



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

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS
PRODUCTORAS DE BLEE AISLADAS EN UROCULTIVOS DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS EN EL
HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO SAN
BARTOLOMÉ - 2018”**

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

ABEL RAMÍREZ CAMPOS

ASESOR :

LIC. TM CÉSAR RAMÍREZ FONTELA

CO-ASESOR :

LIC. TM JAVIER SOTO PASTRANA

Lima – Perú

2019

HOJA DE APROBACIÓN

BACHILLER RAMIREZ CAMPOS ABEL

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE AISLADAS EN UROCULTIVOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS EN EL HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO SAN BARTOLOMÉ - 2018”

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

LIMA – PERÚ

2018

Se dedica este trabajo a:

A todos mis maestros quienes me guiaron a lo largo de mi carrera profesional, influyendo 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.

Agradezco por su contribución para el desarrollo de esta tesis 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.

Al Lic. TM/MG. César Ramírez Fontela por asesorarme durante el desarrollo de esta tesis

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 proyecto, en especial al Lic. TM Javier Soto Pastrana.

Al Lic. TM. Jeel Moya Salazar, a la Dra. María Pons por su mentoría y colaboración en la parte molecular del estudio, respectivamente.

RESUMEN

Objetivos: Determinar la caracterización molecular de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.

Materiales y métodos: Estudio descriptivo corte transversal, prospectivo en 30 urocultivos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé. Se aislaron Enterobacterias productoras de BLEE las cuales se procesaron con el método americano de disco difusión, bajo los puntos de corte de CLSI. La determinación molecular se realizó por PCR convencional. El análisis estadístico fue en IBM SPSS.

Resultados: Las bacterias más frecuentes fueron 24 (80%) de *E. coli*, y *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* ambos con 6.7%. De las *E. coli* 23 (95.8%) presentaron el gen blaCTX, 21 (87.5%) presentaron el gene blaSHV, 20 (83.3 %) presentaron el gen blaTEM, mientras que solo 4(16.7%) presentaron el gen blaOXA. Para *K. pneumoniae* todas las cepas presentaron los tres genes evaluados y solo 1 (50%) cepas presento el gen blaOXA. La cepa de *K. oxytoca* presento el gen blaCTX y blaTEM. Dos cepa evaluadas de *P. mirabilis* presentaron los genes blaCTX, blaTEM, mientras que solo una presentó el gen blaSHV. La única cepa de *S. marcescens* aislada presento sendos genes blaCTX y blaTEM.

Conclusión: Se caracterizó frecuentemente el gen blaCTX, gen blaTEM y el gen blaSHV de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos de un hospital Materno infantil 2018

Palabras clave: Enterobacterias productoras de BLEE, urocultivos, caracterización molecular, genbla.

ABSTRACT

Objectives: To determine the molecular characterization of ESBL-producing enterobacteria isolated in urine cultures of pediatric patients hospitalized at the National Mother Teaching Hospital San Bartolomé - 2018.

Materials and methods: A descriptive, cross-sectional, prospective study in 30 urine cultures in the Teaching Hospital Madre Niño San Bartolomé. Producing-ESBL enterobacteria were isolated and processed with the American diffusion-disc method, under the CLSI cut-off points. The molecular determination was carried out by conventional PCR. The statistical analysis was in IBM SPSS.

Results: The most frequent bacteria were 24 (80%) of *E. coli*, and *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* both with 6.7%. Of the *E. coli* 23 (95.8%) presented the blaCTX gene, 21 (87.5%) presented the blaSHV gene, 20 (83.3%) presented the blaTEM gene, while only 4 (16.7%) presented the blaOXA gene. All strains of *K. pneumoniae* show the three genes and only one (50%) present blaOXA gen. The strain of *K. oxytoca* showed the blaCTX y blaTEM genes. Two strains of *P. mirabilis* presented blaCTX and blaTEM genes, while only one presented the blaSHV gen. The only strain of *S. marcescens* obtainable both blaCTX and blaTEM genes.

Conclusion: The blaCTX, blaTEM and blaSHV gene of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains isolated in pediatric patients from a 2018 Maternal child hospital were frequently characterized.

Key words: ESBL-producing enterobacteria, urocultures, molecular characterization, bla gene.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	01
HOJA DE APROBACIÓN.....	02
DEDICATORIA.....	03
AGRADECIMIENTO.....	04
RESUMEN.....	05
ABSTRACT.....	06
INDICE.....	07
LISTA DE TABLAS.....	08
LISTA DE GRÁFICOS.....	09
INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	
1.1. Planteamiento del Problema.....	12
1.2. Formulación del Problema.....	13
1.2.1. Problema General.....	13
1.2.2. Problemas Específicos.....	13
1.3. Objetivos.....	15
1.3.1. Objetivo General.....	15
1.3.2. Objetivos Específicos.....	15
1.4. Justificación.....	16
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1. Bases Teóricas.....	18
2.2. Antecedentes.....	37
2.2.1. Antecedentes Internacionales.....	37
2.2.2. Antecedentes Nacionales.....	45
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
3.1. Diseño del Estudio.....	49
3.2. Población.....	49
3.2.1. Criterios de Inclusión.....	49
3.2.2. Criterios de Exclusión.....	49
3.3. Muestra.....	50
3.4. Operacionalización de Variables.....	50
3.5. Procedimientos y Técnicas.....	51
3.6. Aspectos Éticos.....	56
3.7. Plan de Análisis de Datos.....	56
CAPÍTULO IV: ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	
4.1. Resultados.....	57
4.2. Discusión.....	66
4.3. Conclusiones.....	70
4.4. Recomendaciones.....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	79
MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	85

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1: Distribución según especie de las enterobacterias aisladas de pacientes pediátricos hospitalizados(n=30) Datos en n %.....	58
Tabla N° 2: Distribución de pacientes pediátricos del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé según sexo durante el periodo de estudio (n=30) Datos en n%.....	60
Tabla N° 3: Distribución de las enterobacterias aisladas de pacientes pediátricos según área de hospitalización (n=30). Datos en %).....	61
Tabla N° 4: Descripción general de las enterobacterias en estudio y su frecuencia de los 4 genes BLEE analizados en el estudio (n=30). Datos en n (%).....	62

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico N° 1: Distribución según especie de las enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados(n=30).....	59
Gráfico N° 2: Distribución de las pacientes pediátricos según sexo durante el periodo de estudio (n=30).....	60
Gráfico N° 3: Distribución de enterobacterias aisladas según área de hospitalización (n=30).....	61
Gráfico N° 4: Lectura interpretada del Antibiograma con presencia de BLEE por el método Americano (CLSI).....	62
Gráfico N° 5: Descripción general de las enterobacterias en estudio y su frecuencia de los 4 genes BLEE analizados en el estudio (n=30).....	64
Gráfico N° 6: Corridas electroforéticas en gel de a.garosa de cepas BLEE analizadas en este estudio.....	65
Gráfico N° 7: Corridas electroforéticas en gel de agarosa de cepas BLEE analizadas en este estudio.....	66

INTRODUCCIÓN

Las infecciones en pacientes pediátricos representan un reto para los sistemas de salud debido a su alto riesgo de mortalidad, limitaciones terapéuticas y posibilidades de complicaciones clínicas. Estas infecciones resultan todavía más críticas cuando presentan resistencia antimicrobiana a los medicamentos de elección para estos pacientes. Estas infecciones suelen ser nosocomiales y facilitan su desarrollo cuando los pacientes pediátricos están inmunocomprometidos, largamente hospitalizados y presentan enfermedades debilitantes o comorbilidades.

La resistencia antibiótica es uno de los actuales y principales problemas de Salud Pública que afectan a los sistemas sanitarios del mundo entero. La resistencia a las principales drogas semisintética como los betalactámicos y las cefalosporinas de varias generaciones cambió el curso de la medicina moderna y la microbiología. Esta resistencia adquirida contra estos antibióticos se desarrolló rápidamente con la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de varios tipos (CTX-M, TEM, SHV y OXA) diseminadas principalmente por clones nosocomiales. Su propagación está cambiando los patrones epidemiológicos de las BLEE en el mundo entero principalmente por la alta frecuencia de las enzimas CTX-M en aislados de Enterobacterias.

La importancia de conocer los componentes moleculares de estas bacterias causantes de alta resistencia a múltiples fármacos en cepas aisladas en pacientes pediátricos hospitalizados con infección hospitalaria

pone un paso adelante en la lucha contra la resistencia bacteriana y por ende en la recuperación del paciente; Además que dicha resistencia es una amenaza para la salud del neonato y/o pediátrico ya que representa altos riesgos de mortalidad y diseminación de las cepas resistentes dentro del nosocomio.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema:

La Organización Mundial de la Salud se encuentra en alerta mundial debido al creciente número de bacterias resistentes a antibióticos, a tal punto de considerar que para el 2050 habrá más muertes por estas infecciones resistentes a drogas que por cáncer (1).

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo entero, y una de las principales y usuales causas de resistencia es la producción de enzimas β -lactamasas que impide la actividad antimicrobiana de los antimicrobianos β -lactámicos, que son los optados para el tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro.

Así, desde la década del 40's se han identificado especies bacterianas productoras de β -lactamasas, principalmente en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, donde solo bastaron 40 años para generar resistencia a penicilina, ampicilina, cefalosporinas y carbapenems (2-4). Esta resistencia se ha visto incrementada en enterobacterias debido fundamentalmente a que estas sintetizan betalactamasas de espectro extendido (BLEE) codificadas en plásmidos que tienen un amplio espectro de actividad y transmisión (5). Además, de que este grupo bacteriano es la principal causa de infección de tracto urinario.

Si bien la infección nosocomial por cepas productoras de BLEE ha sido demostrada en estudios previos (6-8), éstas no han sido detectadas considerando su importancia en pacientes hospitalizados pediátricos.

La particularidad de este grupo poblacional recae en su carácter de vulnerabilidad y propensión a infecciones y otras patologías. En ese sentido, consideramos de mucha importancia a este grupo pediátrico con posibles infecciones con cepas productoras de BLEE ya que estos factores dificultan el tratamiento de las enfermedades infecciosas y deterioran la calidad de vida del individuo (9).

1.2. Formulación del Problema:

1.2.1. Problema General:

¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018?

1.2.2. Problemas Específicos:

- ¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaTEM?

- ¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaSVH?
- ¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaCTX?
- ¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaOXA?
- ¿Cuáles serán las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según especie?
- ¿Cuáles serán las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según sexo?

- ¿Cuáles serán las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según área de hospitalización?

1.3. Objetivos:

1.3.1. Objetivo General:

Determinar la caracterización molecular de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la frecuencia del gen blaTEM implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.
- Determinar la frecuencia del gen blaSHV implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.
- Determinar la frecuencia del gen blaCTX implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en

urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.

- Determinar la frecuencia del gen blaOXA implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.
- Determinar las enterobacterias productoras BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé– 2018, según especie.
- Determinar las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé- 2018, según sexo.
- Determinar las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según el área de hospitalización.

1.4. Justificación:

Debido que las enterobacterias productoras de BLEE son muy frecuentemente aisladas en los Centro de Salud de nuestra comunidad, es importante conocer sus componentes moleculares y la expresión de sus genes en los diferentes estratos donde estas bacterias son aisladas. Ahora bien, la población pediátrica representa una de las poblaciones

más vulnerables por sus características inmunológicas, nutricionales y fisiológicas, por ende son grupos de pacientes donde deben de realizar actividades concretas y organizadas con la finalidad de evitar infecciones, y sobre todo, infecciones con algún tipo de resistencia.

Las infecciones nosocomiales en pediatría son un reto para los centros sanitarios en todo el mundo ya que estos aislamientos son rápidamente contagiosos y usualmente presentan patrones de resistencia a drogas.

El interés del presente proyecto de investigación recae no solo en la identificación de aislamientos bacterianos nosocomiales, si no en la caracterización de sus patrones de resistencia a drogas a través de un estudio molecular. Esto nos permitirá conocer los “brotes” o aislamientos desarrollados en los nosocomios con la finalidad de establecer a futuro una relación epidemiológica de las cepas resistentes involucradas y fomentar acciones de prevención, manejo, diagnóstico y control de estas infecciones nosocomiales en pediatría. Asimismo contribuye a que el clínico opte por un tratamiento empírico apropiado y de la mejor manera posible, ya que los resultados de los urocultivos demoran de entre 2 y 3 días.

Otro aspecto importante que recae en el estudio radica en desarrollar una investigación concienzuda de los cuatro principales genes de resistencia a Betalactámicos, que desde el punto biológico- epidemiológico constituyen herramientas importantes para el entendimiento de la dinámica de contaminación por cepas productoras de BLEE nosocomiales.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Bases Teóricas:

Generalidades

El primer antibiótico, la penicilina, fue descubierto en 1928 por Alexander Fleming (1881-1955). Fue solo 10 años después que Ernest Chain (1906-1979) entendió el alcance del descubrimiento de Fleming y desde 1938 comenzó a trabajar en la penicilina con lo que se llamó el "Grupo de Oxford" que incluía al químico Chain, el fisiólogo Florey y dos bioquímicos y bacteriólogos Edward Abraham y Norman Heatley (10).

Los antibióticos son sustancias naturales, sintéticas, o una mezcla de ambas que inhiben, disminuyen o destruyen a los microorganismos que infectan a los seres vivos. Se agrupan conforme la función de su mecanismo de acción (destrucción de pared celular, alteración de bombas de flujo de membrana, daño a las subunidades ribosomales, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, etc.) y conforme su actividad frente a microorganismos infecciosos (11).

La clasificación según su estructura química permite diferenciar varios grupos de antimicrobianos como las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, sulfamidas, principalmente. Estos medicamentos conforme su acción puede ser denominada de amplio-espectro si afectan a las bacterias Gram positivas y negativas y de reducido espectro si solo actúa a una de ellas (12).

