

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA



DETERMINAR LA FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS CLINICAS DE PACIENTES POST - OPERADOS, RECEPCIONADAS EN EL SERVICIO DE BACTERIOLOGIA DEL HOSPITAL MUNICIPAL BOLIVIANO HOLANDES DE ENERO DE 2009 - DICIEMBRE 2009

ELABORADO POR:

UNIV. MIRIAM SONIA SANGA MAMANI

TESINA PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

La Paz-Bolivia

2010

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



DETERMINAR LA FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS CLINICAS DE PACIENTES POST - OPERADOS, RECEPCIONADAS EN EL SERVICIO DE BACTERIOLOGIA DEL HOSPITAL MUNICIPAL BOLIVIANO HOLANDES DE ENERO DE 2009 - DICIEMBRE 2009

ELABORADO POR:

UNIV. MIRIAM SONIA SANGA MAMANI

ASESORA

Dra. ZAHARELA RODRÍGUEZ

TESINA PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

La Paz-Bolivia

2010

DEDICATORIA

Esta tesina va dedicado a DIOS y a mis padres Teófilo Sanga Huanca y Roberta Mamani de Sanga con todo mi cariño por ser las personas mas importantes en mi vida y en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

A DIOS en primer lugar, por haberme bendecido con unos padres maravillosos a los que quiero con todo mi corazón, por que siempre estuvieron a mi lado confiando en mí y apoyándome en todo momento.

A la Dra. Zaharela Rodríguez asesora, Dra. Verónica Sarmiento Quispe por haberme brindado su colaboración y orientación en este trabajo y la enseñanza y la formación de mi vida profesional.

Un agradecimiento especial al Dr. Alberto Mendoza y Dra. Jannet Martínez por su gran colaboración y apoyo para la elaboración de mi tesina.

Y un agradecimiento muy especial a mi querido primo Freddy Huanca M. al que le considero como mi hermano mayor, por su confianza y apoyándome en todo momento.

Al personal del laboratorio del Hospital Municipal Boliviano Holandés (H.M.B.H.) por haberme dedicado tiempo y orientación para mi vida profesional.

*A los catedráticos de la **FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS** de la **UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES** por haberme dedicado tiempo y orientación en mi formación académica.*

No puedo olvidarme de mis amigos: Delfina V., Zulema S., Ruth T., Norah M., Fabiola Z., Ronny G. , Mayra G., Yola Ch., Hortensia M., Arely P., Venancio C. Marco Polo, Jeannette S. Ana María.....etc. a quienes les agradezco por su amistad y cariño y apoyo por que fue muy importante durante el transcurso de mi carrera y mi formación profesional.

Una vez mas a DIOS por que el siempre esta conmigo en todo momento por su infinito amor para con nosotros el dice: “mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová, tu DIOS, estará contigo donde quiera que vayas” Josué 1:9

“No temas por que yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu DIOS que te esfuerzo; siempre te ayudare, siempre te sustentare con la diestra de mi justicia” Isaías 41:10

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

I. INTRODUCCION.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	4
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.3 JUSTIFICACION.....	7
II. OBJETIVOS.....	8
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	8
III. MERCOS REFERENCIAL.....	9
IV. MARCO TEORICO.....	11
1) Familia de enterobacteriaceae.....	11
1.1 Características generales.....	13
1.1.1 Hábitat.....	13
1.2. Clasificación.....	14
1.2.1 Propiedades bioquímicas.....	14
1.2.2 Propiedades antigénicas.....	14
1.2.3 Patogenia y factores de virulencia.....	15
1.3 Enfermedades (Acción patógena).....	16
1.3.1 Gastrointestinales.....	16
1.3.1,1 PRIMER tipo.....	16
1.3.1.2 SEGUNDO Tipo.....	16
1.3.1.3 TERCER tipo.....	16
1.3.2 Otro tipo de infecciones.....	16

1.3.2.1 No intestinales.....	16
1.4 BACTERIAS MÁS IMPORTANTES, QUE FORMAN PARTE DE ESTA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.....	17
1.4.1 E. Coli.....	17
1.4.2 Salmonella.....	18
1.4.3 Shigella.....	19
1.4.4 Citrobacter.....	20
1.4.5 Enterobacter.....	21
2) Antibióticos B-lactamicos.....	21
2.1 Clasificacion.....	23
a. Penicilina.....	23
b. Cefalosporina.....	23
c. Otros betalactamicos.....	24
d. Inhibidores de betalactamasas.....	24
2.2 Mecanismo de acción de los B-lactamicos.....	25
3) Resietencia antimicrobiana.....	26
3.1 Mecanismo de resistencia de los antibióticos B-lactamicos.....	28
4) B-lactamasas.....	29
4.1 B-lactamasas en grampositivos y gramnegativos.....	30
4.2 Origen de la B-lactamasas.....	31
4.3 Modo de acción de la B-lactamasas.....	31
4.4 Deteccion y caracterización de las B-lactamasas.....	31
4.5 Codificacion de las B-lactamasas.....	32
4.6 Clasificacion de las B-lactamas.....	32
4.6.1 B-lactamasas cromosómicas.....	35

4.6.2 B-lactamasas plasmidicas.....	38
4.6.2.1B-lactamasas de amplio espectro clásicas.....	39
4.6.2.1.1 B-lactamasas TEM- 1.....	39
4.6.2.1.2 B-lactamasas SHV-1.....	40
4.6.2.2 B-lactamasas de espectro extendido BLEE.....	40
4.6.2.2.1 B-lactamasas de espectro extendido tipo TEM y SHV.....	41
4.6.2.2.2 B-lactamasas de espectro extendido de la familia CTX-M.....	43
4.6.2.3 B-lactamasas resistentes a los inhibidores.....	44
5) Otros metodos de detección de Enterobacterias productoras de BLEE---.....	44
5.1 Métodos de detección basados en la utilización de inhibidores de β -l actamasas.....	45
5.1.1Doble difusión con discos.....	45
5.2Metodos bioquímicos.....	47
5.3Isoelectroenfoco (IEF).....	47
5.4 perfil de substrato.....	47
5.5 Métodos moleculares.....	48
5.6 Las técnicas de amplificación.....	48
V. METODO.....	49
5 1DISEÑO METODOLOGICO.....	49
5.1.1DISEÑO ESTADISTICO.....	49
5.2 POBLACION.....	49
5.3TIPO DE INVESTIGACION.....	49

5.4METODO DE INVESTIGACION DOCUMENTAL.....	49
5.5METODO DE INVESTIGACION DE CAMPO.....	49
5.6ANALISIS DE DATOS.....	49
5.7PROCESAMIENTO DE DATOS.....	49
5.8PROCEDIMIENTO DE BLEE.....	50
VI. RESULTADOS.....	51
VII. DISCUSIÓN.....	61
VIII. CONCLUSIONES.....	64
IX. BIBLIOGRAFIA.....	66
X. ANEXOS.....	69

INDICE DE TABLAS

TABLA °N 1 Porcentaje de aislamiento de cepas de Enterobacterias con relación a otro microorganismo en pacientes post-operados.....	pagina51
TABLA °N 2 Frecuencia de enterobacterias productoras y no productoras de betalactamasas en pacientes post-operados.....	pagina 52
TABLA °N 3 Frecuencia de genero de enterobactrias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEEs) en pacientes post-operados.....	pagina 53
TABLA °N 4 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al género.....	pagina 54
TABLA °N 5 Numero de pacientes post-operadosque presentaron BLEEs de acuerdo al rango de edad.	pagina 56
TABLA °N 6 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al servicio hospitalario.....	pagina 57
TABLA °N 7 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al tipo de muestra procesada.....	pagina 59

INDICE DE GRAFICOS Y CUADROS

GRAFICO °N1 Porcentaje de aislamiento de cepas de Enterobacterias con relacion a otro microorganismo en pacientes post-operados.....	pagina 51
GRAFICO ° N 2 Porcentaje de cepas productoras y no productoras B-lactamasa de espectro extendido (BLEE) de pacientes post-operados.....	pagina 52
GRAFICO °N 3 Frecuencia de genero de Enterobactrias productoras de B-lactamasa de espectro extendido (BLEEs) en pacientes post-operados.....	pagina 53
GRAFICO °N 3 Porcentaje de frecuencia de genero de Enterobactrias productoras de B-lactamasa de espectro extendido (BLEEs) en pacientes post-operados.....	pagina 54
CUADRO °N 4 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al género.....	pagina 55
GRAFICO °N 4 Numero de porcentaje de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al género	pagina 55
CUADRO °N 5 Numero de pacientes post-operadosque presentaron BLEEs de acuerdo al rango de edad	pagina 56
GRAFICO °N 5 Numero de porcentaje de pacientes post-operadosque presentaron BLEEs de acuerdo al rango de edad.....	pagina 57
CUADRO N°6 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al servicio hospitalario.....	pagina 58
GRAFICO N°6 Numero de porcentaje de pacientes pos - operdos que presentaron BLEEs de acuerdo al servicio hospitalario.....	Pagina 58
CUADRO °N 7 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al tipo de muestra procesada.....	pagina 59
GRAFICO °N 7 Numero de porcentaje de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al tipo de muestra procesada.....	pagina 60

RESUMEN

Las *Enterobacterias* son bacilos Gram-negativos que son responsables de muchas infecciones nosocomiales causando la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Pese a que existen muchos antimicrobianos para su eliminación, estas *Enterobacterias* han adquirido cierta resistencia a muchos de ellos, incluyendo a los antibióticos de amplio espectro.

La aparición de la multi-resistencia se debe a la producción de la *enzima β -lactamasa de espectro extendido* (BLEE) una enzima que incide sobre el anillo beta-lactámico y que se ha originado desde hace mucho tiempo a partir de las TEM-1 TEM-2 SHV-1 tras sufrir diversas mutaciones.

La aparición de la BLEE está codificada por los plásmidos que le otorgan una capacidad de distribución en distintas cepas y su pronta difusión.

La resistencia a estos antimicrobianos indica la presencia de una cepa BLEE.

En el estudio que se realizó se halló la frecuencia de *Enterobacterias* productoras de *β -lactamasa de espectro extendido* (BLEE) de pacientes post-operados en el Hospital Municipal Boliviano-Holandés, en una población total de 231 muestras clínicas que corresponden al 90% (207 cepas), que dan positivo para la detección de *Enterobacterias*, *E. coli* 30 (cepas), *Enterobacter spp.* (2 cepas), *Acinetobacter spp.* (1 cepa), en un total de 42 cepas productoras de BLEE, éstas se hallaron en diferentes muestras, y el 10% (24 cepas) que corresponde a otro tipo de microorganismo.

ABSTRACT

The *Enterobacteria* are gram-negative bacilluses that are responsible for many nosocomial infections causing the morbidity and the mortality of the patients. In spite of the fact that many antimicrobials exist for its elimination, these *Enterobacteria* has acquired certain resistance to many of them, including to the antibiotics of wide spectrum.

The appearance of the multi-resistance is due to the production of the *wide spectrum-β-lactamase enzyme* (WSBL), an enzyme that impacts on the ring beta-lactamic and that has been originated for a lot of time starting from the TEM-1 TEM-2 SHV-1 after ongoing diverse mutations.

The appearance of the (WSBL) is coded by the plasmids that grant them a distribution capacity between different strains and its prompt diffusion.

The resistance to these antimicrobials indicates the presence of a WSBL strain.

In the study that was carried out it found the frequency of *Enterobacteria* producing of *wide spectrum-β-lactamase enzyme* (WSBL) from patients post-operated in the *Hospital Municipal Boliviano-Holandés*, in a total population of 231 clinical samples that correspond to 90% (207 strains) that give positive for the detection of *Enterobacteria*, *E. coli* (30 strains), *Enterobacter spp.* (2 strains), *Acinetobacter spp.* (1 strain), in a total of 42 strains producing WSBL, these were found in different samples, and 10% (24 strains) corresponds to another microorganism type.

I. INTRODUCCION

Enterobacteriaceae es una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales (1)

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), también llamadas de espectro ampliado (BLEA), son enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente *Enterobacterias* especialmente frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam.

El primer aislamiento de BLEE documentado tuvo lugar en Alemania en 1983, a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae*, y recibió el nombre de SHV-2. En España la primera BLEE se describió en 1988, comenzándose a detectar poco después los primeros brotes por enterobacterias productoras de BLEE.

Esta familia de enzimas, en continuo crecimiento, se reconoce en función de sus características funcionales y genotípicas, mediante la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler. Las distintas BLEE confieren un grado de resistencia muy variable. La intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no tener efecto fenotípicamente detectable en algunos casos en los que únicamente tiene lugar un aumento de la concentración mínima inhibitoria (CMI), pero permaneciendo en el intervalo de sensibilidad.

Las BLEE “clásicas” derivan de las β -lactamasas de amplio espectro, pertenecientes al grupo 2b (TEM-1, TEM-2 y SHV-1). Estas β -lactamasas 2b poseen actividad penicilinasas y son, en su mayoría y *a priori*, inhibibles por el ácido clavulánico. Las mutaciones en el centro activo de estas enzimas 2b, han

determinado la aparición de estas otras β -lactamasas BLEE, capaces de hidrolizar también a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos. Las BLEE, por tanto, se clasifican dentro de ese gran grupo 2b, constituyendo el subgrupo 2be (clase molecular A), si bien algunas de ellas se clasifican en grupos distintos al 2be (ej. ciertas oxacilinasas del grupo 2d, clase molecular D). Hasta la fecha se han descrito más de cien variantes distintas de BLEE, derivadas de las β -lactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de las derivadas de SHV-1**(1)**

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam. **(2)**

Se consideran betalactamasas aquellas enzimas capaces de modificar químicamente el anillo betalactámico que caracteriza a un amplio grupo de antibióticos; se han descrito 3 grupos de bacterias productoras de beta lactamasas, Un primer grupo productores de beta lactamasas denominadas clásicas o de amplio espectro, las cuales van a producir resistencia bacteriana a las amino y carboxipenicilinas, pero con sensibilidad a las cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemicos. Un segundo grupo en que las betalactamasas van a ser de espectro extendido, (BLEE y en ingles ESBL) es decir que su acción va a dirigirse contra todas las cefalosporinas incluyendo las de 3^{ra} generación y la sensibilidad de estas bacterias es a los inhibidores de betalactamasas y carbapenemicos. Estas bacterias van a presentar resistencia también a los aminoglucósidos, limitan mucho la eficacia de los betalactámicos y se asocian con una elevada morbimortalidad. El tercer grupo va a estar caracterizado por producir betalactamasas resistentes a los inhibidores de las mismas es decir al tazobactam, al ácido clavulánico y al sulbactam. Estas bacterias también van a ser resistentes a amino, ureido y carboxipenicilinas. Son sensibles a las cefalosporinas carbapenemicos y monobactámicos. **(3)**

Entre las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de β -lactamasas se encuentran ***Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter***

diversus y distintas especies del género *Kluyvera*. De hecho, en los últimos años, están adquiriendo gran relevancia un nuevo tipo de BLEE plasmídicas, denominadas CTX-M que, precisamente, derivan de la β -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. Por lo general, cuando hablamos de BLEE nos referimos únicamente a las enzimas de codificación plasmídica ya que son éstas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de diseminación. **(6)**

En los brotes nosocomiales de microorganismos BLEE positivo hasta ahora se han implicado mayoritariamente cepas de *K. pneumoniae*. Actualmente, el aislamiento de cepas de *E. coli* BLEE positivo, tanto en la comunidad como en el hospital, se ha convertido en un problema creciente, si bien en general los brotes nosocomiales por dichas cepas son menos frecuentes que los debidos a *K. pneumoniae*. Menor peso global tiene de momento otras enterobacterias, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella* o *Morganella*.

Estas bacterias distintas a *Klebsiella* casi siempre se aíslan en infecciones esporádicas (no epidémicas), tanto hospitalarias como comunitarias. También es posible que una misma cepa origine distintas betalactamasas, pudiéndose aislar, por ejemplo, microorganismos con BLEE de tipo CTX-M y SHV o BLEE de tipo CTX-M y con betalactamasas cromosómicas AmpC, por lo que los fenotipos pueden variar respecto a los esperados. **(1)**

1.1 ANTECEDENTES

La frecuencia de infecciones causadas por Enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), se está incrementando en todo el mundo. La afluencia de estas bacterias en los hospitales tiene implicancias mayores para las estrategias de control de infecciones y tratamiento empírico.

Estudio realizado en el hospital se encontró *Enterobacterias* productoras de betalactamasa de espectro extendido en un 21% en la gestión 2004 -2006

Otro estudio realizado en el hospital de clínicas de la ciudad de La Paz en la gestión 2002, se encontró 0.94% tres cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), 2 cepas de *Klebsiella spp* 1 cepa de *Enterobacter spp*, se aislaron de diferentes muestras, en secreción purulenta, orina, punta de catéter, en ambos géneros.

Según estudio realizado en el hospital obrero ° N 1 de la ciudad de La Paz en la gestión 2005 se encontró enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en un 6%, y con mayor incidencia es en muestras de orina en el género femenino en un rango de edad entre los 71 y 81 años de edad.

Estudios realizados en otros países como la Habana se encontró una mayor incidencia de enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en un 31,1%, las cuales se identificaron como *Proteus spp*, 19,4% *Echerichia coli*, 17,3% *Klebsiella spp.*, 16,3% *Enterobacter spp.*, 4,1% con mayor incidencia en muestras de orina, sangre, líquidos abdominales y otros

En México y América del Sur la *Enterobacteria* más aislada es *Klebsiella pneumoniae* 41 % con mayor frecuencia en hemocultivos, *E. coli* 10 % con mayor frecuencia en cultivo de heridas.

Las *Entrobacterias* también producen infecciones nosocomiales, son un problema de salud pública que afecta todo tipo de instituciones y a la comunidad en general ya sea por su efecto en la salud de los pacientes como por los costos que este problema implica.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos va en aumento, lo que implica generación de problemas a las instituciones de salud y la comunidad en general como: elevación del gasto económico para la compra de medicamentos. Esta resistencia es más marcada cuando hay presencia de microorganismos gram negativos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Los antibióticos B-lactámicos son las drogas más usadas para el tratamiento de infecciones bacterianas tanto a nivel de la comunidad como hospitalario. El amplio espectro, la baja toxicidad y la actividad fuertemente bactericida sobre la mayoría de los microorganismos son algunas de las causas de su amplia utilización. Prácticamente todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por poseer mecanismos enzimáticos naturales de resistencia a los antibióticos Betalactámicos como resultado de la captación de los elementos de ADN móviles (plásmidos, transposones, etc.) o a través de mutaciones cromosómicas.

La aparición de *Enterobacterias* multirresistentes gracias a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se ha incrementado en los últimos años, y se registra, además, una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes con infecciones por estas bacterias.

Las BLEE son enzimas producidas por bacterias Gram-negativas capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos de amplio espectro, estos son los más usados para el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto a nivel de la comunidad como hospitalarias. Otro de los problemas más importantes en la comunidad hospitalaria son las infecciones intrahospitalarias han demostrado ser uno de los problemas muy importantes en los hospitales ya que afectan al paciente cuando adquieren estas infecciones que no estaban presentes ni en periodo de incubación al momento del ingreso, conduciendo además en forma indirecta a un aumento en el costo de la atención hospitalaria.

Las infecciones intrahospitalarias afectan también a pacientes de los servicios generales y los datos sobre la incidencia de estas infecciones son sumamente limitados y no existen datos nacionales sobre la magnitud del problema. Es así que las infecciones intrahospitalarias se han convertido en un problema de salud pública no solo para los pacientes afectados y el plantel médico, sino también para la comunidad en general.

En este trabajo se aborda el problema de las cepas de *Enterobacterias* portadores de B-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en el ámbito de la población atendida en el Hospital Municipal Boliviano Holandés.

¿Las *Enterobacterias* serán cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE)?

1.3 JUSTIFICACION

En el presente trabajo se buscara determinar el tipo, la frecuencia y la distribución de microorganismos productores de BLEE, importante al identificar microorganismos productores de B-lactamasas de espectro extendido lo cual permitirá analizar las tendencias evolutivas en las resistencias bacterianas y adecuar racionalmente el uso de antibióticos. Se dedicará especial atención a la detección de aquellas resistencias que pueden pasar inadvertidas con el uso rutinario de técnicas habituales.

El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos en los hospitales ha llegado a ser de tal magnitud y motivo de preocupación que se requiere un sistema de vigilancia prospectivo y activo.

