



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

GENES *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE
PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA
(Modalidad: Tesis de Grado)

ANA KARINA CASTRO Y VICMARYS CORDERO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

Cumaná, 2011

INDICE

DEDICATORIA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iv
AGRADECIMIENTO	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Aislados bacterianos	7
Viabilidad de los aislados	7
Identificación bacteriana	7
Susceptibilidad antimicrobiana	8
Detección de los genes <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{TEM}	9
Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	9
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	10
Análisis de Datos	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	41
HOJA DE METADATOS	42

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso, por colocar una luz, que ilumina mi sendero, dándome paciencia, fortaleza para poder superar todos los obstáculos y llenarme de fe para llegar a la meta propuesta.

Mis padres, por la comprensión y el apoyo incondicional que me han brindado en todo momento, este esfuerzo es por ustedes y para ustedes. Los amo.

Mis hermanos, por servirme de inspiración y ejemplo de que si se pueden alcanzar los sueños, y hacerme comprender que una familia unida puede vencer todas las dificultades.

Mi novio Luis Bejarano, por su apoyo e incondicional compañía en todo momento, aportando su granito de arena para que este sueño se hiciera realidad.

Mis amigos, en especial a los del lab. de Bacteriología Clínica y el Centro de Estudiantes, por esa mano amiga, quienes a lo largo de esta carrera demostraron su amistad sincera y espíritu de compañerismo. Esta vida no sería igual sin ustedes.

A todos mil gracias.

Vicmarys Cordero.

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso, por permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida, estar siempre a mi lado dándome fortalezas e iluminando mi mente, mi meta anhelada alcanzada gracias a tí.

Mis padres, en especial a ti mi madre hermosa Ana Esperanza, fuiste la persona que me inspiró cada día a seguir adelante dándome ese apoyo que necesitaba en mis momentos de tristeza; Juan Carlos Castro, Yennys Coronado por estar a mi lado ayudándome y comprendiéndome en cada instante, gracias a todos ustedes obtuve mi estabilidad emocional, económica y sentimental para alcanzar este logro que no hubiese podido hacer realidad sin su presencia.

A mi abuela Westalia, por tener la dicha de tenerte a mi lado a toda hora y recibir tus caricias que fueron de inspiración para mi redacción, a ti abuela Arcadia que aunque estés lejos siempre estas presente en mi, las adoro.

Hermana, espero esto te sirva de inspiración para seguir adelante en tus estudios y lograr tu meta propuesta; Susy gracias por estar siempre a mi lado acompañándome en mis noches de desvelo, las quiero. A toda mi familia por estar siempre pendiente de mí.

Mis fieles amigos, Carlos Chávez y Mónica Balarezo, aunque estemos lejos, sus palabras de aliento fueron mi inspiración, gracias por su incondicionalidad a toda hora. A tí, que aunque ya no estés a mi lado, los años que estuvimos juntos ayudaron a forjar mi carrera con felicidad.

A mi novio Efraín Salazar, gracias por acompañarme en mis momentos difíciles, siempre estuviste cuando desesperaba, tu presencia fue de mucha ayuda.

Gracias a todos mis amigos, al centro de estudiantes, a mi equipo de bacteriología clínica por prestarme su ayuda, fueron un gran soporte en mí, de verdad mil gracias a todos.

Ana Karina Castro.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesora Prof. Militza Guzmán, por brindarme su incondicional ayuda y dedicación, por el conocimiento aportado y las palabras de estímulo que reforzaron la realización de nuestro trabajo de investigación. Es un ángel en mi camino.

Mi compañera de tesis Ana Castro, con quien compartí los arduos momentos que conllevan la realización de un trabajo de grado. Nunca te olvidaré, buena vibra.

Mi Prof. y gran amigo Henry De Freitas, por su comprensión y espíritu de servicio al estudiante.

A todos mil gracias.

Vicmarys Cordero.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesora Prof. Militza Guzmán, por ser la persona que me dió el apoyo incondicional y seguridad que tanto necesitaba para lograr mi meta trazada, gracias por impartirme sus conocimientos, siempre serás mi estrella guía.

Mi compañera de tesis Vicmarys Cordero, siempre juntas entendiéndonos, en las buenas y malas salimos adelante, nunca te olvidare amiga.

Ana Karina Castro.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de <i>E. coli</i> , aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, asistidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.	12
Tabla 2. Frecuencia de <i>E. coli</i> , aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria según el tipo de muestra, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.....	13
Tabla 3. Frecuencia de <i>E. coli</i> aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, según el servicio, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009	15
Tabla 4. Frecuencia de cepas de <i>E. coli</i> productoras de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.	20
Tabla 5. Distribución porcentual de cepas de <i>E. coli</i> productoras de β -lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.	21
Tabla 6. Distribución porcentual de cepas de <i>E. coli</i> productoras de β -lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.	22
Tabla 7. Caracterización de las cepas de <i>E. coli</i> provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en los diferentes servicios del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”	25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribución porcentual de la resistencia antimicrobiana a los β -lactámicos presentadas por las cepas de *E. coli* aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009. CF: cefalotina, FEP: cefepima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, ATM: aztreonam. IMP: imipenem, MER: meropenem, AMP: ampicilina. 16
- Figura 2. Distribución de genes codificadores de enzimas β -lactamasas de espectro extendido, detectados en las cepas de *E. coli*, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009. *bla*_{SHV}: gen que codifica a la enzima β -lactamasa SHV, *bla*_{TEM}: gen que codifica a la enzima β -lactamasa tipo TEM..... 23
- Figura 3. Producto de PCR obtenido de la amplificación del gen *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en las cepas de *E. coli*. A. Cepas con el gen *bla*_{TEM}. Líneas 1 a 11. M : Marcador de peso molecular (GeneRuler, invitrogen) (1kb), *K. pneumoniae* M1 (control positivo), *E. coli* J62-2 (Control negativo), 01, 03, 05, 06, 12, 13, 14, 15, 16. B. Cepas con el gen *bla*_{SHV}. Líneas 1 a 5. M : Marcador de peso molecular (GeneRuler, invitrogen) (1kb), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (control positivo), *E. coli* J62-2 (Control negativo), 26, 27, 30. 24

RESUMEN

Se evaluó la presencia de los genes que codifican enzimas β -lactamasas tipo TEM y SHV en aislados de *Escherichia coli*, para ello se utilizaron 135 cepas identificadas inicialmente como bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa, provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria internados en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009. La identificación se realizó empleando los protocolos convencionales para bacterias Gram negativas fermentadoras. La susceptibilidad antimicrobiana y la producción de β -lactamasas se realizaron por el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos para enterobacterias establecidos por el Instituto Estándar de Laboratorios Clínicos (2010). La detección de genes codificadores de β -lactamasas se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El estudio arrojó que 22,96% de las cepas se identificaron como *E. coli* y el 77,04% resultaron otro tipo de enterobacterias; el 97,78% de las cepas de *E. coli* estudiadas fueron resistentes a ampicilina y 77,42% a cefalotina, mientras que, la amoxicilina/ácido clavulánico fue inactiva en el 25,81%, cefotaxima (22,58%), ceftazidima (16,13%) y 12,90% para aztreonam y cefepima respectivamente. La frecuencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido fue de 22,58%. Un 29,03% de los aislados mostró la presencia del gen *bla*_{TEM} y 9,68% el gen *bla*_{SHV}. La presencia de cepas de *E. coli* productoras de enzimas β -lactamasas representa un riesgo para el centro hospitalario, ya que este mecanismo de resistencia puede diseminarse hacia otros géneros y familias bacterianas, comprometiendo el éxito terapéutico.

INTRODUCCIÓN

Se denomina infección intrahospitalaria (IIH) a toda infección que se desarrolla durante la estadía de un paciente en un centro hospitalario, se originan en un periodo de 48 a 72 horas después que un paciente ha ingresado al centro, o dentro de los 14 días después de que el paciente ha egresado del mismo. Las IIH representan una de las complicaciones más comunes que afectan al paciente hospitalizado (Horan *et al.*, 2008).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente, el 5,00% de los pacientes que ingresan a un centro hospitalario pueden contraer una IIH (Cutie *et al.*, 2003). Estudios microbiológicos han demostrado que el 50,00% de estas infecciones son causadas por bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, no obstante, la frecuencia de una especie en particular varía según la flora microbiana de cada hospital. Dentro de las especies que se aíslan frecuentemente se encuentran *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Albar *et al.*, 1993; Smith, 1999).

E. coli ha sido clasificada dentro del reino Procariota, orden Enterobacteriales, familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichiae* y género *Escherichia*. Estos microorganismos son bacilos Gram negativos que miden de 1,00 – 3,00 μm de largo, anaerobios facultativos, móviles, con excepción de algunas variantes que son inmóviles, en su mayoría no son capsuladas, no forman esporas y crecen bien en los medios comunes de laboratorio (Koneman *et al.*, 2008).

E. coli forma parte de la flora normal del intestino, la piel y las mucosas, pero en ocasiones es considerada patógena, capaz de producir una amplia variedad de cuadros clínicos, como infección del tracto urinario, de heridas postoperatorias, infección respiratoria o bacteriemias primarias. Globalmente, son las

responsables de un tercio de las bacteriemias, de más de la mitad de las infecciones entéricas y de la mayoría de las infecciones urinarias (Eisenstein y Zaleznik, 2000).

La frecuencia de IIH causada por cepas de *E. coli* resistente a los antimicrobianos, se han incrementado en las últimas décadas, reflejándose con mayor incidencia en las áreas de hospitalización, especialmente, en las unidades de cuidados intensivos, situación que se manifiesta en los altos costos hospitalarios, complicaciones médicas y en las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Livermore *et al.*, 2007).

Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antimicrobianos, así mismo, un antimicrobiano puede ser inactivado por distintos mecanismos. El mecanismo más común de adquirir resistencia bacteriana es el intercambio de material genético entre poblaciones bacterianas, el cual permite la adquisición de características fenotípicas que originan la aparición de cepas bacterianas con nuevos fenotipos (Ariffin *et al.*, 2004; Byarugaba, 2004).