Un antibiótico de amplio espectro encuentra una utilidad terapéutica más extensa que uno de corto espectro, el cual sólo actúa sobre un único grupo de microorganismos.

Betalactámicos

El efecto bactericida de los antibióticos betalactámicos implica la inhibición de la síntesis de la pared celular, y este efecto ocurre a través de la unión covalente a la proteína de unión a la penicilina (PBP por sus siglas en inglés), que es una enzima peptidoglicano transpeptidasa que cataliza los pasos finales en la formación de la pared bacteriana. Hasta la fecha se han identificado varios PBP, y son exclusivos de las bacterias. Además, el espectro y los efectos de las diferentes betalactamasas están determinados por los PBP a los que estos antibióticos se unen (13). Son compuestos de acción bactericida lenta que presentan escasa toxicidad para el ser humano y poseen un amplio espectro terapéutico (14).

a) Penicilinas

Fueron los primeros antibióticos de origen biológico usados como alternativa terapéutica. El primer tratamiento clínico exitoso con penicilina se logró en 1930 por George C. Paine en la Enfermería Real de Sheffield, cuando utilizó gotas de la solución de Fleming para tratar la conjuntivitis en recién nacidos. Aunque George C. Paine no publicó sus resultados pero muchos años, esto dio campo y mostró una opción para las compañías farmacéuticas americanas comenzaron a producir penicilina G, en competencia con la Penicilina F producida en el Reino Unido, y con la Penicilina V descubierta en Austria (11,15). Toda la penicilina son

bactericidas debido a su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, conforme describimos antes.

La Penicilina G es el antibiótico de primera elección en las infecciones causadas por estreptococos y en la sífilis (16). Sus principales representantes son dicloxacilina y oxacilina. Le sigue a esta penicilina, los aminopenicilinas, como la ampicilina y amoxicilina. Tanto la ampicilina como la amoxicilina (ambas α -aminopenicilinas), son dos penicilinas derivadas, tienen mayor estabilidad ácida y un mejor efecto sobre las bacterias Gram negativo productoras de penicilinasa natural, y al asociarse con inhibidores de betalactamasa (sulbactam y/o ácido clavulánico) también son efectivas contra *Haemophilus influenzae*.

Beecham desarrollo estas aminopenicilinas, y también preparó metilicina en 1959 y nafcilina en 1960, dos derivados de penicilina adicionales que eran mucho más estables contra las betalactamasas, y estos fueron seguidos pronto por los compuestos flucloxacilina y dicloxacilina, que mostró una estabilidad ácida aún mayor.

Conforme se dieron nuevos desarrollo de drogas en esos años, en 1945, Brotzu y colaboradores aislaron el hongo *Cephalosporium acremonium* del agua de mar cerca de una salida de aguas residuales mientras se estudia un brote de fiebre tifoidea en Italia. Pese a que su grupo continuo trabajando en la extracción y producción de la sustancia activa, fue Abrahams en el laboratorio de Florey en Oxford, que analizo *C. acremonium* y evidencio que la cadena lateral en la molécula de β -lactama incluye en un efecto antibacterial. Luego de este hito, fue posible extraer penicilina N del hongo, y tuvo un efecto sobre los aislamientos

Gram negativo más fuerte que la penicilina. Entre los productos de degradación de penicilina N, Abraham y colaboradores encontraron cefalosporina C, que resultó ser más estable que las penicilinas contra las betalactamasas bacterianas (17). Este descubrimiento finalmente condujo a la producción semisintética de cuatro generaciones de cefalosporinas.

b) Cefalosporinas

Son antibióticos similares a las penicilinas que poseen modificaciones químicas del anillo 7-amino-cefalosporánico, estas modificaciones de penicilina fueron sintetizados por primera vez a partir de *Cephalosporium* como se ha descrito líneas arriba. Su clasificación convencional se muestra en el anexo 1.

Las primeras cefalosporinas semisintética (cefaloridina y cefalotina) se introdujeron a mediados de la década de 1960 y mostraron una acción algo limitada contra bacterias Gram negativas, pero contrariamente buena actividad contra *Staphylococcus aureus* productor de penicilinas (18). Comparado con las penicilinas, resultó más fácil modular las cefalosporinas en la búsqueda de alterar su actividad antimicrobiana, especialmente para mejorar su efecto sobre las bacterias Gram negativas, y por lo tanto, muchos de estos agentes han aparecido en el mercado desde la introducción de la primera cefalosporina (11, 12, 19).

El sistema utilizado para producir cefalosporinas se basa en las diferencias en la actividad microbiana. Por lo tanto, cuando se inició la síntesis de la segunda generación de cefalosporinas a principios de la

década de 1970, se realizaron esfuerzos para expandir la cobertura e incluir un impacto en bacterias gram negativas además del efecto sobre las gram positivas. La cefuroxima se introdujo en 1984, y tenía una capacidad mejorada para penetrar la barrera sanguínea y cerebral, lo que significa que podría usarse en lugar de la tradicional bencil-penicilina o ampicilina como tratamiento inicial en casos de meningitis (20).

La tercera generación de cefalosporinas (también conocidas como oximino-beta-lactamas) incluyó compuestos tales como cefotaxima (descubierta en 1979), ceftazidima (descubierta en 1980) y ceftriaxona (descubierta en 1981), que ofrecía una cobertura extendida contra las bacterias gram negativas e incluso una mejor estabilidad que las betalactamasas (Figura 1). En parte, estas cefalosporinas se desarrollaron debido al descubrimiento de betalactamasas de espectro-estrecho y algunas de ellas también tenían una buena biodisponibilidad oral, que podría usarse por administración oral para el tratamiento de la pielonefritis.

El efecto sobre las bacterias gram negativas se extendió aún más en la cuarta generación de cefalosporinas (21). Posteriormente, se obtuvo un mejor efecto Gram-positivo en la quinta generación, y esto incluso se aplicó a *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM o MRSA) y, por lo tanto, estos agentes también se denominan cefalosporinas SARM-activas (20).

C. Monobactámicos y carbapenémicos

A finales de la década de 1960, Beecham y Merck utilizaron *Streptomyces* para desarrollar los carbapenémicos, que se encontraron altamente resistentes a la hidrólisis enzimática. En total, se han encontrado más de 50 carbapenémicos, pero muchos de ellos son demasiado inestables para usarse en el tratamiento de infecciones. (20). El primer carbapenémico en el mercado fue imipenem, que se descubrió en el año de 1979 e introducido en el mercado a mediados de 1984, y se tuvo que combinar con cilastatina para protegerlo contra la deshidropeptidasa renal.

La segunda generación de carbapenémicos incluidos meropenem (descubierto el año 1996), ertapenem (descubierto el año 2001) y doripenem (descubierto el año 2007), son resistentes a la deshidropeptidasa renal. Por otra parte, meropenem que puede penetrar en la sangre y atravesar la barrera hematoencefálica, tiene un mejor efecto sobre las bacterias gram negativas, pero se considera menos eficaz contra bacterias gram-positivas tales como *Enterococos*.

Los carbapenémicos son betalactámicos sintéticos con actividad preponderante contra bacterias Gram negativas resistentes a las penicilinas y cefalosporinas (22). Los carbapenémicos también son los únicos antibióticos que tienen algún grado de efecto post-antibiótico en infecciones con bacterias Gram negativas (20,23).

Los primeros antibióticos betalactámicos producidos por bacterias monocíclicas se describieron en 1979 y más tarde se llamaron

monobactams (por ejemplo, aztreonam). Aztreonam es el principal representante de los monobactámicos e imipenem, meropenem y ertapenem constituyen el grupo de los carbapenémicos. La producción de resistencia bacteria, por ejemplo la producción de BLEE por parte de ciertas enterobacterias les confiere resistencia al aztreonam, pero sensibilidad al imipenem (24). Los monobactámicos tienen un buen efecto Gram negativo pero ningún efecto útil sobre las bacterias Gram positivas (20).

En 1977, varios grupos científicos identificaron la betalactamasa inhibidores del ácido clavulánico en *Streptomyces*, y este compuesto, compuesto que actualmente se usa en combinación con amoxicilina. Otros agentes en este grupo incluyen sulbactam, que tiene buena actividad contra betalactamasas de clase A, y tazobactam, que es activo contra algunas betalactamasas de clase C. Así, tazobactam está disponible en combinación con piperacilina, que lo hace útil como un antibiótico de amplio espectro con buenos efectos sobre bacterias gram negativas y gram-positivas (12, 20, 25).

Betalactamasas

Las betalactamasas son el nombre colectivo de las enzimas que abren el anillo betalactámico mediante la adición de una molécula de agua al enlace betalactama común, y esto inactiva el antibiótico betalactámico desde las penicilina a los carbapenémicos. Esta hidrolización fue observada por primera vez en 1940 por Abraham y Chain (penicilinasas) en una cepa de *E. coli* (26). No obstante, el efecto clínico de dicha

hidrolización no se observó hasta principios de la década de 1950, cuando aparecieron los primeros aislamientos de *S. aureus* resistentes a betalactámicos en los hospitales (27). Las betalactamasas en *S. aureus* se encuentran en los cromosomas y son a menudo inducibles, mientras que la primera betalactamasa mediada por plásmidos se detectó en bacterias gram negativas en Grecia en la década de 1960 (28). Se denominó TEM por el nombre del paciente donde se encontró por primera vez, así TEM-1 es la betalactamasa más común en bacterias Gram-negativas, y puede hidrolizar las penicilinas (como la ampicilina).

Las betalactamasas también se propagaron rápidamente a otras bacterias, y pronto, después de cambios en solo uno o algunos aminoácidos, estas enzimas pudieron hidrolizar cefalosporinas de espectro-estrecho y se encontraron en Enterobacterias, *Neisseria gonorrhoeae* y *H. influenzae* (29). En comparación con los TEM, las betalactamasas sulfhidriladas (SHV) son similares en la estructura bioquímica pero son más común en *Klebsiella spp.* Las cefalosporinas de tercera generación fueron estables frente a la hidrólisis por los TEM y SHV originales. Tanto las betalactamasas de tipo TEM como SHV son enzimas primigenias que confieren resistencia a la ampicilina. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) derivadas como mutantes de ellas, típicamente codifican mutaciones puntuales que resultan en cambios de 1 a 4 aminoácidos. Estas substituciones inducen alteraciones en el sitio activo de la enzima, que reducen la actividad de un grupo amplio de antibióticos que incluyen cefalosporinas de espectro extendido.

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

En 1983, Knothe encontró una única mutación de nucleótido en un SHV que representaba la primera betalactamasa codificada por plásmido que podía hidrolizar el espectro extendido de las cefalosporinas en un aislado de *K. ozaenae*, y a ese tipo se denominó SHV-2 (30).

Los brotes de *Klebsiella spp* principalmente con TEM mutado y los derivados de la enzima SHV se informaron en los hospitales franceses a finales de la década de 1980, y, para distinguir estas enzimas de las betalactamasas de amplio espectro (principalmente TEM-1, TEM-2 y SHV-1), el término de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) fue acuñado por Philippon en 1989 (31). Las BLEE se definen como betalactamasas que tienen las siguientes características:

- a) Son transferibles.
- b) Pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam.
- c) Pueden ser bloqueado in vitro por inhibidores de betalactamasa como el ácido clavulánico (32).

Las betalactamasas generalmente se clasifican de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros o la clasificación estructural de Ambler (33-35). Ambler en 1980, quien propuso la primera clasificación basada en la estructura molecular: La Clase A, Penicilinasas que poseen un residuo de serina en el centro activo; y la Clase B, Carbapenemasas, metalo-beta-lactamasas que requieren zinc como cofactor. Jaurin y Grundström en 1981 completaron esta clasificación

añadiendo la Clase C; Cefalosporinasa con una serina en su centro activo. A finales de los años 80 se segrega la Clase D, enzimas que hidrolizan oxacilina, de otras β -lactamasas tipo serina (35).

Desde el año 1995, Bush, Jacob y Medeiros propusieron una clasificación funcional para las betalactamasas que se basa en el peso molecular de la enzima, su punto isoeléctrico (pI), el perfil del sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o EDTA (10,36). En base a este esquema surgieron cuatro grupos funcionales que se correlacionan bien con la clasificación de Ambler, denominándose como se refiere en el anexo 2 (37)

Producción de enzimas betalactámicas

Como sabemos estas enzimas están codificadas por genes y estos pueden encontrarse en el cromosoma de la bacteria o en los segmentos de DNA extra cromosómico, denominados plásmidos y estos son los responsables de la diseminación de la mayoría de las betalactamasas. Las principales betalactamasas responsables de la resistencia en los bacilos Gram negativos son las del tipo AmpC y las betalactamasas plasmídicas de amplia espectro (BLEA) y de espectro extendido (BLEE) (33,38).

Betalactamasas de espectro ampliado (BLEA)

A las primeras β -lactamasas aisladas se les denominó β -lactamasas de amplio espectro que ofrecían resistencia a la ampicilina y amoxicilina pero no a las cefalosporinas de tercera generación. Dentro de este grupo están

incluidas TEM-1, TEM-2, SHV-1, éstas pertenecen a la clase molecular A y son inhibidas por el ácido clavulánico y también está incluida la tipo OXA. Ninguna de estas betalactamasas hidroliza cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas, monobactams o carbapenemas (36,38).

Betalactamasas tipo TEM resistentes a los inhibidores (IRT)

Estas enzimas derivan de las betalactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a amino-carboxi y ureidopenicilinas, no les afecta los inhibidores de betalactamasa y tampoco tienen actividad sobre el resto de betalactámicos; se les denominó IRT porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2, aunque también se han descrito derivadas de SHV-1(30,39).