La identificación de infecciones intrahospitalaria por enterobacterias como *Klebsiella* y *Escherichia coli* es muy importante ya que estas bacterias intrahospitalarias en la población hospitalaria representan un grave problema de salud y en ellas radica la posibilidad de ejercer acciones destinadas al control y prevención de las mismas.

El hecho de que un paciente adquiera una infección intrahospitalaria, tiene diversas implicaciones, tanto directamente sobre la salud y pronóstico del paciente, como en la eficiencia, costo económico y funcionamiento del hospital

Las infecciones intrahospitalaria pueden causar enfermedad severa o muerte, la estancia hospitalaria prologada, la necesidad de utilizar tratamiento antimicrobiano adicional o que el paciente infectado se convierta en fuente o reservorio

La E. Coli, es el principal habitante anaerobio facultativo del intestino grueso y es el único entre los microorganismos que integran la flora normal y por cuanto también es el único microorganismo aislado, con mayor frecuencia como agente causal de infecciones urinarias de heridas, neumonías, meningitis, y de septicemia tanto en las infecciones comunitarias como las adquiridas en el hospital.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la frecuencia de *Enterobacterias* productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en pacientes post-operados de muestras clínicas recepcionadas en el servicio de bacteriología del Hospital Municipal Boliviano Holandés de enero de 2009-diciembre de 2009

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Determinar el porcentaje de aislamiento de cepas de *Enterobacterias* con relación a otro microorganismo en paciente post-operados.
- ❖ Determinar la frecuencia de género de *Enterobacterias* más frecuentes productoras de betalactamasa de espectro extendido BLEE en paciente post-operados.
- ❖ Determinar la frecuencia de *Enterobacterias* productoras de BLEE según género en paciente post-operados.
- ❖ Determinar la frecuencia de *Enterobacterias* productoras de BLEE según rango de edad en paciente post-operados.
- ❖ Determinar la frecuencia de *Enterobacterias* productoras de BLEE según tipo de muestra en paciente post-operados.

III. MARCO REFERENCIAL

La primera BLEE (SHV-2) fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983. Desde entonces se ha publicado una gran cantidad de brotes epidémicos de *Enterobacterias* con BLEE, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuentemente involucrada. La primera descripción de cepas de *Enterobacterias* productoras de BLEE en España fue en 1988 y la primera epidemia documentada ocurrió entre 1988 y 1990. Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol. Durante las décadas de los 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran del tipo TEM o SHV, habiéndose descrito hasta la fecha más de cien variantes distintas derivadas de las B-lactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de SHV-1, lo que da idea de la gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto periodo de tiempo debido, esencialmente, a la presión selectiva de los antibióticos. En 1989 se describió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, prácticamente de forma simultánea en una cepa de *E. coli* en Alemania y en una cepa de *Salmonella* en Argentina. Estas enzimas se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a la cefuroxima, cefotaxima y cefepima, prácticamente sin incrementar las CMI de la ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Estas BLEE, de naturaleza plasmídica al igual que las TEM o SHV, derivan de la B-lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. También existen otras BLEE, algunas de ellas descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, con menor importancia epidemiológica desde el punto de vista de su diseminación, al menos por el momento en España (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendido.

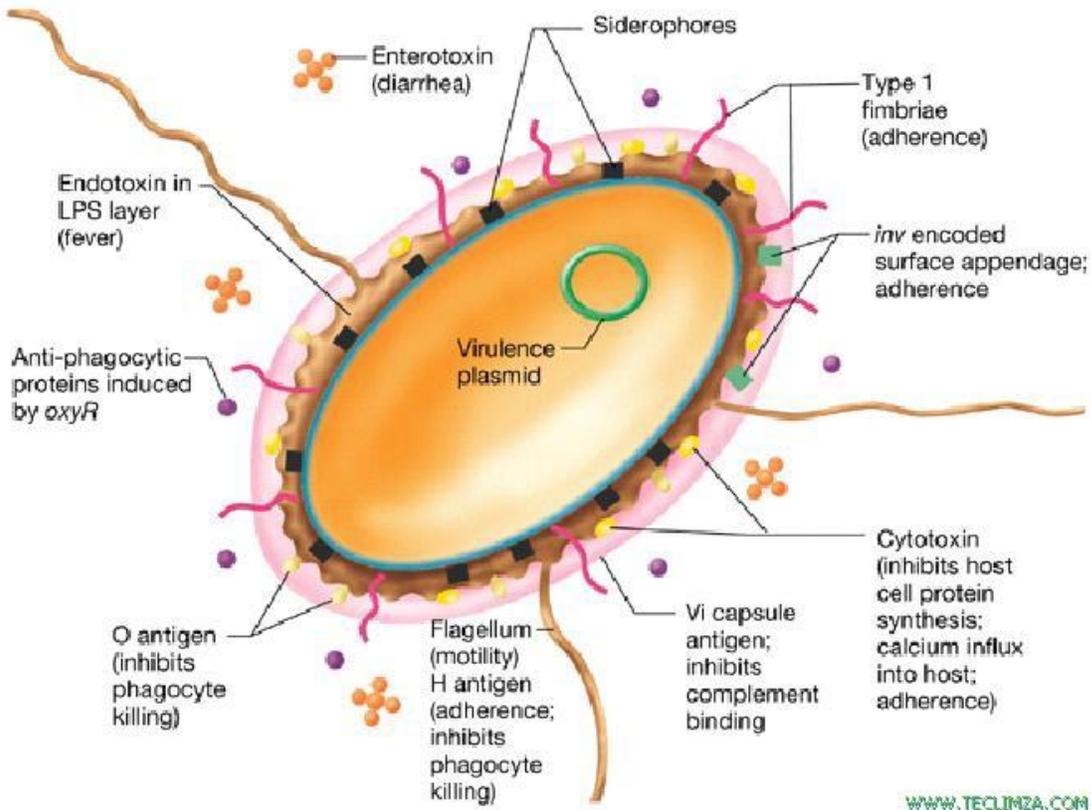
BLEE	β -lactamasa relacionada	País de origen	Especies en las que se detectaron inicialmente
TEM	TEM-1, TEM-2	Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1/LEN	Alemania	<i>P. aeruginosa</i> /BGNNF
CTX-M	KLUA <i>Kluyvera</i>	Alemania/Argentina	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
OXA	OXA-10	Turquía /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

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las *Enterobacterias* productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M. La diseminación de este tipo de BLEE, como será comentado en apartados posteriores, plantea ciertas dificultades para su detección, especialmente cuando se utiliza ceftazidima como único marcador. Por otro lado, *K. pneumoniae*, la especie más frecuentemente asociada con la producción de BLEE en las décadas anteriores, actualmente está siendo desplazada de forma paulatina, aunque con menor carácter epidémico, por *E. coli*. En España, si bien el porcentaje de cepas con BLEE encontradas en un estudio multicéntrico reciente fue mayor en *K. pneumoniae* (2,7%) que en *E. coli* (0,5%), el número absoluto de cepas fue significativamente superior para *E. coli*. En relación con este último punto, es cada vez más frecuente el aislamiento de *Enterobacterias* con BLEE, especialmente *E. coli*, fuera del ámbito hospitalario, particularmente como causa de infección urinaria en pacientes de atención primaria y así, en el estudio anteriormente aludido, se encontró que el 50% de las cepas de *E. coli* con BLEE procedían de la comunidad. Otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEE en *Enterobacterias* productoras de B-lactamasas cromosómicas AmpC. **(2)**

IV. MARCO TEORICO

2) Familia de enterobacteriaceae

Las Enterobacteriaceae son » bacilos » Gram negativos » Aerobios o Facultativos, con importancia clínica. Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas (baterías bioquímicas), estructura antigénica (serotipificación) e hibridación y secuenciación de su material genético. A pesar de la complejidad de la familia menos de 20 especies son responsables de más del 95% de las infecciones. (7)



La relación genealógica existente entre los diversos géneros de *Enterobacteriaceae* está basada en técnicas moleculares como la hibridación del ADN, y es razonablemente concordante con los esquemas tradicionales de clasificación metabólica⁴⁶. Esta concordancia apoya la conclusión de que la transferencia de los genes cromosómicos (es decir, la recombinación) es rara

entre las poblaciones naturales de enterobacterias. Por ello, cada una de la gran mayoría de especies de enterobacterias, sobre todo las relacionadas con procesos patológicos específicos, comprende un número bastante limitado de linajes o clones con evolución independiente. A primera vista, esta conclusión puede parecer que contradice la facilidad de transferencia genética entre estos organismos, observada en el laboratorio, por medio de conjugación, transducción, transformación y transposición de elementos genéticos móviles como se demuestra por el rápido intercambio de plásmidos de resistencia entre *Enterobacteriaceae* (y otras muchas bacterias gramnegativas). Parte de la explicación podría residir en el equilibrio de los sistemas complejos del cromosoma lo que condicionaría dificultad para establecer otras recombinaciones aparte de las altamente homólogas a diferencia de los genes facultativos de los plásmidos. En efecto, el ADN extracromosómico confiere características que son de importancia transitoria, pero pueden conferir con frecuencia beneficios a la especie. Así, especies diferentes de *Enterobacteriaceae* son con frecuencia portadoras del mismo determinante de patogenicidad o de resistencia antibiótica, codificado en un plásmido, un transposón o un fago. Estas propiedades de virulencia o resistencia representan probablemente adiciones recientes al repertorio genético de un microorganismo, lo que le proporciona acceso a un nuevo nicho ecológico.

La pared celular de las enterobacterias está compuesta por mureína, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS) y tiene una disposición laminar. La capa de lipoproteína-mureína constituye alrededor del 20% de la pared de la célula y es responsable de la rigidez celular. El 80% restante de la pared celular se une con los lípidos de la lipoproteína para formar la capa laminar. El LPS contiene las cadenas polisacáridas específicas que determinan la antigenicidad de las diversas especies (el tipo O) y su componente lipídico es la estructura responsable de la actividad endotóxica. En el caso de ciertas especies de *Enterobacteriaceae* la estructura antigénica desempeña un papel importante en la clasificación epidemiológica. Los antígenos O (antígeno somático, LPS), H

(antígeno flagelar proteico) y K (antígeno capsular polisacárido) son los principales componentes que se usan en la tipificación serológica **(14)**

1.1 Características generales.

La más importantes, la familia es la enterobacteriaceae, formada por numerosas especies, muy grandes, gran importancia clínica. Hay 27 géneros y hasta 102 especies. Bacilos Gram (-) anaerobios facultativos, de tamaño moderado, extremos redondeados, móviles, (flagelación peritrica), no forman esporas y son catalasa (+) y oxidasa (-), requerimientos nutricionales simples. Los géneros más comunes son los siguientes:

- Escherichia especie coli.
- Enterobacter varias especies.
- Citrobacter.
- Salmonella.
- Shigella
- Klebsiella.
- Serratia.
- Hafnia.
- Edwardsiella.
- Proteus.
- Yersinia.

1.1.1 Hábitat.

Están ampliamente distribuidas por la naturaleza, vegetación, vida libre, enterobacterias que forman parte de la flora intestinal del ser humano. Hay algunos que se asocian con enfermedades Salmonella, Shigella, Yersinia pestis.

Otros miembros patógenos oportunistas E.coli, klebsiella pneumoniae, proteus mirabilis, causan enfermedades gastrointestinales (diarrea) y no gastrointestinales (infecciones del tracto urinario y también sepsis). Estas enfermedades se producen en pacientes inmunodeprimidos y son enfermedades nosocomiales (que se cogen en el hospital)

1.2. Clasificación.

Se clasificara de acuerdo a las propiedades bioquímicas y antigénicas.

1.2.1 Propiedades bioquímicas:

- Catalasa positiva.
- Anaerobios facultativos.
- Oxidasa positiva.
- Reducen el nitrato a nitrito positivo.

Tienen flagelación peritrica, forma con extremos redondeados, con estas propiedades podemos distinguir el género *enterobacteriaceae* de otros bacilos Gram negativos que se incluyen dentro de otra familia vibrionaceae.

Desde el punto de vista metabólico las enterobacterias pueden usar una gran variedad de azúcares y lo pueden hacer por distintas rutas metabólicas (fermentación ácido - mixta, butilenglicólica) y los productos que obtenemos son ácido y gases. Las enterobacterias tienen gran cantidad de enzimas (ureasas, carboxilasas), que permiten su identificación.

1.2.2 Propiedades antigénicas.

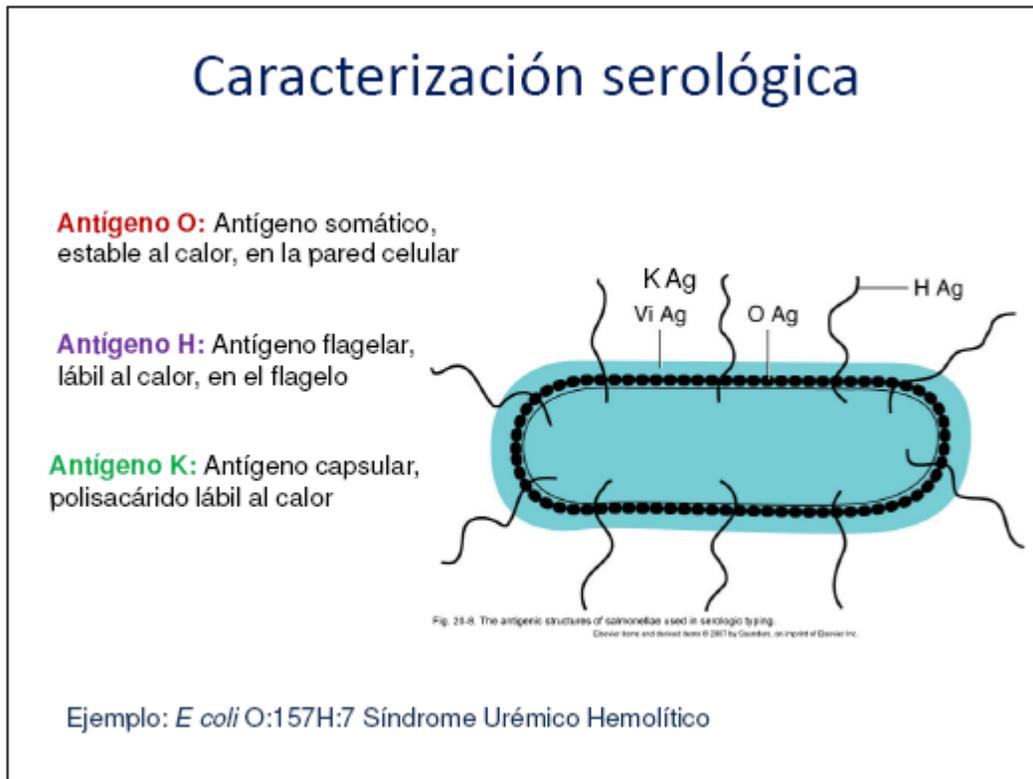
Mediante técnicas inmunológicas. En las enterobacterias

- Antígeno somático (O) pared celular, fracción externa del lipopolisacárido.

Dependiendo de la naturaleza de este antígeno lo podemos distinguir:

- Ag K antígeno capsular de naturaleza polisacáridica, permite distinguir varios grupos, (ejemplo *Klebsiella*, *Salmonella thypi*).
- Ag flagelar (en el flagelo) o Ag H.
- Ag F en las fimbrias o pillus permite su clasificación.

Dentro de las enterobacterias existe una gran variedad de genotípica dentro de un mismo género producida por mutación puntual y transferencia génica.



1.2.3 Patogenia y factores de virulencia.

- Cápsula (proporciona propiedades antifagocitarias).
- Pili (proporciona adherencia).
- Toxinas, son de 2 tipos:
- Endotoxina (lípidos A), Gram (-), produce los síntomas fiebre, leucopenia, hemorragia capilar, hipotensión, colapso respiratorio.
- Enterotoxinas (afectan al aparato gastrointestinal), pueden producir diarrea. Las más conocidas son *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*.

1.3 Enfermedades (Acción patógena).

1.3.1 Gastrointestinales.

Se produce diarrea, diferentes manifestaciones dependiendo de la profundidad de la invasión.

1.3.1, 1 PRIMER tipo:

La bacteria se adhiere a la mucosa de la célula epitelial, pero no penetra, la bacteria libera la exotoxina y esta penetra en las células. Produce pérdida de electrolitos y muerte celular. Diarrea acuosa, sin fiebre. Ejemplo producida por: E. Coli enterotoxigénica y vibrio colerae.

1.3.1.2 SEGUNDO Tipo:

Invasión del epitelio, la bacteria penetra en las células epiteliales, libera la toxina dentro de la célula, se produce muerte celular y asociado a esto hay respuesta inmune del organismo, invasión local de leucos (leucos aumentados) y fiebre. Diarrea con sangre en las heces. Ejemplo: E. Coli enteroinvasiva, Shiguella, Salmonella.

1.3.1.3 TERCER tipo:

La bacteria invade los ganglios y pasa a la sangre. Se produce dolor abdominal, diarrea con leucos y sangre. La invasión es más profunda. Síntomas fiebre, dolor de cabeza, leucocitosis, sepsis. Ejemplo: Salmonella thypi, yersina enterocolítica, campylobacter jejuni.

1.3.2 Otro tipo de infecciones.

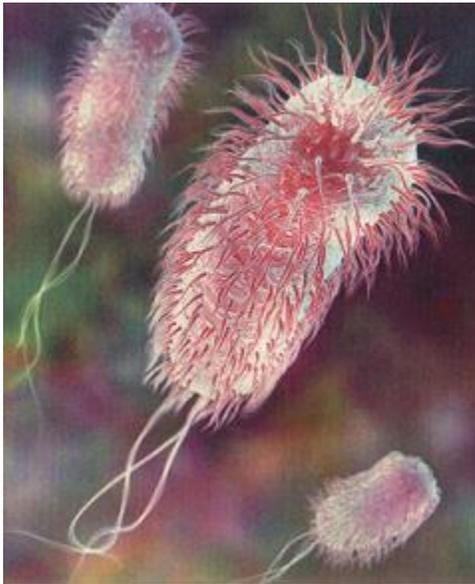
1.3.2.1 No intestinales.

Se adquieren en los hospitales en pacientes debilitados que han desarrollado resistencia frente a los antibióticos de los hospitales. Infecciones urinarias y

neumonía, (ejemplo: al colocar sondas (infecciones urinarias), o en casos en los que se puede aspirar el vómito (neumonía). Bacterias Oportunistas E. Coli, Klebsiella pneumoniae, proteus mirabilis, citrobacter. **(8)**

1.4 Bacterias más importantes, que forman parte de esta familia *Enterobacteriaceae*

1.4.1 Escherichia coli.

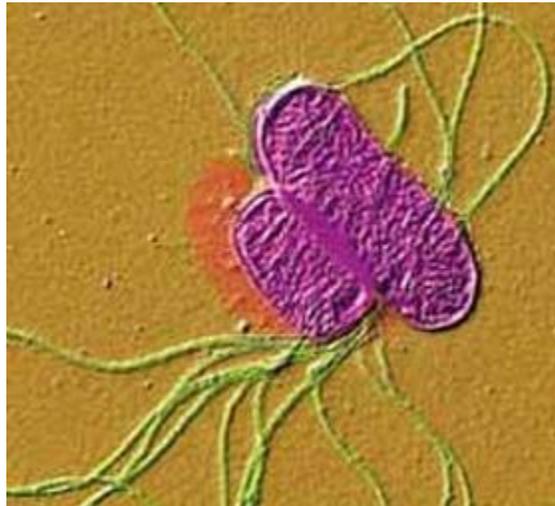


Escherichia coli (*E. coli*) es quizás el organismo procarionte más estudiado por el hombre. Se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos de todos los animales, incluyendo a los humanos. Son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es » anaerobio facultativo, móvil por » flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma » esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. La bacteria E. coli, puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente severas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Especialmente a niños y ancianos, o bien en personas que tengan el sistema inmunológico deprimido. Generalmente la presencia de esta bacteria en los alimentos o en las superficies, se considera un indicativo de falta de higiene. La simple presencia de este

microorganismo, o un recuento superior a mayor 100 ufc/g o ml indicará una contaminación fecal con el consiguiente riesgo de que existan cepas patógenas. La enfermedad se transmite por vía feco-oral y el vehículo más frecuente de infección humana es la carne de bovino, leche, yogur, mayonesa, ensaladas, vegetales crudos y agua. (7)

1.4.2 Salmonella.

La Salmonella está formada por bacilos gram negativos, son anaerobios facultativos, disponen de flagelos peritricos que rodean al microorganismo y no desarrolla cápsula ni espora. Fermentan glucosa pero no lactosa, y no producen ureasa.