Los β -lactámicos, por ser altamente eficaces, tener baja toxicidad y ser de amplio espectro, son los antimicrobianos que comúnmente se emplean en el tratamiento de las IIH causadas por bacilos Gram negativos; sin embargo, el éxito de los mismos ha sido afectado por los diversos mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias (Giamarellou, 2005; Denton, 2007).

En las bacterias Gram negativas existen diversos mecanismos que le proporciona resistencia a los β -lactámicos, entre los más comunes se encuentran, alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, disminución en la afinidad de los sitios blancos de la droga o de las proteínas fijadoras de penicilinas y la producción de enzimas β -lactamasas (Venezia *et al.*, 2005). La producción de enzimas β -lactamasas constituye el principal

mecanismo de resistencia presente en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* contra los β -lactámicos (Owens y Rice, 2006; Paterson, 2006).

Las β -lactamasas son un grupo complejo de enzimas con propiedades diferenciales de acuerdo al sustrato que hidrolizan. Según la localización del gen que codifica a la β -lactamasa pueden ser cromosómicas o plasmídicas. Las β -lactamasas cromosómicas forman parte del genoma bacteriano y se mantienen presentes en bacterias de una misma especie, mientras que las codificadas por plásmidos pueden encontrarse en diferentes especies bacterianas, además, poseen la propiedad de diseminarse mediante el proceso de conjugación bacteriana a cepas relacionadas o no, confiriéndole de esta manera a la bacteria que lo recibe un perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana múltiple (Gniadkouski, 2001).

Las enzimas β -lactamasas han sido clasificadas en base a su punto isoeléctrico, especificidad de sustrato y secuencia de aminoácidos, pero la clasificación más utilizada es la de Bush *et al.* (1995), donde se emplean los criterios de funcionalidad clásicos con los aspectos moleculares, el grupo 2b de esta clasificación incluye a las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, también conocidas como β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), presentes generalmente en bacilos Gram negativos, las cuales, debido a mutaciones puntuales ocurridas en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos, dando origen a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas que pertenecen a la clase molecular A de Ambler y se incluyen dentro del grupo 2be propuesto en la clasificación (Bush *et al.*, 1995).

Se han descrito más de 100 variantes de BLEE tipo TEM y SHV (Jacoby y Bush, 2009), lo que genera una idea de la gran diversidad del proceso evolutivo

que han presentado estas enzimas. En las enterobacterias se han descrito otros tipos de BLEE (CTX-M, PER, GES y OXA), las cuales presentan orígenes diferentes y una escasa relación estructural con las TEM y SHV (Walsh *et al.*, 2005; Máttar y Martínez, 2007).

Las BLEE presentan de 1 a 4 sustituciones de aminoácidos comparados con las enzimas originales, estas mutaciones puntuales provocan cambios en la configuración alrededor del sitio activo de la enzima, aumentando el espectro de su actividad hidrolítica y reduciendo la actividad de un amplio rango de β -lactámicos de espectro extendido, que incluyen a las cefalosporinas de tercera generación, al aztreonam y a cefepima, no siendo activas contra los carbapenemas (Bradford, 2001; Rice, 2001).

Las BLEE se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico (AC), propiedad que ha permitido su detección fenotípica a través de la producción de un fenómeno sinérgico, al aproximar los discos de cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima) y cuarta generación (cefepima) a 15,00 mm del AC. La identificación definitiva de los distintos genes que codifican BLEE se realiza mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Blásquez *et al.*, 1993; Murria *et al.*, 2003).

Ryoo *et al.* (2005) realizaron una investigación para determinar la diseminación de β -lactamasas tipo SHV-12, TEM y CTX-M, en cepas intrahospitalarias de *E. coli* y *K. pneumoniae*, aislada de 12 hospitales de Corea. En el estudio se reportó la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV12} como los más frecuentes entre los aislados de *E. coli*.

Subramaniam *et al.* (2006), en un estudio hecho en Malasia a 11 cepas de *E. coli*, encontraron que todas fueron fenotípicamente productoras de BLEE y

genotípicamente presentaban la enzima SHV-5, la cual estaba codificada en un plásmido conjugativo de alto peso molecular.

Tsering *et al.* (2009), en la India, realizaron una investigación para detectar la producción de BLEE en 1 489 bacilos Gram negativos, aislados de muestras de pacientes con IIH. Del total de cepas, 34,00% resultaron positivas para BLEE.

Pitout *et al.* (2009) realizaron un estudio con la finalidad de caracterizar molecularmente cepas de *E. coli* productora de BLEE, aisladas de 67 pacientes con bacteriemias en la ciudad de Alberta, Canadá. Los resultados revelaron que el 90,00% de los aislamientos presentaron el gen *bla*_{CTX-M} y un 3,00% y 7,00% los genes *bla*_{TEM-52} y *bla*_{SHV-2}, respectivamente.

Araque *et al.* (2000), en la ciudad de Mérida, Venezuela, ejecutaron un estudio con 12 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de los Andes. Los resultados revelaron la presencia de un plásmido de alto peso molecular que porta el gen *bla*_{SHV-5}, el cual codifica resistencia para β -lactamasas de primera y tercera generación.

Torres *et al.* (2006) llevaron a cabo la detección fenotípica y molecular de BLEE a 224 aislados de enterobacterias, provenientes de ocho Centros de Salud en Caracas. El 91,10% de las cepas analizadas fueron productoras de BLEE. El análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM) para ceftazidima, cefotaxima, cefepima y aztreonam mostró una mayor proporción de cepas productoras de BLEE con actividad ceftazidimasa, compatibles con las familias SHV y/o TEM, y en menor proporción pertenecientes a la familia CTX-M, resultando un predominio de SHV-BLEE (72,00%) y CTX-M-BLEE (21,10%).

Guzmán y Alonso (2009), en un trabajo realizado con el propósito de detectar

los tipos de genes que codificaban BLEE en 25 cepas intrahospitalarias de *K. pneumoniae*, aisladas del Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, Cumaná, reportaron la presencia de BLEE en el 76,00% de las cepas, las cuales presentaron susceptibilidad disminuida a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam. El gen que codificaba la enzima responsable de conferir resistencia a los β -lactámicos fue el *bla*_{SHV-5-2a}, encontrado en un plásmido de alta masa molecular.

La presencia y diseminación de enzimas β -lactamasas es considerada un problema difícil de abordar, que trae como consecuencia limitaciones en el tratamiento de los pacientes hospitalizados, debiendo recurrir a otras alternativas terapéuticas y a sus consecuentes efectos adversos. Partiendo del hecho que la producción de β -lactamasa en enterobacterias es el principal mecanismo de resistencia contra los β -lactámicos, el presente trabajo permitirá identificar la producción de β -lactamasas y la presencia de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} en aislados de *E. coli*, procedentes de pacientes asistidos en diferentes áreas médicas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” de la ciudad de Cumaná.

METODOLOGÍA

Aislados bacterianos

Se evaluaron un total de 135 aislados identificados como bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales fueron recolectados, entre agosto de 2008 y diciembre de 2009, por el personal del laboratorio de bacteriología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Los mismos se obtuvieron a partir de muestras de sangre, orina y secreciones de pacientes internados en las áreas de cuidados intensivos, medicina, cirugía y retén, con diagnóstico de IIH e indicación de cultivo y antibiograma. Los aislados se encontraban conservados en el Laboratorio de Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis.

Viabilidad de los aislados

Con el propósito de determinar la viabilidad de los aislados, los mismos se sembraron en caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 35°C durante 18 horas de incubación. Luego, se sembraron en una placa con agar MacConkey (AMC) y después de 18 horas se observó el crecimiento bacteriano y se confirmó la pureza. En caso de no observarse el cultivo puro, se valoraron las colonias lactosa positiva, realizando nuevos subcultivos en AMC hasta obtener la pureza.

Identificación bacteriana

A partir del AMC se valoraron y seleccionaron las colonias con las siguientes características: grandes (2-4 mm), redondas, lisas, elevadas o aplanadas, de consistencia blanda y de color fucsia (fermentadoras de lactosa). A cada una de las colonias seleccionadas se le realizó un extendido para colorear con la tinción de Gram y comprobar la presencia de bacilos Gram negativos (Huccker y Coon, 1923).

A partir de un crecimiento puro en AN se realizaron las pruebas para la identificación del género y la especie, empleando las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de la oxidasa, fermentación de azúcares, utilización del citrato, producción de enzima ureasa, vía de utilización de la glucosa, motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina y de la lisina, fermentación de manitol y sacarosa. Todas las pruebas se leyeron a partir de las 18 horas de incubación (Koneman *et al.*, 2008).

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco sugerido por Bauer *et al.* (1966), siguiendo los lineamientos para enterobacterias propuesto por el “Instituto de Estandarización de Laboratorios Clínicos” “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI, 2010). Se preparó una suspensión bacteriana de los aislados en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas, sembrado en agar tripticasa de soya (ATS), ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Una vez obtenida la turbidez respectiva, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton (Himedia) contenido en placas de Petri, dejando secar para proceder a colocar los discos de los agentes antimicrobianos a ensayar: ampicilina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), (todos marca OXOID). La colocación de los discos en la placa de Mueller Hinton se hizo tomando en consideración las plantillas sugeridas por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rengel” para el antibiograma estandarizado (Anexo 1). Las placas se incubaron a 35°C durante 18 horas en ambiente de aerobiosis y, posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición empleando una regla milimetrada. Los halos de inhibición

presentados por cada antimicrobiano se reportaron de acuerdo con los criterios de interpretación propuestos por el CLSI (2010).

La presencia de BLEE se determinó fenotípicamente mediante la observación de una distorsión en el halo de inhibición entre los discos de cefotaxima o ceftazidima y el AC, mientras que la disociación de los halos entre AMP y AC se utilizó para estimar la presencia de una BLEA.

