

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Caracterización Genotípica, Mediante ERIC-PCR, de
Aislamientos Clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella
pneumoniae* Productoras de Beta-lactamasas de
Espectro Extendido

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

1942

Presenta:

KATYA ROCÍO FÉLIX MURRAY

Hermosillo, Sonora

Marzo 2018

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Katya Rocío Félix Murray, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Enrique Bolado Martínez
Director de Tesis

M.C. Lucia Guadalupe Castellón Campaña
Secretario

M.C. Griselda Macrina Moreno
Vocal

M.C. Moisés Navarro Navarro
Suplente

A Renán, mi padre.

*Por siempre intentar inculcarme el valor de la constancia y un ferviente
interés en la ciencia y el aprendizaje continuo.*

Agradecimientos

Dedico esta página para mencionar y agradecer a las personas que motivaron la escritura y el trabajo detrás de esta tesis, esperando sepan de mi gratitud. Son ustedes la razón de mi esfuerzo y el motor que me impulsó a llegar al final de este proyecto.

A mi Madre, por su amor, su paciencia y el gran esfuerzo que siempre hace por educarme, para que sea una persona de bien y además, profesionalista.

A mis hermanos, Teresa Elda, Renán y Paula, por su apoyo incondicional y la complicidad fraternal que siempre me han ofrecido.

A Alejandro, por tu tiempo, el amor y el balance que aporta tu presencia en mi vida. Por comprender a la perfección la pasión que siento por mi profesión, casi tan grande como la que sientes por la tuya.

A mis amigos y compañeros, (en especial a Leira, Dafne, Yesica, Rocío, Martín y Lizbeth) por el aprendizaje adquirido juntos, por el gran equipo que siempre fuimos, por su amistad y las experiencias que compartimos.

A mi asesor, por invitarme a realizar este proyecto, y acompañarme en el hasta su culminación. Por su ayuda, su paciencia, sus enseñanzas y su amistad.

A mis sinodales y profesores, (Mtro. Moisés, Mtra. Lucía y Mtra. Griselda) por ofrecerme un tercer ojo para la revisión de este trabajo, porque quizás sin darse cuenta, con sus clases sembraron en mí un gran amor por la microbiología, por su apoyo, y por la fé que tuvieron en mí y en este proyecto desde el principio. También, y muy especialmente al Mtro. Rafael Cannet Romero, quien siempre supo usar las palabras correctas para motivarme a seguir el camino de la investigación.

A todos, ¡Muchas gracias!

*Un experimento científico, por espectaculares que sean sus resultados, no
termina hasta que sus resultados se publican.
Robert Day*

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABLAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| OBJETIVOS | 1 |
| Objetivo General | 1 |
| Objetivos Particulares..... | 1 |
| RESUMEN | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| ANTECEDENTES | 6 |
| Antibióticos Beta-lactámicos | 6 |
| Grupos de Antibióticos Beta-lactámicos | 7 |
| Penicilinas | 7 |
| Cefalosporinas y cefamicinas | 7 |
| Carbapenémicos | 7 |
| Monobactámicos | 8 |
| Mecanismo de Acción de los Antibióticos Beta-lactámicos | 9 |
| Resistencia Bacteriana a los Antibióticos | 10 |
| Tipos de Resistencia a los Antibióticos | 12 |
| Resistencia natural o intrínseca | 12 |
| Resistencia adquirida | 13 |
| Mecanismos de Resistencia | 13 |
| Alteración del sitio blanco del antibiótico | 14 |
| Producción de enzimas | 14 |
| Alteraciones de la permeabilidad | 15 |
| Expresión de bombas eflujo | 17 |
| Transferencia de Resistencia a los Antibióticos | 17 |
| Beta-Lactamasas de Espectro Extendido | 18 |
| Definición y Contexto de las BLEE | 18 |
| Importancia del Estudio de las BLEE | 20 |
| Prevalencia de las BLEE | 21 |
| Métodos para la Detección de BLEE | 22 |
| Métodos fenotípicos | 22 |