Betalactamasas tipo AmpC

Pertenece a la clase molecular C, Las cepas que producen betalactamasas plasmídicas de espectro extendido tradicionales no confieren resistencia a las cefamicinas; sin embargo en los últimos años se han descrito betalactamasas plasmídicas que confieren resistencia no solo a cefalosporinas de tercera generación sino también a cefamicinas y se les conoce como cefamicinasas plasmídicas. Hasta la fecha se han descrito numerosas betalactamasas plasmídicas AmpC (30,40).

Betalactamasas tipo Carbapenemasas

Esta resistencia es poco frecuente, estas enzimas son activas frente a las oximino-cefalosporinas, cefamicinas y carbapenems. La resistencia a los

carbapenems puede deberse a alteraciones en la permeabilidad, expulsión, inactivación por betalactamasas o a modificaciones de las dianas PBP (31,41).

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Son enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro que contienen una cadena lateral de oximino, entre las cuales están incluidas la ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y también aztreonam. No actúan sobre cefamicinas ni carbapenems, son inhibidas por el ácido clavulámico, el sulbactam o tazobactam.

Las BLEE, se clasifican dentro de ese gran grupo 2b, constituyendo el subgrupo 2be (clase molecular A), aunque algunas de ellas también se clasifican en grupos distintos al 2be; por ejemplo ciertas oxacilinasas del grupo 2d, clase molecular D. Sin embargo hasta la fecha la mayoría de los BLEE se pueden dividir en tres grupos, que se designan las enzimas TEM (Aproximadamente 200 variantes), SHV (más de 140 variantes) y CTX- M (aproximadamente 130 variantes) (42,43).

Dentro de las BLEE destacan los principales grupos:

BLEE tipo TEM

Las BLEE tipo TEM son derivadas de las betalactamasas de amplio espectro TEM-1 y TEM-2, por modificación en la secuencia de aminoácidos lo que provoca cambios en la estabilidad de la enzima y en el perfil hidrolítico. De las betalactamasas tipo TEM la gran mayoría es BLEE (44,45).

BLEE tipo SHV

Las betalactamasas SHV aparecen principalmente en el género *Klebsiella* aunque también pueden encontrarse en otras enterobacterias. Las betalactamasas del tipo SHV son similares a las TEM en cuanto a su estructura y función. Las BLEE tipo SHV derivan de la betalactamasa SHV-1, esto ocurre por medio de sustituciones de aminoácidos en el centro activo de la enzima y agranda el centro activo de la enzima permitiendo de esta manera el acoplamiento de la larga cadena lateral R de las cefalosporinas lo que provoca el aumento del espectro de acción (44,46).

BLEE tipo OXA

Estas betalactamasas pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d y se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a cloxacilina y oxacilina, son resistentes a ampicilina, cefalotina y son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico. Sin embargo la mayoría de estas betalactamasas no hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro y algunas son consideradas dentro del grupo de las BLEE, no obstante, OXA-10 hidroliza débilmente cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam provocando una reducción de la sensibilidad de muchos microorganismos a estos antibióticos (44,47).

BLEE tipo CTX-M

Los miembros del grupo CTX-M ahora son los BLEE más comunes en todo el mundo. El primer CTX-M fue descrito en Japón en 1986 por

Matsumoto y colaboradores (48), quienes encontraron esta enzima en un perro de laboratorio utilizado para estudios farmacocinéticos de antibióticos betalactámicos. En Alemania en 1989, Bauernfeind y colaboradores obtuvieron un aislado de *E. coli* que era resistente a la cefotaxima y produjo una enzima que no era TEM y no SHV, a la que denominaron CTX-M-1 debido a su actividad elevada contra la cefotaxima (49). Las enzimas CTX-M son betalactamasas naturales que son producidas por *Kluyvera spp.*, y se encuentran en los cromosomas de esas bacterias y también se han transferido a un plásmido que porta estas enzimas. Las enzimas CTX-M se pueden clasificar en cinco grupos principales, que se denominan CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, y CTX-M-25, Cada uno de estos incluye varias enzimas mediadas por plásmidos (50).

Un nuevo esquema de clasificación con mejor disponibilidad clínica fue propuesto recientemente y solo constituye tres categorías aunque no se ha establecido internacionalmente (51,52):

- a) A **BLEE_S**: Incluye un grupo grande y mixto de BLEE (mediados por transferencia de plasmidos - AmpC y OXA-BLEE).
- b) **BLEE_A**: Incluyen las betalactamasas clásicamente clasificadas como clase A (y clase 2be)
- c) **BLEE_{CARBA}**: BLEE con actividad hidrolítica contra carbapenémicos.

Otros BLEE que se han descrito son PER-1 y -2, VEB-1 y -2, TLA-1, BES-1 y SFO-1, entre otros (53).

Detección de BLEE

Para detectar BLEE en los laboratorios de análisis clínicos y de investigación se utilizan diversos métodos fenotípicos y genotípicos, y criterios que permiten caracterizarlos completamente con diferente grado de eficiencia y certeza.

Podemos mencionar los siguientes métodos de determinación fenotípica de BLEE: la prueba E-test (que contiene un gradiente predefinido y estable de concentraciones de antibióticos en una tira plástico que se deposita sobre los cultivos a analizar), los sistemas automáticos como Vitek® y Phoenix®. Y las pruebas de difusión en disco y las de CIM con diferentes modificaciones (36), (54-57).

El Clinical and Laboratory Standard Insitute (CLSI) de Estado Unidos (USA) recomienda hacer un cribado de la posible producción de BLEE en, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca*, y *Proteus mirabilis*, bajo sus propias recomendaciones y lineamientos para la identificación de BLEE en estos agentes (58,59).

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

El éxito o fracaso de la terapia antimicrobiana en las infecciones bacterianas se predice mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, en la que los microorganismos se dividen en categorías tratables o no tratables en función de los puntos de corte de la CIM. Hoy en día, los puntos de corte también son utilizados para facilitar la importante tarea de descubrir y controlar la resistencia fenotípica (60). Por

lo tanto, los puntos de corte son útiles tanto para guiar la terapia como para vigilar la resistencia emergente. Las dosis, las indicaciones clínicas, la farmacocinética, los mecanismos de resistencia, la distribución de la CIM, las distribuciones del diámetro de la zona y, más recientemente, la farmacodinamia y los valores de corte epidemiológico se utilizan en el proceso de establecimiento del punto de corte. Cuando cualquiera de estos datos de fondo cambia, los puntos críticos antimicrobianos pueden requerir una revisión. La concentración mínima inhibitoria (MIC o CIM) es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo posterior a su incubación de 24 horas.

El punto de corte Sensibilidad (S) / (I) Intermedio normalmente se basa en la dosis estándar y el punto de corte intermedio (I) / R (resistente) en la dosis máxima (55), (60,61). Los puntos de corte MIC están armonizados en Europa por el Comité Europeo de Prueba de susceptibilidad antimicrobiana (EUCAST) (60), en América por la CLSI (62) y en Reino Unido por British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) (63). Aunque el EUCAST unifica los puntos de corte para la mayoría de los países europeos.

Mediante la base de datos de distribución MIC por cualquiera de estas instituciones, están disponibles las distribuciones de MICs totales de agentes antimicrobianos para especies individuales, tanto para organismos de tipo salvaje como no salvajes. El MIC es una medida fundamental que forma la base para la mayoría de los métodos de prueba de susceptibilidad y contra los cuales los niveles de droga alcanzables en

el cuerpo y los fluidos se pueden comparar para determinar puntos de corte para definir la susceptibilidad. Según EUCAST y CLSI un microorganismo se define como susceptible si tiene un nivel de actividad antimicrobiana asociada con una alta probabilidad de éxito terapéutico. Así, un microorganismo se clasifica como susceptible mediante la aplicación del punto de corte apropiado dentro de un sistema fenotípico definido. Por el contrario, la resistencia se define como una alta probabilidad de falla terapéutica. En la categoría intermedia, la actividad antimicrobiana está asociada con un efecto terapéutico incierto (60, 62,63).

La determinación de MIC se puede realizar con diferentes métodos. La difusión de disco es una de los métodos más antiguos para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana y sigue siendo uno de los métodos ampliamente utilizados en laboratorios clínicos de rutina. Este análisis de susceptibilidad tiene como objetivo evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciéndose como factor predictivo de la eficacia clínica (64). Se fundamenta en el hecho de conocer la MIC de un antimicrobiano necesaria para inhibir el desarrollo del microorganismo (55, 59,65). Un disco que contiene una cantidad definida de antibiótico se aplica a una superficie de agar y luego se incuba a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas. El crecimiento de microorganismos se inhibe por la presencia del antimicrobiano. El diámetro de la zona de inhibición se mide y esto se correlaciona con la MIC del aislado.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana es usada comúnmente para la identificación de resistencia a drogas, y posteriormente para la identificación cuantitativa de BLEE. Basado en esto podemos mencionar los siguientes métodos fenotípicos para la identificación de BLEE:

a) Sistemas automatizados: Los sistemas automatizados se fundamentan en la 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 MIC (11,36).

b) E-test: Como ya mencionamos: Este método utiliza tiras de material no poroso, que contienen el antimicrobiano en estudio y el mismo agente combinado con ácido clavulánico, en un gradiente de concentración que permite determinar el MIC (11,37).

c) Método de tamizaje según CLSI: Se utiliza el método de disco difusión mediante la técnica de Kirby-Baüer, donde se emplean discos de susceptibilidad antimicrobiana aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, que indican sospechosos de BLEE cuando los halos de inhibición iguales o inferiores a los diámetros referidos para cada antibiótico (66,67).

d) Método americano confirmatorio de BLEE: se utiliza sobre agar Mueller Hinton las cepas sospechosas, con los discos de ceftazidima, cefotaxima, y ceftazidima y cefotaxima con ácido clavulánico. Una diferencia ≥ 5 mm en los halos de inhibición entre cualquiera de los discos solos frente a los combinados indica una positividad (68-70).

e) Método de Jarlier confirmatorio de BLEE: Utiliza sobre agar Mueller Hinton las cepas sospechosas con discos de amoxicilina-ácido clavulánico en el centro de una placa, y rodeado a 25 mm de distancia con discos de ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y adicionalmente aztreonam y/o amoxicilina. El efecto sinérgico del inhibidor y los discos en forma de cola de pez o balón de futbol americano es característico de la presencia de BLEE (71).

f) Determinación de BLEE con el método Hodge: Se emplea agar preparado con lo antibiótico a analizar, y se suspende inicialmente y luego se inocula sobre el agar la cepa de *E. coli* ATCC 25922. Sobre la superficie se realiza una estría de 2 cm de la cepa a investigar, desde el centro hacia afuera del disco. La presencia de la enzima se evidencia por la deformación del halo de inhibición de la cepa de *E.coli* al disco con el sustrato en forma de hendidura (72).

g) Determinación tridimensional de BLEE: En este bioensayo se basa en la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia presente en microorganismos con capacidad hidrolizable de antibióticos. Se inocula una suspensión de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 sobre agar Mueller Hinton. Se colocan el antibiótico en mención al centro de la placa y se realizan surcos hasta de 2 cm de distancia que concluyen hacia el borde donde se realiza un orificio de 2 mm en la cual se inocula 20 µL de la cepa problema. Una hendidura en el halo de inhibición en forma de V permite la identificación de la enzima correspondiente con el disco empleado como sustrato (73,74).

h) Método de pre-difusión para la determinación de BLEE: Basado en el método de predifusión para la identificación de cepas de *Acinetobacter* resistentes a colistina desarrollado en Argentina (75), en este método previo al inóculo, se colocan dos discos de Amoxicilina sobre la placa con agar Mueller Hinton. Se deja dos horas a temperatura ambiente y posteriormente se retiran los discos. Luego se inócula la cepa y se colocaron dos discos de cefotaxima y ceftazidima cada uno de ellos encima de donde había estado uno de los discos de Amoxicilina previamente. De igual manera con los dos discos de cefotaxima y ceftazidima en forma paralela hacia el otro extremo. Se considera un resultado positivo la diferencia ≥ 5 mm entre el halo de inhibición de la cefotaxima más inhibitor (amoxicilina) respecto del halo de cefotaxima sola. Igual para ceftazidima (76).

2.2. Antecedentes:

2.2.1. Antecedentes Internacionales:

En los años 2007-2008, Guillen et al en Paraguay identificaron los genes blaCTX-M2, blaPER-2, blaSHV y blaTEM, en aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE, aisladas a partir de materiales biológicos de pacientes, ambulatorios u hospitalizados, que concurrieron al Instituto de Previsión Social (IPS) y al Hospital

de Clínicas (HCL). Hospitales de referencia de Asunción. La detección molecular de los genes se realizó por PCR empleando oligonucleótidos específicos. De los 232 aislados BLEE analizados, el 83% (n=192) portó al menos un gen bla, en el 17% (n=40) restante no fue detectado ninguno de los genes incluido en el estudio. Se observaron las siguientes frecuencias: 49% (94/192) blaCTX-M2, 45% (86/192) blaSHV, 40% (77/192) blaTEM y 7% (13/192) blaPER-2. En el 47% (90/192) se detectó más de un gen, siendo la combinación blaCTXM2+blaTEM+blaSHV, la más frecuente observada en 32 aislados. El blaCTX-M2 como el gen más frecuente en este estudio (77).

En los años 2008-2009, Ferzabadi et al en Irán, se detectaron y determinaron los genes que codifican cepas productoras de BLEE, incluidos los grupos bla (TEM), bla (SHV) y bla (CTX-M), entre 89 aislamientos de *K. pneumoniae* en el Hospital de Labbafinejad, mediante PCR y caracterizarlos por secuenciación directa de productos de PCR. Se identificaron las *K. pneumoniae* con pruebas bioquímicas. La susceptibilidad de los aislamientos a 17 agentes antimicrobianos diferentes se determinó usando el método de difusión en disco de agar. Se utilizó como prueba confirmatoria fenotípica para seleccionar los aislados productores de BLEE según CLSI.