Como control de calidad se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 y, como control positivo de BLEE, la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Detección de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}

Los genes se determinaron mediante la técnica de PCR, empleando oligonucleótidos específicos que hibridan en regiones conservadas para todos los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}.

Los oligonucleótidos SHV-F: 5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3' y SHV-R: 5'-CGT TTC CCA GCG GTC AAG G-3', permitieron amplificar un producto de 840 pb (Brisse y Verhoef, 2001), y TEM-F: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3' y TEM-R: 5'-CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG-3 un producto de 867 pb (Eckert *et al.*, 2004).

Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit de extracción Genomic Wizard (Promega); para esto se tomaron 1,50 ml de caldo LB, con un crecimiento previo de 24 horas, los cuales se centrifugaron durante 5 minutos a 5 000 g. Luego, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en

450 µl de solución de lisis de núcleo, mezclándose suavemente. Se añadieron 3 µl de solución de ARNasa, mezclándose de 5 a 6 veces por inversión para incubarlas luego a 80°C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron 150 µl de solución precipitante de proteínas, y se mezcló bien con vortex por 20 segundos. Se incubó en hielo por 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos, a 4°C y se transfirió el sobrenadante, cuidadosamente, a un tubo limpio que contenía 600 µl de isopropanol, mezclándose bien pero lentamente y centrifugando a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C. Después se decantó el isopropanol, seguidamente se agregaron 600 µl de etanol al 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos. Luego se decantó el etanol y se dejó secar a 37°C, con cuidado de no exceder el secado. Posteriormente, se resuspendió en 50 µl de solución de rehidratación del ADN y se incubó a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Por último, se guardó a -20°C hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para las reacciones de PCR se utilizaron las siguientes condiciones: 12,5 µl de la mezcla Master MIX 2X (Promega), 2 µl de los oligonucleótidos específicos en cada caso, para una concentración final de 1 µmol.l⁻¹, 2,5 µl de ADN y agua hasta completar un volumen total de reacción 25 µl (Eckert *et al.*, 2004; Brisse y Verhoef, 2001).

Las condiciones de reacción fueron 94°C por cinco minutos, 94°C por un minuto, 45°C por un minuto, 72°C por dos minutos y medio durante 35 ciclos, con una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Como control negativo para todas las reacciones de PCR, se empleó la cepa *E. coli* J62-2, la cual no presenta los genes y un segundo control negativo que consistió en mezclar todos los componentes sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen.

Como control positivo del gen *bla*_{SHV} se empleó la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603, la cual presenta la enzima SHV-18. Como control positivo del gen *bla*_{TEM} se empleó la cepa de *K. pneumoniae* M1, la cual presenta la enzima TEM-1.

Los productos amplificados se analizaron en una corrida electroforética; para esto se preparó un gel de agarosa al 2,00% con buffer Tris/Borato/EDTA o TBE 1X (45 mmol.l⁻¹ tris-borato y 1 mmol.l⁻¹ EDTA [pH 8,0]). Este buffer se utilizó, además, para realizar las migraciones electroforéticas, agregándole la cantidad adecuada a una cámara de electroforesis Sigma, modelo EC360M. Para las corridas electroforéticas se empleó un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25% y sacarosa 0,25%), el cual se mezcló con el producto amplificado en proporción 1:1 y se colocó en el gel de agarosa. La determinación del tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se observó por comparación con el marcador de masa molecular de 1 kb (GeneRuler, invitrogen), colocado en el gel junto a las muestras.

Los geles fueron corridos en buffer TBE 1X a 80 voltios durante una hora y media, aproximadamente, luego se colorearon con bromuro de etidio (0,5µg.ml⁻¹) y se observaron con un transiluminador de luz ultravioleta para, finalmente, ser fotografiados y analizados.

Análisis de Datos

Los resultados obtenidos se analizaron a través de tablas y gráficos de distribución porcentual. Para asociar el perfil hidrolítico con la presencia o no de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, se empleó un análisis de Chi cuadrado con la corrección de Yates (Steel y Torrie, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las IIH constituyen un gran problema de salud pública, por su elevada frecuencia, severidad y altos costos (Flores *et al.*, 2008). Cada año, a nivel mundial, las IIH aportan un número importante de casos a las tasas de morbilidad y mortalidad. Dentro de los patógenos causantes de IIH que se aíslan con mayor frecuencia se encuentran los bacilos Gram negativos, como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Ducel *et al.*, 2002).

La tabla 1 muestra la frecuencia de cepas de *E. coli* aisladas en los pacientes con IIH; de un total de 135 cepas se encontró que el 22,96% pertenecían a *E. coli* y el 77,04% a otras enterobacterias.

Tabla 1. Frecuencia de *E. coli*, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, asistidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.

Bacterias	Número de cepas	Frecuencia (%)
<i>E. coli</i>	31	22,96
Otras Enterobacterias	104	77,04
Total	135	100,00

E. coli es un importante patógeno intrahospitalario, que puede causar elevados porcentajes de morbimortalidad en la población, especialmente en pacientes de edad pediátrica (Blanco *et al.*, 2003). La hospitalización y el empleo de antimicrobianos favorecen su capacidad de colonización, pudiendo desencadenar un proceso infeccioso, determinado por su comportamiento como agente oportunista, no obstante, algunas cepas de *E. coli* pueden causar distintos tipos de infecciones debido a la presencia de determinantes como adhesinas, tal es el caso de las cepas de *E. coli* uropatógenas (Ducel *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2003).

Diversos investigadores han reportado a *E. coli* como agente causante de infecciones. Sarmiento *et al.* (2001), en un estudio realizado para determinar los agentes más frecuentes en pacientes con pie diabético en el hospital IVSS Dr. Rafael Calles Sierra, Punto Fijo, estado Falcón, reportaron que el microorganismo con mayor prevalencia fue *E. coli* con un 22,00%, seguido de *P. aeruginosa* y *S. aureus* con 18,00% respectivamente. Vera (2005), en su trabajo sobre la prevalencia de microorganismos causantes de infecciones, realizado en pacientes con IIH internados en la clínica de la caja petrolera de la ciudad de La Paz, Bolivia, reportó que el principal microorganismo causante de dicha infección fue *E. coli* con un 16,00%. Así mismo, Flores *et al.* (2008), en pacientes con infecciones intrahospitalarias del tracto urinario (ITU), en Lima, Perú, encontró una frecuencia de *E. coli* de 37,71%.

Dentro de los procesos infecciosos que produce *E. coli* se encuentran las infecciones urinaria, del tracto respiratorio, piel, tejidos blandos, cavidad abdominal, bacteriemia y septicemia (Astete *et al.*, 2004; Peralta *et al.*, 2004).

En la tabla 2 se observa la frecuencia de *E. coli*, según el tipo de muestra de donde fue aislada. El 58,06% de las cepas se aisló de muestras de secreción, 25,81% de muestras de orina, 12,90% de esputo y 3,23% de líquidos estériles.

Tabla 2. Frecuencia de *E. coli*, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria según el tipo de muestra, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.

Muestra	Número de cepa	Frecuencia (%)
Secreción*	18	58,06
Orina	8	25,81
Esputo	4	12,90
Líquido Estériles	1	3,23
Total	31	100,00

*Secreciones respiratorias, de heridas quirúrgicas, abscesos.

La ITU representa a nivel mundial, una de las causas más frecuentes de IIH con porcentajes de frecuencia de 40,00%, destacándose el aislamiento de *E. coli* en el 90,00% de los casos, sin embargo, su presencia varía de acuerdo con las características de los pacientes (Astete *et al.*, 2004).

Las infecciones de heridas ocupan el tercer lugar dentro de las IIH, con cifras de 14,00% a 16,00%, dentro de éstas se pueden mencionar las infecciones de heridas quirúrgicas, con 24,00%, y en menor frecuencia las infecciones respiratorias con un 10,00% (Peralta *et al.*, 2004).

Diversos estudios han estado orientados a establecer las posibles causas por las cuales los pacientes en un centro hospitalario se infectan, entre algunas de ellas se encuentran las condiciones ambientales no favorables como: poca ventilación, el número de pacientes que excede la capacidad de las instalaciones, el estrato socioeconómico de los mismos y la mala nutrición; otros factores de riesgo lo representa el personal asistencial del hospital, debido a que no siempre siguen rigurosamente las técnicas de esterilidad y lavado de manos (Byarugaba, 2004).

En la presente investigación se encontró que el mayor número de cepas fueron aisladas de secreciones, seguido de muestras de orina. Al respecto, Espinoza *et al.* (2007), en un estudio realizado en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de la Habana, encontraron frecuencias superiores al 90,00% de *E. coli* en cultivos de secreciones y de 56,50% en muestras de orinas.

La distribución porcentual de los aislados según el servicio, indica que *E. coli* se presentó con mayor frecuencia en el área de medicina y pediatría con 19 y 6 casos (Tabla 3).

Las infecciones por *E. coli* se han reportado en todos los servicios de un centro hospitalario, pero su mayor frecuencia se ha presentado en la UCI (Molina *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2007). En esta investigación no se encontró aislamiento de *E. coli* en la UCI, aspecto que puede estar influenciado por el muestreo realizado, en el cual por razones desconocidas no se recolectaron cepas procedentes de UCI durante el periodo agosto – diciembre 2008.

Tabla 3. Frecuencia de *E. coli* aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, según el servicio, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009

Servicio	Número de cepa	Frecuencia (%)
Medicina	19	61,29
Pediatría	6	19,35
Cirugía	3	9,68
Reten	2	6,45
Emergencia	1	3,23
Total	31	100,00

Castro y Lage (2005), en un estudio realizado en Porlamar, Estado Nueva Esparta, durante el periodo enero – junio 2005, detectaron una prevalencia de *E. coli* de 14,00% en el área de medicina y 29,00% en cirugía. García *et al.* (2007) reportaron que el microorganismo más frecuente aislado de IIH en Navarra, España, durante el año 2005, fue *E. coli* con 21,20%, aislada principalmente del área de medicina (44,4%), cirugía (28,40%) y cuidados intensivos (18,90%)

En la figura 1 se muestran los porcentajes de resistencia obtenidos en las cepas intrahospitalarias de *E. coli* a los antimicrobianos ensayados. El 97,78% fue resistente a ampicilina (AMP), 77,42% a cefalotina (CF), 25,81% a amoxicilina/ácido clavulánico, 22,58% a cefotaxima (CTX), 16,13% a

ceftazidima (CAZ), y 12,90% para aztreonam (ATM) y cefepima, respectivamente.