Esta bacteria no es demasiado resistente a las condiciones ambientales, tales como luz solar, desecación, concentraciones elevadas de sal o calor. Sin embargo, es la responsable de casi la mitad de los casos de infecciones de origen alimentario que se diagnostican en los hospitales españoles.

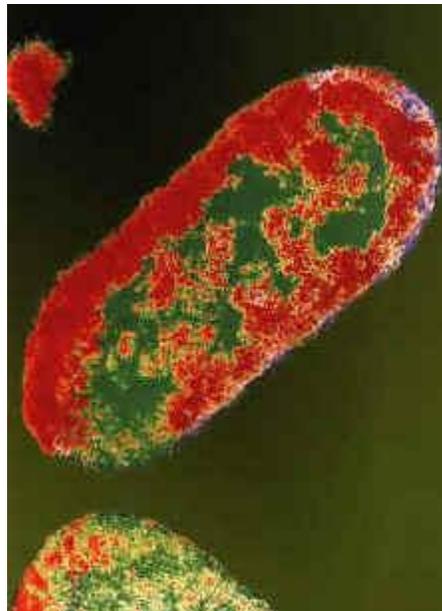
Y esta situación se vive de forma similar en los países de nuestro entorno. El origen del problema radica en que este microorganismo se adapta muy bien a los animales y las personas. El intestino puede colonizarlo, es decir dar lugar a una infección; o bien, puede llegar a un equilibrio con otros microorganismos intestinales donde sobrevivirá y se multiplicará en los restos de alimentos que van

a ir pasando por el tubo digestivo. Tanto las personas enfermas, como los animales y personas que tienen *Salmonella* en su intestino son portadores durante unos meses e incluso años. Por este motivo, la materia fecal de los portadores suele presentar una elevada concentración del microorganismo patógeno. El mejor sistema de prevención en este caso es acentuar las medidas de higiene personal. Lavarse las manos de forma intensa con abundante agua y jabón tras la utilización del aseo, así como antes y después de manipular alimentos frescos, suelen ser las medidas más recomendadas.

El producto más implicado en este problema es la salsa tipo mayonesa elaborada con huevo fresco. El huevo puede llevar *Salmonella* en su cáscara, ya que las gallinas, al igual que otros animales o incluso las personas, son portadoras. Si la cáscara está contaminada, la bacteria puede pasar al producto tras cascar el huevo y contaminar los productos que se elaboren con él. (7)

1.4.3 Shigella

La Shigella es un género de bacterias con forma de basilo, Gram negativas, no móviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que puede ocasionar diarrea en los seres humanos.



Fue descubierto y descrito por el bacteriólogo japonés Shiga, a quien debe el nombre. Sus brotes se relacionan con la falta de higiene y se transmite fácilmente, bien directamente de persona a persona o a través de las manos, insectos o por contaminación fecal.

Con todo, el agua contaminada es uno de los principales focos de infección. Tras su ingestión esta bacteria libera una endotoxina que afecta a la mucosa intestinal. Tanto el periodo de incubación como los síntomas son muy variables: dolores abdominales, diarreas, esclofríos, náuseas y cefaleas de diferentes grados de gravedad.

La shigelosis, también llamada disentería bacilar, aparece con más frecuencia de la que a menudo se le concede. Además del agua, se la relaciona con alimentos con elevada tasa de humedad, como la leche, las verduras como judías verdes o papas, aunque se han visto también implicados en sus brotes atún, gambas, pavo y salsas preparadas. Las medidas de prevención están relacionadas con la estricta higiene personal, así como evitar su desarrollo mediante una refrigeración adecuada y una correcta higienización de los alimentos previa a su consumo. (7)

1.4.4 Citrobacter.



El género Citrobacter es un grupo de bacilos gram negativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, suelo, comida y el tracto intestinal de animales y humanos como flora saprófita. La Citrobacter junto con Enterobacter, Klebsiella y Escherichia forma el grupo » coliforme de bacterias entéricas. Son bacterias móviles, fermentadores variables de la lactosa, se sabe que estos microorganismos pueden producir infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodepresivos. Son organismos ubicuos y son causa frecuente de

infecciones en el hombre, en especial infecciones urinarias, meningitis neonatal y abscesos cerebrales. Es uno de los patógenos más importantes en unidades de cuidados neonatales hospitalarios. Destruyen las microvellosidades, formando lesiones muy características denominadas de adherencia y eliminación. (7)

1.4.5 Enterobacter.



La Enterobacter es un género de bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Esta Bacteria es conocida como patógena desde hace relativamente poco tiempo. Se trata de un microorganismo con una clara acción contaminante que afecta sobre todo a los bebés prematuros y, en general, a los lactantes de menos de 6 meses de edad que reciben lactancia artificial. La incorrecta esterilización de los biberones, la recontaminación por una mala higiene o la contaminación de la leche son los factores de mayor riesgo. Por ello, unas adecuadas prácticas higiénicas al preparar el producto son fundamentales para evitar la multiplicación del patógeno.

3) Antibióticos B-lactámicos

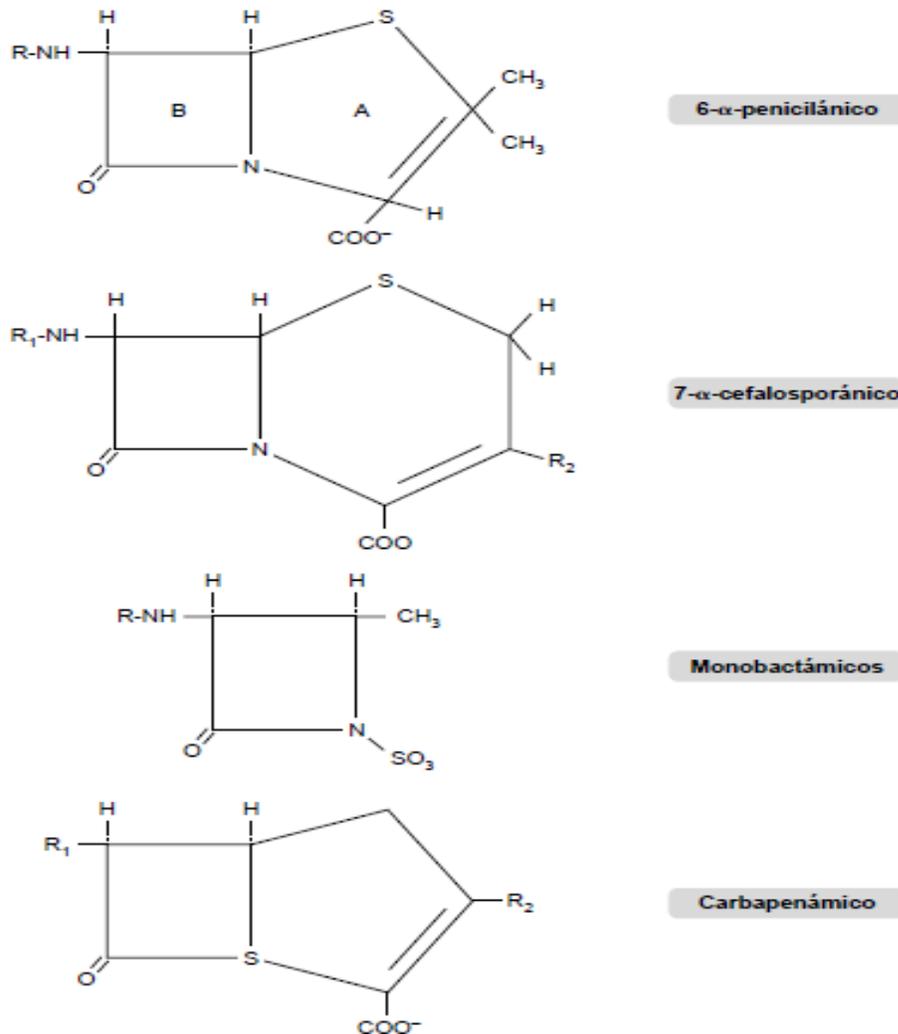
Para poder comprender los mecanismos de resistencia de las bacterias se debe conocer la naturaleza de los antibióticos y su mecanismo de acción.

Un antibiótico son Sustancias químicas sintetizadas por microorganismos que poseen acción antimicrobiana. Desde el punto de vista práctico existen distintos tipos de antimicrobianos. Los antibióticos betalactámicos son una amplia clase de

antibióticos incluyendo derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactams, carbacefem, carbapenems e inhibidores de la betalactamasa (β -lactamasa); básicamente cualquier agente antibiótico que contenga un anillo β -lactámico en su estructura molecular. Son el grupo más ampliamente usado entre los antibióticos disponibles.

Los antibióticos betalactámicos están indicados para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones causadas por los microorganismos susceptibles. Tradicionalmente, los antibióticos betalactámicos han sido activos solamente contra las bacterias Gram positivas, pero el desarrollo de antibióticos de espectro ampliado, activos contra varios microorganismos Gram negativos, ha aumentado la utilidad de los antibióticos β -lactámicos.(9)

Nucleo del antibióticos betalactamico



2.1 Clasificación

La estructura básica de estos compuestos es el anillo B-lactámico esencial para su actividad antimicrobiana entre ellos se encuentran:

a. Penicilinas:

1. **Naturales:** Penicilina G. Fue la molécula original descubierta por Fleming. A partir de ella se han sintetizado todas las demás. Su espectro se reduce a gram + y anaerobias. No se administran por vía oral porque el ácido del estómago las destruyen.
2. **Acido-resistentes:** Penicilina V. El espectro es el mismo que el de la G pero se da por vía oral.
3. **Aminopenicilinas:** Ampicilina y Amoxicilina. Se administran por vía oral, tienen una vida media larga y se administran cada 8 horas. Son eficaces también contra algunos gram negativo.
4. **Antiestafilocócica:** Meticilina y Cloxaciclina. Se administran por vía oral y son resistentes a las betalactamasas del Estafilococos.
5. **Antipseudomonas:** Ticarcilina. Es eficaz contra Pseudomonas y otros tipos de bacterias, pero no se usa comúnmente.
6. **Amidinopenicilinas:** Mecilinam. Eficaz contra las gram - como la E. Coli y otras bacterias del tubo digestivo.
7. **Resistentes a betalactamasas gram negativo:** Temocilina. De uso hospitalario para infecciones graves. Se administran por vía parenteral.

b. Cefalosporinas:

1. **Primera generación:** Cefalexina (se administra por vía oral) y Cefazolina (vía parenteral).
2. **Segunda generación:** Cefuroxina. De uso hospitalario.
3. **Tercera generación:** Cefotaxina. De uso hospitalario.

c. Otros betalactámicos:

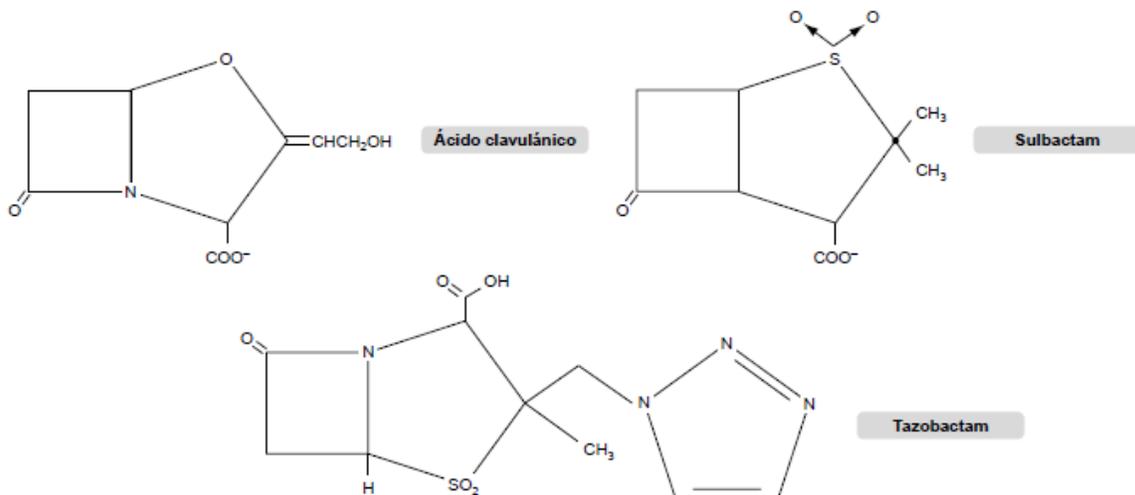
1. Monobactámicos: Aztreonam.
2. Tienamicinas: Imipenem.

d. Inhibidores de betalactamasas:

Se dan junto a un antibiótico. El inhibidor bloquea la betalactamasas, mientras que el antibiótico ejerce su acción. Ácido clavulánico, que se asocia con Amoxicilina. **(10)**

Los inhibidores de betalactamasa no tienen ninguna actividad antimicrobiana, se administran conjuntamente con los antibióticos beta-lactámicos. Su propósito único es prevenir la inactivación de los antibióticos beta-lactámicos por betalactamasas ya que se unen irreversiblemente a éstas y no tiene afinidad por PBP's. Las betalactamasas son enzimas producidas por las bacterias que les da la habilidad de ser resistentes a la acción de los antibióticos beta-lactámicos (mecanismo de resistencia bacteriana **(9)**)

- Ácido clavulánico (Clavuronato)
- tazobactam
- sulbactam

Inhibidores de las betalactamasas

2.2 Mecanismo de acción de los B-lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son bactericidas, y actúan inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. La barrera de peptidoglicanos es importante para la integridad estructural de la pared celular, especialmente para los microorganismos Gram positivos.

El paso final de la síntesis de los peptidoglicanos, la transpeptidación, se facilita por unas transpeptidasas conocidas como "penicillin binding proteins" (PBPs, proteínas de anclaje de penicilinas). Los β -lactámicos son análogos de la D-alanil-D-alanina, el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera peptidoglicana que se está formando.

La similitud estructural que existe entre los antibióticos β -lactámicos y la D-alanil-D-alanina facilita su anclaje al sitio activo de las PBPs. El núcleo β -lactámico de la molécula se une irreversiblemente al PBP. Esta unión irreversible evita el paso final (la transpeptidación) de la formación de la barrera de peptidoglicanos, interrumpiendo la síntesis de la pared celular. Es posible, además, que la inhibición de los PBPs (mediante dicha unión irreversible), haga también que se activen enzimas autolíticos de la pared celular bacteriana. **(9)**

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano. En las bacterias grampositivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína. Las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano.

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (gramnegativos) o

mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos). Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros betalactámicos, por lo que se llaman PBP. La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de los betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas. Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. **(21)**

3) Resistencia antimicrobiana

Consideramos a la resistencia microbiana como la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. Este hecho involucra necesariamente la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo, que se transmite a sus descendientes, los que por este motivo resultan también insensibles al antimicrobiano en cuestión. Si bien cualquier microorganismo puede desarrollar resistencia a los antimicrobianos, este fenómeno ha sido estudiado más ampliamente en las bacterias. Aunque la resistencia no es un fenómeno universal, se afirma que tarde o temprano las bacterias desarrollan resistencia a cualquier antimicrobiano; en realidad, hay algunas excepciones a esta afirmación siendo una de las más notables la ausencia de resistencia, hasta el momento, de *Treponema pallidum* a la penicilina G. La resistencia microbiana constituye un problema de grandes implicancias

clínicas, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, siempre más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones; además ha obligado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico a muchas drogas que inicialmente fueron muy útiles. Cuando se prueba inicialmente una droga antimicrobiana se define el espectro de microorganismos sobre los cuales es eficaz o ineficaz. Este patrón inicial frecuentemente va cambiando a medida que la droga se utiliza clínicamente. **(11)**

La resistencia es generada por la aparición de genes de origen cromosómico y extracromosómico cuya diseminación a casi todas las especies bacterianas es debida entre otras causas al uso indiscriminado e inadecuado de todo tipo de antimicrobianos. Esta modificación en el genoma es debida a cambios en los procesos evolutivos bacterianos que llevan a mutaciones en los nucleótidos del DNA así como a fenómenos de mutación, duplicación, deleción o transposición, siendo éste la causa de la dispersión de las cepas resistentes. **(13)**

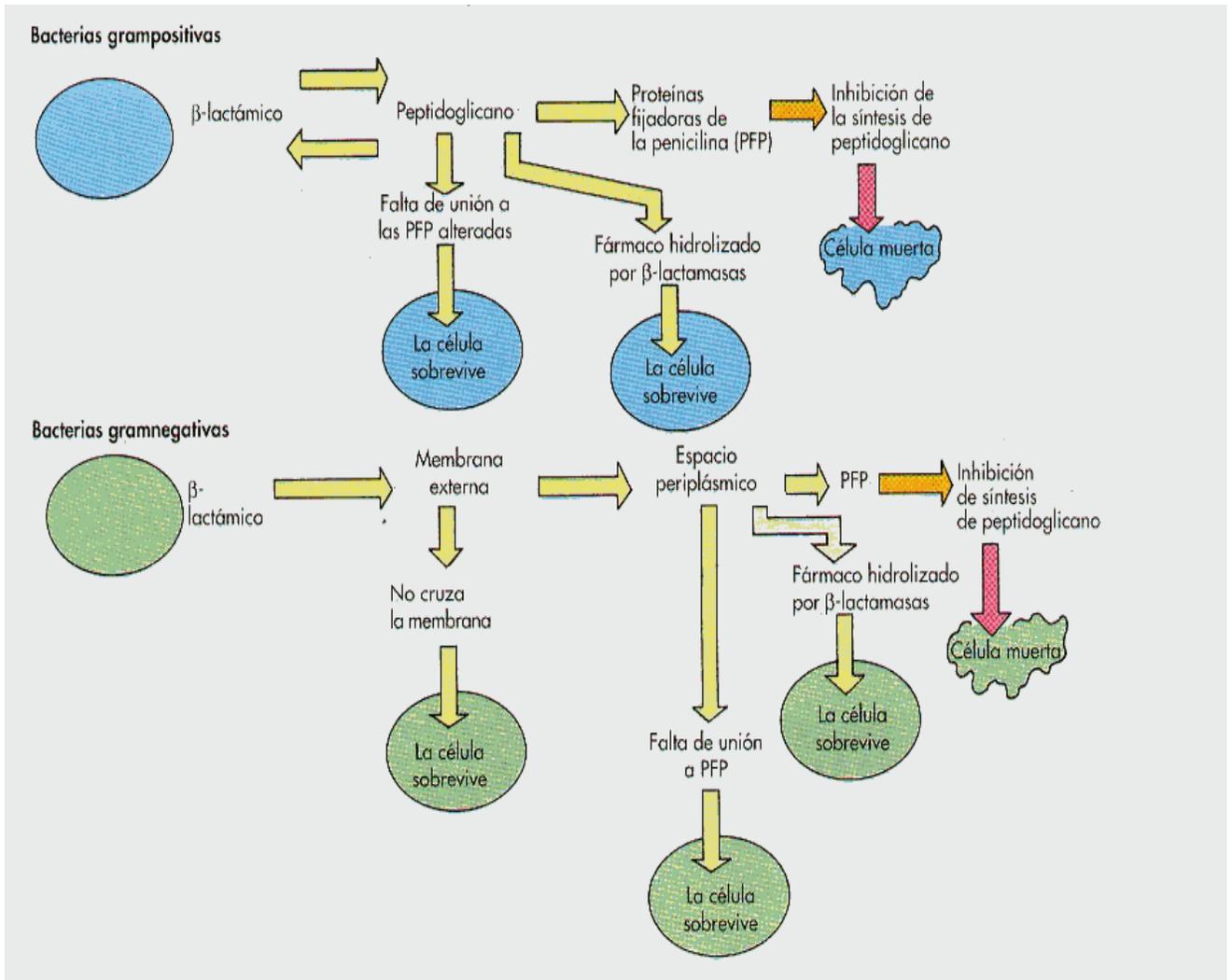
Tabla Factores asociados con aumento en la resistencia bacteriana

- Uso incrementado de antimicrobianos
- Uso incrementado de antibióticos empíricos
- Uso de antibióticos de amplio espectro
- Cursos repetidos de antibióticos
- Estancias hospitalarias prolongadas
- Estancia prolongada en cuidado intensivo
- Pacientes con padecimientos muy graves
- Estados inmunológicos deprimidos
- Aumento de el uso de procedimientos invasivos
- Ausencia de comités de infecciones
- Transferencia Inter.-hospitales de pacientes colonizados
- Uso indiscriminado de antibióticos de animales
- Viajes internacionales.