Para amplificar el bla (SHV), el ADN molde se extrajo por el método de ebullición. El ADN del plásmido se extrajo utilizando un kit de mini preparación y se usó como plantilla en la PCR para la detección de bla (TEM) y bla (CTX-M). Los productos de PCR seleccionados se secuenciaron y analizaron.

Todas las cepas fueron susceptibles a imipenem. Las tasas de resistencia a diferentes antibióticos fueron en el siguiente orden: aztronam (79.7%), cefexime (67.4%), cefpodoxima (66.2%), cefotaxima (65.1%), ceftazidima (61.7%). La prueba confirmatoria fenotípica detectó 62 aislamientos (69,7%) como *K. pneumoniae* productora de BLEE. La prevalencia de genes que codifican BLEE fue la siguiente: bla (TEM) 54% (n = 48), bla (SHV) 67,4% (n = 60), bla (CTX-M-I) 46,51% (n = 40) y bla (CTX-M-III) 29% (n = 25). Los genes bla (CTX-M-II) y bla (CTX-M-IV) no se detectaron. Todos los tipos bla (TEM) se caracterizaron como bla (TEM-1) y todos los bla (CTX-M-I) se identificaron como bla (CTX-M-15). Los tipos de SHV se caracterizaron como SHV-5, SHV-11 y SHV-12. Los autores concluyen que la tasa de BLEE en el Hospital Labbafinejad fue un 25% mayor en un estudio de 4 años que finalizó en marzo de 2009. Al parecer el gene bla (TEM-1), bla (SHV-5), bla (SHV-11), bla (SHV -12), y bla (CTX-M-15) son los BLEE dominantes entre las cepas resistentes de *K. pneumoniae* en Irán (78).

En el año 2009, Gonzales et al en Venezuela, realizaron un estudio con el propósito de Determinar las características microbiológicas y moleculares asociadas a las infecciones causadas por *K. pneumoniae*. El estudio se llevó a cabo en cepas aisladas de pacientes hospitalizados en las unidades clínicas: Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) y en la unidad de cuidados intensivos para adultos (UCIA), durante el período comprendido entre junio y noviembre. Se caracterizaron 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos con infección nosocomial hospitalizados en la UARN, así como 11 cepas aisladas de pacientes hospitalizados en la UCla, durante el período de estudio. Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los neonatos mostraron un alto porcentaje de resistencia a ampicilina (100%), ampicilina/sulbactam (100%), amoxicilina/ác. clavulánico (100%) seguido de amikacina (94%), ceftazidima (94%), cefotaxima (94%), aztreonam (94%), gentamicina (82%) y una sensibilidad de 100% a imipenem, 94% a cefoxitina, 88% a ciprofloxacina y 58,8% a piperacilina/tazobactam. En las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los pacientes hospitalizados en la UCla, se observó similares porcentaje de resistencia a los β -lactámicos y su combinación con inhibidores que en las cepas aisladas de la UARN. De las 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los neonatos, en 7 (41,2%) cepas se detectaron los tres genes bla (TEM, SHV y CTX-M) investigados; sin embargo, las siete eran del fenotipo BLEE (-). Los valores de CIM de ceftazidima ante estas cepas fueron de 64 μ g/ml. El resto

de las cepas sólo poseían los genes bla (TEM y SHV); no obstante, sólo tres (3/17; 17,6%) eran del fenotipo BLEE (+). Todas las 17 cepas fueron genótipicamente diferentes mediante REP-PCR. De las cepas aisladas en la UCla, 9 (82%) poseían los tres genes bla (TEM, SHV y CTX-M) investigados y, a diferencia de las cepas aisladas de la UARN, las 9 eran del fenotipo BLEE (+). El resto de las cepas (n: 2) sólo poseían los genes de TEM y SHV y una de ellas era del fenotipo BLEE (-). En suma, 10/11 (91%) de las cepas estudiadas en la UCla eran BLEE (+) (8).

En el año 2010-2011, Gorgge et al en Turquía. Determinó la prevalencia de los genes de beta-lactamasa, las susceptibilidades a los antibióticos y las relaciones clonales de los aislados de *E. coli* productores de BLEE en el Hospital público de Malatya, de las 76 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas, de orina (n = 26), sangre (n = 25) y herida (n = 25). Las muestras incluidas fueron de pacientes hospitalizados identificados como agentes de infección nosocomial según los criterios de los CDC. La susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos se detectó mediante el método de difusión del disco Kirby-Bauer de acuerdo con las recomendaciones de CLSI. La producción de BLEE se probó mediante el método de difusión de doble disco, y las E-test de cefotaxima / cefotaxima-ácido clavulánico (AB Biodisk, Suecia) se usaron para resultados indeterminados. Investigaron la presencia de genes de BLEE TEM, SHV, CTX-M, OXA-2, grupo OXA-10,

PER, VEB y GES mediante PCR utilizando cebadores específicos. El método de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se utilizó para la detección de relaciones clonales entre las cepas. La mayoría de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se aislaron a partir de muestras de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (35%), medicina interna (16%) y cirugía general (13%). Todas las 76 cepas se encontraron susceptibles a imipenem, meropenem y amikacina; sin embargo, todos fueron resistentes a cefotaxima y ceftriaxona. Las tasas de susceptibilidad de los aislamientos a ceftazidima, cefepima, amoxicilina- ácido clavulánico, aztreonam y ciprofloxacina fueron del 96%, 83%, 63%, 61%, 50%, 41 %, 25%, 21%, 20% y 18%, respectivamente. Entre los aislamientos de *E. coli*, se encontró que la frecuencia de los genes CTX-M, TEM, OXA-2, PER, SHV y OXA-10 del grupo beta-lactamasa fue de 89.5%, 59.2%, 15.8%, 14.5%, 11.8% y 3.9%, respectivamente, mientras que ninguno de los aislados fue positivo para los genes BLEE VEB y GES. En 1 (1.3%) cepa, ninguno de los genes investigados fueron detectados. Los análisis de PCR de los aislamientos revelaron que 25 albergaban genes CTX-M y TEM juntos, mientras que 20 albergaron solo CTX-M y dos genes TEM alojados únicamente. El único gen SHV no se detectó en ninguno de los aislados. El PFGE no demostró una relación clonal importante entre los aislamientos productores de BLEE. Los

autores concluyen que las enzimas tipo CTX-M eran altamente endémicas entre las cepas de *E. coli* nosocomiales productoras de BLEE en su hospital, con la diseminación policlonal de las bacterias productoras de BLEE sin ningún clon epidémico dominante. Consideran que se necesitan más estudios para explicar la relación entre los clones epidémicos y los plásmidos con el uso de análisis de plásmidos y métodos de tipificación de secuencia multilocus (79).

2014, en Irán, Rezai et al realizó un estudio con el propósito de genotipificar los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE de pacientes pediátricos en el Hospital Buali Sina (hospital pediátrico de referencia) para determinar genes de resistencia asociación con la resistencia a los antimicrobianos. El estudio se llevó a cabo en 327 aislamientos de *E. coli* en muestras de orina. De los 327 aislamientos de *E. coli*, 100 (30.5%) fueron positivos para betalactamasas de espectro extendido. Los aislados de BLEE mostraron la mayor susceptibilidad a carbapenémicos (66%) y amicacina (58%), lo que está de acuerdo con los criterios CLSI 2011 para la prueba MIC. Los resultados del genotipado de BLEE fueron: El gen TEM fue el más frecuente (49%) seguido de los genes SHV (44%), CTX (28%), VEB (8%) y GES (0%). Se demostró que alrededor del 12% de los aislados de BLEE tenían genes TEM y CTX-M. En general, el 30% de los aislados portaron 2 genes resistentes (80).

En el año 2015, López et al en Colombia, realizó un estudio con el propósito de determinar los genes que codifican la resistencia en bacilos gramnegativos con fenotipo BLEE aislados de urocultivos, en una institución prestadora de servicios de salud del departamento de Boyacá. El estudio se llevó a cabo en 19 cepas resistentes con fenotipo BLEE, a las cuales se hizo la confirmación microbiológica del género y la especie. La concordancia entre los dos métodos, Vitek® y BBL Crystal®, fue muy buena; para el género y la especie fue de 94,7 %, con un índice kappa de 0,99, y para el fenotipo de resistencia fue de 100 %, con un índice kappa de 1. La cepa en la cual no se obtuvieron resultados similares en los laboratorios correspondió a la reportada como *Serratia marcescens* y, en el Laboratorio de Análisis Microbiológico de la Universidad de Boyacá, se identificó como *Stenotrophomonas maltophilia*. El microorganismo más prevalente fue *E. coli*, 78,94 % (n=15), seguido por *K. pneumoniae*, 10,52 % (n=2), *Pseudomonas aeruginosa*, 5,26% (n=1) y *S. maltophilia*, 5,26 % (n=1). Los perfiles de sensibilidad de los aislamientos reportaron resistencia a ampicilina de 100%(n=19/19); a ampicilina-sulbactam, de 63,2% (12/19); a cefalotina, de 89,5 % (n=17/19); a cefuroxima, de 84,2 % (n=16/19); a cefotaxima, de 89,5 % (n=17/19); a ceftriaxona, de 89,5 % (n=17/19), y a cefepime, de 73,7 % (n=14/19). Respecto a la determinación de genes que codifican para la resistencia del fenotipo BLEE, hubo 61,11 % (n=12) de fragmentos con el tamaño esperado para el gen blaCTX; 55,6 % (n=10) para el del gen

AmpC; 50 % (n=9) para el del gen blaSHV, y 38,88 % (n=7) para el del gen blaTEM. La presencia de los genes AmpC, blaSHV, blaTEM y blaCTX en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos indica una probable capacidad de movilizarse y transferirse horizontalmente, lo que les confiere un claro potencial epidémico en el ámbito hospitalario y en la comunidad (81).

2.2.2. Antecedentes Nacionales:

En el año 2010, Rivera-Jacinto et al en Lambayeque, Perú, en un estudio “Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM Y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios”. Se colectaron mediante hisopado 125 muestras desde lavatorios, mesas, camas y otras superficies en las salas de cirugía, pediatría, medicina, neonatología, maternidad y unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Regional de Cajamarca. De 20 cepas de *E. coli*, 19 de *K. pneumoniae* y 4 de *K. oxytoca*, 15 cepas (5 de *E. coli*, 9 de *K.pneumoniae*, y 1 de *K. oxytoca*) fueron encontrados previamente para ser productores de BLEE por pruebas fenotípicas (disco doble y sinergia de disco combinado). Previa evaluación y tamizaje de las cepas bacterianas, se hizo un PCR para amplificar fragmentos de 1078 pb y 544 pb correspondientes a BLEE tipo TEM y CTX-M. 7 Cepas de *K. pneumoniae* y 4 cepas de *E. coli* portaban ambos genes (bla TEM y

bla CTX-M), 2 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca* solo tenían bla CTX-M, y una cepa de *E. coli* aislada del pabellón pediátrico no tenía los genes que usamos para las pruebas. Los autores concluyen que la importancia de demostrar la presencia de genes BLEE en cultivos de origen ambiental, algunos de los cuales podrían pertenecer a más de un tipo; esta información podría servir de base para implementar medidas de prevención que eviten la transmisión de bacterias multirresistentes desde superficies inanimadas a los pacientes, principalmente en áreas hospitalarias críticas (82).

En el año 2012, Méndez (tesis) en Lima Perú, realizó un estudio con el propósito de determinar a nivel fenotípico y molecular la presencia y frecuencia de genes que codifica BLEE del tipo CTX-M en cepas de *E. Coli* provenientes de urocultivos en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI). El estudio se llevó a cabo en 50 cepas. De las cuales se aislaron 36 cepas de *E.Coli*. De éstas, 21 (58,3%) presentaron mecanismo de resistencia por producción de BLEE, tomando como BLEE positivo a toda aquella cepa cuya diferencia del diámetro del halo de inhibición del crecimiento entre el disco de la cefalosporina sola y el disco combinado de amoxicilina/ácido clavulánico era de 5mm o mayor. De esas 21 cepas que presentaron el mecanismo de resistencia por producción de BLEE, el 85.7% (18 cepas) evidenció la presencia del gen de

resistencia CTX-M que es uno de los genes que codifica resistencia a betalactamasas de espectro extendido (83)

En el año 2013, Arce-Gil et al en Chiclayo Perú, realizó un estudio con el propósito de Determinar la presencia de genes TEM, SHV y CTX-M. El estudio se llevó a cabo en 50 cepas de *E. coli* productora BLEE aisladas de urocultivos proveniente del laboratorio de Microbiología en el periodo de Enero- Mayo en el Hospital Nacional "Almanzor Aguinaga Asenjo". Las 50 cepas de *E. coli* fueron confirmadas fenotípicamente como productoras de BLEE a través del método de Jarlier. Todas las cepas fueron analizadas mediante la amplificación de ADN por PCR. De éstas cepas, 8 (22,8%) presentaron sólo el gen TEM, 22 cepas (62,8%) presentaron sólo el gen SHV, 10 cepas presentaron el gen CTX-M. (28,5%). Asimismo, 2 cepas expresaron los tres genes (5,7%), 10 cepas no expresaron ninguno de los tres genes (84)

En el año 2015, Diaz et al en Trujillo Perú, realizó un estudio con el objetivo de detectar y caracterizar los tipos de genes que codifican la síntesis de BLEE en 138 *E. coli* uropatógenas en el hospital Belén de Trujillo, durante enero-abril. Realizaron la confirmación fenotípica de cepas productoras de BLEE mediante prueba de sinergia doble disco, y posteriormente utilizaron PCR para la detección de los tipos de genes BLEE (TEM, CTX y SHV). Encontraron que un 30.43% del total de cultivos fueron productores

de BLEE. Los genes BLEE caracterizados fueron CTX-M, TEM y SHV, de los cuales 88% fueron CTX-M, 54.7% de tipo TEM y 38% SHV. Asimismo se encontró que en 52.3% de cepas de *E. coli* coexistieron genes de tipo TEM y CTX-M. Los autores concluyen que la frecuencia de *E. coli* productores de BLEE fue de 30.43%, siendo el gen tipo bla CTX-M el más frecuente (6).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño del Estudio:

Estudio descriptivo, prospectivo, de corte trasversal.