El aislamiento frecuente de una especie bacteriana de cualquiera de los elementos que componen el ambiente hospitalario depende, entre otros factores de la resistencia bacteriana, la cual se define como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad que tiene una bacteria de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico, conjuntamente con las IIH, representan un importante problema de salud pública, que trae como consecuencia un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados, complicándose cuando un microorganismo puede presentar más de un mecanismo de resistencia y tiene la facultad de transmitirlo (Hernández, 2010).

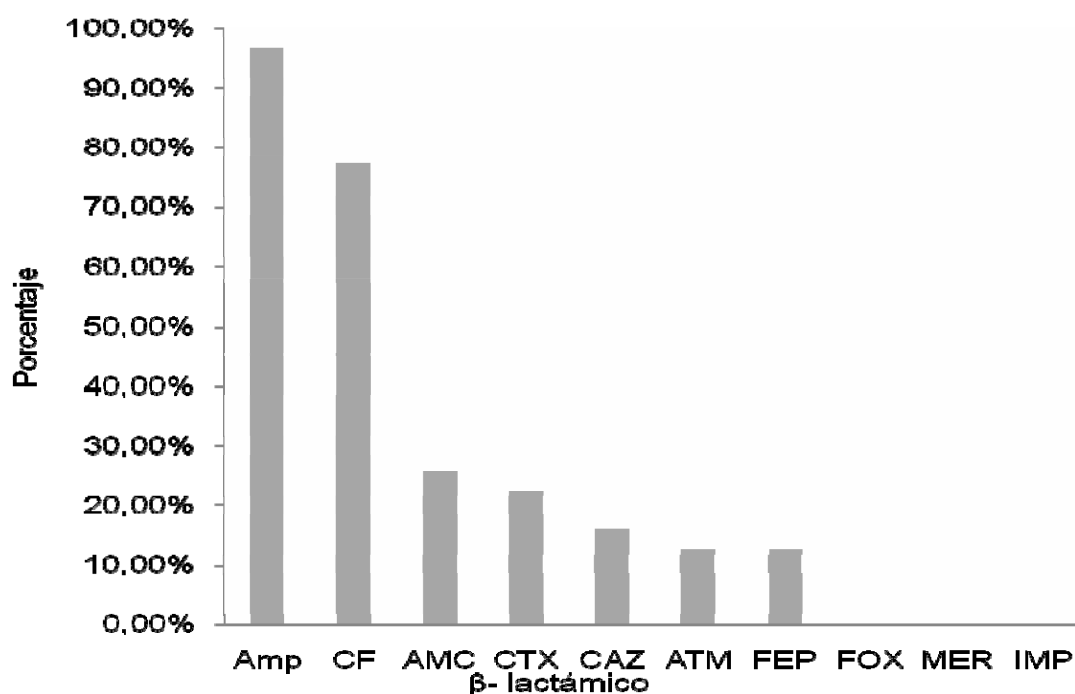


Figura 1. Distribución porcentual de la resistencia antimicrobiana a los β -lactámicos presentadas por las cepas de *E. coli* aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009. CF: cefalotina, FEP: cefepima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FOX: cefoxitina, ATM: aztreonam. IMP: imipenem, MER: meropenem, AMP: ampicilina.

Hasta hace poco, la ampicilina y cefalotina constituían los principales antimicrobianos que se utilizaban en el tratamiento de las enfermedades infecciosas los cuales habían resultado eficaces en el tratamiento de las infecciones tanto intrahospitalaria como comunitarias, debido a su bajo costo, fácil administración y pocos efectos secundarios que causa al paciente, sin embargo, su empleo continuo e indiscriminado por parte del personal médico en los distintos centros asistenciales y la falta de control en su uso por parte de la comunidad en general, ha favorecido, desde el punto de vista epidemiológico, la aparición de cepas capaces de desarrollar mecanismos de resistencia (Pérez, 1998; Sánchez *et al.*, 2008).

Según los resultados descritos en la figura 1, se puede observar que el 98,00% de las cepas presentan mecanismo de resistencia a los β -lactámicos (resistencia a ampicilina), 70,00% a dos antimicrobianos (ampicilina y cefalotina) y menos del 30,00% a siete agentes β -lactámicos. Los determinantes de resistencia presentes en las distintas cepas, pueden ser considerados como el resultado del empleo empírico, amplio y generalizado que se les ha dado a los antimicrobianos β -lactámicos.

En el estudio se encontró un 25,00% de cepas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, este hecho llama la atención, ya que hasta los momentos los porcentajes de resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico en enterobacterias habían sido muy bajos. Como es de esperarse el aumento puede deberse al uso excesivo que ha tenido el ácido clavulánico en el reestablecimiento de la actividad de la amoxicilina en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Gaspari *et al.*, 2005).

En *E. coli* existen varios mecanismos de resistencia a estas asociaciones. Uno de ellos es la producción de cantidades elevadas de la β -lactamasa tipo TEM-1,

presente generalmente en plásmidos multicopias o a la presencia de mutaciones en el promotor del gen. Otro mecanismo de resistencia lo constituyen las alteraciones de la permeabilidad por pérdida de porinas junto con una producción "normal" de TEM-1, y otra posibilidad es la hiperproducción de la β -lactamasa cromosómica ampC (Alós y Oteo, 2011).

Otros mecanismos responsables de la resistencia a los inhibidores es la producción de β -lactamasas plasmídicas del tipo OXA-1, la cual se caracteriza por ser menos sensible a la inhibición que las del tipo TEM o SHV y a las β -lactamasas conocidas como resistentes a inhibidores (IRT) que surgen de mutaciones en los genes *bla*_{TEM-1} (Alós y Oteo, 2011).

La resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y cuarta generación se presentaron con porcentajes menores al 30,00%. Después de la aparición de cepas resistentes a las penicilinas, el uso de este grupo de antimicrobianos fue la opción terapéutica en el tratamiento de las IIH causadas por bacterias Gram negativas, sin embargo, debido a la producción de enzimas tipo BLEE, se presentan actualmente a nivel mundial cepas resistentes a estos fármacos (Sánchez *et al.*, 2008).

En el presente estudio no se encontró resistencia a los carbapenemas, no obstante, se debe tener en cuenta que el uso de estos antimicrobianos deben ser controlado, ya que en cualquier momento, puede ocurrir la aparición de cepas resistentes y es posible que su dispersión ocurra rápidamente (Gaitán *et al.*, 2009).

La frecuencia de cepas resistentes y el mecanismo prevalente en las mismas va a depender del área geográfica y de las condiciones subyacentes características de cada región y de cada institución (De Champs *et al.*, 2000).

Messai *et al.* (2006), en su trabajo prevalencia de cepas clínicas de *E. coli* resistentes a β -lactámicos provenientes de un hospital de Argelia, España,

reportaron que el 69,50% presentaron resistencia a ampicilina, mientras que la tasa de resistencia más baja se encontró para amoxicilina/ácido clavulánico y cefotaxima, con 4,90% y 1,50%.

Bermúdez (2007), en un estudio realizado en cepas de *E. coli* productoras de BLEE en pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico Quirúrgico Docente Dr. "Salvador Allende", en Cuba, reportó un 97,22% de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, así mismo, demostró un 2,77% de resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico. Mientras que los carbapenemicos se presentaron sensibles.

González *et al.* (2008), en México, estudiaron 68 enterobacterias productoras de IIH, donde el 40,00% de las cepas de *E. coli* fue resistente a las cefalosporinas de tercera generación y el 24,00% a la cefalosporinas de cuarta generación.

Generalmente, el mecanismo que confiere resistencia a los β -lactámicos, excepto meropenem e imipenem son las BLEE, que por lo general están codificadas en plásmidos, los cuales tienen la potencialidad de provocar una transmisión horizontal de la resistencia (Zamora *et al.*, 1998; Comegna *et al.*, 2000).

La tabla 4 muestra la frecuencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas en los pacientes con IIH, de los cuales el 22,58% de las cepas mostraron fenotipo para BLEE.

Tabla 4. Frecuencia de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.

BLEE	Número de cepas	Frecuencia (%)
Positivo	7	22,58
Negativo	24	77,42
Total	31	100,00

Desde el punto de vista clínico, la detección de las BLEE es importante, porque de su reporte depende el éxito terapéutico al utilizar cefalosporinas de tercera generación o aztreonam, es por eso que en los pacientes donde se aíslan cepas productoras de BLEE, no es recomendable la administración de estos antimicrobianos, ya que conducirán a un fracaso terapéutico, sobre todo cuando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cefalosporinas de tercera generación oscilan entre 2-8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Winokur *et al.*, 2001).

La emergencia de enterobacterias como *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, se ha convertido en un problema creciente en el mundo, sobre todo en los hospitales latinoamericanos donde se han encontrado elevados porcentajes de cepas productoras de BLEE (Martínez *et al.*, 2005). De todos los grupos de bacterias, las enterobacterias han ocupado siempre el primer lugar en presentar producción de BLEE, destacándose *K. pneumoniae* y *E. coli*. En América Latina la incidencia de BLEE en *E. coli* presenta un porcentaje de 8,00%, mientras que el primer lugar lo ocupa *Klebsiella* con 45,00%. Otras bacterias también pueden ser productoras de BLEE como *Enterobacter*, *Salmonella* y *Pseudomonas* (Winokur *et al.*, 2001).