3.1 Mecanismo de resistencia de los antibióticos B-lactámicos

El acceso de los antibióticos a sus "blancos" intracelulares es un factor importante para valorar la susceptibilidad de los microorganismos a ellos. Muchos gramnegativos son "intrínsecamente" resistentes a clases amplias de antibióticos, por su complicada estructura de membrana, que no permite la penetración de los fármacos; por lo contrario, los estreptococos y los enterococos son resistentes a los aminoglucosidos, por la poca permeabilidad de su pared. Los principales mecanismos primarios de disminución del acceso de los antibióticos a las bacterias son una menor permeabilidad de la membrana externa, salida activa del fármaco y "atrapamiento" del antibiótico. La menor permeabilidad de la membrana externa de los gramnegativos es un mecanismo común de resistencia a múltiples antibióticos, dicha membrana es una bicapa de lípidos asimétrica, compuesta de lipopolisacáridos (LPS) en la "hojilla" externa, y fosfolípidos en la interna. En la bicapa están intercaladas proteínas transmembrana, como las porinas, que forman conductos llenos de agua a través de la membrana externa. Los antibióticos hidrófobos, como la tetraciclina, penetran en la bacteria por difusión a través de la bicapa lípida, en tanto que los hidrófilos, incluidos los β -lactámicos, algunas quinolonas y los aminoglucósidos, utilizan conductos de porina para penetrar por el espacio periplásmico. **(9)**

Otro mecanismo de captación referente a los aminoglucósidos es la llamada vía "autopromovida" presente en *P. Aeruginosa*: los aminoglucósidos desplazan los cationes divalentes que estabilizan la interacción de los lipopolisacáridos y las porinas en la hojuela externa de la membrana externa, y así permiten la penetración de los fármacos. Los cambios en la cantidad, la estructura y la función de las porinas y los LPS pueden ocasionar resistencia a β -lactámicos, tetraciclina, quinolonas y cloranfenicol, como resultados de una disminución de número de poros o de su diámetro en los conductos de porina transmembrana.**(12)**



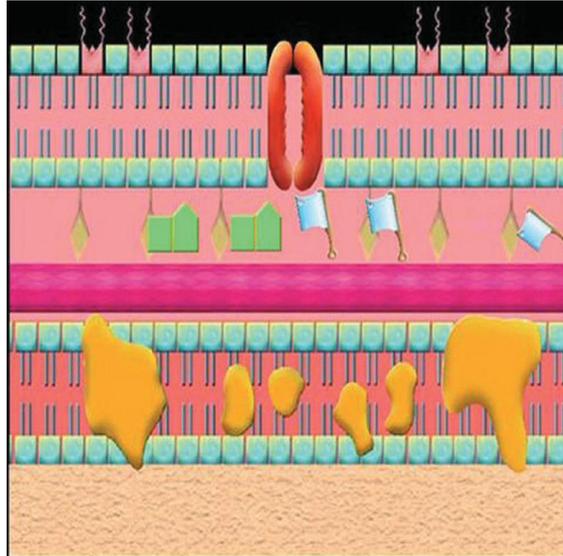
Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos

4) B-lactamasas

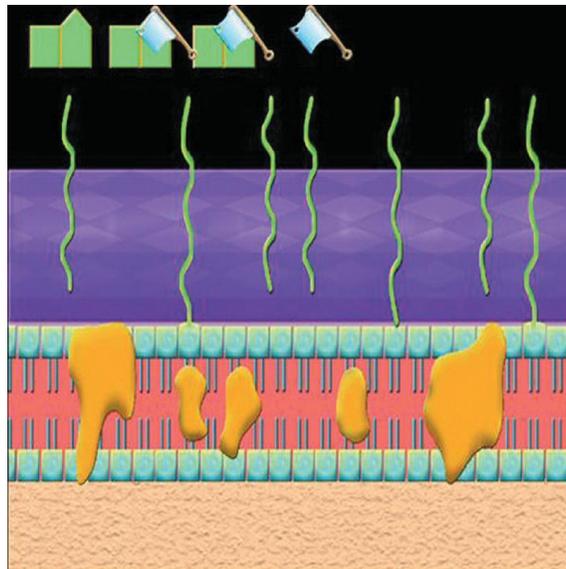
Las betalactamasas son proteínas fijadoras de penicilina que catalizan la hidrólisis del anillo Betalactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular **(13)**

4.1 B-lactamasas en grampositivos y gramnegativo

Las beta-lactamasas de las bacterias gram-negativas permanecen dentro de la célula e inactivan los beta-lactámicos en el espacio periplásmico, esto es, en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica



La mayoría de bacterias gram-positivas secretan sus beta-lactamasas de forma que los agentes antimicrobianos beta-lactámicos son inactivados extracelularmente, en el medio que las rodea.



4.2 Origen de la B-lactamasas

Las B-lactamasas probablemente derivan de diferentes PBP, con las que guardan homología secuencial y estructural. Es posible que su función natural originaria fuera la de participar en la biosíntesis de la pared o la de evitar la autolesión en los microorganismos que producen naturalmente antibióticos B-lactámicos; por lo que no es extraño que se hayan codificado en el cromosoma de diversas bacterias dado su significado funcional. A través de elementos móviles como plásmidos, transposones y otros pueden difundir largamente entre las bacterias, manteniéndose por la presión selectiva de los antibióticos utilizados por el hombre. (14)

4.3 Modo de acción de la B-lactamasas

Las B-lactamasas se unen al antibiótico formando un complejo reversible no covalente; el grupo éster del anillo B-lactámico es acilado por el grupo hidroxilo libre del residuo de serina, que es el sitio activo de la enzima; finalmente hay un proceso de hidrólisis por el cual se reactiva la enzima y se libera el antibiótico inactivo. (14)

4.4 Detección y caracterización de las B-lactamasas

Aunque el patrón de resistencia de una enterobacteria puede orientar respecto al tipo de b-lactamasa presente, reconocerlas basándose en el patrón de resistencia requiere una gran experiencia y aún así es difícil, por la posibilidad de la hiperproducción de una enzima, que modifica el espectro de resistencia en relación con su expresión basal o la presencia simultánea de más de una b-lactamasa plasmídica o de otros mecanismos de resistencia no enzimáticos asociados (permeabilidad, eflujo).

Por eso para identificar la b-lactamasa, junto al patrón fenotípico de resistencia, es necesario estudiar su punto isoeléctrico (pI), sus parámetros cinéticos: velocidad de hidrólisis sobre el antibiótico (K_{cat}) y la afinidad por él (K_m). Posteriormente pueden caracterizarse mediante sondas genéticas o por PCR con iniciadores específicos, para poder determinar con elevado nivel de probabilidad la (las)

enzima presente, que en algún caso puede confirmarse aplicando técnicas de restricción sobre los amplicones, aunque en otros su determinación precisa requiere la secuenciación. **(14)**

4.5 Codificación de las B-lactamasas

Las b-lactamasas pueden ser codificadas por genes cromosómicos y plasmídicos y a su vez encontrarse en otras estructuras móviles como transposones o integrones. Los plásmidos se transfieren entre los diferentes géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae*, propagándose también a los bacilos gramnegativos pertenecientes a otras familias (*Pseudomonadas*, *Vibrionaceae*, etc.). Los genes que las codifican son los genes *bla*. La expresión de algunas b-lactamasas es constitutiva, mientras que otras son inducidas por la exposición al antibiótico. Las b-lactamasas cromosómicas endógenas, que confieren bajo nivel de resistencia, están muy difundidas entre las bacterias **(14)**

4.6 Clasificación de las B-lactamasas

Se han propuesto varios modelos de clasificación para las beta-lactamasas de acuerdo con su espectro de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores, ubicación en genes (plásmido o cromosoma), y secuencia de genes o de proteínas.

Existen dos sistemas principales de clasificación:

La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de la beta-lactamasa y su secuencia de aminoácidos. Esta clasificación que, en forma inicial, fue introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados A hasta D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa. Las beta-lactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA. La clasificación de Bush se basa en los sustratos que la beta-lactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, y aztreonam u oxacilina. Este modelo funcional de clasificación de las beta-lactamasas, propuestos por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, define los cuatro siguientes grupos de acuerdo a los sustratos hidrolizados y perfiles de inhibición

- **Grupo 1:** cefalosporinas que no son adecuadamente inhibidas por el ácido clavulánico.
- **Grupo 2:** penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas que generalmente son inhibidas por inhibidores de beta-lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los subgrupos también se definen de acuerdo a las tasas de hidrólisis de carbenicilina o cloxacilina (oxacilina) producidas por las penicilinasas del Grupo 2.
- **Grupo 3:** metalo-beta-lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenems que son inhibidas por EDTA y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los beta-lactámicos.
- **Grupo 4:** penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico. (22)

Beta-lactamasas Inducible

La producción de beta-lactamasa inducible se inicia o induce cuando las bacterias que poseen un gen de beta-lactamasa se exponen a un agente beta-lactámico. La acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de beta-lactamasa. La producción de beta-lactamasa cesa ante la ausencia de los agentes antimicrobianos en la pared celular o alrededor de ella. (22) Beta-lactamasas Constitutiva

Beta-lactamasas constitutivas

Son aquellas que la bacteria produce en forma continua. Un ejemplo de producción de beta-lactamasa constitutiva es la enzima cromosómica SHV-1 de *K. pneumoniae* que interviene en la resistencia a la ampicilina y ticarcilina. (22)

Clasificación esquemática de la B-lactamas

Grupo ^a	Inh. clavulán ^b	Sustrato preferente	Genes ^d	Enzimas representativas
1 (C)	N	Cefalosporinas	Croms Plasm	Enzimas cromosómicas de bacterias gram negativas MIR-1, MOX-1, FOX-1, CMY-2
2a (A)	S	Penicilinas	Croms /Plasm	Penicilinasas de bacterias gram positivas
2b (A)	S	Cefalosporinas de 1 ^o generación, penicilinas	Plasm Croms /Plasm	TEM-1, TEM-2, SHV-1, OHIO-1, ROB-1 SHV-1 (cromosómica en <i>K. pneumoniae</i>)
2be(A)	S	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilinas y monobactámicos	Plasm Croms	TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-63, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-80 a TEM-90, SHV-2, SHV-2a, SHV-3 a SHV-30, TOHO-1, TOHO-2, CTX-M-1 a CTX-M-9, PER-1, PER-2 K1 (cromosómica de <i>K. oxytoca</i>)
2br(A)	N	Penicilinas, inhibidores de β -lactamasas	Plasm	TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-79
2c (A)	S	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilinas, carbenicilina	Plasm	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d (D)	S ^c	Penicilinas, cloxacilina	Plasm Croms	OXA-1 a OXA-19 <i>Aeromonas</i>
2e (A)	S	Cefalosporinas	Croms	<i>Proteus vulgaris</i>
2f (A)	S	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilina, carbapenemes	Croms	<i>Enterobacter cloacae</i> NMC-A, IMI-1 <i>Serratia marcescens</i> Sme-1
3 (B)	N	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilina, carbapenemes	Croms Plasm	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1, <i>Bacteroides fragilis</i> Ccr-A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IMP-1
4	N	Penicilinas	Croms /Plasm	<i>Burkholderia cepacia</i>

^aLa letra en paréntesis corresponde a la clasificación de Ambler

^bS, β -lactamasas que son inhibidas por 10 μ M de ácido clavulánico; N, β -lactamasas que no son inhibidas por 10 μ M de ácido clavulánico. ^cLa inhibición por el ácido clavulánico puede ocurrir en altas concentraciones para algunos miembros de este grupo

^dCroms: cromosómicos; Plasm: plasmídicos

4.6.1 B-lactamasas cromosómicas

Como ya se dijo no son inhibibles. La ausencia de bucle omega sella su perfil de actividad. No restringen la llegada de cefalosporinas, por lo tanto son cefalosporinasas, pero por la misma razón no son altamente eficientes. Confieren resistencia a cefalosporinas de segunda generación, y dependiendo de su cantidad, también son capaces de conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Su mecanismo de expresión está estrechamente relacionado a la síntesis y reciclaje del peptidoglicano, que actúa a través de un promotor que en condiciones normales se encuentra inhibido. La ausencia de dicho promotor, impide la expresión de la betalactamasa y es lo que sucede con *E. coli*, donde aún teniendo el gen que la codifica, no es posible provocar su inducción.(15)

La mayoría de las enterobacterias, como muchas bacterias de otros grupos, poseen en su cromosoma un gen que codifica una B-lactamasa; existe especificidad entre la especie bacteriana y el tipo de b lactamasa. En algunas especies como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *C. diversus* y *Yersinia enterocolitica* (y en la mayoría de las cepas del género anaerobio *Bacteroides*), la B-lactamasa cromosómica es de clase A (sensible al ácido clavulánico); se expresa a niveles bajos, que resultan escasamente operativos, ya que la exigua cantidad producida no es suficiente para inactivar a los B-lactámicos o sólo afecta a los más lábiles como la ampicilina. Este es el caso de SHV-1 de *K. pneumoniae* y K1 en *K. oxytoca*. Sin embargo, estas enzimas son inducibles, excepto en *Klebsiella*, por lo que se puede incrementar su producción basal durante el tratamiento. Otro grupo de enterobacterias poseen b-lactamasas cromosómicas de la clase C: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *M. morgani*, (y *P. aeruginosa*). Estas b-lactamasas, que no son sensibles al ácido clavulánico y, son inducibles (fenómeno reversible) particularmente por ceftioxitin e imipenem, se expresan a nivel moderado. Las mutaciones en los genes reguladores pueden implicar una elevada y continua producción (constitutiva) de la enzima (desrepresión, fenómeno irreversible), la cual inactiva a todos los b-lactámicos, excepto los carbapenems. Sin embargo, en presencia de alteraciones en las porinas, que disminuyan la permeabilidad de la membrana externa, los

carbapenems también pueden resultar inactivos. Tanto la inducción como la desrepresión, requieren de al menos cinco genes: *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE*. El mecanismo de regulación de la b-lactamasa cromosómica inducible de clase C, está relacionado con el reciclaje de los muropéptidos. El producto de expresión de *ampR* (AmpR) es una proteína que se une al ADN, en un lugar entre *ampR* y *ampC* (genes contiguos), y en condiciones normales, actúa como represor de *ampC*. En presencia de acumulación de derivados de peptidoglicano (muropéptidos: D-tripéptidos y D-tetrapéptidos), la proteína AmpR cambia a la conformación activadora y permite la expresión de *ampC* produciéndose la b-lactamasa (en presencia de b-lactámicos inductores: inducción; o en mutantes *ampD*:- desrepresión). La expresión de *ampC*, se debe a que en el reciclaje de los muropéptidos, quienes se desprenden del péptidoglicano en el espacio periplasmático, ingresan al citoplasma a través de AmpG (producto de expresión de *ampG*, que es una proteína integral tipo permeasa de la membrana interna) y estimulan la conversión a la forma activadora de AmpR. Pero, por la presencia de AmpD (amidasa específica de muropéptidos), los muropéptidos son degradados (parte glicosídica: Nacetilglucosamina y N-acetilanhidromureína), de manera que ya no pueden unirse a AmpR. Luego, los oligopéptidos (tri y tetra) son nuevamente glicosilados, activados con UDP y transportados nuevamente al espacio periplasmático donde sirven para reconstituir el péptidoglicano. *E. coli* y *Shigella*, poseen una b-lactamasa cromosómica de la clase C, pero producida en cantidades insuficientes para afectar a los b-lactámicos. Tienen un sistema de regulación diferente del mencionado anteriormente (*E. cloacae* y otras); carecen de *ampR* en su genoma cromosómico¹⁷⁹, por lo que expresan constitutivamente *ampC* (no inducible). La eficiencia de transcripción de *ampC* depende entonces de su promotor, de la región del atenuador o del número de copias del gen. Dado que en *E. coli*, *ampC* tiene un promotor débil, mutaciones en éste o en la región del atenuador, tienen como consecuencia un aumento en la tasa de transcripción. También se ha observado que el nivel de expresión de *ampC*, puede estar asociado a un mayor número de copias del gen. Otros factores que provocan un aumento en los niveles de expresión de *ampC*, pueden ser la incorporación de un

elemento de inserción conteniendo secuencias promotoras (IS2) o la adquisición de un promotor fuerte, como el de *Shigella*32, 111. de la familia *Enterobacteriaceae*, en el cromosoma, además de b-lactamasas de las clases A y C se han detectado otras pertenecientes a la clase B (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis*, *Flavobacterium odoratum*, *Aeromonas hydrophila*) que son carbapenemasas. También se han detectado como cromosómicas aunque no son naturales de la especie, tres más de este tipo que pertenecen a la clase A (grupo 2f). Sme-1 en *S. marcescens* y IMI-1 y NmcA en *E. cloacae*. Se inactivan por el ácido clavulánico, hidrolizan las amino y carboxipenicilinas y aztreonam pero no a las C3G; su actividad frente a los carbapenems es inferior a la de las metaloenzimas (clase B). Se localizan en el cromosoma (NmcA es inducible) y no se han encontrado en su entorno estructuras compatibles con transposones o integrones. También se ha detectado enzimas cromosómicas de la clase D en *Aeromonas sobria*.

En algunas especies del género *Yersinia* se ha descrito la existencia simultánea de más de una b-lactamasa cromosómica.

Por lo que se acaba de exponer, se puede deducir la resistencia natural de las Enterobacterias a los antibióticos b-lactámicos, aunque el perfil de resistencia depende, además de la clase, de la cantidad de enzima producida.

Diversas bacterias carecen en su cromosoma de genes codificantes de b-lactamasas como sucede en los estafilococos, estreptococos, enterococos, neisserias (meningococo y gonococo) salmonelas, *P. mirabilis* y *H. influenzae*, por lo que son sensibles a la penicilina y a la ampicilina. En estas bacterias la presencia de una b-lactamasa, que comporta resistencia a esos antibióticos, se debe a la adquisición de un plásmido u otro vector genético externo portador del gen. (14)

4.6.2 B-lactamasas plasmidicas

En los grampositivos son fundamentalmente penicilinasas, sin incluir acción sobre cefalosporinas. Las betalactamasas en bacilos gramnegativos, originalmente poseían un espectro más reducido de acción que las cromosómicas, pero eran más eficaces. La presencia de una estructura a manera de compuerta (denominado bucle omega) relacionada con el óptimo enfrentamiento entre el anillo betalactámico y la molécula de agua ya mencionada, restringía a su vez la llegada al sitio activo de moléculas más grandes. Estas primeras enzimas denominadas betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), tienen acción sobre penicilinas y cefalosporinas de primera generación. El agregado de cadenas laterales grandes a nivel del carbono 7 del anillo cefalosporánico, evita la entrada de estos antibióticos al sitio activo de las (BLEA) y define a las cefalosporinas de tercera generación. Mutaciones generalmente en dos pasos, generaron la aparición de betalactamasas de espectro expandido (BLEE), con acción sobre cefalosporinas de tercera generación. (Ver figura 5) Para la generación de una BLEE a partir de una BLEA, una primer mutación implica la apertura del bucle omega, con la consiguiente pérdida de la eficacia (disminución de V_{max}). Una segunda mutación reajusta la molécula de agua al anillo betalactámico. La sustitución de dos aminoácidos es suficiente para producir estos cambios.

Por lo dicho, las betalactamasas plasmídicas ofrecen al menos dos motivos de alerta: su fácil diseminación inter e intraespecie, y su alta variabilidad con el consiguiente aumento del espectro de acción. La mayoría de las transformaciones se dan a nivel intrahospitalario, donde las cepas pasan de paciente en paciente y las enzimas de germen en germen, hasta que las mutaciones ocurren. Otro elemento importante de las betalactamasas plasmídicas es su capacidad de interactuar con los inhibidores de betalactamasas tipo sulbactam. Estas moléculas con anillo betalactámico pero casi sin actividad antibiótica, tienen la capacidad de una vez acilados, interactuar con residuos enzimáticos (arginina 244) que generan un total desenfoque entre la molécula de agua y el anillo betalactámico. El resultado es una actividad suicida donde se impide la deacilación. La estructura

con la que actúan los inhibidores no se encuentra presente en las betalactamasas cromosómicas. **(15)**

4.6.2.1 B-lactamasas de amplio espectro clásicas

La mayoría de las B-lactamasas plasmídicas que se encuentran en las enterobacterias, como la TEM-1, TEM-2, SHV-1 y OXA-1 que son las más frecuentes, pertenecen a la clase A. Hidrolizan, y por tanto inactivan, con eficacia decreciente a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y cefalosporinas de primera generación, siendo sensibles al ácido clavulánico. La síntesis de antibióticos como la cefoxitina, la cefotaxima y el aztreonam, que no se inactivan por estas B-lactamasas permitió superar la resistencia de las enterobacterias productoras de esas enzimas. **(14)**

4.6.2.1.1 B-lactamasas TEM- 1

La enzima TEM-1 contiene 263 aminoácidos, la alteración en 3 posiciones genera fácilmente actividad de BLEE. En consecuencia, la concentración inhibitoria mínima de ceftazidima pasa de 0 a 256 mg/ml surgiendo una situación en la que todas las especies de *Klebsiella* y un 30% de las de *E. Coli* están a una mutación de producir BLEE. Considerando la tasa de reproducción bacteriana, hay una posibilidad alta de que tales variantes se reproduzcan fácil y rápidamente en clínicas y hospitales. **(17)**

La primera enzima mediada por un plásmido y encontrada en una enterobacteria, fue la TEM-1 aislada en *E. coli* en 1965. El nombre de TEM es una contracción de Temoniera, el nombre de un paciente del que fue aislado. Desde esa época se ha expandido entre un 20 y un 60% entre las enterobacterias; su frecuencia varía con la especie y el lugar. En *E. coli* es la responsable de la resistencia a la ampicilina en cerca del 25% de las cepas.