3.2. Población:

La población la constituyeron todos los aislamientos bacterianos en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados de entre 0 a 5 años de edad derivados al Servicio de Microbiología, del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé (HONADOMANI SB) para su análisis durante mayo -agosto del 2018.

3.2.1. Criterios de Inclusión:

- Muestras de orina provenientes de pacientes pediátricos de 0 a 5 años.
- Muestras de pacientes pediátricos hospitalizados.
- Enterobacterias aisladas de urocultivos pediátricos con producción de BLEE.

3.2.2. Criterios de Exclusión:

- Muestras de orina provenientes pacientes pediátricos ambulatorios.
- Aislamientos bacterianos de hemocultivos, coprocultivo, secreción, u otras diferentes de urocultivo.
- Enterobacterias aisladas de urocultivo pediátrico no productoras de BLEE.

3.3. Muestra:

La muestra la constituyeron 30 cepas de enterobacterias productores de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados de 0 – 5 años en el periodo de Mayo – Agosto 2018 en el Hospital Nacional Madre Niño San Bartolomé (HONADOMANI SB). El tipo de muestreo fue por conveniencia.

3.4. Operacionalización de Variables:

Variable	Definición Operacional	Instrumento de Medición	Escala de Medición	Forma de Registro
<u>V. Principal:</u> Caracterización molecular de BLEE	Identificaciones Genes de resistencia a Betalactámicos	PCR convencional	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
<u>V. Secundarias</u> Gen bla TEM	Fragmento de ADN que codifica una proteína	PCR convencional	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Gen bla SHV	Fragmento de ADN que codifica una proteína	PCR convencional	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Gen bla CTX	Fragmento de ADN que codifica una proteína	PCR convencional	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Gen bla OXA	Fragmento de ADN que codifica una proteína	PCR convencional	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Especie bacteriana	Cepas que comparten Características propias	Vitek	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>K. pneumoniae</i> • <i>K. oxitoca</i> • <i>Proteus mirabilis</i> • <i>S. marcescens</i>
Sexo	Diferencia de sexo de un individuo	Ficha de recolección de datos	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Masculino • Femenino
Procedencia	Lugar de donde se refiere a un paciente hospitalizado.	Ficha de recolección de datos	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • UCI-Neonatología • UCI- Pediatría • UTIP

3.5. Procedimientos y Técnicas

La secuencia para este trabajo llevó el siguiente orden:

A. Muestras

Las muestras colectadas de pacientes pediátricos internados en el HONADOMANI SB fueron enviadas para “cultivo de orina” (Urocultivo) al Servicio de Microbiología de la Institución. Las muestras fueron recolectadas en frascos de plástico 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, Bolsas colectoras, estériles, con rotulación sobre la bolsa y por sonda.

Las muestras fueron procesadas inmediatamente. También, fueron conservadas a temperatura ambiente por ≤ 1 hora, o a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ por ≤ 4 horas desde la colección, evitando así la proliferación de las bacterias oportunistas contaminantes.

B. Aislamiento microbiológico

Las muestras de orina fueron sembradas de manera convencional en placas de medios de cultivo con Agar Sangre de Carnero 5% y Agar Mac Conkey (ambos de Merck, Darmstadt, Germany) a temperatura ambiente, con un asa estéril descartable calibrado de 1uL, manteniendo la esterilidad del medio. Estos cultivos se incubaron $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones aeróbicas durante 24 horas. Adicionalmente, se sembraron las muestras para el urocultivo en Agar cistina-lactosa deficiente en electrolitos (CLED),

estas realizadas durante el horario nocturno. Los aislamientos obtenidos en este medio de cultivo también fueron incluidos en el estudio de BLEE y posterior caracterización molecular (66).

C. Lectura de Medios e Identificación bioquímica

La lectura de los medios y su evaluación se realizó al término de las 24 horas indicadas. Cuando no se encontró aislamiento bacteriano se dejó incubar hasta las 48 horas para considerarlo como verdadero negativo. La lectura de los cultivos positivos consistió en realizar el recuento de colonias, cuyo resultado se multiplica por el factor de dilución para obtener las UFC por ml (positivos= ≥ 1000 UFC/ml).

La identificación bioquímica de los aislamientos sospechosos, se realizó mediante la coloración Gram y conjuntamente se sembró en una batería bioquímica de identificación (Agar Triple Sugar Iron (TSI), Agar Lisina (LIA), Agar Ornitina Indol (MIO), Agar Citrato (CITRATO) y Agar Urea (UREA)) (todos los medios de Merck, Darmstadt, Germany), dejándose incubar por un tiempo de 18 – 24 horas(66).

Además, los aislamientos fueron analizados automatizadamente en el sistema Vitek® 2 Compact (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) obteniéndose resultados en menor tiempo. Se consideraron positivos los resultados con aislamientos de Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, entre otras) y otros patógenos no saprofitos.

D. Determinación fenotípica de BLEE

Se realizó, ambos el análisis bioquímico y el antibiograma en el sistema Vitek® 2 Compact, donde se determinaron las pruebas bioquímicas y el antibiograma para determinar la presencia de cepas productoras de BLEE. Con este sistema se obtuvieron las Concentración mínima inhibitoria (MICs o CIMs) de cada antimicrobiano. Además, la caracterización fenotípica de cepas productoras de BLEE se realizó con el Test confirmatorio para BLEE, recomendado por el CLSI (Método Americano) (60), prueba de sinergia doble disco bajo el método de Kirby-Bauer. Con este sistema se obtuvo la medida de los halos de cada antibiótico en milímetros (85). La detección de BLEE por pruebas fenotípicas examinan las dos características principales de las cepas productoras de BLEE, primero, sensibilidad disminuida a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam, e inhibición de la resistencia por ácido clavulánico. Se usaron placas con agar Mueller Hinton con 4mm de alto; cada cepa se llevara a la turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland y se inoculara en las placas con Agar Mueller Hinton por diseminación en superficie con hisopo (método de la estera) y se siguieron las recomendaciones del CLSI (Método americano), colocándose discos de susceptibilidad antimicrobiana (Valtek) de ceftazidima (CAZ de 30µg), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) de (30µg/10µg), cefotaxima (CTX de 30µg), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CTX-CLA) de (30µg/10µg), donde una diferencia igual o mayor a 5mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ o CTX-CLA y CTX se

interpretara como un resultado positivo(68). Se utilizó como control de BLEE positivo para método Kirby Bauer, cepas *Klebsiella pneumoniae*, derivado de ATCC® 700603™ Microbiologics.

E. Conservación de cepas

Las cepas se conservaron en agar tripticasa soya (TSA) y posteriormente se colocaran a una temperatura de -20°C; sacándose solamente para el uso correspondiente.

F. Caracterización molecular de gene BLEE

La caracterización molecular posterior se llevó a cabo mediante PCR convencional la cual constó de los siguientes procesos:

- 1) Extracción estandarizada para DNA bacteriano con shock térmico modificado, ver Anexo 3.
- 2) Los extractos de DNA fueron cuantificados con el fluorómetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad,CA).
- 3) Los primers utilizados fueron tomados del estudio de Maina et al, (2012) (86):
CTX-M (5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAG TAA-3') y
CTX-M (5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCAT-3').
Lectura: 540 pb.
TEM (5'ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3') y
TEM (5'-GACAGTTACC AATGCTTAATC-3').
Lectura: 918 pb.

SHV (5-TGGTTATGCGTTATATTCGCC-3'), y

SHV (5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGC-3').

Lectura: 237 pb.

OXA (5'-GGCTTA GAGCATTACCATA-3'), y

OXA (5'-GGAATTCCATGAATAAATAT TTTACTTGC-3') .

Lectura: 813 pb.

En todos los análisis (corrida de 5 o 10 muestras) se incluyó un par de iniciadores para el gen de la β - globina como control de calidad interno de DNA genómico amplificable. Se utilizó Taq DNA Polymerase Recombinante (Invitrogen, CA, USA).

4) Amplificación: Treinta y cinco ciclos de PCR se realizaron mediante el uso de 94°C durante 30 segundos para la denaturación, luego la hibridación se hizo a 56°C durante 10 segundos, la extensión a 72°C durante 30 segundos, finalmente una elongación final de 72°C durante 2 min, posteriormente se bajó la temperatura a 4°C. Se utilizó el termociclador Bio Rad T100™ ThermalCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se usó la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo y *E. coli* ATCC 25922 como control negativo.

5) La visualización de los productos amplificados se realizaron en una corrida por electroforesis horizontal empleando gel de agarosa al 3% a 112 V por 45 minutos coloreados luego con SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 15 minutos. Luego se visualizaron con el transiluminador UV, se fotografiaron con el sistema Bio-Rad Gel Doc™

XR+ y procesadas con el Software ImageLab™ (ambos de Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (87).

3.6. Aspectos Éticos:

La presente investigación por su diseño cumple con todos los criterios de ética en investigación donde todos los datos de los pacientes se mantendrán en anonimato y sólo se usarán para esta investigación. Este estudio será revisado y aprobado por las instituciones participantes en conformidad con los Jefes de Departamento, Servicio o Instituto Ver Anexo 4. El Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé a través d la Oficina de Investigación aprobó este estudio referido en el código N° 0577-2018-OADI-HONADOMANI SB.

3.7. Plan de Análisis de Datos:

Los datos serán recolectados mediante una Ficha Estandarizada de recolección de datos (Anexo 5). Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 23.0. El programa de Microsoft Excel 2013. Se emplearon tablas de frecuencia y de contingencia.

Se determinará la asociación entre variables a través de la prueba chi cuadrado para las variables cualitativas, análisis de varianza (ANOVA), considerando estadísticamente significativo los valores de $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Resultados

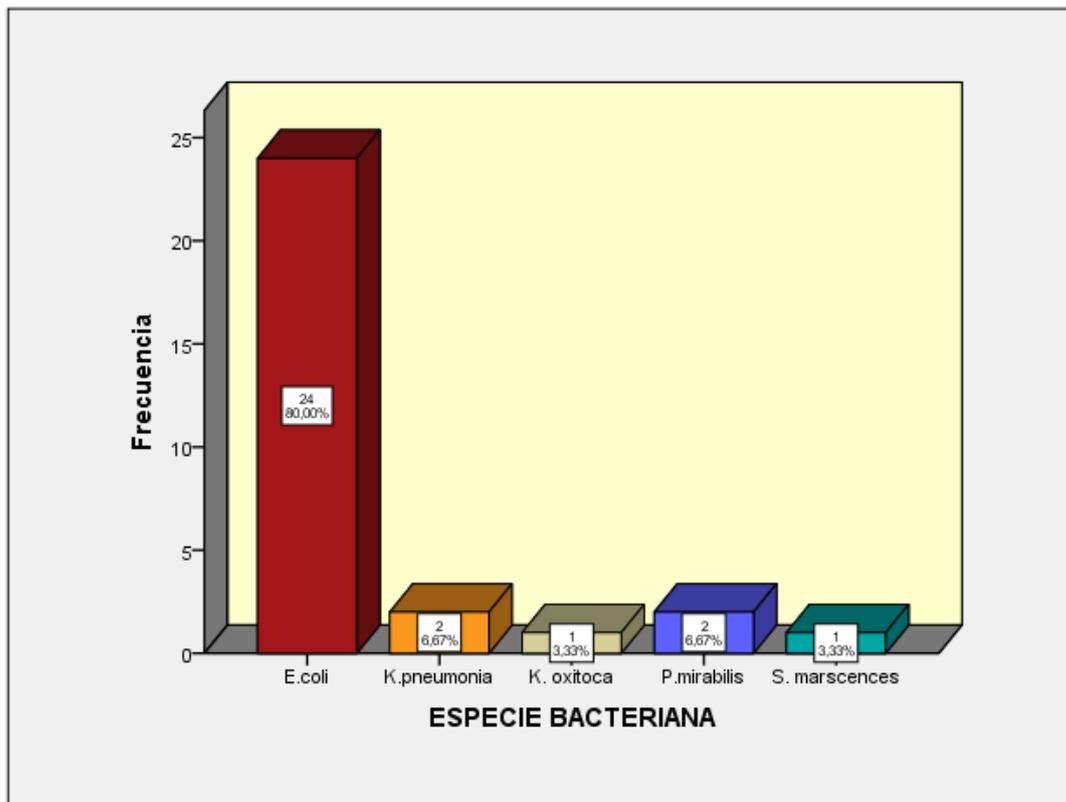
En este estudio fueron incluidos un total de 30 aislamientos bacterianos (Enterobacterias) de muestras de urocultivos (100%) de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé durante el periodo de estudio. Estas cepas presentaron patrones de resistencia durante lectura interpretada del antibiograma.

Tabla 1. Distribución según especie de las enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados (n=30). Datos en n %

Especies bacterianas	n(%)
<i>E. coli</i>	24 (80)
<i>K. oxytoca</i>	1 (3.3)
<i>K. pneumoniae</i>	2 (6.7)
<i>P.mirabilis</i>	2 (6.7)
<i>S. marcescens</i>	1 (3.3)

Fuente: Propia

Grafico1. Distribución según especie de las enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados (n=30).