Al comparar los porcentajes de cepas de *E. coli* productoras de BLEE encontradas en este estudio (22,58%) con los resultados reportados por otros investigadores, se puede observar que la frecuencia se mantiene dentro del rango de 10,00% - 25,00%. Estudios de vigilancia epidemiológica realizados

en hospitales Franceses, durante los años 1996 – 2000, reportaron diversas especies productoras de BLEE, donde *E. aerogenes* fue la más frecuente, con 50,00%, seguida de *K. pneumoniae* (26,50%) y *E. coli* (25,00%) (Albertini *et al.*, 2002). Martínez *et al.* (2005), en un estudio realizado en el hospital San Jerónimo de Monterá, Colombia, determinaron la prevalencia de *K. pneumoniae* productoras de BLEE en el 36,60% de las cepas, mientras que en *E. coli* la frecuencia fue de 10,00%.

En la tabla 5 se representa la distribución porcentual de las cepas productoras de BLEE según el servicio donde fueron aisladas, en ella se puede observar que en todos los servicios se encontraron cepas de *E. coli* productoras de BLEE. La mayor frecuencia se presentó en medicina, con un 57,14%, seguido del área de cirugía, con 28,57%.

Tabla 5. Distribución porcentual de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.

Servicio	Número de cepa productora de BLEE	Frecuencia (%)
Medicina	4	57,14
Cirugía	2	28,57
Pediatría	1	14,29
Total	7	100,00

En la tabla 6 se muestra la distribución porcentual de las cepas productoras de BLEE según el tipo de muestra, en ella se puede observar que en todas las muestras se encontraron cepas de *E. coli* productoras de BLEE a excepción de la sangre. La mayor frecuencia se presentó en secreción, con un 57,14%, seguido de orina, con 28,57%.

Tabla 6. Distribución porcentual de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009.

Muestra	Número de cepa productora de BLEE	Frecuencia (%)
Secreción	4	57,14
Orina	2	28,57
Líquido Estériles	1	14,29
Sangre	0	0,00
Total	7	100,00

Las distintas cepas productoras de BLEE destacadas en este estudio, sugiere la presencia de una presión selectiva en el ambiente hospitalario, la cual puede ser consecuencia del uso empírico de los agentes β -lactámicos. Este hecho es de gran interés epidemiológico, debido a que los genes codificadores de BLEE se encuentran en moléculas plasmídicas transferibles, lo que hace posible la diseminación de los genes entre las cepas presentes en diferentes servicios.

Diferentes autores han reportado la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE con mayor predominio en las áreas de medicina y cirugía (Torres *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayor detección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE se han detectado en la UCI, estimándose una frecuencia de 10,00% a 20,00% (De Champs *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2011). En el presente trabajo no se pudo establecer la frecuencia de cepas BLEE positivas en la UCI del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, debido a que no se recolectaron muestras en ese servicio.

En la figura 2 se muestran los genes codificadores de BLEE detectados en las cepas de *E. coli*. El 29,03% presentó el gen *bla*_{TEM}, 9,68% el gen *bla*_{SHV} y el 61,29% no presentó ninguno de los genes estudiados.

Según la clasificación de Bush *et al.* (1995), existen distintas clases de β -

lactamasas, pero las frecuentes en enterobacterias son las de la clase A, grupo 2b tipo TEM, SHV y CTX, sin embargo, en el antibiograma siempre se realiza la búsqueda de enzimas como GES, ampC y metalobetalactamasas.

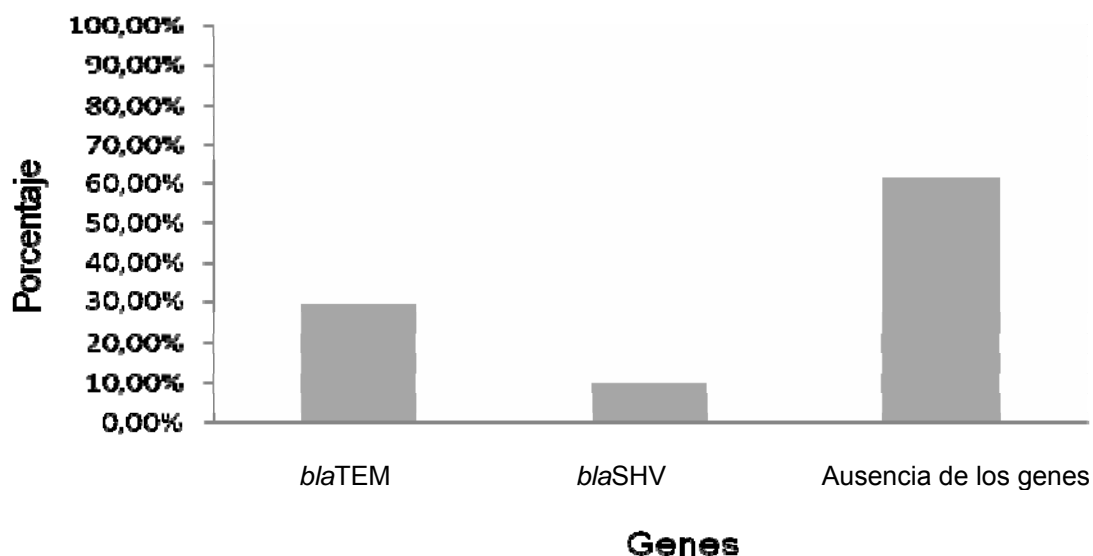


Figura 2. Distribución de genes codificadores de enzimas β -lactamasas de espectro extendido, detectados en las cepas de *E. coli*, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009. *bla*SHV: gen que codifica a la enzima β -lactamasa SHV, *bla*TEM: gen que codifica a la enzima β -lactamasa tipo TEM.

La detección fenotípica de β -lactamasas sólo permite predecir la posible clase de BLEE, dependiendo del fenómeno que se observe en el antibiograma, razón por la cual hay que recurrir a estudios moleculares para poder establecer el tipo específico de enzima. Desde el punto de vista molecular la identificación de una β -lactamasa se realiza mediante la técnica de PCR, amplificando un determinado gen (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, *bla*OXA, *bla*PER, entre otros), sin embargo, para la identificación definitiva, se tienen que secuenciar los productos (Bonnet *et al.*, 2001).

En la presente investigación se encontró el gen *bla*_{TEM} en 9 cepas (01, 03, 05, 06, 12, 13, 14, 15, 16), y el *bla*_{SHV} en tres cepas (26, 27, 30) (Figura 3).

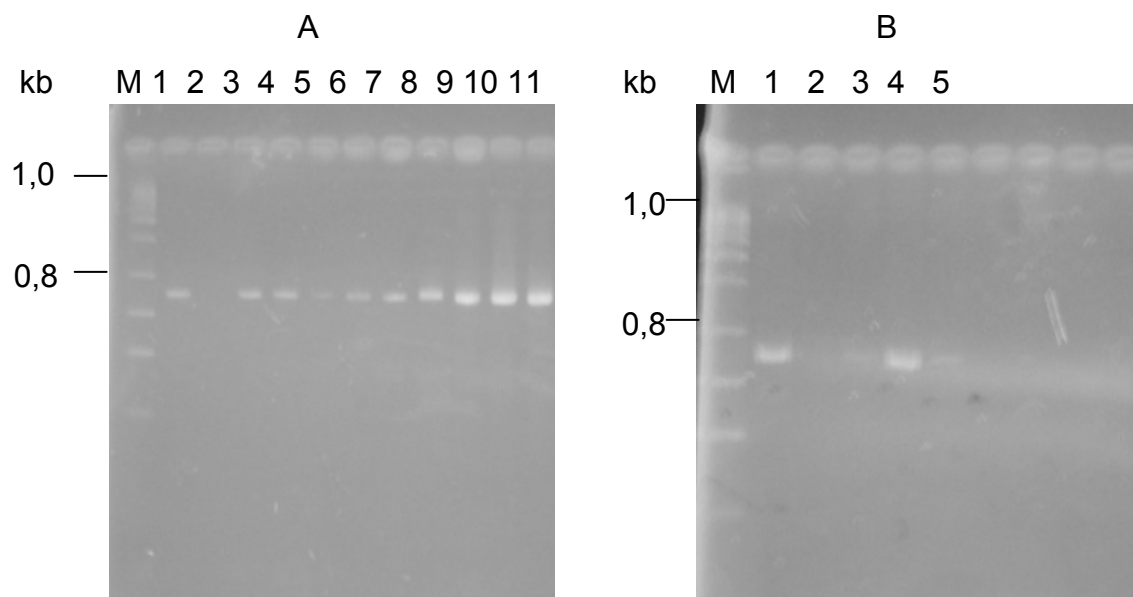


Figura 3. Producto de PCR obtenido de la amplificación del gen *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en las cepas de *E. coli*. A. Cepas con el gen *bla*_{TEM}. Líneas 1 a 11. M : Marcador de peso molecular (GeneRuler, invitrogen) (1kb), *K. pneumoniae* M1 (control positivo), *E. coli* J62-2 (Control negativo), 01, 03, 05, 06, 12, 13, 14, 15, 16. B. Cepas con el gen *bla*_{SHV}. Líneas 1 a 5. M : Marcador de peso molecular (GeneRuler, invitrogen) (1kb), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (control positivo), *E. coli* J62-2 (Control negativo), 26, 27, 30.

Entre las β -lactamasas del grupo 2b que se han identificado con mayor frecuencia en *E. coli* se encuentran las enzimas TEM-1 y SHV-1, las cuales son BLEA porque sólo logran hidrolizar a las penicilinas y cefalosporina de primera generación y las BLEE (grupo 2be) SHV-2a, SHV-5, SHV-12, enzimas que se originan a partir de las mutaciones en los genes *bla*_{SHV-1}. Estas BLEE se caracterizan por poseer un residuo de serina en su centro catalítico (Bush *et al.*, 1995).

La tabla 7 muestra la resistencia a β -lactámicos, producción de BLEE y la presencia de genes que codifican β -lactamasas en las cepas de *E. coli*. De

acuerdo a la resistencia presentada por las cepas a los β -lactámicos,

se establecieron 11 fenotipos o perfiles, los cuales fueron designados arbitrariamente con números romanos.

Tabla 7. Caracterización de las cepas de *E. coli* provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria, atendidos en los diferentes servicios del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.