Esta enzima se ha aislado también en cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Desde las enterobacterias esta enzima se expandió a *Haemophilus influenzae* y a

Neisseria gonorrhoeae. Más tarde se ha observado que en muchas cepas aisladas en clínica se pueden encontrar dos o hasta tres tipos de b-lactamasas mediadas por plásmidos, y en muchos casos se ha visto que la TEM-1 es una de estas b-lactamasas^{44,76}.

También se han observado hiperproducciones de TEM-1 responsables de la disminución de la sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico. **(14)**

4.6.2.1.2 B-lactamasas SHV-1

La SHV es una contracción de sulhidrilo variable, una descripción de las propiedades bioquímicas de esta b-lactamasa. La SHV-1 fue también llamado PIT-2, porque fue por primera vez descrito por Pitton en 1972¹⁴³. La SHV-1 plasmídica ha sido detectada principalmente en *Klebsiella* (además de ser portadora natural de SHV-1 en su cromosoma) entre un 33% y un 94% de las cepas que producen resistencia a la ampicilina¹⁴⁹. Se han observado hiperproducciones de SHV-1 tanto en *E. coli* como en *K.pneumoniae*. La hiperproducción de la SHV-1 produce una disminución de la sensibilidad a la ceftazidima y a la amoxicilina-ácido clavulánico^{99,185}.**(14)**

4.6.2.2 B-lactamasas de espectro extendido BLEE

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam. Las BLEE clásicas derivan de las β -lactamasas con actividad fundamentalmente penicilinasas e inhibibles por el ácido clavulánico, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, enzimas del grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Debido a mutaciones en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. Las BLEE, por lo tanto, se engloban dentro del grupo 2be de la clasificación antes mencionadas.**(16)**

Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendido.

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

4.6.2.2.1 B-lactamasas de espectro extendido tipo TEM y SHV

Las C3G son resistentes a las penicilinasas plasmídicas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1)¹⁶⁸. Pero en 1983 y debido al uso intensivo de estos compuestos en el tratamiento de las infecciones en los hospitales, emergió un nuevo tipo de resistencia a aquellos antibióticos¹²⁸. Fue en la República Federal de Alemania donde se detectó por primera vez en cepas de *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *S. marcescens*, una b-lactamasa plasmídica capaz de hidrolizar a las C3G, que se denominó SHV-2 por su similitud con SHV-13. Después de ese primer aislamiento han aparecido en los cinco continentes, sobre todo en el género

Klebsiella inicialmente, poco después en *E. coli* y luego progresivamente en las demás enterobacterias.

Las BLEAs derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, se inactivan por el ácido clavulánico al que suelen ser aún más sensibles que las propias b-lactamasas de las que se derivan, pero expanden su espectro de acción hidrolizando las cefalosporinas de segunda y tercera generación y al aztreonam, sin afectar a la cefoxitina (cefamicina) ni al imipenem (carbapenem). En general, la eficiencia catalítica global de estas variantes suele ser inferior a las de sus parentales lo que en ocasiones se halla compensado por la disposición de promotores más eficientes.

Al estudiar estas b-lactamasas se observó que similares a las b-lactamasas plasmídicas clásicas de la que se derivaban, en las que mínimas modificaciones en su estructura, muchas veces la variación de un sólo aminoácido, (por mutaciones puntuales en los correspondientes genes estructurales) dan lugar a alteraciones muy considerables en su espectro de sustrato, se les denominó b-lactamasas de espectro extendido (BLEA).

El grado de actividad sobre los diferentes b-lactámicos varía según la b-lactamasa implicada, así la TEM-4 por ejemplo actúa sobre cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima en tanto que la TEM-12 y la TEM-26 son fundamentalmente ceftazidimasas, hidrolizando poco la cefotaxima.

Hay otras enzimas de espectro extendido derivadas de la SHV-1. En todas ellas, la acumulación de nuevas mutaciones, sobre mutantes previas, puede incrementar y modificar el espectro de actividad de una b-lactamasa. Por ejemplo en la SHV-2, que se origina de la SHV-1 por la mutación Gly-238-Ser, cuando aparece la mutación Glu-240-Lys se origina la SHV-5; en el caso de SHV-3, que proviene de SHV-2 por la mutación Leu-205-Arg, cuando aparece la mutación Glu-240-Lys se origina la SHV-4, en ambos casos la acción global incrementa la resistencia a la ceftazidima y al aztreonam⁴. En general estas enzimas han sido encontradas en muchas *Enterobacteriaceae*, sin embargo son predominantes en *K. pneumoniae*. En el caso de los derivados de SHV, esta situación podría estar en relación con el hecho de que la enzima original SHV-1 probablemente se deriva del gen de

codificación cromosómica de *Klebsiella*, ya que es idéntica³. Hay sin embargo, menos claridad para los derivados de TEM, ya que el origen de las TEM-1 y 2 no se conoce.

En Inglaterra, Francia y Portugal del 14 al 16% de las BLEAs se detectan en *K. pneumoniae*. Otras *Enterobacteriaceae* también producen BLEAs pero en mucha menor frecuencia. En Francia, por ejemplo del 2 al 3% del total de enterobacterias portadoras de BLEAs son *Enterobacter* spp y *K. oxytoca*, y el 0,1% a *E. coli*. No sorprende que los brotes hayan sido asociados a largas hospitalizaciones, cirugía, o la presencia de catéteres urinarios o arteriales, especialmente en pacientes de las unidades de cuidados intensivos. De hecho también se ha observado la aparición de nuevos mutantes de b- lactamasas de espectro extendido en la misma institución o incluso en el mismo paciente⁸⁶. El tracto gastrointestinal de los pacientes hospitalizados puede actuar como reservorio de estos microorganismos portadores de BLEAs.

En la actualidad se conocen 89 BLEAS tipo TEM, 31 tipo SHV y 9 tipo OXA pero es difícil cerrar un número porque continuamente se describen nuevas mutantes. Probablemente la diferencia de las políticas en el uso de antibióticos de cada país hace que se distribuya una u otra enzima.

4.6.2.2.2 B-lactamasas de espectro extendido de la familia CTX-M

Un nuevo grupo de reciente aparición y que se ha incorporado a la clase A (subgrupo 2be) son las enzimas del grupo CTX-M. Poseen una afinidad de sustrato muy preferente por la cefotaxima y son susceptibles a la inhibición por inhibidores de b-lactamasas. Sin embargo, su secuencia de proteínas es muy distinta a la de las TEM, SHV u OXA siendo en cambio similar (85% de homología) a la b-lactamasa cromosómica de *K. oxytoca*¹⁴ y recientemente se ha descrito una alta homología con la b-lactamasa de *Kluyvera ascorbata* KluA1 y KluA2. Estas son CTX-M-1 (MEN-1), CTX-M-2, CTX M-3, CTX-M-4 CTX-M-5 CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-8, CTX-M-9, TOHO-1 y TOHO-29. Estas enzimas se han aislado en áreas geográficamente distantes como Alemania, Italia, Argentina y España, lo que sugiere una amplia difusión de estas b-lactamasas.

4.6.2.3 B-lactamasas resistentes a los inhibidores

Otro grupo de b-lactamasas, conocido desde los primeros años 90, son unas enzimas que no modifican de forma sustancial el espectro de sustratos que hidroliza, pero si modifican su reconocimiento por inhibidores de b-lactamasas. Se han originado partir de TEM-1 y TEM-2 y son resistentes a los inhibidores de las b-lactamasas como el ácido clavulánico o el sulbactam; se les ha denominado b-lactamasas resistentes a los inhibidores (IRBL), pero también son conocidas como IRT (Inhibitor Resistant TEM).

Se conocen varias enzimas con esa actividad (TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-79). Estas enzimas resistentes a los inhibidores, muestran menor actividad hidrolítica frente a todas las cefalosporinas, por lo que no parecen constituir una gran amenaza.

En estas enzimas aparecen cambios de aminoácidos en hasta tres puntos distintos y han sido detectadas principalmente en *E. coli*, *K. pneumoniae* y, más recientemente en *P.mirabilis*³¹. Las posiciones en las que estas modificaciones son más frecuentes son Met 69, Trp 165, Met 182, Arg 244, Arg 275 y Asn 276. Se trata de cambios que no afectan a su espectro, pero reducen de forma notable su sensibilidad a la inhibición por ácido clavulánico y otros inhibidores de b-lactamasas. También se ha descrito una IRBL, derivada de SHV, la SHV-10, resistente a la acción del ácido clavulánico; de otro lado se ha encontrado un enzima, TEM-50, con una mutación del tipo BLEA y otra IRT, aunque su actividad en ambos sentidos es pequeña.

5) Otros metodos de detección de *Enterobacterias* productoras de BLEE

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE han sido diseñados para enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibible de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β-lactamasas. Existen también otros métodos basados en bioensayos, en el análisis del perfil de sustrato o en técnicas moleculares, aunque son más propios

para su caracterización. Con independencia de ello, la aplicación de los métodos que se describen a continuación debe ir precedida de un riguroso análisis del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos, con los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma, que permita detectar fenotipos compatibles con su presencia. En algunos casos, dado que se encuentran preferentemente en determinantes genéticos transferibles, es necesario transferir la resistencia conferida por la BLEE a otro microorganismo en el que sea más sencilla la demostración de su presencia.

5.1 Métodos de detección basados en la utilización de inhibidores de β -lactamasas

Son los métodos más sencillos. El más difundido en los laboratorios clínicos es el de aproximación de discos.

5.1.1 doble difusión con discos.

Fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g) y aztreonam (30 μ g). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE. Esta prueba ha sufrido diferentes modificaciones para aumentar su eficiencia entre ellas la reducción de la distancia entre los discos (a 20 mm), la utilización de un inóculo algo más elevado que el habitual en las pruebas de difusión y la utilización de cefalosporinas de cuarta generación, esencialmente la cefepima. Con ello se facilita la detección de cepas con BLEE con poca eficiencia hidrolítica y, por lo tanto, con halos de inhibición poco afectados, así como de microorganismos productores de β -lactamasa AmpC (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*) que podrían enmascarar su presencia.

En la actualidad existen sistemas comerciales que añaden inhibidores de β -lactamasas, esencialmente ácido clavulánico, a las cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima, ceftazidima y cefepima. Por ejemplo, debe destacarse los

discos con ácido clavulánico [ceftazidima-clavulánico (30-1 µg), cefotaxima-clavulánico (30-1 µg) y cefepima-clavulánico (30-1 µg)], y las **tiras de E-test**, que contienen en una parte de ellas concentraciones decrecientes de la cefalosporina y en la otra la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico (2 µg) por cada concentración. En todos los casos es recomendable utilizar simultáneamente los discos o las tiras de ceftazidima y cefotaxima en asociación con el ácido clavulánico ya que no todas las enzimas hidrolizan por igual estos dos sustratos, y con la utilización exclusiva de uno de ellos podría limitarse su detección. Éste sería el caso de los microorganismos productores de BLEE de tipo CTX-M en los que la utilización de ceftazidima como único sustrato impediría una detección correcta. Habitualmente, la hidrólisis de este último antibiótico por estas enzimas es muy pobre, al contrario de lo que acontece con la mayoría de las BLEE de los grupos TEM y SHV. Por el contrario, la hidrólisis de la cefotaxima es muy eficiente con las CTX-M, siendo el mejor marcador para su detección. Asimismo, es imprescindible añadir cefepima con clavulánico en los casos en los que se sospeche la presencia de BLEE en los microorganismos productores de AmpC ya que esta cefalosporina de cuarta generación se afecta poco por AmpC, incluso cuando está hiperproducida, y puede observarse la sinergia con el ácido clavulánico en el caso de que exista una BLEE. También se ha propuesto la utilización de discos de cefalosporinas y sulbactam como inhibidor de β -lactamasa pero no han tenido tanto éxito como las propuestas anteriores.

En la actualidad, los **sistemas automáticos** para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos han recogido esta experiencia y tienden a incluir simultáneamente cefotaxima y ceftazidima con ácido clavulánico e iguales recomendaciones deben establecerse con los discos o el E-test con el ácido clavulánico. Su capacidad de detección también ha sido evaluada con colecciones de microorganismos con BLEE obteniéndose en algunos casos una sensibilidad y especificidad superior al 99%.

La utilización de bioensayos, como la prueba de Masuda o el método tridimensional, pueden ser adecuados para demostrar la presencia de estas

enzimas en cepas en las que existan dudas acerca de su producción. Ambas pruebas, dependiendo de los sustratos que se utilicen, son útiles para cualquier tipo de β -lactamasa. A pesar de su versatilidad, son engorrosas de realizar y han tenido poco éxito. **(16)**

5.2 Métodos bioquímicos

La mayoría de estos métodos se aplican una vez confirmada la presencia de la BLEE en el aislado correspondiente y sirven para caracterizar dicha enzima. Los métodos bioquímicos incluyen el isoelectroenfoque, el análisis del perfil de sustrato, la cinética enzimática y la determinación de los IC_{50} para diferentes inhibidores de β -lactamasas. **(16)**

5.3 Isoelectroenfoque (IEF)

Permite conocer el punto isoelectrico (pI) de la proteína y era de gran utilidad cuando existían pocas BLEE descritas. En la actualidad, se utiliza poco debido a la descripción de diferentes BLEE que comparten idéntico pI. Sin embargo, es muy útil si se combina con el análisis del fenotipo de sensibilidad ya que puede orientar el tipo de BLEE para un análisis posterior del perfil de sustrato o estudio molecular. También es de gran interés cuando existen varias enzimas en un mismo aislado y se utilizan sustratos antes de proceder al revelado. **(23)**

5.4 Perfil de sustrato

Es imprescindible para la caracterización final de las BLEE. Se determina por medio de un espectrofotómetro la tasa de hidrólisis (V_{max}) relativa de diferentes sustratos β -lactámicos, generalmente a una concentración elevada (1 mM), en comparación con un sustrato estándar (bencilpenicilina, cefaloridina o nitrocefín). Como complemento del perfil de sustrato suele determinarse la concentración de inhibidor (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam en el caso de las BLEE) que reduce la actividad hidrolítica de una β -lactamasa cuando se compara con un

control (**IC₅₀**). En algunos casos es preciso definir el mecanismo de actuación del enzima mediante el **estudio cinético** de la constante de afinidad (Km) y la eficiencia relativa de hidrólisis (Vmax/Km). La mayoría de estas determinaciones quedan relegadas a laboratorios especializados en los que se realiza una caracterización bioquímica de las β-lactamasas.

5.5 Métodos moleculares

Al igual que los métodos bioquímicos, muchos de ellos son más propios de la caracterización específica del tipo de BLEE que útiles en su detección. Habitualmente se aplican una vez demostrada la presencia de la BLEE por los métodos descritos en el apartado anterior. Entre los métodos moleculares destaca las sondas de DNA, escasamente utilizadas en la actualidad, y las técnicas de amplificación (24). Las **sondas de DNA** permiten realizar cribados en colecciones amplias de aislados, sobre todo si se combina con técnicas de hibridación directa sobre colonia. **(25)**

5.6 Técnicas de amplificación

Son las que más éxito han tenido, debido a su fácil realización. Tienen los mismos inconvenientes que las sondas de DNA pero, a diferencia de éstas, permiten la secuenciación posterior del producto de PCR, siendo muy útiles para la caracterización del enzima. El uso de cebadores específicos diseñados para detectar mutaciones puntuales y el desarrollo de la reacción de amplificación en condiciones estrictas permite la caracterización de algunas de las BLEE. Esta técnica, denominada "**oligotyping**", fue diseñada para las BLEE de tipo TEM y SHV. Está limitada en la actualidad por el alto número de variantes y el aumento del número de mutaciones en las nuevas BLEE que pertenecen a estas familias. **(16), (23).**

V. METODO

5.1 DISEÑO METODOLOGICO

La investigación de este trabajo es de tipo retrospectivo.

5.1.1 DISEÑO ESTADISTICO

La sistematización y el análisis de la resolución de los datos estadísticos se lo realizaran de manera informativa.

5.2 POBLACION

La población son muestras recepcionadas en el servicio de bacteriología de todos los pacientes post-operados del Hospital Municipal Boliviano Holandés, durante la gestión de enero 2009 a diciembre 2009.

5.3 METODO DE INVESTIGACION DOCUMENTAL

La investigación será a base de revistas, artículos de investigación, páginas electrónicas actualizadas referentes al tema.

5.4 METODO DE INVESTIGACION DE CAMPO

Son datos obtenidos de pacientes, cuyos resultados obtenidos de muestras procesadas dieron *Enterobacterias* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) En el servicio de bacteriología del Hospital Municipal Boliviano Holandés durante la gestión de enero del 2009 – diciembre del 2009.

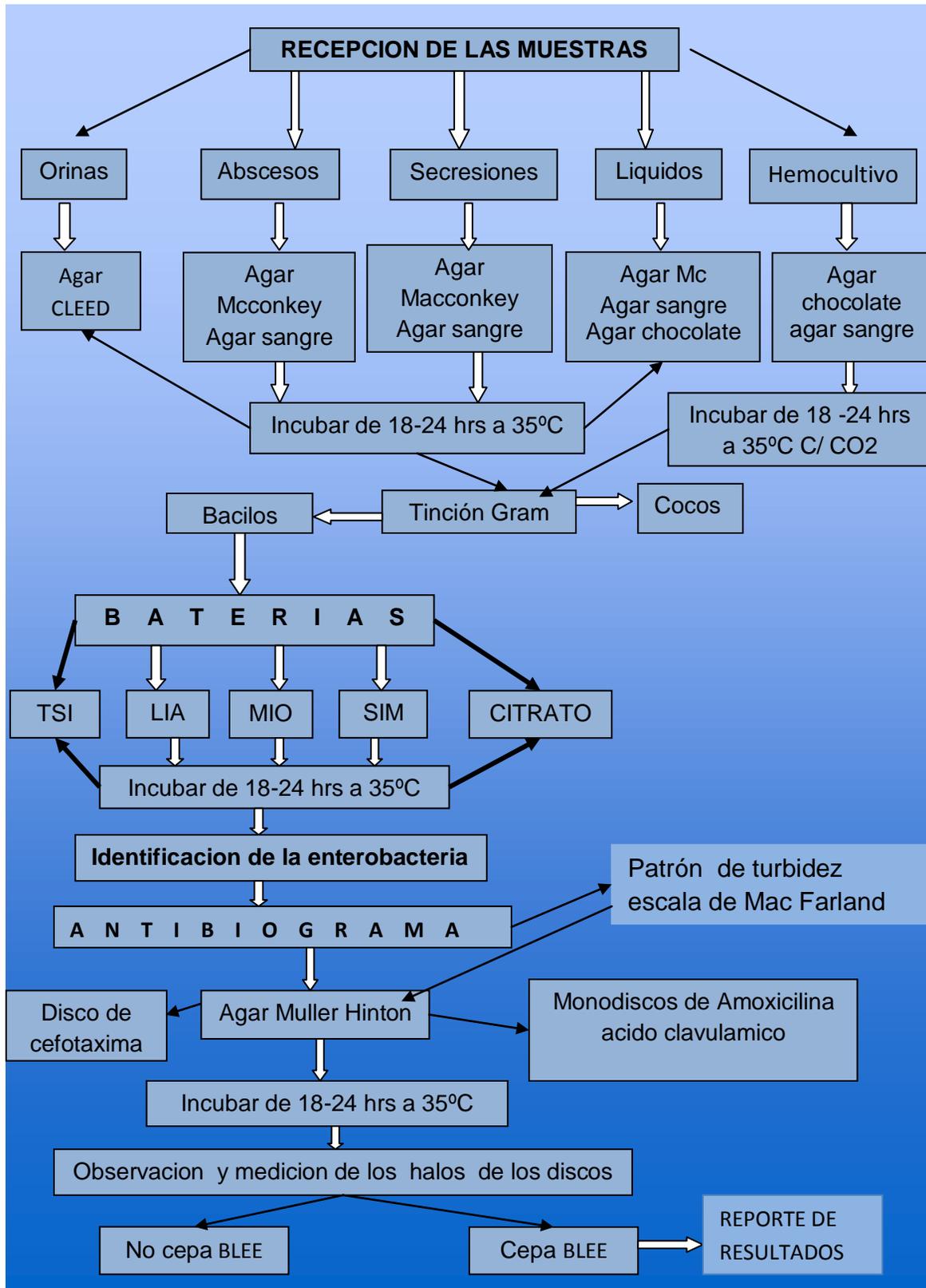
5.6 ANALISIS DE DATOS

El análisis de este trabajo se realizara mediante la revisión de los archivos de registro del área de bacteriología del laboratorio de, pacientes que estan internados en el hospital.