Fuente: Propia

Del total de las enterobacterias productoras de BLEE analizadas en este estudio, el 80% de especies bacterianas aisladas correspondieron con *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* con 6.7%.

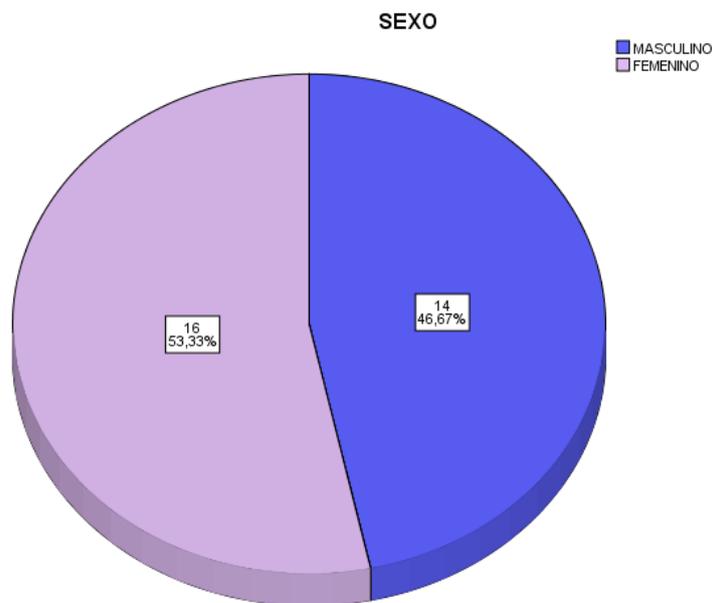
Tabla 2. Distribución de pacientes pediátricos del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé según sexo durante el periodo de estudio. (n=30).

Datos en n %

Sexo	n(%)
Masculino	14 (46,67)
Femenino	16 (53.33)

Fuente: Propia

Grafico 2. Distribución de las pacientes pediátricos según sexo durante el periodo de estudio (n=30).



Fuente: Propia

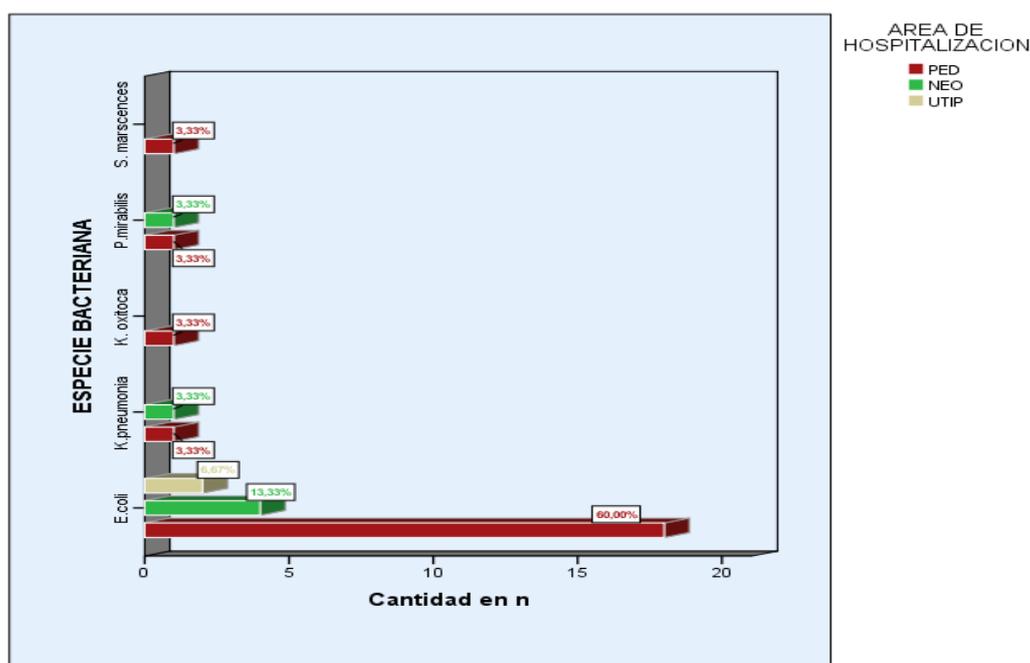
Se incluyeron en este estudio 16 (53.33%) pacientes del sexo femenino y 14 (46.67%) del sexo masculino. No se encontró diferencia significativa entre ambos sexos ($p=0.643$).

Tabla 3. Distribución de las enterobacterias aisladas de pacientes pediátricos según área de hospitalización. Datos en n (%).

Especies	Áreas de Hospitalización		
	Pediatría	Neonatología	UTIP
<i>E. coli</i>	18(60)	4(13.3)	2(6.7)
<i>K. oxytoca</i>	1(3.3)	--	--
<i>K. pneumoniae</i>	1(3.3)	1(3.3)	--
<i>P. mirabilis</i>	1(3.3)	1(3.3)	--
<i>S. marcescens</i>	1(3.3)	--	--
Total	22(73.3)	6(20)	2(6.7)

Fuente: Propia

Grafico3. Distribución de las enterobacterias aisladas según área de hospitalización (n=30).



Fuente: Propia

En cuanto a la distribución de las enterobacterias según el área de Hospitalización se aisló 22 (73.3%) cepas del área de Pediatría, seguidos de Neonatología 6 (20%) y de UTIP 2 (6.7%). En pacientes del área de Pediatría las cepas aisladas y caracterizadas fueron *E. coli* 18

(60%), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *K. oxitoca* y *S. marcescens*, se aisló 1 (3.3%) de cada especie; en el área de Neonatología fueron aisladas *E. coli* 4 (13.3%), *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* 1 (3.3%) de cada especie, mientras que en el área de UTIP la cepas analizadas fueron solo *E. coli* 2(6.7%). Del total, las enterobacterias más aisladas fueron *E. coli*.

Grafico4. Lectura interpretada del Antibiograma con presencia de BLEE por el método americano (CLSI).



Fuente: Propia

Nuestros resultados de la lectura interpretada del antibiograma indican que todas las cepas presentaron BLEE mediado por sinergia entre el

ácido clavulánico y cefalosporinas de tercera generación. La sinergia se evidenció según los MIC del CLSI y por el método americano de resistencia a BLEE donde: (CTX= Cefotaxima, CAZ= ceftazidima, CTC= cefotaxima/ac. clav, CAZ/CLA= ceftazidima/ ac. clav) Observamos una diferencia de más de 5 mm en los diámetros entre las cefalosporina sola con respecto a la misma combinada con el ácido clavulámico.

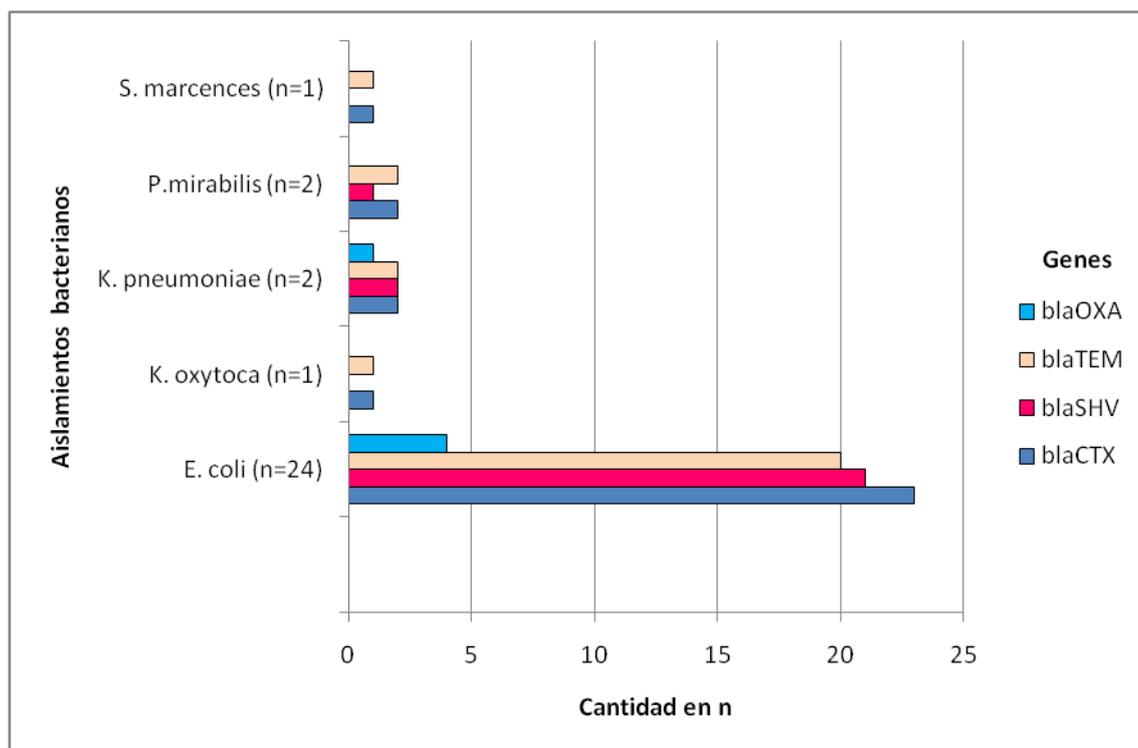
Todas las cepas productoras de BLEE fueron identificadas molecularmente luego de su evaluación fenotípica.

Tabla 4. Descripción general de las enterobacterias en estudio y su frecuencia de los 4 genes BLEE analizados en el estudio (n=30). Datos en n (%)

Especies	Genes			
	blaCTX	blaSHV	blaTEM	blaOXA
<i>E.coli</i> (n=24)	23(95.8)	21 (87.5)	20(83.3)	4(16.7)
<i>K. oxytoca</i> (n=1)	1(100)	--	1(100)	--
<i>K. pneumoniae</i> (n=2)	2(100)	2(100)	2(100)	1(50)
<i>P. mirabilis</i> (n=2)	2(100)	1(50)	2(100)	--
<i>S. marcescens</i> (n=1)	1(100)	--	1(100)	--
Total	29(96.7)	24(80)	26(86.7)	5(16.7)

Fuente: Propia

Grafico 5. Descripción general de las enterobacterias en estudio y su frecuencia de los 4 genes BLEE analizados en el estudio (n=30).



Fuente: Propia

Del total de las enterobacterias analizadas el 29 (96.7%) presentaron el gen blaCTX, 26 (86.7%), el gen blaTEM, 24 (80%) el gen blaSHV y 5 (16.7 %) el gen blaOXA. De las *E. coli* 23 (95.8%) presentaron el gen blaCTX, 21 (87.5%) presentaron el gene blaSHV, 20 (83.3 %) presentaron el gen blaTEM, mientras que solo 4(16.7%) presentaron el gen blaOXA, 20 (83.3%) cepas de *E.coli* aisladas de pacientes pediátricos presentaron los tres genes evaluados (blaCTX, blaSHV y blaTEM). Para *K. pneumoniae* 2 (100%) cepas presentaron los tres genes evaluados (blaCTX, blaSHV y blaTEM), y solo 1 (50%) de cepas presento el gen blaOXA. La cepa de *K. oxytoca* presentó el gen blaCTX y blaTEM. Dos cepa evaluadas de *P. mirabilis* presentaron los genes

*bla*CTX, *bla*TEM, mientras que solo una presentó el gen *bla*SHV. La única cepa de *S. marcescens* aislada presentó los genes *bla*CTX y *bla*TEM.

No se encontró diferencia significativa entre la cantidad de genes por especie ($p=0.151$) pero sí entre especies ($p=0.001$).

Gráfico 6. Corridas electroforéticas en gel de agarosa de cepas BLEE analizadas en este estudio. (gen *bla*CTX- gen *bla*TEM)

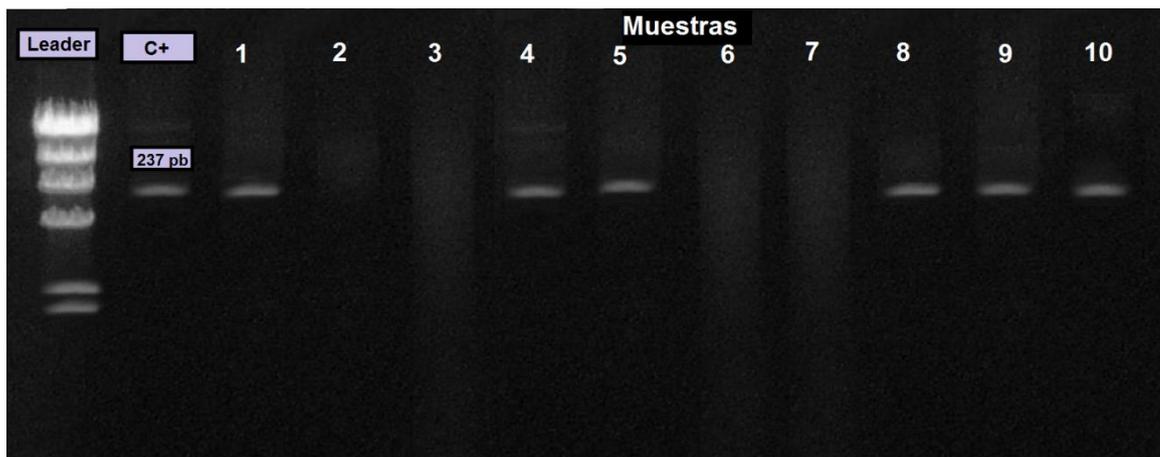


Fuente: Propia

Gráfico: **6-A.** Gel mostrando el fragmento de 540 pb del gen *bla*CTX-M (cepa 1 es negativa a BLEE tipo CTX-M). **6-B.** Gel mostrando el fragmento de 918 pb del gen *bla*TEM (cepa 5, 8 y 10 son negativa a

BLEE tipo TEM). De izquierda a derecha (Leader) el marcador de peso molecular gen de la β - globina.