Cepas	Perfil de resistencia	perfil	BLEE	Muestra	Servicio	Genes
01	AMP	I	-	Secreción	Cirugía	TEM
02	AMP	I	-	Secreción	Pediatría	---
03	AMP	I	-	Secreción	Medicina	TEM
04	AMP	I	-	Secreción	Medicina	---
05	AMP	I	-	Secreción	Medicina	TEM
06	AMP	I	-	Orina	Medicina	TEM
07	AMP	I	-	Orina	Medicina	---
08	AMP, CF,CAZ,CTX,FEP	III	+	Secreción	Medicina	---
09	AMP,CF	II	-	Secreción	Medicina	---
10	---	XII	-	Espujo	Medicina	---
11	AMP,CF	II	-	Secreción	Medicina	---
12	AMP,CF	II	-	Orina	Pediatría	TEM
13	AMP , CF, CAZ, FEP, AMC	IV	+	Orina	Medicina	TEM
14	AMP,CF	II	-	Secreción	Medicina	TEM
15	AMP ,CF, CTX, AMC, ATM	V	+	Secreción	Medicina	TEM
16	AMP,CF	II	-	Secreción	Pediatría	TEM
17	AMP,CF	II	-	Secreción	Medicina	---
18	AMC,CF	II	-	Secreción	Emerg	---
19	AMC,CF	II	-	Orina	Pediatría	---
20	AMP,CF	II	-	Espujo	Reten	---
21	AMP,CF	II	-	Secreción	Pediatría	---
22	AMP, CF,CAZ,CTX,FEP, ATM	VI	+	Secreción	Pediatría	---
23	AMP ,CF,CAZ,CTX,FEP, AMC, ATM	VII	+	Secreción	Cirugía	---
24	AMP,CF,CTX	VIII	+	Líquido	Cirugía	---
25	AMP	I	-	Orina	Reten	---
26	AMP,CF,CTX, AMC	IX	+	Orina	Medicina	SHV
27	AMP,CF	II	-	Secreción	Medicina	SHV
28	AMP,CF, AMC	X	-	Espujo	Medicina	---
29	AMP, CF, AMC	X	-	Orina	Medicina	---
30	AMP, CF, CAZ, CTX, , AMC, ATM,	XI	-	Secreción	Medicina	SHV
31	AMP, CF, AMC	X	-	Espujo	Medicina	---

Emerg: emergencia ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, CF: cefalotina, Fep: cefepima, FOX: ceftaxitin, AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, (---): sensible a todo, BLEE: β -lactamasas de espectro extendido, bla_{SHV} : gen que codifica a la enzima β -lactamasa tipo SHV, bla_{TEM} : gen que codifica a la enzima β -lactamasa tipo TEM.

Los perfiles de resistencia más frecuente fueron el perfil II y el perfil I. En el perfil I se detectaron 11 cepas resistentes a AMP, CF, de las cuales, 3 cepas presentaron el gen bla_{TEM} , una el gen bla_{SHV} y 7 cepas ninguno de los genes; mientras que el perfil I presentó 8 cepas resistentes a AMP, donde la mitad de las cepas tenían el gen bla_{TEM} y el resto ausencia de los genes.

De acuerdo a los resultados obtenidos con respecto a los perfiles I y II, se puede predecir, que posiblemente, en las cepas donde se encontró el gen bla_{TEM} sean productoras de una β -lactamasa tipo TEM-1 o TEM-2 y el gen bla_{SHV} codifique para una enzima tipo SHV-1, debido a que las cepas con este fenotipo no fueron productoras de BLEE, pero según la diferencia de los halos entre los discos ampicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, pudiera tratarse de una BLEA. La resistencia en las cepas que no presentaron genes, pudiera deberse a otro mecanismo de resistencia como disminución en la permeabilidad o alteración de porinas (Miró *et al.*, 2004).

Las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 son consecuencia de la presión selectiva ejercida por la introducción de la ampicilina en los años 1960, carbenicilina y las cefalosporinas de primera generación. La enzima TEM-1 fue detectada, por primera vez, en una cepa de *E. coli* resistente a ampicilina y debido a que normalmente se encuentra localizada en un plásmido, su diseminación se ha extendido hacia otros géneros como *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Haemophilus*, entre otros (Máttar y Martínez, 2007).

Araya *et al.* (2007), realizaron un estudio en el laboratorio de bacteriología del HSJD, Costa Rica, con el fin de identificar cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEA, durante los años 2004-2005, los resultados revelaron 33

aislamientos de *E. coli* productores de BLEA, de los cuales el 94,00% presentaban el gen *bla*_{TEM}.

En los perfiles III (cepa 08), VI (cepa 22), VII (cepa 23) y VIII (cepa 24), todas las cepas presentaron fenotípicamente BLEE, pero no amplificaron para los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, en estas cepas se descarta la presencia de enzimas SHV y TEM, pero debido a que las cepas presentan determinantes de resistencia para CTX y FEP, es posible que la enzima tipo BLEE existente en ellas sea una cefotaximasa (CTX-M), la cual no fue incluida en el presente estudio. Al respecto Torres *et al.* (2006), realizaron la detección fenotípica y molecular de BLEE en 224 aislados de enterobacterias, provenientes de ocho centros de salud de la ciudad de Caracas, Venezuela y obtuvieron que un 91,10% de cepas fueron productoras de BLEE, de las cuales, 29,50% pertenecían a *E. coli*, resistentes a FEP y CTX. El gen responsable de conferir el fenotipo de resistencia en las cepas fue *bla*_{CTX-M}.

En los perfiles IV (cepa 13) y V (cepa 15), se encontraron cepas productoras de BLEE, con presencia del gen *bla*_{TEM}. Este hecho llama la atención, ya que si bien existen β -lactamasas tipo TEM que son BLEE, en Venezuela, hasta ahora no hay reporte de este tipo de enzima, entonces, es posible, que este gen codifique para una BLEA tipo TEM, y adicional de acuerdo al perfil fenotípico, se puede predecir la presencia de otro gen que codifique para una BLEE tipo CTX-M, debido a la resistencia presentada a FEP y CTX.

Eckert *et al.* (2004), realizaron un trabajo con el propósito de determinar la diseminación de β -lactamasas tipo CTX-M en cepas de enterobacterias en Francia, ellos encontraron 16 aislamientos de *E. coli* con alto nivel resistencia a CTX y ATM, en todas las cepas el gen responsable fue el *bla*_{CTX-M-15}, adicionalmente se encontró el gen *bla*_{TEM}.

La cepa con el fenotipo IX productora de BLEE y con el gen *bla_{SHV}*, coincide para una cepa productora de betalactamasa tipo SHV, no obstante, puede darse el caso que la cepa presente una enzima SHV-1 y una CTX-M como responsable de conferir resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, (Torres *et al.*, 2006).

La cepa con el perfil XI no fue productora de BLEE y presentó el gen *bla_{SHV}*, de acuerdo a los resultados se puede estimar que la enzima codificada por el gen sea una β -lactamasa SHV tipo BLEE o BLEA, Al respecto es importante tener presente que en muchos casos puede darse una hiperproducción de la enzima SHV-1, que puede generar hidrólisis de las cefalosporinas de tercera generación sin producción fenotípica de BLEE. La hiperproducción de SHV-1 es poco frecuente y cuando se produce, en general, es debida a la existencia de varias copias del gen en el cromosoma o cambios en el promotor del gen que codifica para la enzima (Lemus, 2004).

El perfil X se caracterizó por presentar resistencia a AMP, CF y AMC. En este no se detectó BLEE ni los genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*. Los resultados permiten inferir que la resistencia a AMC puede ser producida por un mecanismo diferente a una hiperproducción de TEM, ya que no se encontró el gen, o quizás a la presencia de una enzima tipo OXA, en las cepas se descarta la existencia de la enzima AmpC, debido a que FOX se mantiene sensible.

En el presente trabajo se detectaron cepas con genes *bla_{SHV}* o *bla_{TEM}* que según el perfil de resistencia codifican para una enzima que pertenece al grupo 2b (BLEA), aspecto que es válido, debido a que los oligonucleótidos empleados en esta investigación hibridan en regiones conservadas de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*. Al respecto, hay que tener presente que el estudio completo de las secuencias nucleotídicas de los genes *bla* detectados es el que permitirá identificar las posibles mutaciones que generan los cambios de

aminoácidos responsables de alterar la estructura secundaria o las regiones implicadas en el sitio activo de las β -lactamasas de espectro ampliado.

Al asociar las variables espectro de hidrólisis con la presencia o no de los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*, detectadas en las cepas productoras de BLEE, no se encontró asociación entre la presencia de un gen con el sustrato hidrolizado, debido a que los genes se detectaron en cepas tanto sensibles como resistentes.

Bonnet (2004), señala que las enzimas BLEE tipo TEM y SHV pueden ser tipo ceftazidimasas, ya que hidrolizan con mayor eficacia ceftazidima, sin embargo, un porcentaje representativo de ellas son cefotaximasas, razón por la cual, la hidrólisis del sustrato no es un argumento evidente para caracterizar una BLEE.

En la presente investigación es de interés mencionar que muchos de los patrones fenotípicos sugieren la presencia de enzimas tipo CTX-M, las cuales son conocidas como cefotaximasas, porque se caracterizan por hidrolizar eficientemente a cefotaxima, ceftriaxona y cefepime, sin embargo, se han reportado cepas de *E. coli* productoras de CTX-M (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 y CTX-M-19) que hidrolizan ceftazidima (Bonnet 2004; Walsh *et al.*, 2005). En Venezuela las enzimas CTX-M reportadas son tipo cefotaximasa y se han identificado en cepas de *E. coli* asiladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico Universitario, Caracas (Torres *et al.*, 2006) y en cepas de *K. pneumoniae* en el HUAPA, Cumaná (Guzmán y Alonso, 2009).