5.7 PROCESAMIENTO DE DATOS

El análisis de datos y resultados obtenidos se realizara por tablas y graficas de frecuencia de acuerdo a los objetivos propuestos, mediante Microsoft Office Excel 2007.

5.8 PROCEDIMIENTO PRÁCTICO DE BLEE

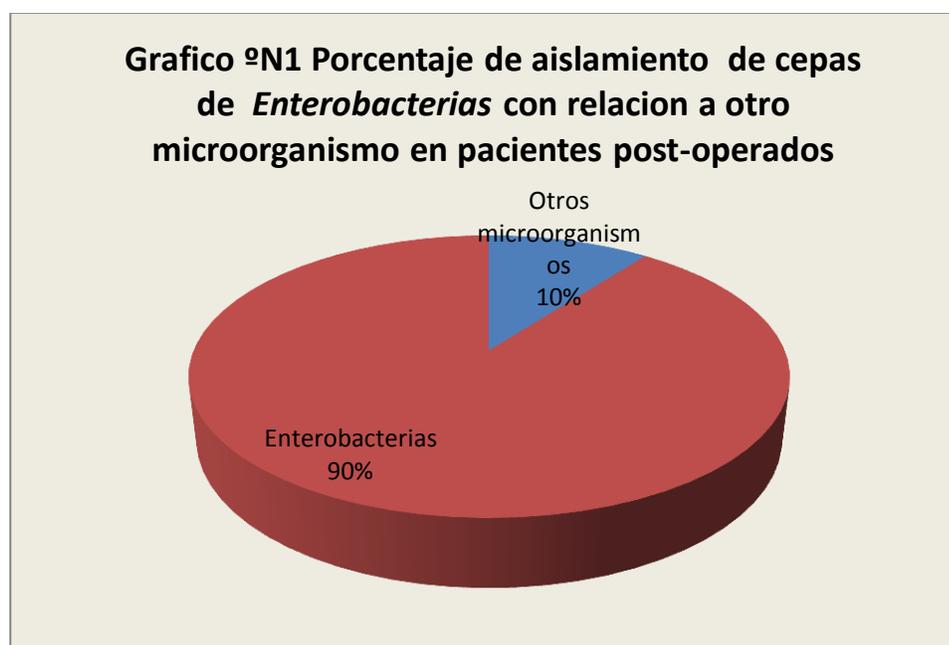


VI. RESULTADOS

El estudio se realizó en una población total de 231 muestras clínicas recepcionadas de pacientes post-operados en el Hospital Municipal Boliviano Holandés. De estas 231 muestras el 90% (207 cepas) dan positivo para el aislamiento de *Enterobacterias* y el 10% (24 cepas) que corresponde a otro tipo de microorganismo como se muestra en la tabla N°1

TABLA N° 1 Porcentaje de aislamiento de cepas de enterobacterias con relación a otro microorganismo en pacientes post-operados

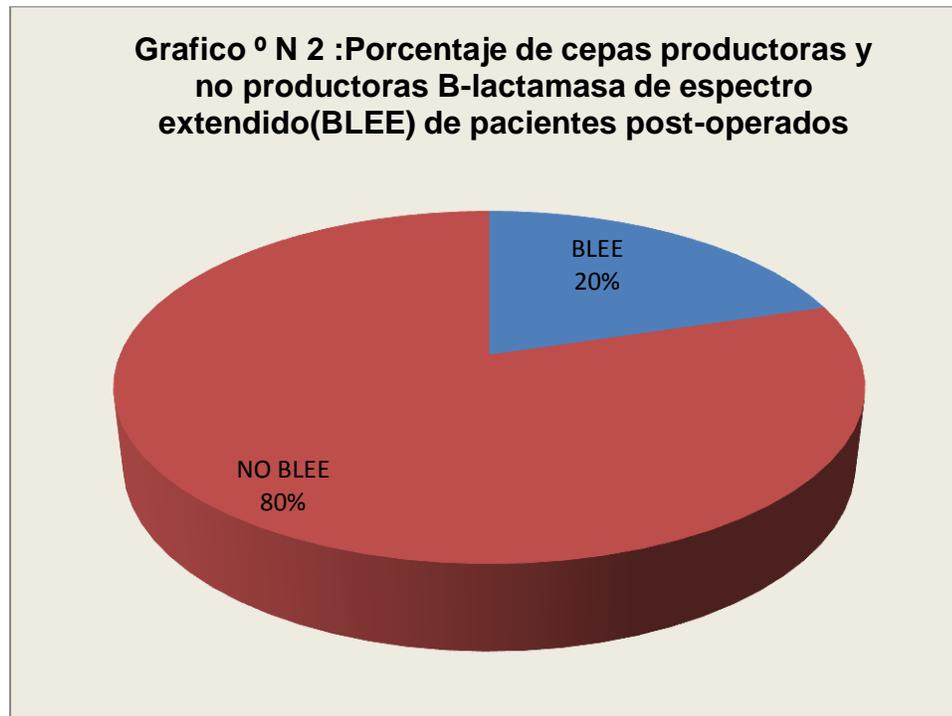
	Nº de cepas	% de cepas
Otros microorganismos	24	10
<i>Enterobacterias</i>	207	90
Total	231	100



De las 231 cepas de pacientes post-operados el 90% (207 cepas) de *Enterobacterias* aisladas presentan aislamiento positivo de *Enterobacterias* y el 10% (24 cepas) presenta un aislamiento para otro tipo de microorganismo.

TABLA °N 2 frecuencia de enterobacterias productoras y no productoras de betalactamasas en pacientes post-operados

ENTEROBACTERIAS	° N cepas	% de cepas
BLEE	42	20,29
NO BLEE	165	79,71
Total	207	100,00



En la tabla y grafico anterior se observa la frecuencia de enterobacterias productoras de betalactamasa con un 20%(42 cepas) y no productoras de betalactamasa (BLEE) 80% (165 cepas) en una población total de 207 enterobacterias aisladas.

TABLA °N 3 Frecuencia de genero de *enterobactrias* productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEEs) en pacientes post-operados

<i>Entrobactrias</i>	BLEE	% BLEE
<i>E. coli</i>	30	71,43
<i>Enterobacter spp</i>	4	9,52
<i>P.auriginosa</i>	3	7,14
<i>Klebsiella spp</i>	2	4,76
<i>Proteus spp</i>	2	4,76
<i>Acinetobacter spp</i>	1	2,38
total	42	100,00

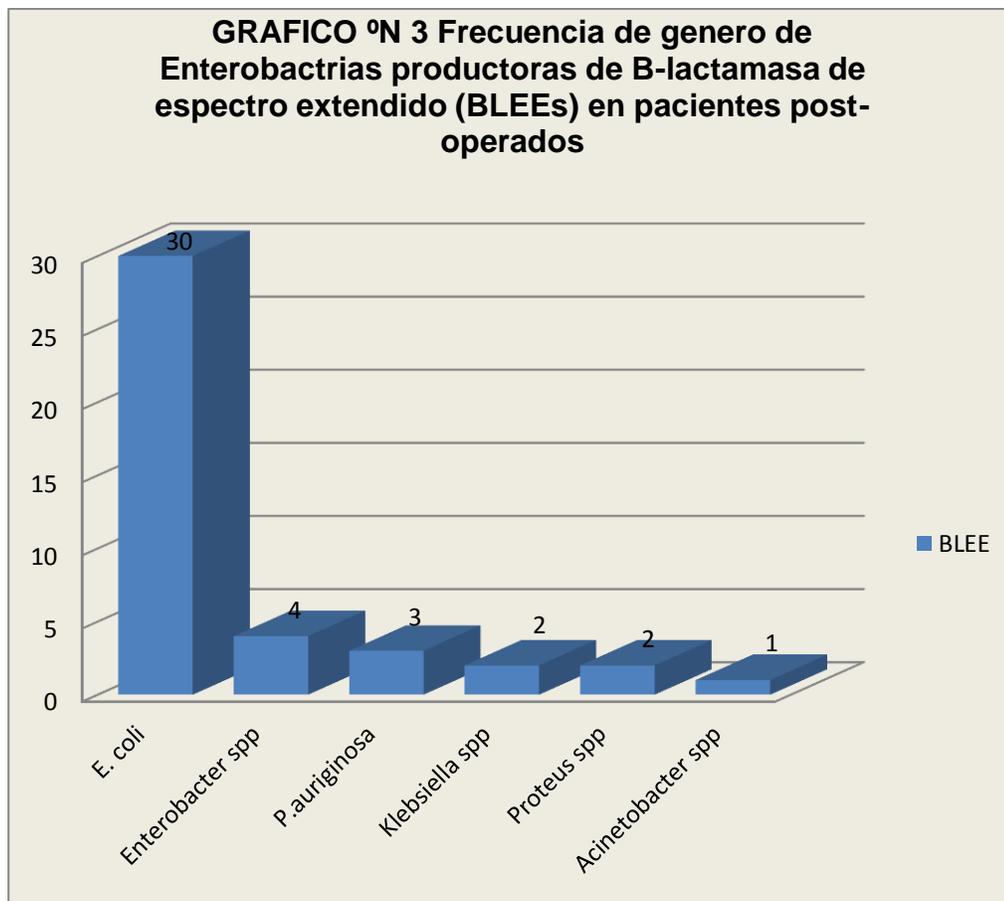
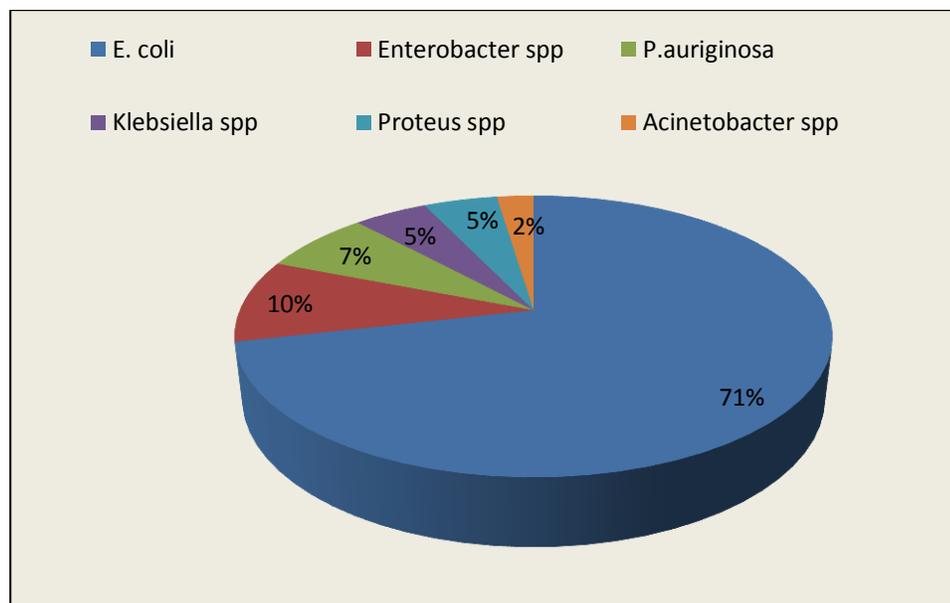


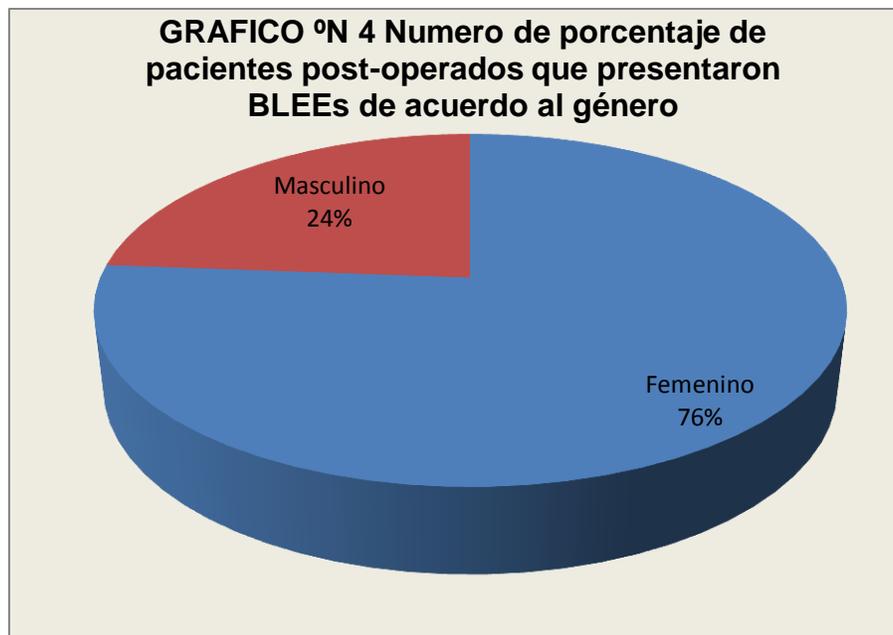
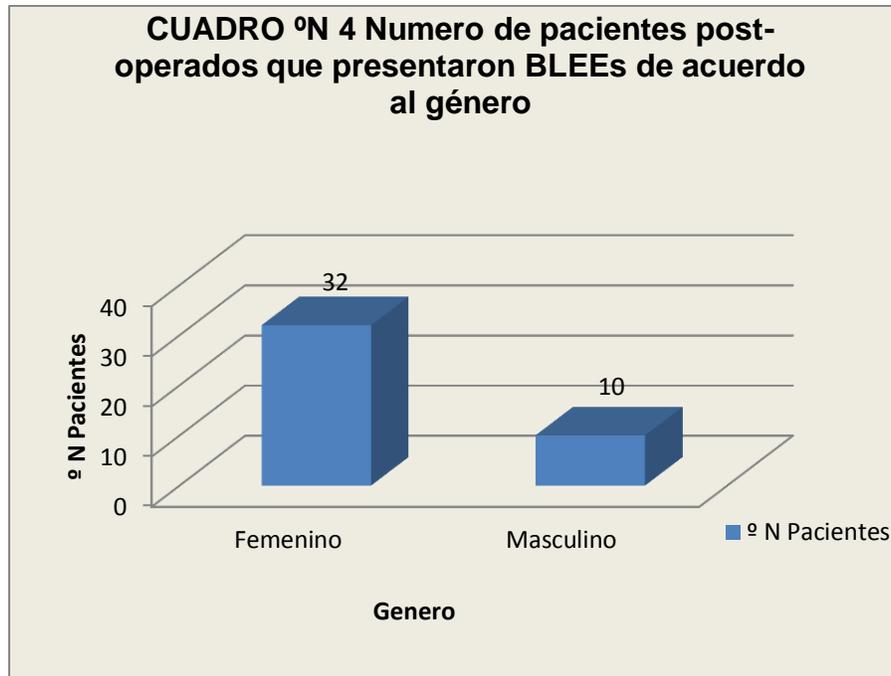
GRAFICO °N 3 Porcentaje de frecuencia de genero de *Enterobacterias* productoras de B-lactamasa de espectro extendido (BLEEs) en pacientes post-operados



En la tabla y grafico anterior, el total de las cepas productoras de BLEEs, la mas frecuente aislada en 42 cepas productores de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) son para *E.coli* 71% (30 cepas), *Enterobacter spp* 10 % (4 cepas), *P.aeruginosa* 7% (3cepas), *Klebsiella spp* 5 % (2 cepas), *Pruteus spp* 5 % (2 cepas), *Acinetnetobacter spp* 2% (1cepas).

TABLA °N 4 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al género

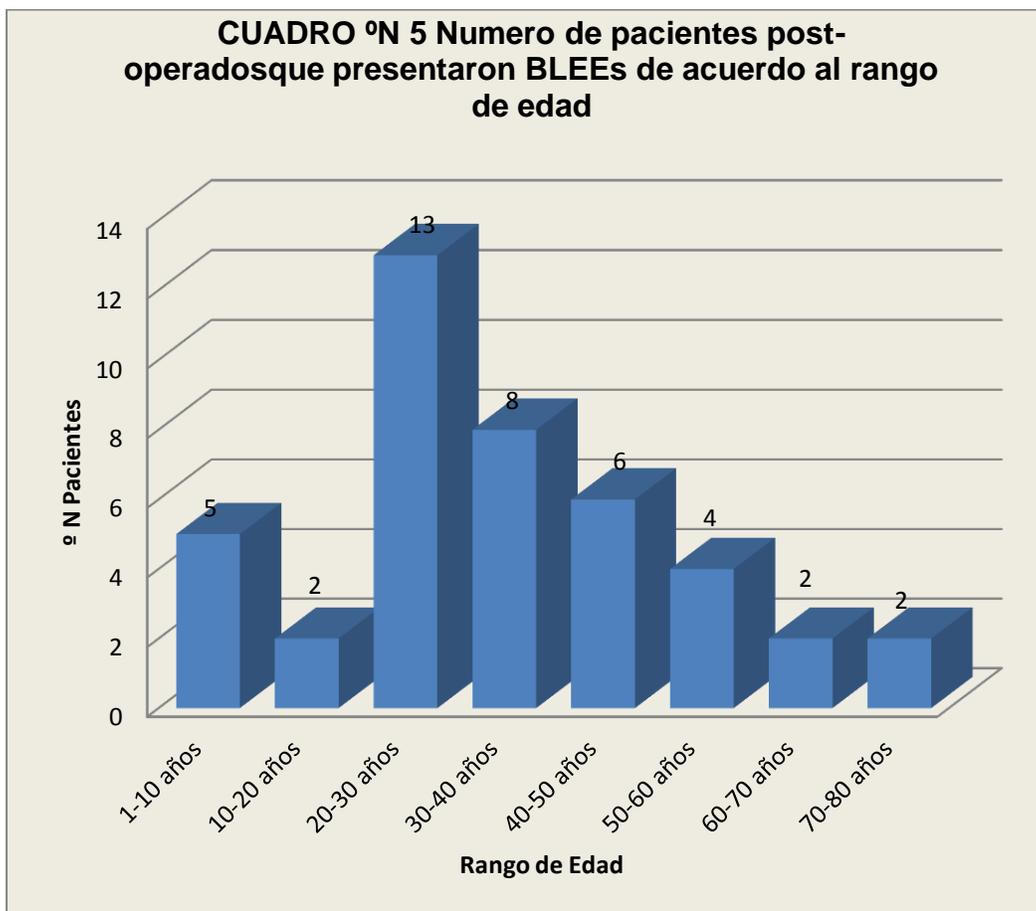
Genero	° N Pacientes	% Pacientes
Femenino	32	76,19
Masculino	10	23,81
Total	42	100,00