Gráfico 7. Corridas electroforéticas en gel de agarosa de cepas BLEE analizadas en este estudio. (Gen bla_{SHV})



Fuente: Propia

Gráfico: 7. Gel mostrando el fragmento de 237 pb del gen bla_{SHV} (cepa 2, 3, 6 y 7 son negativas a BLEE tipo SHV). De izquierda a derecha (Leader) el marcador de peso molecular gen de la β - globina.

4.2. Discusión

El estudio tuvo como objetivo determinar las características fenotípicas y moleculares de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de urocultivos de pacientes pediátricos de un hospital pediátrico 2018, demostrando una gran cuantía cepas con presencia fenotípica y genotípica de BLEE.

Nuestro estudio es similar al realizado por Guillén et al. (2008) Paraguay, determino una frecuencia de *bla*CTX (49%), seguido de *bla*SHV (45%) y *bla*TEM (40%) como los principales, resultando que concuerda con nuestros hallazgos (77). Otro estudio Iraní de Feizabadiet et al (2009) que evaluó 89 aislamientos de *K. pneumoniae* demostró alta frecuencia de los genes *bla*SHV, *bla*TEM, y *bla*CTX (CTX-I y CTX-II) en el 67.4%, 54%, 75.5% de cepas respectivamente, similar a nuestro estudio (78).

El estudio de Görgeç et al., del (2011) Turquía, demostró que en 76 cepas de *E. coli* aisladas el gen *bla*CTX y *bla*TEM *bla* fueron los más frecuente con 89% y 59.2% respectivamente, el gen OXA 19% (79) muy parecido a nuestro estudio; Sin embargo, Rezai et al (2014) demostró en 327 asilamientos de *E. coli* en población iraní, una frecuencia elevada del gen *bla*TEM (49%), seguido del gen *bla*SHV (44%) y *bla*CTX con 28% (80) discrepando con este estudio en donde más frecuente fue el gen *bla*CTX .

En otro estudio realizado López et al (2015) Colombia demostró alta frecuencia de los genes *bla*CTX (61%), *bla*SHV(55.6%), y *bla*TEM (33%).(81)

En nuestro país existealta frecuencia del gen *bla*CTX (80%) y del gen *bla*TEM (40%) en varios estudios en diferentes poblaciones (6, 81, 83,84).

Resultados similares a este estudio.

Rivera-Jacinto et al (2010), en Lambayeque, Perú, en un estudio “Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM Y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios de 15 cepas (5 de *E. coli*, 9 de *K.pneumoniae*, y 1 de *K. oxytoca*) el 93% presento CTX Y 73% el gen TEM (82) resultados que concuerdan con este estudio.

Otro estudio realizado por Méndez el 2012, en Lima Perú, para determinar molecularmente BLEE del tipo CTX-M en cepas de *E. Coli* provenientes de urocultivos en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI). De 50, 21 cepas que presentaron el mecanismo de resistencia por producción de BLEE, de estas el 85.7% evidenció la presencia del gen de resistencia CTX-M, muy cercano a este estudio.

Díaz et al (2015), determino genes que codifican la síntesis de BLEE en *E.coli* uropatógenas (n=138) en el hospital Belén de Trujillo, durante enero-abril. En donde los genes más frecuente con 88% fueron CTX-M, seguido TEM con 54.7% y 38% SHV. Resultados parecidos a este estudio.

Debido a la falta de información actual en este campo de pediatría, enfatizamos su importancia y brindamos información útil para el conocimiento de las cepas productoras de BLEE desde el punto de vista molecular en el Perú. Debemos de describir la importancia de los genes BLEE analizados debido a la alta frecuencia de estos en bacterias en la comunidad (24,25). Nuestros hallazgos permiten establecer el punto inicial para ampliar estudios sobre resistencia bacteriana y caracterización

molecular en otros centros nosocomiales especializados en atención madre niños, ya que esta población resulta ser una de las más vulnerables y donde el manejo terapéutico es riguroso (24, 25,32).

En el mismo sentido, las frecuencias reportadas en este estudio permiten establecer indicativos de que las cepas analizadas fenotípica y molecularmente son productoras de BLEE, hecho que debe ser corroborado en su magnitud, primero describiendo los subtipos de los genes más frecuentes que han sido reportados en la nación (3,26). Segundo, evaluando la clonalidad de las cepas que nos permitirán estimar los mecanismo y la persistencia de cepas en una comunidad hospitalaria establecida, y tercero, la descripción de cepas con presencia de plásmidos y demás contenidos moleculares, que permitirán, si es que ya no se viene haciendo, conocer los mecanismos de transmisión y posible vías por las cual sucede para luego, plantear herramientas de prevención y control de su transmisión en los principales centros hospitalarios (31).

Actualmente, la OMS esta en búsqueda de afrontar esta era-post antibiótica en todos los países del mundo (1). Los programas o equipo de resistencia nacional o local desempeñan un rol fundamental para la vigilancia de estas cepas en todos los centros nosocomiales y comunidades (3,6). Esta vigilancia debe de ser muy rigurosa y organizada en pediatría ya que la aparición de un brote con multiresistencia ocasionaría detrimento de la población de niños hospitalizados comprometiendo su salud física y acrecentando los costos económicos involucrados en su atención, que como se viene estudiando estos son

elevados. Todo esto en el marco de las superbacterias, resulta de vital importancia para los trabajadores de salud, que también son vehículos de movilidad de bacterias dentro de las áreas de los hospitales (18). Los profesionales involucrados en la atención pediátrica, tanto directos como indirectos, cumplen un papel fundamental para establecer medidas de prevención dentro de la atención neonatas y pediátricas.

Por otro lado, la caracterización de genes de BLEE en esta cepas pediátricas nos va a permitir conocer su distribución, entender con futuros estudios cómo se comportan, el entorno en el que se desarrollan y las posibilidades de intervención y vigilancia de sus mecanismo de difusión y producción de resistencia, para prevenir su expansión y socorrer sus necesidades terapéuticas con nuevas drogas, que deben de ser estudiadas *in vitro* y *in vivo* previamente en la comunidad (15, 18,22).

Las complicaciones en los pacientes con enfermedad oncológica suelen ser diversas.

4.3. Conclusiones

- Se concluye que las características fenotípicas y moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en pacientes pediátricos hospitalizados de un hospital Materno-Infantil 2018 fueron indicativos de resistencia bacteriana.
- La mayor especie aislada de enterobacterias productoras de BLEE fue *Escherichia coli*, seguida de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*.
- El sexo con más frecuencia de cuya muestra de orina se aisló enterobacterias productoras de BLEE fueron las pacientes del sexo femenino de un hospital Materno-Infantil 2018.
- Los pacientes hospitalizados de donde se aisló la mayor cantidad de enterobacterias productoras de BLEE pertenecieron al área de pediatría.
- Existe una alta frecuencia del gen *bla*CTX, seguido del gen *bla*TEM *bla*SHV y en menor medida de *bla*OXA en enterobacterias productoras de BLEE aislados en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados de un hospital Materno-Infantil 2018.

4.4. Recomendaciones

- Se recomienda ampliar el tamaño muestral de caracterización molecular de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de pacientes pediátricos a nivel regional y nacional.
- Se recomienda confirmar el estudio con la caracterización de cada subtipo de los genes analizados en este estudio con la finalidad de conocer su frecuencia por cada especie bacteriana.
- En las áreas de atención pediátrica se deben de evaluar las especies aisladas de superficies en búsqueda de cepas productoras de BLEE y/u otros tipos de resistencia ya que podrían constituir focos infecciosos tanto para los pacientes como para el personal de salud.
- Basados en nuestros resultados, se deben de promover una cultura de prevención de infecciones en pediatría ya que estos pacientes son muy vulnerables y demandan altas actividades terapéuticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moya-Salazar J, Terán-Vásquez A, Salazar-Hernández R. High antimicrobial resistant to fluoroquinolones by *Campylobacter* in Peruvian pediatric patients. *Rev Per Med Exp Salud Pública* 2018; 35(1): 158-160.
2. Soraas A. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae – aspects on carriage, infection and treatment. [Tesis] Baerum: Department of Medical Microbiology Faculty of Medicine, Trust University of Oslo; 2014.
3. Méndez REA. Determinación de la frecuencia del gen CTX-M que codifica β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* uropatógenas aisladas en el Hospital Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012. [Tesis] Lima: E.A.P. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
4. Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI. Clonal Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental, Human and Food Samples. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 14(7): 676.
5. Morales CIA. Prevalencia de cepas portadoras de marcadores de resistencia (BLEE) aisladas en muestras clínicas provenientes de pacientes ambulatorios. [Tesis] México D.F.: Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
6. Abanto DC, Gonzales CJ, Avila VE, Teran RJ, Castillo DKM. Detección y caracterización genotípica de betalactamasas de *Escherichia coli* uropatógenas del Hospital Belén de Trujillo durante enero-abril de 2015. *Pueblo Cont. Vol.* 2017; 28(1):57-66.
7. Rojas-Jaimes J. Identificación fenotípica y caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* durante un brote hospitalario en Madre de Dios, Perú. *Científica* 2016; 13 (3): 187-192.
8. González AC, Nieves B, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Moreno M. Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30 (4): 374-380
9. Zhang X, Chen D, Xu G, Huang W, Wang X. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China. *PLoS ONE* 2018; 13(3): e0194000.
10. Elhani D. [The widening challenge of extended spectrum beta- lactamases]. *Ann Biol Clin* 2012; 70 (2): 117-40.

11. Chiriboga AC, Araujo LC. Nuevo Método alternativo para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. [Tesis]. Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Médicas. Instituto Superior de Investigación y Postgrado; 2012.
12. Cué BM, Morejón GM. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1998; 14(4).
13. Ghuysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and betalactamasas. *Trends Microbiol* 1994; 2(10):372-80.
14. Marín M, Gudiol F. Betalactam antibiotics. *Enf Inf Microbiol Clin* 2003; 21(1).
15. Brandl E, Giovannini M, Margreiter H. Studies on the acid stable, orally efficacious phenoxymethylpenicillin (penicillin V). *Wien Med Wochenschr* 1953; 103(33-34):602-7.
16. Alvarado CP. 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]. Loja: Universidad Tecnica Particular de Loja. Área Bioquímica; 2014.
17. Abraham EP, Newton GGF, Crawford K, Burton HS, Hale CW. Cephalosporin- N A new type of penicillin. *Nature*. 1953; 171(4347):343-9.
18. Muggleton PW, O'Callaghan CH, Stevens WK. Laboratory Evaluation of a New Antibiotic--Cephaloridine (Ceporin). *Br Med J* 1964;2(5419):1234-7
19. Boniece WS, Wick WE, Holmes DH, Redman CE. In vitro and in vivo laboratory evaluation of cephalothin, a new broad spectrum antibiotic. *J Bacteriol* 1962;84:1292-6
20. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R. Cephalosporins. 7th edition. New York: Elsevier and Churchill Livingstone; 2009.
21. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century-A clinical super-challenge. *N Engl J Med*. 2009; 360:439-43.
22. Echevarria ZJ, Quilca DI. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered* 2003; 14 (4): 195-203.
23. Odenholt-Tornqvist I. Studies on the postantibiotic effect and the postantibiotic subMIC effect of meropenem. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(6):881-92.
24. Abreu RR. Prevalencia de Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en exudados rectales de pollos de engorde en granjas avícolas en la isla de Tenerife, España. [Tesis]. España: Universidad de la Laguna. Ciencias y Tecnologías; 2013.
25. Podschun R, Ullman U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens:

- Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998, 35(2):589–603
26. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940; 146:837-48.
 27. Kirby WMM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science.* 1944; 99(2579):452-3.
 28. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 1965; 208(5007):239-41.
 29. Brunton J, Clare D, Meier MA. Molecular epidemiology of antibiotic resistance plasmids of Haemophilus species and Neisseria gonorrhoeae. *Rev Infect Dis* 1986; 8(5):713-24.
 30. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofex, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection* 1983;11(6):315-17.
 31. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(8):1131-36.
 32. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(3):323-34.
 33. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamasas and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39 (6):1211-33.
 34. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(3):259-63.
 35. Ambler RP, Coulson AF. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991; 276(1): 269-70.
 36. Abarca G, Herrera M. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* 2001; 36:1-2.
 37. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum -lactamase- producing? *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1996; 15:361.
 38. Vignoli, R., & Seija, V. (2007). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Rev Principles and Practice of Infectious Diseases*, 352, 380-91.
 39. Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 29(7), 524-

534.

40. Rojas, M., Del Valle, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 78-83.
41. Morejón García, M. (2012). Carbapenemasas, una amenaza actual. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 11(4), 2613-2618.
42. Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3).
43. García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 24(2)
44. Guzmán, M., Rodríguez, E., Antón, K., Silva, S., Navarro, J., Lastra, L., & Alonso, G. (2013). Genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Investigación Clínica*, 54(3), 235-245.
45. RIVERA-JACINTO, Marco, et al. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2015, vol. 32, p. 752-755.
46. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. Una revisión de β -Lactamasas de espectro extendido SHV: Descuidado pero omnipresente. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 1374. doi: 10.3389 / fmicb.2016.01374.
47. García, C., Astocondor, L., Banda, C. (2012). Enterobacterias productoras de lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta médica peruana*, 29(3), 163-169.
48. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(8):1243-6.
49. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990; 18(5):294-8.
50. Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(12):3595-8.
51. Agents Chemother 2001; 45(12):3595-8.
52. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases:balancing science

- and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(1):1-4.
53. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectrum* 2016; 4(2):VMBF-0016-2015
 54. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4):657-86.
 55. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1877-1882.
 56. Cavalieri SJ, Rankin ID, Harbeck RJ, et al. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology, Laboratory Manuals, PAHO. Artículo en línea. [Internet] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid= Fecha de Acceso: 15-05-2018
 57. Fihn SD. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *N Engl J Med.* 2003; 349(3):259-66.
 58. Hernández AE. Escherichia coli productores de blee aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. [Tesis]. España: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología I; 2010.
 59. Seral GC, Pardos GM, Castillo GF. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than Escherichia coli and Klebsiella. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(Supl 1):12-18
 60. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 557-84.
 61. Kahlmeter, G. Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother,* 2003; 52(2): p. 145-8.
 62. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-951.
 63. Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15: 21.
 64. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48(suppl S1): 17-28.