CONCLUSIONES

E. coli se aisló con una frecuencia de 22,96% durante el periodo agosto 2008-diciembre 2009.

Un mayor número de pacientes internados en el área de medicina y pediatría fueron los más afectados con infecciones por *E. coli*, siendo aislada con mayor frecuencia en muestras de secreción y muestras de orina.

El mayor porcentaje de resistencia presentado por las cepas fue para ampicilina y cefalotina.

El 22,58% de las cepas de *E. coli* mostraron fenotipo para BLEE.

Los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} se encontraron con mayor frecuencia en cepas no productoras de BLEE.

RECOMENDACIONES

Fomentar el uso y selección adecuada de los agentes antimicrobianos de amplio espectro en el ambiente hospitalario, especialmente, en el área de medicina y pediatría, de tal manera de evitar el progreso y propagación de infecciones intrahospitalarias, y concientizar al personal de salud para que aplique normas higiénicas antes y después de examinar a los pacientes.

Asi mismo se recomienda que las cepas de *E. coli* recolectadas en el presente estudio se le realice la detección del *bla*_{CTX-M}, debido a que la mayoría de las cepas presentaron resistencia a CTX y FEP.

BIBLIOGRAFÍA

Albar, C.; Rabanaque, M. y Gómez L. 1993. Infección nosocomial de pacientes quirúrgicos. Problemas de medición y comparación de resultados. *Revista Española de Salud Pública*, 3: 29-37.

Albertini, M.; Benoit, C. y Rouveau, M. 2002. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a fiveyear multicentre incidence study." *Journal Hospital Infection*, 52(2): 107-113.

Alós, J. y Oteo, J. 2011. Resistencia a las asociaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas. Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles, 1: 57-69.

Araque, M.; Nieves, B.; Lauretti, L. y Rossolini, G. 2000. Molecular bases of extended-spectrum β -lactamases production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15: 37-42.

Araya, F.; Boza, C.; Arguedas, S.; Badilla, B. y García, S. 2007. Infecciones nosocomiales por bacterias productoras de β -lactamasa de espectro ampliado: prevalencia, factores de riesgo y análisis molecular. *Acta Médica Costarricense*, 49(2): 90-96.

Ariffin, H.; Navaratnam, P.; Kee, T. y Balan, G. 2004. Antibiotic resistance patterns in nosocomial Gram-negative bacterial infections in units with heavy antibiotic usage. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(1): 26-31.

Astete, S.; Flores, F.; Buckley, A. y Villarreal, J. 2004. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Intensivista*, 17(1): 1-8.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

Bermúdez, M. 2007. Aislamiento de cepas *Escherichia coli* productoras de enzimas Beta- lactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados en el HDCQ Dr. Salvador Allende en el periodo 2005-2006. <RevistaCiencia.com> (24/05/11).

Blanco, M.; Blanco, J.; Mora, A.; Rey, J.; Alonso, JM. y Hermoso, M. 2003. Serotypes virulence genes and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1351-1356.

Blásquez, J.; Blaquero, M.; Cantón, R.; Alos, I. y Blaquero, F. 1993. Characterization of a new TEM-type β -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 2059-2063.

Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48: 1-14.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.; Chanal, C.; Sirot, D. y Labia, R. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45(8): 2269-2275.

Bradford, P. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Infection Microbiology Clinical*, 14: 933-935.

Brisse, S. y Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* gene sequencing and automated ribotyping. *Institution Systemic Evolution and Microbiology*, 51: 915-924.

Bush, K.; Jacoby, G. y Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.

Byarugaba, D. 2004. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 105-110.

Castro, L. y Lage, L. 2005. Prevalencia y susceptibilidad antimicrobiana, de bacterias aisladas en muestras clínicas. Hospital Central: "Dr. Luís Ortega". Porlamar. Enero - junio 2005. Trabajo de Postgrado. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. *Performance standards for Antimicrobial Susceptibility testing*. Fifteenth Informational Supplement M100-S18. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA.

Comegna, M.; Guzmán, B.; Carmona, O.; Molina, M. y colaboradores del grupo venezolano de resistencia bacteriana. 2000. Resistencia a los antimicrobianos en Venezuela, nuevos hallazgos. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 20(1): 58-63.

Cutie, O; Rodríguez, A; Laguna, M. y Ricardo, M. 2003. "Infección intrahospitalaria como causa de muerte". "Monografías". <[http:// ww.monografias.com/trabajos14/infeccionintra/infeccionintra.shtml](http://ww.monografias.com/trabajos14/infeccionintra/infeccionintra.shtml)> (01/02/2009).

De Champs, C.; Sirot, D. y Fuster, C. 2000. A 1998 survey of extended-spectrum betalactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11): 3177-3179.

Denton, M. 2007. *Enterobacteriaceae*. *International Journal Antimicrobial Agents*, 29: 9-22.

Ducel, G.; Fabry, J. y Nicolle, L. 2002. Prevención de las infecciones nosocomiales. Organización Mundial de la Salud. Segunda edición. 1: 1-63.

Eckert, C.; Gautier, V.; Saladin-Allaard, M.; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z.; Barnaud, G.; Delisle, F.; Rossier, A.; Lambert, T.; Philippon, A. y Arlet, G. 2004. Dissemination of CTX-M- type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1249-1255.

Eisenstein, B. y Zaleznik, D. 2000. *Enterobacteriaceae*. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G. Bennett, J. y Dolin, R. (eds). New York: Churchill Livingstone. 1: 2294-2310.

Espinoza, F.; Hart, M.; Halley, M.; Pardo, A. y Martínez, A. 2007. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas del tracto urinario en pacientes de cuidados intensivos. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 76(1): 645-650.

Flores, M.; Perez, L.; Trelles, M.; Malaga, Germán.; Loza, C. y Tapia, E. 2008. Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un hospital general. *Revista Médica Herediana*, 19(2): 46-52.

Gaitán, S.; Espinal, P. y Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana, Región Caribe. 2009. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Revista Chiana del Infectología*, 26(3): 239-246.

García, M.; Chamorro, J.; Vidán, J.; Lanzeta, I.; Lameiro, I.; Urtasum, J. y Otermin, I. 2007. Prevalencia de la infección nosocomial en Navarra. Resultados agregados del estudio EPINE 2005. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(1): 89-99.

Gaspari, R.; Dickson, E.; Karlowsky, J. y Doern, G. 2005. Tendencias de la Resistencia antibiótica en los uropatógenos pediátricos. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(4): 267-271.

Giamarellou, H. 2005. Multidrug resistance in Gram - negative bacteria that

produce Extended-Spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology Infections*, 11: 1-16.

Gniadkouski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL, producing microorganism. *Infection Microbiology Clinical*, 7: 597-608.

Gonzalez, M.; Mendoza, A.; Pavón, S.; Becerril, R. y Vilchis, A. 2008. Resistencia a cefalosporina de tercera y cuarta generación en enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales y caracterización preliminar de los plásmidos involucrados. *Red de Revistas Científicas de America Latina Y el Caribe*, 15: 83-90.

Guzmán, M. y Alonso, G. 2009. Caracterización de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre - Venezuela. *Investigación Clínica*, 50: 419-431.

Hernández, E. 2010. “*Escherichia coli*” productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Trabajo de Postgrado. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Hernández, J.; Pascual, A.; Cantón, R.; Martínez, L. y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. 2000. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedad Infecciosa y Microbiología Clínica*, 21(2): 77-82.

Horan, T.; Andrus, M. y Dudeck, M. 2008. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal Infections Control*, 36: 309-332.

Huccker, G. y Coon, H. 1923. Methodos of Gram staining. *Technical bulletin New York State Agriculture Experimentation*, 93(5): 1-37.

Jacoby, G y Bush, K. 2009. "β-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes". "Lahey Clinic". <<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>>. (23/05/2010).

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Washington, W. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana.

Lemus, C. 2004. Determinación de β-lactamasas de espectro ampliado y de espectro extendido, en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas de pacientes del Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), por medio del Método de Difusión en Disco. Trabajo de Postgrado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Livermore, D.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.; Arlet, G. y Woodford, N. 2007. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 165-174.

Martínez, P.; Espinal, P.; Bustos, A. y Mattar, S. 2005. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Medicina UNAB*, 8(1): 15-22.

Máttar, S. y Martínez, P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE): Detección, impacto clínico y epidemiología. *Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1): 23-35.

Messai, y.; Naim, M.; Bakour, R.; Benhassine, T. y Paul, G. 2006. Prevalencia de la resistencia a betalactámicos en cepas clínicas de *Escherichia coli* procedentes de un hospital en Argelia. *Revista Española de Quimioterapia*, 19(2): 144-151.

Miró, E.; Vergés, C.; García, I.; Mirelis, B.; Navarro, F.; Coll, P.; Prats, G. y Martínez, L. 2004. Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa.

Enfermedad Infecciosa y Microbiología Clínica, 22(4): 204-211.

Molina, J.; Díaz, C.; Barrera, L.; De La Rosa, G.; Dennis, R.; Duenas, C.; Granados, M.; Londono, D.; Ortiz, G.; Rodríguez, F. y Jaimes, F. 2011. Perfil microbiológico de la Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos de Colombia (EPISEPSIS Colombia). *Medicina Intensivista*, 35(2): 75 – 83.

Murria, P.; Baron, E. y Jorgensen, J. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. octava edición. American Society for Microbiology (ASM).

Owens, R. y Rice, L. 2006. Hospital based strategies for combating resistance. *Clinical Infections Diseases*, 42: 173-181.

Paterson, D. 2006. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal Medicine*, 119: 20-28.

Peralta, V.; López, H. y Díaz, R. 2004. Infección en el sitio operatorio en apendiceptomizados en el servicio de cirugía del hospital “III ESSALUD. CHIMBOTE”. *Revista Gastroenterology Perú*, 24(1): 43-49.

Pérez, D. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22: 57-67

Pitout, J.; Gregson, D.; Campbell, L. y Laupland, K. 2009. Molecular characteristics of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the calgary health region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 2846-2851.

Rice, L. 2001. Evolution and clinical importance of extended spectrum β -lactamasas. *Chest*, 119: 391-396.