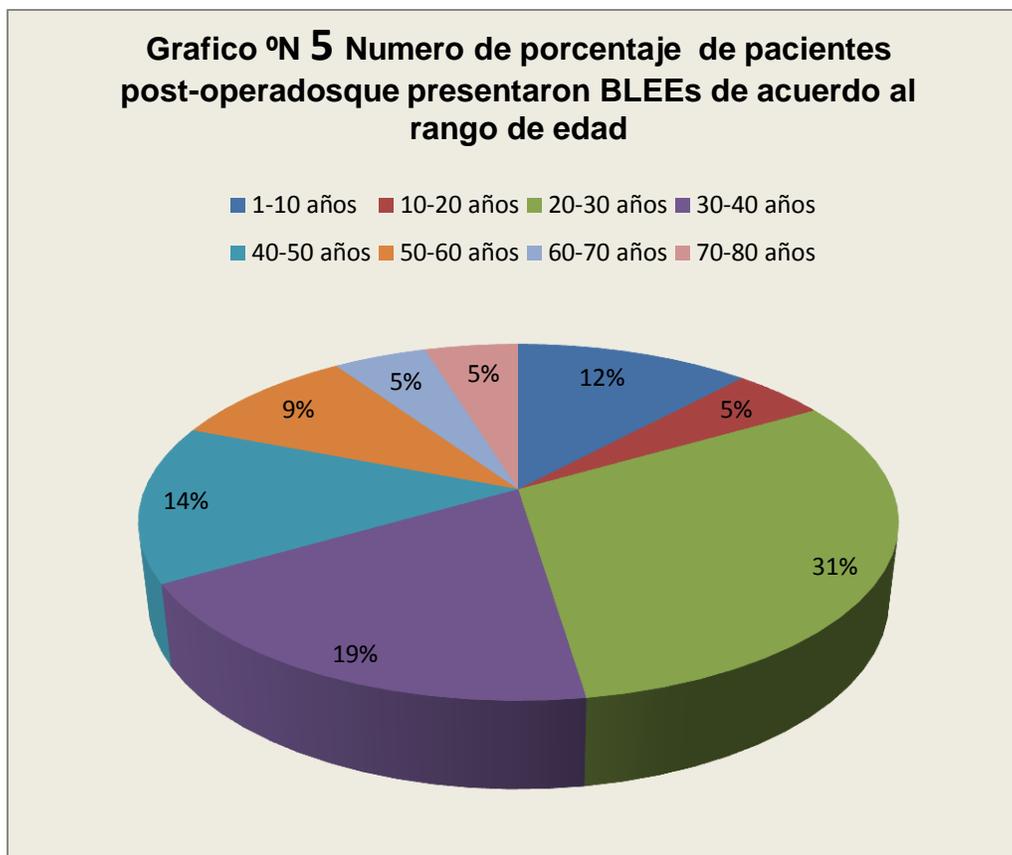


Se observa que la mayor cantidad de BLEEs encontrados en las muestras procesadas, pertenecen al genero femenino con un 76 % (32 muestras) para genero masculino 24 % (10 muestras) como se muestra en la tabla y grafico °N 4

TABLA °N 5 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al rango de edad

Rango de Edad	° N Pacientes	% Pacientes
1-10 años	5	11,90
10-20 años	2	4,76
20-30 años	13	30,95
30-40 años	8	19,05
40-50 años	6	14,29
50-60 años	4	9,52
60-70 años	2	4,76
70-80 años	2	4,76
Total	42	100,00

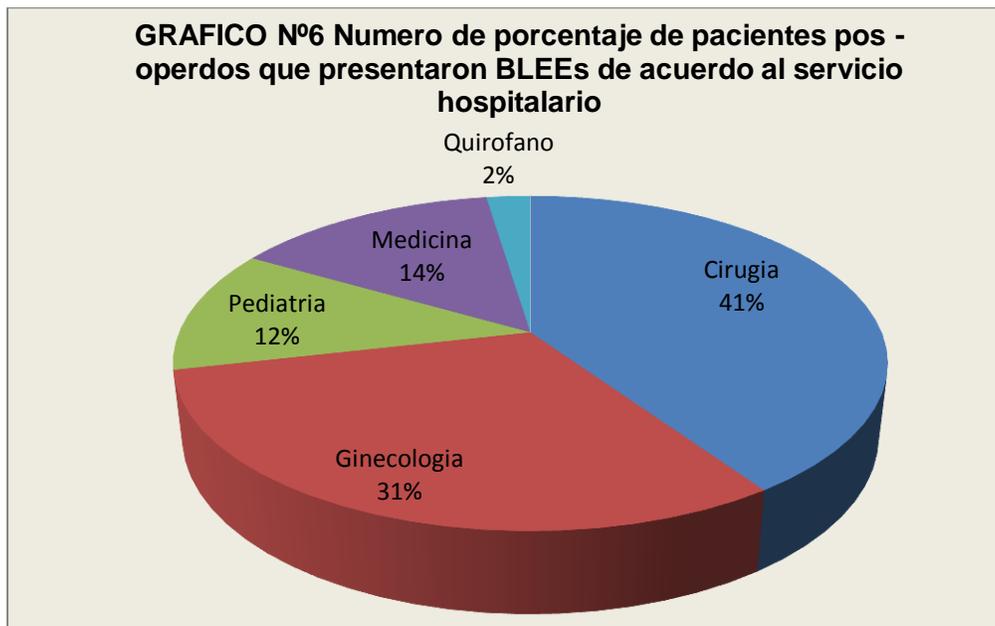
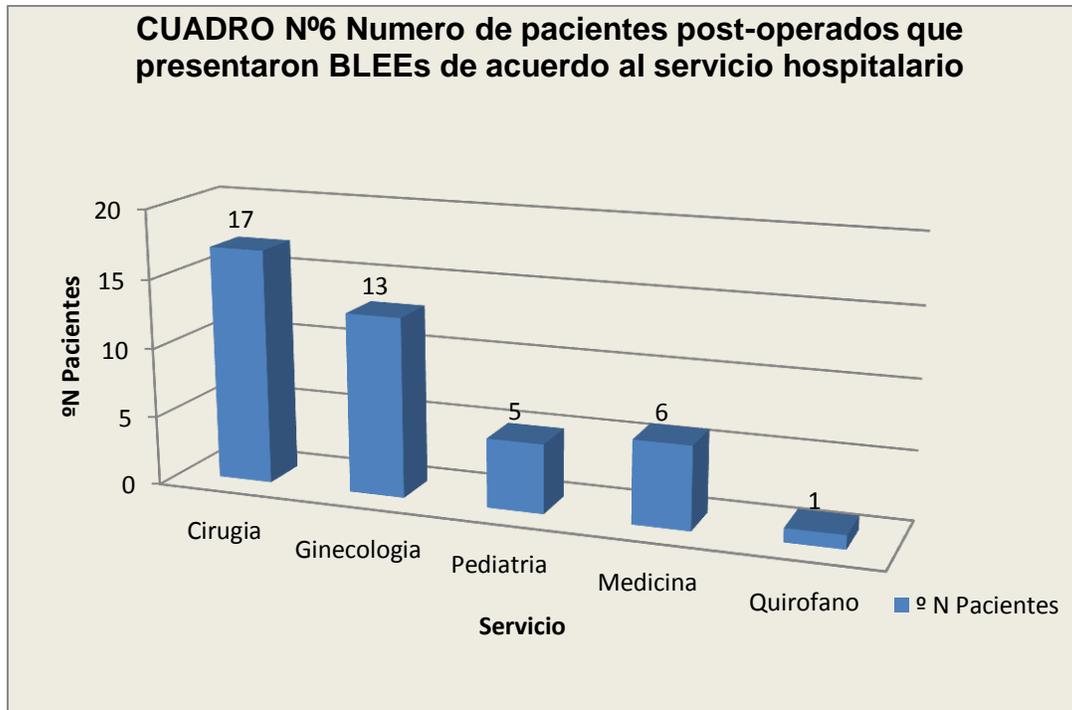




En la tabla y el cuadro anterior se puede observar que la mayor cantidad de BLEEs encontrados en las muestras procesadas pertenecen a las edades comprendidas entre 20 – 30 años 31 % (13 pacientes), 30-40 años 19 % (8 pacientes), 40-50 años 14% (6 pacientes), 1-10 años 12 % (5pacientes), 50-60 años 9 % (4 pacientes), 60-70 años 5 % (2pacientes), 70-80 años 5 % (2 pacientes).

TABLA °N 6 Numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al servicio hospitalario

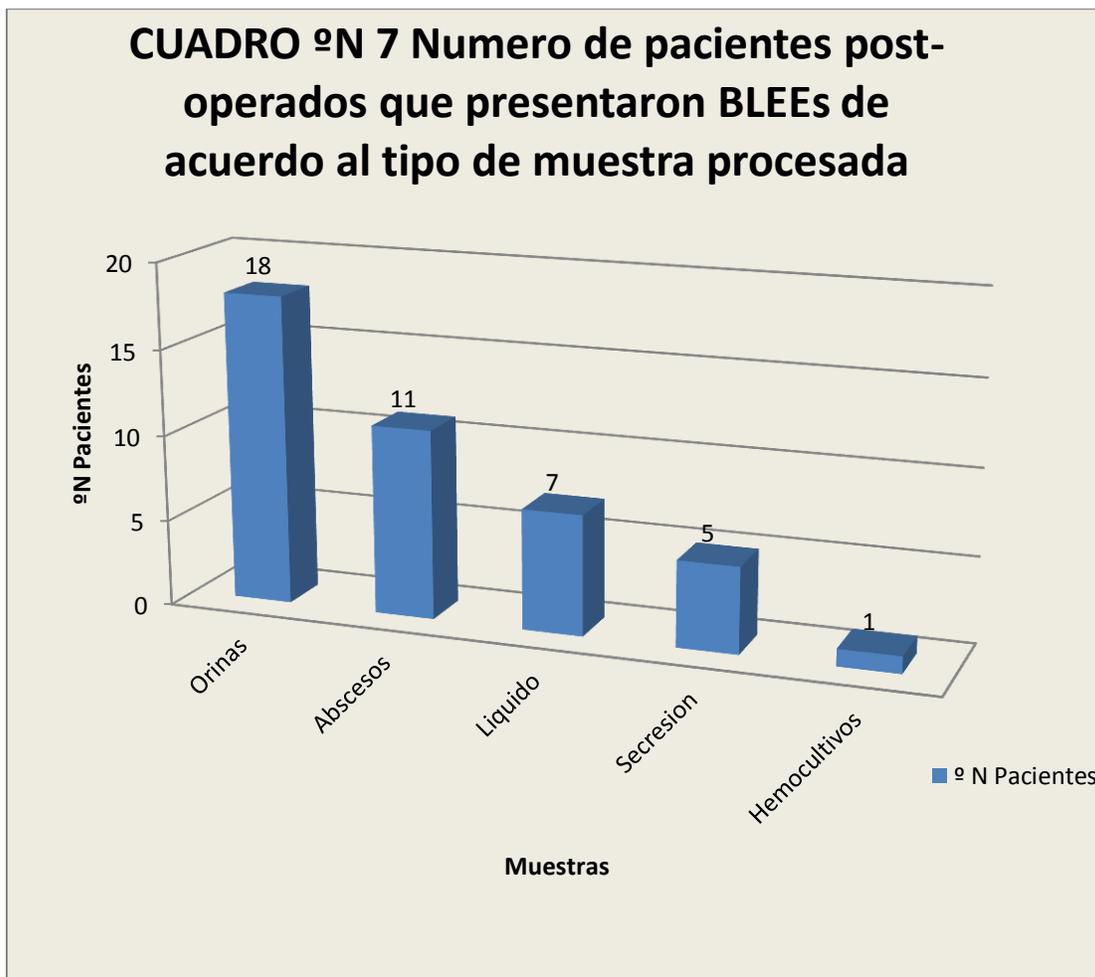
Servicio	° N Pacientes	% Pacientes
Cirugia	17	40,48
Ginecologia	13	30,95
Pediatría	5	11,90
Medicina	6	14,29
Quirofano	1	2,38
Total	42	100,00

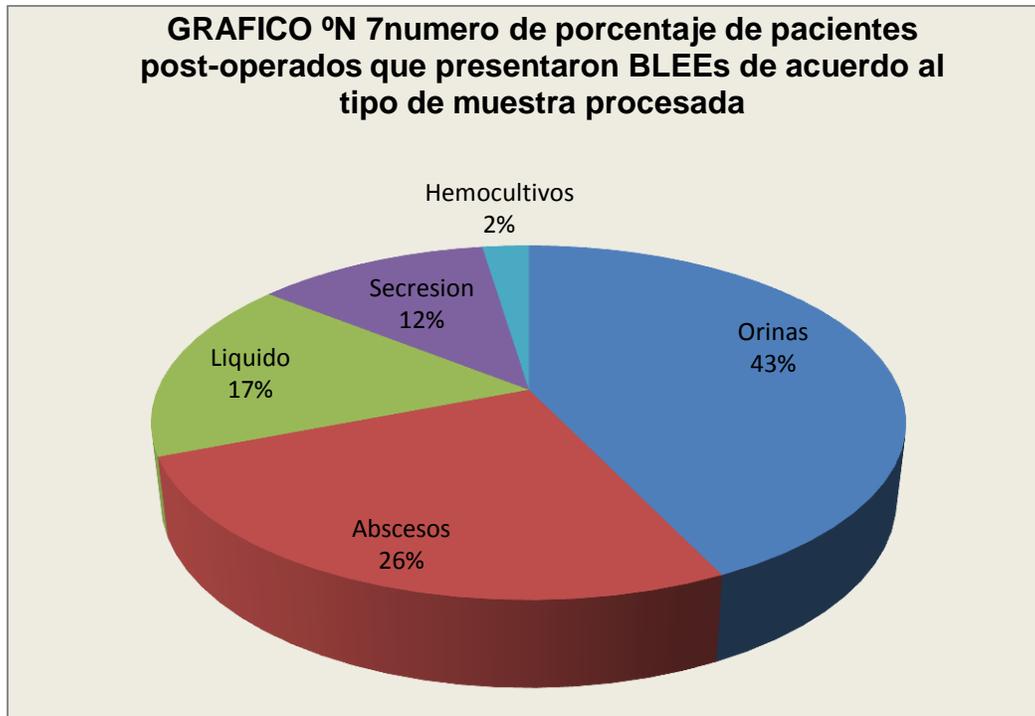


En la tabla y grafico anterior se puede observar que la mayor cantidad de BLEEs encontrados en las muestras procesadas pertenecen al servicio de cirugía 41 % (17 cepas).ginecologia 31 %(13 cepas), pediatria 12%(5 cepas), medicina 14%(6 cepas), quirofano 2% (1 cepa).

CUADRO °N 7 numero de pacientes post-operados que presentaron BLEEs de acuerdo al tipo de muestra procesada

Muestras	° N Pacientes	%Pacientes
Orinas	18	42,86
Abscesos	11	26,19
Liquido	7	16,67
Secresion	5	11,90
Hemocultivos	1	2,38
Total	42	100,00





En la tabla y el grafico anterior se puede observar que la mayor cantidad de BLEEs encontrados en las muestras procesadas fueron de muestras Orinas 43 % (18 muestras) de absceso 26%(11 muestras) Secresion 12% (5 muestras); liquidos 17 % (7 muestras) hemocultivos 2 %.(1 muestras).

VII. DISCUSIÓN

Las β -lactamasas de espectro extendido son una familia de enzimas producidas por los bacilos gram negativos, fundamentalmente *Enterobacterias* especialmente frecuentes en *klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam.

El estudio realizado en el laboratorio de bacteriología del hospital municipal boliviano holandés, de pacientes post-operados durante la gestión 2009, la identificación de *Enterobacterias* con relación a otros microorganismos aislados constituye un mayor porcentaje de aislamiento del total de toda la población en estudio, *Enterobacterias* 90% y otros microorganismos 10%.

El hallazgo de *Enterobacterias* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) contribuye a la resistencia a cefotaxima representando el 20 % (42 cepas), estudios realizados anteriormente en el hospital se encontró 21 % en el año 2004 , en otros hospitales se encontró en menor porcentaje de 0.94% en el hospital de clínicas de la ciudad de La Paz gestión 2002 ,lo cual es indicativo de que existe cierto tipo de mecanismo de resistencia por el cual la bacteria se hacen resistente a la cefotaxima y este mecanismo lleva a la inactivación de los antibióticos por la enzima,

Estas betalactamasas son enzimas que se han originado desde las enzimas TEM-1 TEM-2 o SHV -1 tras sufrir diversas mutaciones. estas mutaciones les confieren al germen cierta resistencia, las enzimas se encuentran codificadas por plásmidos lo que les otorga una capacidad de diseminación en distintas cepas que ha hecho que se haya difundido en pocos años.

La frecuencia de género de *Enterobacterias* mas frecuentes productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), y en mayor proporción causantes de infecciones intrahospitalarias y comunitarias estas cepas aparecen con mayor frecuencia en un 71 % del aislamiento de *E. coli*. y en segundo lugar *Enterobacter*

spp 10%. *P. auriginosa* 7%, *Klebsiella spp* 6 % sin embargo en países como México y América del Sur y otros países el microorganismo que predomina es *Klebsiella pneumoniae* 42 %, en nuestro estudio esta ocupa el cuarto lugar, *E.coli* 10% y en nuestro medio esta productora de BLEE ocupa el primer lugar, bibliografía revisadas se encontró también que en la ciudad de las Habana el 2006 se encontró una mayor predominancia de *klebsiella spp* 60% *E.coli* con 53% y *Enterobacter spp* con un 47% en nuestro estudio *Enterobacter spp* ocupa un segundo lugar con un 10%, con relación a otras bacterias obtenidas como BLEE en nuestro estudio no se encontró datos relacionados con los resultados obtenidos ya que estas no son de mayor relevancia de importancia clínica.

Se observa que la mayor frecuencia de BLEE encontrados en las muestras procesadas pertenece al género femenino con un 76 % comprendidas entre 20 – 30 años de edad y la *Enterobacteria* más frecuente aislada es la *E.coli*

Hay cepas enteropatógenas de *E. coli* que causa más del 50% de las infecciones urinarias tanto en hombres como en mujeres. Las mujeres son más propensas a sufrir infecciones del tracto urinario a una edad más temprana lo cual se puede correlacionar con estudio anteriores, que en la ciudad de la Habana, y México la mayor frecuencia de BLEE encontrados se da en el género masculino en un 75% y en nuestro estudio esta se encuentra en una menor proporción un 22%.

El mayor porcentaje de cepa BLEE corresponde al servicio cirugía (41%) seguido ginecología 31 % pediatría 12 % medicina 14%, quirófano 2% con estos datos es preciso señalar que la presencia de enterobacterias en los servicios del hospital son como agentes causales de infecciones intrahospitalarias la cual se correlaciona con datos obtenidos en Argentina, que la mayor frecuencia de aislamiento de enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido BLEE se encuentran en el servicio de medicina 50 % cirugía 15% el cual en nuestro estudio la mayor frecuencia de aislamiento de *Enterobacterias* productoras de betalactamasa BLEE se encuentra en el servicio de cirugía seguido por ginecología.

Las muestras donde se aislaron con mayor frecuencia estas cepas, fueron orinas 43% (18 muestras), absceso 26%(11 muestras), líquidos 17 %(7 muestras) secreción 12 % (5 muestras); hemocultivos 2%.(1 muestras). Se encontró datos relacionados con el estudio, que con mayor frecuencia se aislaron de orina 42%, hemocultivos 15%, líquidos 8%, secreciones 5%, en nuestro estudio de aislaron en menor porcentaje de frecuencia en las muestras en estudio de los pacientes post-operados.

En nuestro trabajo, del total de cepas BLEE positivas, aisladas de pacientes con diagnóstico de puerperio quirúrgico, la mayor incidencia le correspondió a *e.coli*. en muestras de orina.

En nuestro estudio, el porcentaje de enterobacterias productoras de BLEE, fue del 20 %, este porcentaje está dentro de los valores de frecuencias comparado con otros resultados en Argentina se aislaron con una frecuencia de 31.1 % que está también dentro de los valores de referencia que va de 20 a 48 % de aislamiento de enterobacterias.

Las infecciones intrahospitalaria constituyen un problema grave en todos los hospitales.

Del total de cepas BLEE encontradas en pacientes post-operados internados en las diferentes unidades del hospital, son más propensos a adquirir infecciones por microorganismos gram negativos, debido a su baja defensa inmunológica y el tiempo de internación, también tienen un tratamiento prolongado de antibióticos y sondas urinarias permanentes.

VIII CONCLUSION

Las enterobacterias con relación a otro microorganismo son aislada con mayor frecuencia en un 90%(207 cepas), de estas 20% (42 cepas) son *Enterobactrias* productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y otros microorganismos con un 10 %(24 cepas) en un total de 231 muestras recepcionadas de pacientes post- operados.

La frecuencia de género de *Enterobacterias* más frecuentes productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y con mayor frecuencia de aislamiento es la *E coli*.71%, se encontró en ambos generos, diferentes rango de edad en diferentes servicios.