| | |
|--|----|
| Métodos automatizados | 23 |
| Métodos bioquímicos | 24 |
| Métodos genotípicos | 24 |
| Aplicación de Métodos Genotípicos en Análisis Epidemiológicos | 24 |
| Regiones Consenso Intergénicas Repetitivas de las Enterobacterias (ERIC)..... | 26 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| Descripción del Estudio | 29 |
| Extracción de ADN de Aislamientos Clínicos | 29 |
| ERIC-PCR | 30 |
| Análisis de la Información | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 32 |
| Aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Productoras de BLEE | 34 |
| Aislamientos de <i>Escherichia coli</i> Productoras de BLEE | 39 |
| CONCLUSIONES | 45 |
| BIBLIOGRAFIA | 54 |
| ANEXOS | |
| Anexo 1. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 202 aislamientos de <i>E. coli</i> de acuerdo a perfiles ERIC-PCR obtenidos | 46 |
| Anexo 2. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA, de 202 aislamientos de <i>E. coli</i> de acuerdo a perfiles ERIC-PCR obtenidos y al perfil de susceptibilidad a los antibióticos correspondiente | 50 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1 Grupos de antibióticos beta-lactámicos y algunos de sus integrantes | 9 |
| 2 Esquemas de clasificación para beta-lactamasas bacterianas | 16 |
| 3 Tamizaje para la detección de BLEE por la técnica de difusión de disco y concentración mínima inhibitoria | 23 |
| 4 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en ERIC-PCR | 31 |
| 5 Distribución, por institución de salud, de 215 aislamientos clínicos recuperados | 32 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1 Núcleo estructural de los grupos de antibióticos beta-lactámicos | 8 |
| 2 Historia del descubrimiento de antibióticos y desarrollo concomitante de resistencia a los mismos | 11 |
| 3 Mecanismos de resistencia bacteriana | 14 |
| 4 Metodología a seguir para la realización de ERIC-PCR | 31 |
| 5 Fotografía de un gel de agarosa obtenido después de electroforesis en agarosa al 1.5% de los productos de ERIC-PCR | 33 |
| 6 Fotografía de un gel de agarosa obtenido después de electroforesis en agarosa al 1.5% de los productos de ERIC-PCR y su análisis con el programa Bionumerics | 34 |
| 7 Dendrograma de 13 aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> , resultado del agrupamiento de los patrones ERIC con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice | 36 |
| 8 Dendrograma de 13 aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> evaluando la similitud de su perfil de susceptibilidad mediante el coeficiente de Pearson | 37 |
| 9 Dendrograma de 8 aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> , resultado del agrupamiento de los patrones ERIC con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice | 38 |
| 10 Dendrograma de 8 aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> , resultado del agrupamiento de los patrones PFGE con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice | 38 |
| 11 Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 34 aislamientos de <i>E. coli</i> de acuerdo a perfiles ERIC-PCR obtenidos | 42 |
| 12 Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 34 aislamientos de <i>E. coli</i> de acuerdo a perfiles de PFGE obtenidos | 43 |
| 13 Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 34 aislamientos de <i>E. coli</i> de acuerdo a perfiles ERIC-PCR y servicio hospitalario | 44 |

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar genotípicamente, mediante ERIC-PCR, aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), recuperadas de pacientes de cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

Objetivos Particulares

- Extraer ADN genómico de aislamientos Clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE recuperados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora.
- Realizar un análisis genotípico, mediante la técnica de ERIC-PCR, de los aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE recuperados
- Establecer patrones de similitud mediante el análisis de apareamiento por media aritmética sin ponderación (UPGMA), y así revelar la heterogeneidad genética de los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* recuperados de cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