Ryoo, M.; Kim, E.; Hong, S.; Park, Y.; Lee, K.; Bae, I.; Song, E. Y Jeong, S. 2005. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamasas among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 698-702.

Sánchez, J.; Guillán, C.; Fuster, C.; López, R.; González, M.; Raya, C. y García, J. 2008. evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Archivo Especial de Urología*, 61(7): 776-780.

Sarmiento, G.; Bracamonte, M.; Camargo, H. y Hurazo, J. 2001. Gérmenes mas frecuentemente encontrados en pacientes con pie diabético en el hospital IVSS Dr. Rafael Calles Sierra en los años 1987 - 2000 Punto Fijo, Estado Falcón. *Revista Venezolana*, 2: 51-63.

Smith, R. 1999. *Pseudomonas aeruginosa*: infections and treatment. *Journal of Medicine*, 332: 20-24.

Steel, R. y Torrie, J. 1985. *Bioestadística, principios y procedimientos*. Editorial Mc Graw Hill. Colombia.

Subramaniam, G.; Palasubmaniam, S. y Navaratnam, P. 2006. SHV-5 extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* in Malasia. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (3): 205-207.

Toledo, L.; Montes, A.; Reyes, E. y Perozo, A. 2007. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela / Extended-spectrum β -lactamase producers isolated from hemocultures at the University Hospital in Venezuela. *Kasmera*, 35(1): 15-25.

Torres, L.; Díaz, S.; Hudson, V.; Morales, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Calvo, A.; Rodríguez, N. y Pedroza, R. 2005. Distribución de BLEE en enterobacterias aisladas en centros de salud del área Metropolitana de Caracas. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1: 53- 68.

Torres, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Benítez, M.; Domínguez, M. y Pedroza, R. 2006. β -lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(2): 80-88.

Tsering, D.; Das, S.; Adhiakari, L.; Pal, R. y Singh, T. 2009. Extended spectrum beta-lactamase detection in gram-negative bacilli of nosocomial origin. *Clinical Investigation*, 1: 87-92.

Venezia, R.; Scarano, F.; Preston, K.; Steele, L.; Root, T. y Limberger, R. 2005. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clinical Infections Diseases*, 21: 915-923.

Vera, M. 2005. Estudio de la prevalencia de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en la clínica de la caja petrolera de salud de la ciudad de La Paz durante los meses julio – diciembre 2005. Trabajo de Postgrado. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.

Walsh, T.; Toleman, M., Poirel, L. y Nordman, P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical Microbiology Review*, 18: 306-325.

Winokur, P.; Canton, R.; Casellas, M. y Legakes, N. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clinical Infections Diseases*, 32(2): 94-103.

Zamora, R.; Areu, A.; Gundián, J.; Manresa, R.; Sánchez, J. y Morales, R. 1998. Cefalosporinas. *Acta Médica*, 8(1): 40-47.

ANEXOS

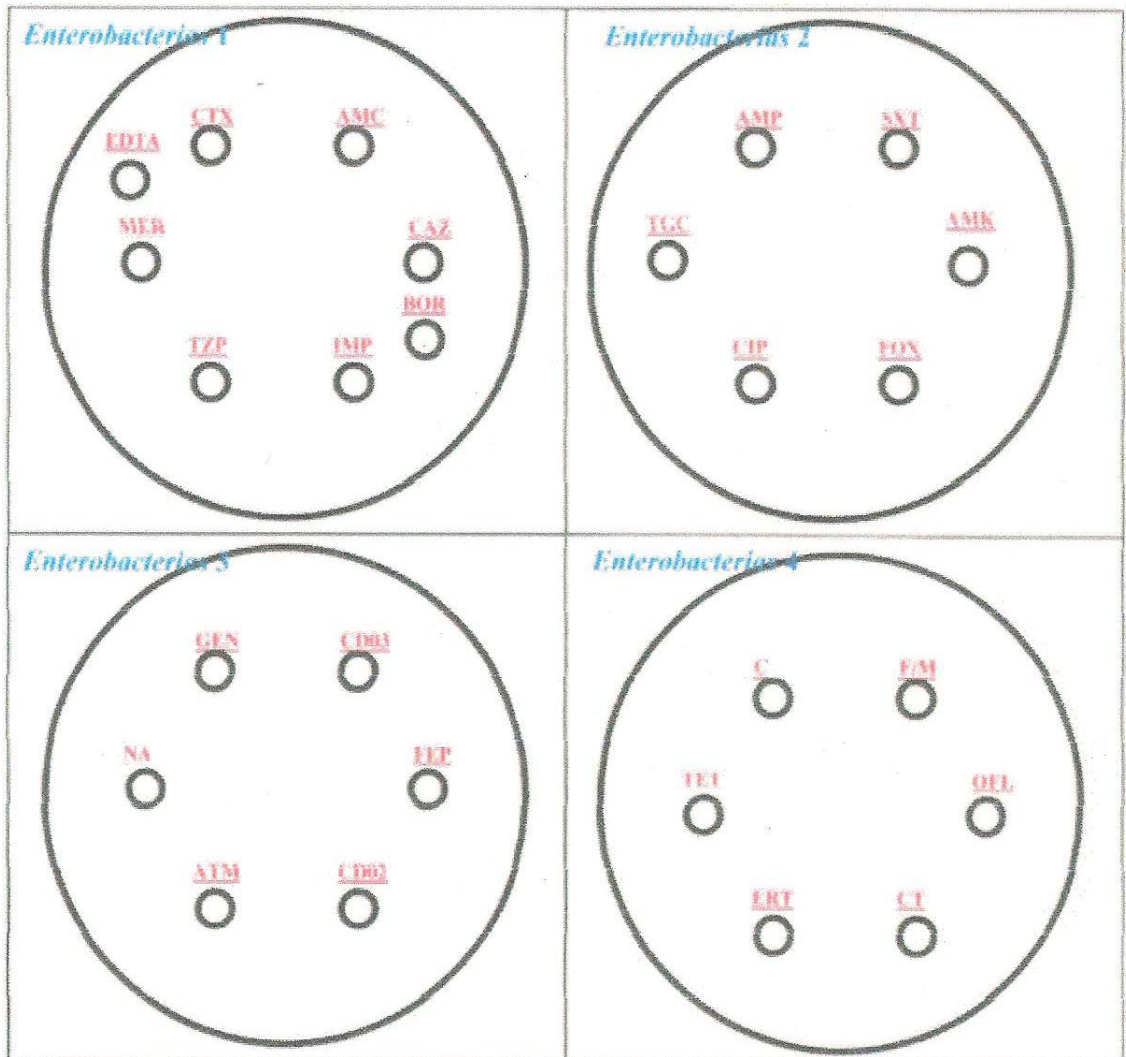
Anexo 1



Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Ciudad Universitaria UCV, Los Chaguaramos,
Caracas - República Bolivariana de Venezuela Cod. 1041
Teléfono: (0058-0212) 219.1622
<http://www.inhrr.gob.ve>
RIF: G-20000101-1

a) Enterobacterias



HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	GENES <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{TEM} EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> AISLADAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Cordero V, Vicmarys A	CVLAC	18413453
	e-mail	bimbovacv@hotmail.com
	e-mail	
Castro P, Ana K	CVLAC	18212963
	e-mail	Anak_peinadisimo@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

E. coli
Infección Intrahospitalarias
B-lactamasa de espectro extendido

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó la presencia de los genes que codifican enzimas β -lactamasas tipo TEM y SHV en aislados de *Escherichia coli*, para ello se utilizaron 135 cepas identificadas inicialmente como bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa, provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria internados en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre, durante el periodo agosto 2008 – diciembre 2009. La identificación se realizó empleando los protocolos convencionales para bacterias Gram negativas fermentadoras. La susceptibilidad antimicrobiana y la producción de β -lactamasas se realizaron por el método de difusión en disco, siguiendo los lineamientos para enterobacterias establecidos por el Instituto Estándar de Laboratorios Clínicos (2010). La detección de genes codificadores de β -lactamasas se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El estudio arrojó que 22,96% de las cepas se identificaron como *E. coli* y el 77,04% resultaron otro tipo de enterobacterias; el 97,78% de las cepas de *E. coli* estudiadas fueron resistentes a ampicilina y 77,42% a cefalotina, mientras que, la amoxicilina/ácido clavulánico fue inactiva en el 25,81%, cefotaxima (22,58%), ceftazidima (16,13%) y 12,90% para aztreonam y cefepima respectivamente. La frecuencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido fue de 22,58%. Un 29,03% de los aislados mostró la presencia del gen bla_{TEM} y 9,68% el gen bla_{SHV} . La presencia de cepas de *E. coli* productoras de enzimas β -lactamasas representa un riesgo para el centro hospitalario, ya que este mecanismo de resistencia puede diseminarse hacia otros géneros y familias bacterianas, comprometiendo el éxito terapéutico

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL /	Código CVLAC /	e-mail
Militza Guzmán	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>	
	CVLAC	8954225	
	e-mail	miltzaguz@yahoo.es	
	e-mail		
Elsa Salazar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>	
	CVLAC	10460717	
	e-mail	Elsazul2003@yahoo.es	
	e-mail		
Yasmina Araque	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>	
	CVLAC	8000717	
	e-mail	Yamasi40@hotmail.com	
	e-mail		

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2011	10	18
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-corderocastro.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:
Licenciados en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo:
Licenciados

Área de Estudio:
Ciencias Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JEI
Vicerrector
Universidad
Su Despacho

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Estimado Sr. **Prof. JEI**,
de acuerdo al **Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del Cuatrimestre 2009, según comunicación CU-034-2009)**: "Los trabajos de grados son de exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización".

Le
Abul K. E.
unanimemente
Universidad

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE CONTROL DE DOCUMENTOS
RECIBIDO POR <i>[Signature]</i>
FECHA <i>5/8</i>

Vismarys Cordero
Autor

Br. Ana K. Castro
Autor

C.C.: Rec
Adm
Cor
Din

JABC/YGC

Apartado

Prof. Militza Guzmán