La frecuencia de *Enterobacterias* productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) según genero, con mayor predominancia de aislamiento es para el genero femenino con un 76 %, comprendidos entre los 20-30 años de edad y genero masculino con 24 %en muestras de orinas, absceso, Secresion, liquidos hemocultivos.

Los factores de riesgo para la aparición de bacterias productoras de BLEE incluyen la administración previa de cefalosporinas de amplio espectro y la utilización de cefalosporinas de tercera generación, ejerce una presión importante en las bacterias Gram negativas. Esto último genera un problema, que el 50% de las infecciones intrehospitalaria son tratadas con antibióticos beta-lactanticos.

El hecho de que un paciente adquiera una infección intrahospitalaria, tiene diversas implicaciones, tanto directamente sobre la salud y pronóstico del paciente, como en la eficiencia, costo económico y funcionamiento del hospital.

Las infecciones intrahospitalaria pueden causar enfermedad severa o muerte, la estancia hospitalaria prologada, la necesidad de utilizar tratamiento antimicrobiano adicional o que el paciente infectado se convierta en fuente o reservorio

El hallazgo de estas cepas en nuestro medio debe orientar a extremas medidas de control en cuanto al uso indiscriminado de antimicrobianos, tratamiento ineficaces y sobre todo sin haber realizado antes un antibiograma

Por todo lo indicado anteriormente, la presencia de BLEE en un hospital de segundo nivel, se sugiere, restringir el uso de beta-lactámicos de amplio espectro e implementar medidas rigurosas de higiene para el control de las infecciones y la prevención de la diseminación de microorganismos productores de BLEE en el ambiente hospitalario. El problema de la resistencia antimicrobiana es responsabilidad de todo el personal de salud que está involucrado en el uso de antimicrobianos. La mejor estrategia continúa siendo el uso adecuado de estos fármacos. El conservar su utilidad por tiempo prolongado depende de la prescripción razonada, no de la capacidad de la droga por mantener su actividad ante la inevitable repuesta de las bacterias que les permite expresar sus mecanismos de resistencia.

IX BIBLIOGRAFIA

1. Sanchez Beatris, Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) URL disponible en: <http://www.encolombia.com/medicina/pediatria/pedi37402beta3.htm> Artículo nº C6. Vol 4 nº 8, agosto 2004.
2. Antonio Oliver y Rafael Cantón, Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido URL disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Blees.htm
3. Dr. Alexander Ramos Godínez, Dr. Wilfredo Hernandez Pedroso, Detección precoz de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes graves ,URL disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/mie/vol5_1_06/mie07106.htm
4. Muzachiodi, Marisol I. Incidencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido URL disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/b1betalactamasas_de_espectro_extendido.pdf Resumen: M-135
5. Ministerio de Salud y Previsión Social. Dirección General de Epidemiología. Manual de Normas, Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias. 2001.
6. Monforte ML, Palacián MP, Bacteremias por escherichia coli klebsiella spp productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) URL disponible en: http://www.postersessiononline.com/312191188_es/congresos/13reseimc/aula/poster_25544.pd, DOI: 10.3252/pso.es.13reseimc.2009.
7. WWW.TECLIMZA.COM. Las Enterobacteriaceae URL disponible en: www.teclimza.com/.../lasenterobacteriaceae.html
8. Enterobacteriaceae URL disponible en: http://html.rincondelvago.com/microbiologia_18.html
9. De Wikipedia, la enciclopedia libre. Antibiótico betalactámico, URL disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Antibi%C3%B3tico_betalact%C3%A1mico
10. Elergonomista.com ,antibióticos betalactamicos ,URL disponible en <http://www.elergonomista.com/farmacologia/beta.htm>, 2005

11. Pacheco Chirinos Julio. Los Mecanismos de la Resistencia Microbiana, URL disponible en: <http://www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/larev/mecre.htm>, LA REVISTA MÉDICA DEL C.I.E.M. Arequipa, Perú.
12. Monografías.com ,mecanismo de resistencia moleculares URL disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos11/resanti/resanti.shtml>
13. REVISTA DE PEDIATRÍA , Origen de las BLEE URL disponible en: <http://www.encolombia.com/medicina/pediatria/pedi37402-beta3.htm>
14. Roxana Rebeca Aliaga Almedo CARACTERIZACIÓN DE LAS B-LACTAMASAS DE..., Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) URL disponible en: <http://ddd.uab.cat/pub/tesis/2001/tdx-0925101-164302/rraa6de6.pdf> Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
15. R. Vignoli, V. Seija Principales mecanismos de resistencia antibiótica, URL disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf> ,
16. Antonio Oliver, ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO, URL disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Blees.htm Hospital Universitario Ramón y Cajal², Madrid
17. Origen de la BLLE URL disponible en: <http://www.encolombia.com/medicina/pediatria/pedi37402-beta4.htm>, colom
18. Ministerio de salud y deportes instituto nacional de laboratorios en salud ,Manual de aislamiento e identificación de patógenos Gram negativos asociados a infecciones intrahospitalarias
19. Infección intrahospitalaria como causa de muerte URL disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos14/infeccionintra/infeccionintra.shtml>
20. Milagros Dávalos Moscol Cefalosporinas de tercera generación URL disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v11n1/cefalosporinas.htm> Hospital Nacional "Edgardo Rebagliati Martins" - IPSS. Lima.

21. Mar Marín y Francesc Gudiol. Antibióticos betalactámicos URL disponible en: http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/eimc_docs/28v21n01a13042137pdf001.pdf *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;21(1):42-55
22. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*: E. Coli y K. Pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles. 2006; 21(2):77-82. URL disponible en: http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/eimc_docs/28v21n01a13042137pdf001.pdf
23. Cristina Seral García, María Pardos de la Gándara, Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella URL disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Blees.htm. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(Supl 1):12-18
24. Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G. Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect Dis*. 1988;10:850-9.
25. Jacoby GA, Bush K. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. 2009; Ed.: Lahey CLINIC. URL Disponible en: <http://www.lahey.org/studies/>.

ANEXOS

FOTOS DE MUESTRAS RECEPCIONADAS Y PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE CEPAS DE *ENTEROBACTERIAS* PRODUCTORAS DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN EL SERVICIO DE BACTERIOLOGÍA DE PACIENTES POST-OPERADOS EN EL HOSPITAL MUNICIPAL BOLIVIANO HOLANDES

FIGURA °N 1 Recepcion de muestras



FIGURA °N 2 Siembra de una muestra de orina en agar CLEED



FIGURA 0 N 3 siembra de muestras de absceso y liquidos y secreciones en agar sangre macckonque

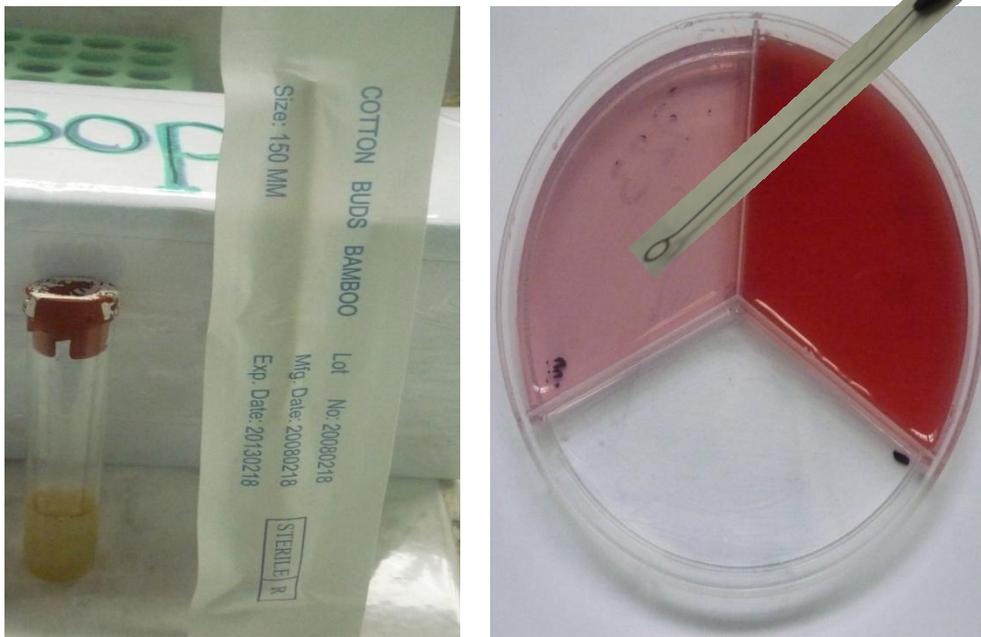


FIGURA 0N 4 siembra de hemocultivo en agar chocolate



FIGURA °N 5 siembra de liquidos en agar macconkey y chocolate

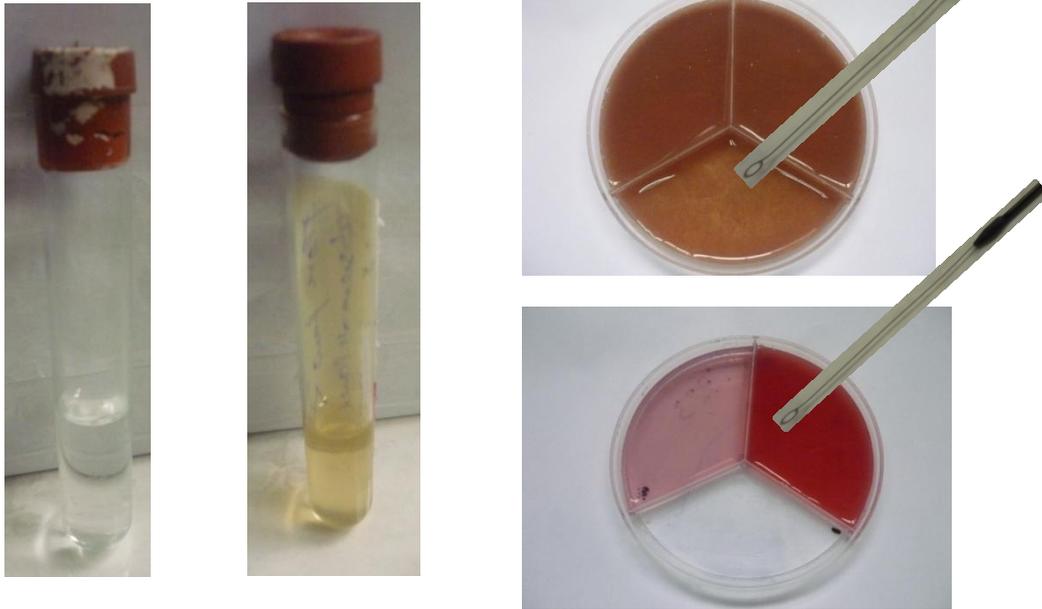


FIGURA ° N 6 crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivos sembrados



FIGURA ° N 7 Tincion gram

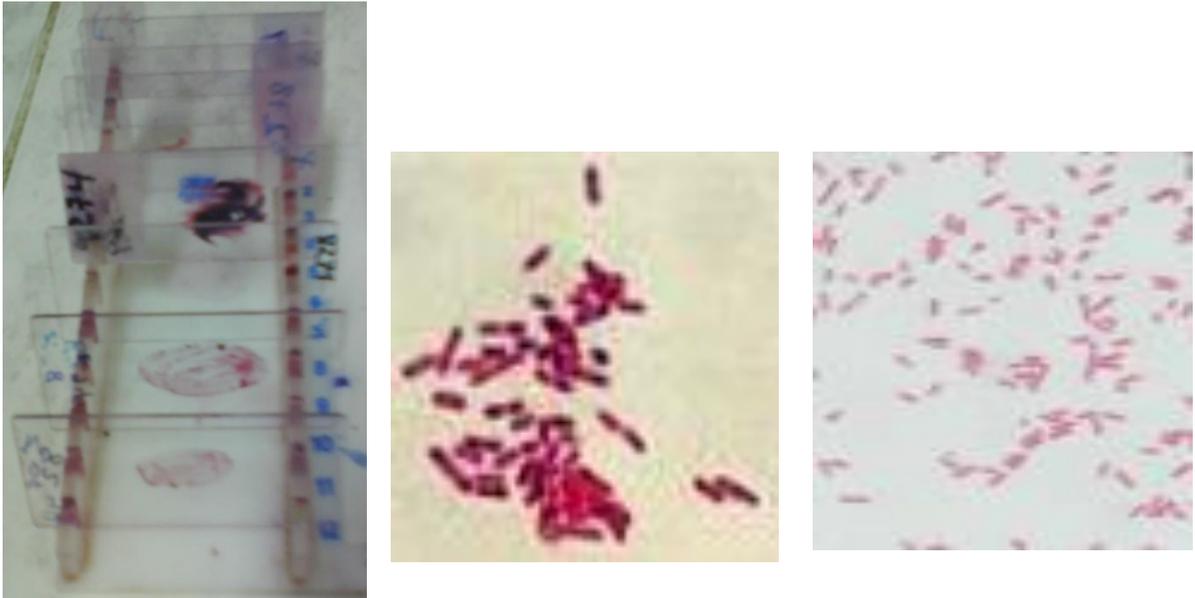


FIGURA ° N 8 Pruebas bioquimicas (baterias bacteriologica) TSI; LIA; MIO; SIM; CITRATO.



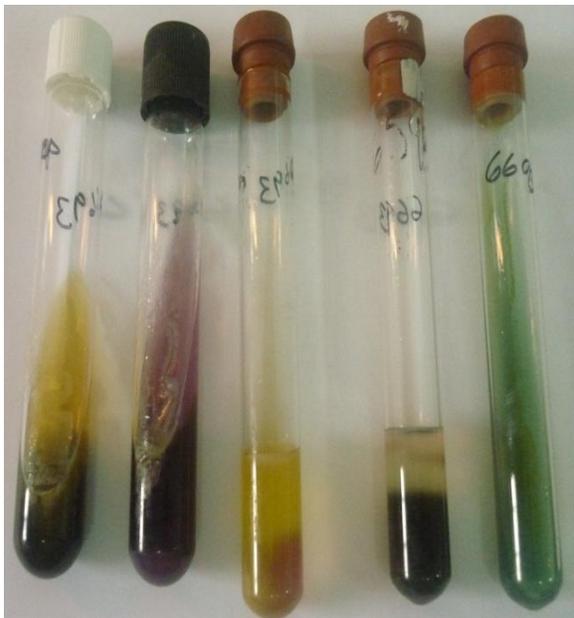
FIGURA ° N 9 Identificación de las *enterobacterias* a través de la lectura de las baterias bacteriologicas



Enterobacter spp



E. coli



Proteus spp



P. auriginosa



Klebsiella spp

FIGURA ° N 10 Colonias disueltas en solucion fisiologica para realizar el antibiograma y comparacion con el estandar de turbidez 0.5 Mac Farland a una concentracion de $1,5 - 2 \times 10^8$ ufc/mL de la escala Mac Farlan

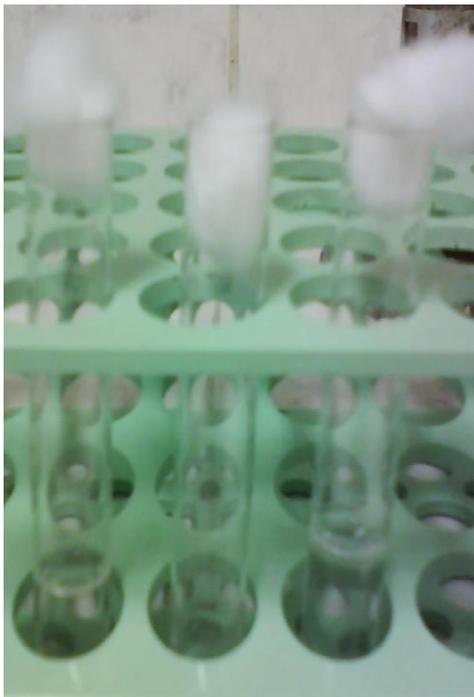


FIGURA ° N 11 Discos de antibióticos para realizar el antibiograma en agar mueller hinton

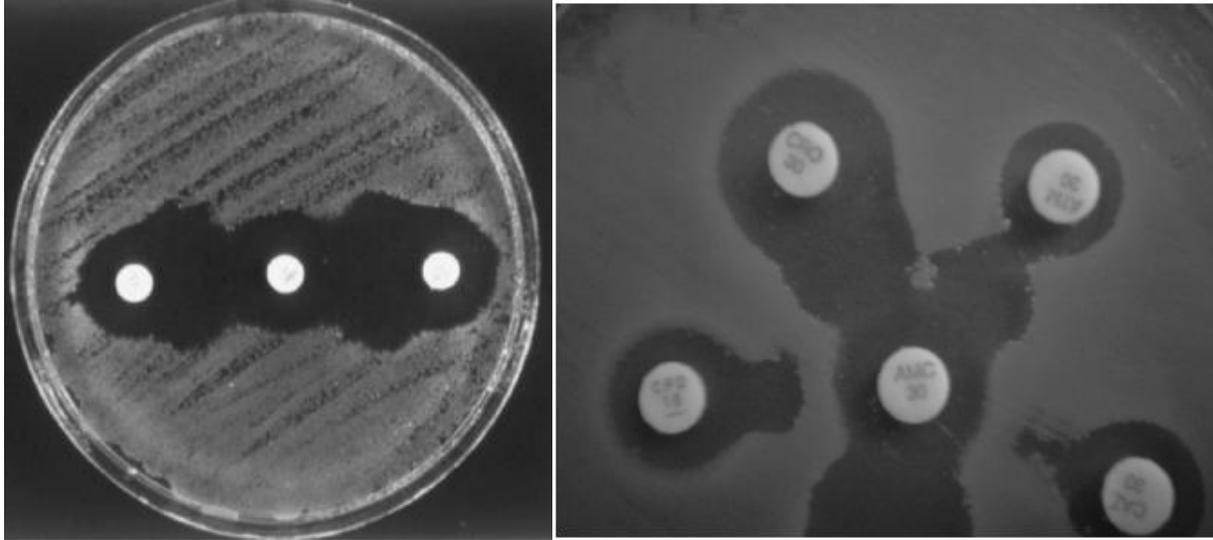


FIGURA ° N 12 Disco de cefotaxima y amoxiclavulamico en agar mueller hinton para la detección de BLEE

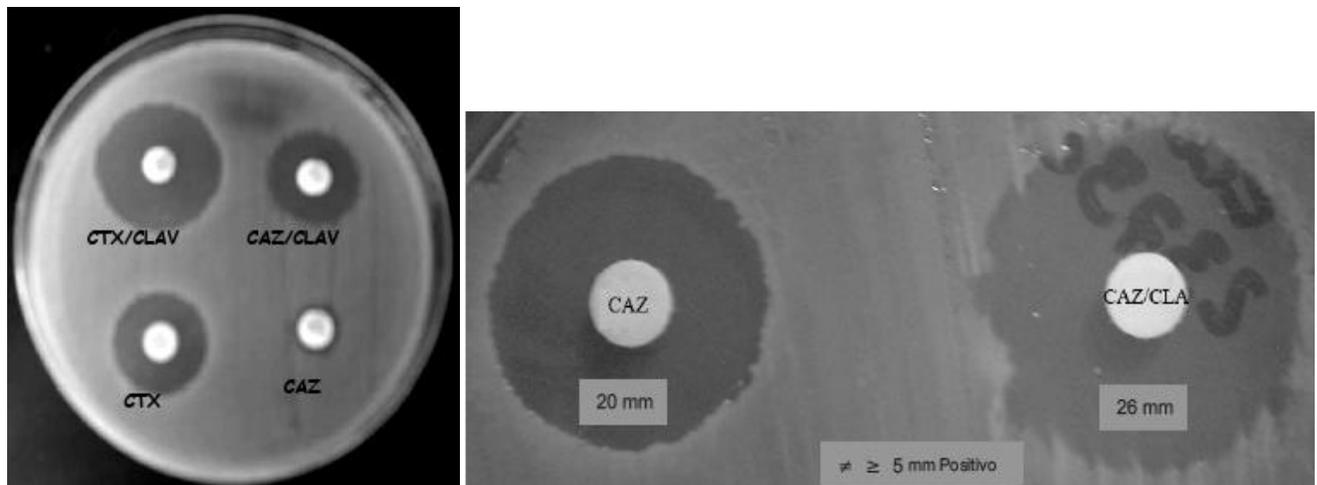


FIGURA ° N 15 Métodos de detección de BLEES.

a) Sinergia de doble disco.



b) Combinación de discos



c) E-test. CAZ: ceftazidima. AMX: amoxicilina; CLA: ácido clavulánico; CTX: cefotaxima