65. Mulgrave L. Extended Spectrum β -Lactamase Detection in the Clinical Laboratory: A Mini-Review. Australian Society for Antimicrobials newsletter 1999; 200: 35.
66. Perez F, Endimiani A, et al. The continuing challenge of ESBLs." *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(5): 459-69.
67. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4):493-6.
68. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta- lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(9):1877-82.
69. Sacsquispe CR, Ventura EG. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N° 28. Instituto Nacional de Salud. Lima: MINSA; 2005.
70. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de β -Lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2003.
71. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
72. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4):493-6.
73. Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 1978; 7(1):102-3.
74. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended spectrum beta- lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(9):1877-82.
75. 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.
76. 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.
77. Guillén R, Velázquez G, Lird G, Espínola C, Laconich M, Carpinelli L et al. Detección molecular de β -lactamasas de espectro (BLEE) en enterobacterias aisladas en Asunción. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.*

2015;13(2):8-16

78. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 2010; 16(1):49-53.
79. Görgeç S, Kuzucu Ç, Otlu B, Yetkin F, Ersoy Y. [Investigation of beta-lactamase genes and clonal relationship among the extended-spectrum beta-lactamase producing nosocomial *Escherichia coli* isolates]. *Mikrobiyol Bul.* 2015; 49(1):15-25.
80. Rezai, M. S., Salehifar, E., Rafiei, A., Langae, T., Rafati, M., Shafahi, K., Eslami, G. (2015). Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in North of Iran. *BioMed research international*, 2015.
81. López DP, Torres MI, Castañeda LM, Prada-Quiroga CF. Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. *Revista Investig Salud Univ Boyacá.* 2016;3(2):107-126
82. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Flores CR, Serquén LL, Arce GZ. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM Y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2015; 32(4):752-5.
83. Méndez Ruiz, E. A. (2015). Determinación de la frecuencia del gen CTX-M QUE CODIFICA β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) EN *Escherichia coli* uropatógenas aisladas en el Hospital Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012.
84. Gil, Z. A., Núñez, J. L., Benevidez, E. A., López, E. L. (2014). 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. *Rev. Cuerpo Med. HNAAA*, 7(3), 27-30.
85. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 36:493-496.
86. Maina D, Revathi G, Kariuki S, Ozwara H. Genotypes and cephalosporin susceptibility in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae in the community. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6(6):470-7.
87. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490–495.

ANEXOS

Anexo 01:

Figura 1. Clasificación de cefalosporinas. Se indican sus principales representantes (PR) y su función (FX). Abreviaturas, GP: Gram positivos, GN: Gram Negativos.

Cefalosporinas de Primera generación

- PR: cefalexina, cefadroxilo, cefalotina, cefazolina.
- FX: sobrebacterias GP y algunas GN.

Cefalosporinas de Segunda generación

- PR: cefaclor, cefamandol, cefonicida, cefuroxima.
- FX: contrapocos GP y GN en igual proporción.

Cefalosporinas de Tercera generación

- PR: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefixima.
- FX: sobre bacterias GN y pocas GP.

Cefalosporinas de Cuarta generación

- PR: cefepima, cefpiroma
- FX: contra *P.aureginosa* y otras GN

Cefalosporinas de Quinta generación

- PR: ceftobipro y Ceftarolina
- FX: contra GP (MRSA-VRSA)

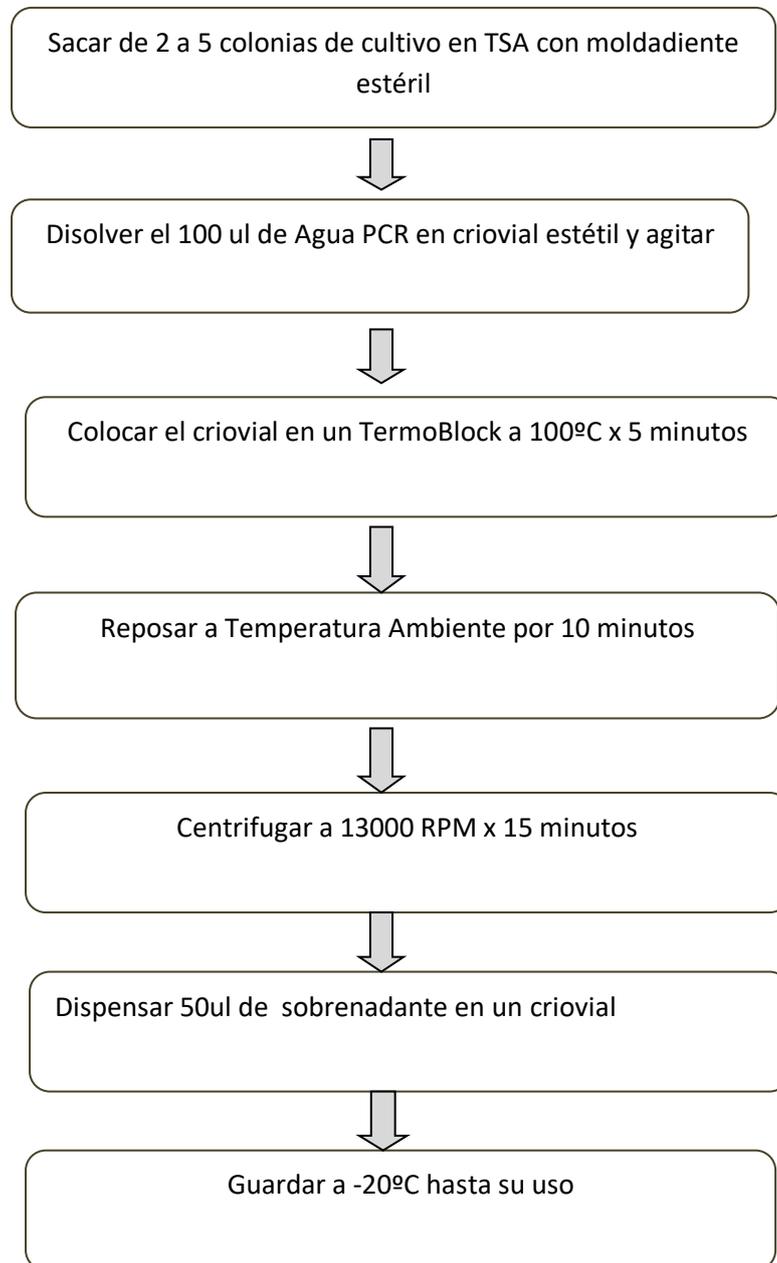
Anexo 02

Figura 2. Clasificación de betalactamasas según Ambler - Bush, Jacob y Medeiros.

Grupo Bus(1995)	Clase Molecular (Ambler)	Preferencia al sustrato	Inhibición por ácido clavulánico	Tipo de BLEE
1	C	Cefalosporinas	-	AmpC
2 ^a	A	Penicilinas	+	PC1(<i>S.aureus</i>)
2b	A	Penicilinas y cefalosporinas	+	TEM-1,TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro	+	TEM-3 a 28, SHV-2 a 6
2br	A	Penicilinas	+/-	TEM-30 a 36,
2c	A	Penicilinas y carbenicilina	+	PSE-1, CARB-3
2d	D	Penicilinas y cloxacilina	+/-	OXA-1, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	Cefalosporinasa inducible
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos	+	IMI-1, NMC-A, Sme-1
3	B	Carbapenémicos	-	L1
4	?	<i>Penicilinas</i>	-	<i>Penicilinasa de P.cepacea</i>

Anexo 3:

Extracción estandarizada para DNA bacteriano con shock térmico modificado



Anexo 04:



PERU

Ministerio de Salud

Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé"

Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

Lima, 06 de setiembre de 2018

OFICIO N° 0577-2018-OADI-HONADOMANI-SB

ABEL RAMIREZ CAMPOS

Investigador Principal

Presente. –

Exp. N° 10620-18

Tengo el agrado de dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y en relación al Proyecto de Investigación, titulado:

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE AISLADAS EN UROCULTIVOS DE PACIENTES PEDIATRICOS HOSPITALIZADOS EN EL HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO SAN BARTOLOMÉ-2018".

Al respecto se informa lo siguiente:

El planteamiento del estudio y la metodología, incluyendo el análisis estadístico propuesto para la evaluación de los resultados son apropiados para el estudio.

Conclusión

El proyecto con Expediente N°10620-18. Esta aprobado por el Comité de Ética Institucional e Investigación de manera expedita.

Nos es propicia la oportunidad para renovar los sentimientos de nuestra consideración y estima personal.

Atentamente,



HDB/vma
cc.archivo

Av. Alfonso Ugarte 825 4to piso Lima – Perú

Teléfono 2010400- anexo 162

Lima, 27 de Noviembre de 2018

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El presente documento da constancia que el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Científica del Sur, ha colaborado satisfactoriamente con el proyecto “caracterización molecular de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el **Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018**” realizado por el Bachiller en Tecnología Médica Sr. Abel Ramírez Campos durante el 2018.

Conjuntamente con el Lic. TM. Jeel Moya Salazar hemos supervisado y realizado las actividades señaladas en su proyecto de tesis respetando los cronogramas establecidos. Asimismo, referir que se le ha brindado todas las facilidades analíticas y metodológicas.

Se expide la siguiente constancia para los requerimientos solicitados,

Atentamente,



María J Pons

Investigadora

Anexo 05:

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

NÚMERO DE FICHA :

1. DATOS:

EDAD :

SEXO : () MASCULINO () FEMENINO

SERVICIO DE HOSPITALIZACION : () UCI NEONATOLOGIA

() UCI PEDIATRÍA

() UTIP

2. ESPECIE AISLADA PRODUCTORA DE BLE

•

3. CARACTERIZACION MOLECULAR

• Gen bla TEM

• Gen bla SHV

• Gen bla CTX

• Gen bla OXA

MATRIZ DE CONSISTENCIA

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS PRODUCTORAS DE BLEE NOSOCOMIALES AISLADAS DE UROCULTIVOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS EN EL HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO SAN BARTOLOME - 2018

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES DE ESTUDIO	DIMENSIONES Y ESCALA	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	METODOLOGÍA
<p>Problema general:</p> <p>¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018?</p>	<p>Objetivo general:</p> <p>Determinar la caracterización molecular de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.</p>	<p>Variable Principal:</p> <p>Caracterización molecular de BLEE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia del gen • No presencia del gen 	<p>PCR convencional</p>	<p>Tipo de Investigación:</p> <p>Observacional descriptivo</p> <p>Nivel de la Investigación:</p> <p>Prospectivo de corte transversal.</p>
<p>Problemas específicos:</p> <p>¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaTEM?</p>	<p>Objetivos específicos:</p> <p>Determinar la frecuencia del gen blaTEM implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.</p>	<p>Variable Secundaria.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gen bla TEM 	<p>Positivo Negativo)</p>	<p>PCR convencional</p>	<p>Población:</p> <p>La población la constituyen todos los aislamientos bacterianos en urocultivos de los pacientes pediátricos hospitalizados de entre 0 a 5 años de edad derivados al Servicio de Microbiología, del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé (HONADOMANI SB) para su análisis durante mayo a agosto del 2018.</p> <p>Muestra:</p> <p>La muestra la constituirán todas las enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados de 0 – 5 años en el periodo de Mayo – Agosto 2018 en el Hospital Nacional Madre Niño San Bartolomé (HONADOMANI SB). El tipo de muestreo será no probabilístico por conveniencia.</p> <p>Tipo de Muestra: No probabilística por conveniencia</p>
<p>¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaSHV?</p>	<p>Determinar la frecuencia del gen blaSHV implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Gen bla SHV 	<p>Positivo Negativo)</p>	<p>PCR convencional</p>	
<p>¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaCTX?</p>	<p>Determinar la frecuencia del gen blaCTX implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Gen bla CTX 	<p>Positivo Negativo)</p>	<p>PCR convencional</p>	
<p>¿Cuáles serán las características moleculares de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según frecuencia del gen blaOXA?</p>	<p>Determinar la frecuencia del gen blaOXA implicado en la resistencia a betalactámicos en enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Gen bla OXA 	<p>Positivo Negativo)</p>	<p>PCR convencional</p>	
<p>¿Cuáles serán las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según especie?</p>	<p>Determinar las enterobacterias productoras BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé – 2018, según especie.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Especie bacteriana 	<p><i>E.Coli</i></p> <p><i>K. Pneumoniae</i></p> <p><i>K. oxitoca</i></p> <p><i>Proteos mirabilis</i></p> <p><i>S. marcescens</i></p>	<p>Vitek</p>	
<p>¿Cuáles serán las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según sexo?</p>	<p>Determinar las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé- 2018, según sexo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo 	<p>Masculino Femenino</p>	<p>Ficha de recolección de datos</p>	
<p>¿Cuáles serán las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según área de hospitalización?</p>	<p>Determinar las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes aisladas en urocultivos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé - 2018, según el área de hospitalización.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Procedencia 	<p>UCI-Neo</p> <p>UCI- Pediátrica</p> <p>UTIP)</p>	<p>Ficha de recolección de datos</p>	