RESUMEN

El presente trabajo consistió en genotipificar aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), mediante la amplificación por PCR de las regiones consenso intergénicas repetitivas de las enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés de enterobacterial repetitive intergenic consensus). Para ello, se recuperaron aislamientos provenientes de tres instituciones públicas de salud y un hospital privado, de la Ciudad de Hermosillo, Sonora, México, durante el periodo comprendido entre el 15 de febrero y el 15 de agosto de 2016. La identificación y pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se llevaron a cabo utilizando los sistemas Microscan®, o Vitek®, resultando en un total de 215 aislamientos clínicos BLEE positivos. A estos aislamientos se les extrajo el ADN con un equipo comercial y posteriormente se procedió a la genotipificación mediante ERIC-PCR. Los productos amplificados se analizaron y se generaron dendrogramas mediante UPGMA y el coeficiente Dice. Para los aislamientos de *K. pneumoniae*, la genotipificación permitió diferenciar 13 patrones ERIC, todos diferentes para cada aislamiento analizado, mientras que los hallazgos fenotípicos mostraban dos grupos con dos y cuatro aislamientos idénticos. En el caso de *E. coli*, el agrupamiento con ERIC-PCR mostró seis parejas de aislamientos idénticos, no obstante, al utilizar todas las pruebas (fenotípicas y genotípicas), solo dos de los 202 aislamientos mostraron un perfil idéntico. Por otra parte, se compararon aislamientos de los que se contaba con su perfil de electroforesis en campo pulsado (PFGE) frente a sus perfiles ERIC. Los análisis revelaron que ambas técnicas mostraron 34 cepas diferentes de *E.coli* y ocho cepas diferentes de *K. pneumoniae*. Los hallazgos del presente estudio evidencian que incluir ERIC-PCR en la caracterización genotípica, como un método para la diferenciación de aislamientos clínicos tanto de *K. pneumoniae* como de *E. coli* en instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora tiene valiosa utilidad y un poder de discriminación comparable con el método de PFGE.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha visto que algunos microorganismos tienen la capacidad de adquirir resistencia múltiple a los agentes antimicrobianos. En el caso de las bacterias, esta última propiedad se pone de manifiesto por la presencia de elementos genéticos tanto cromosomales, como serían los transposones y los integrones, como extracromosomales, es decir, plásmidos, que les permiten compartir y adquirir resistencia a los antibióticos (Errecalde, 2004).

El medio hospitalario es propicio para la difusión de resistencia bacteriana a los antibióticos, ya que regularmente un tercio de los pacientes reciben terapia con este grupo de medicamentos (Valencia-Ramos, *et al*, 2003). Este hecho tiene como consecuencia la selección de bacterias resistentes a los antimicrobianos. El uso inadecuado de antibióticos es particularmente importante, pues contribuye al desarrollo de resistencia bacteriana, lo que reduce la efectividad de los tratamientos antimicrobianos e incrementa los costos y la mortalidad por enfermedades infecciosas (Dreser, *et al*, 2008), por lo que la resistencia bacteriana a los antibióticos debe ser considerada como un grave problema de salud pública que demanda respuestas en los planos mundial, nacional y local.

Desde la década de los ochenta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el uso racional de medicamentos y ha recomendado que este aspecto sea integrado en las políticas nacionales de medicamentos (Dreser, *et al*, 2008). En los últimos años, el problema de la resistencia bacteriana hacia los antibióticos se ha incrementado dramáticamente. Desde que se detectó la primera cepa productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en 1983, se han reportado brotes de infección causados por estas cepas en Francia, otros países Europeos y Norteamérica (Lucet, *et al.*, 1999). Las principales especies productoras de BLEE son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*; no obstante la prevalencia de estos microorganismos, a partir de muestras clínicas, es considerablemente variable entre países y entre hospitales de la misma región geográfica (Navarro-Navarro, *et al*, 2011).

La detección de cepas productoras de BLEE, no es posible utilizando métodos de rutina (Navarro-Navarro, *et al*, 2005). Para llevar a cabo correctamente la detección de este tipo de enzimas, el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés de Clinical and Laboratory Standards Institute) publicó guías para la realización de pruebas de laboratorio. La prueba fenotípica para confirmar *in vitro* la producción de una BLEE, es la observación del efecto potenciado para los antibióticos cefotaxima y ceftazidima en presencia

de ácido clavulánico (Paterson y Yu, 1999). A pesar de la gran importancia de la detección de este tipo de cepas, para el control de infecciones, la prevalencia de las bacterias productoras de BLEE permanece desconocida en muchos hospitales de México.

Para clasificar a los microorganismos como estrechamente relacionados o como divergentes, es fundamental utilizar técnicas de genotipificación molecular, como herramientas para la investigación y la vigilancia de la resistencia bacteriana. La información proporcionada por técnicas moleculares permite establecer relaciones entre cepas recuperadas tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario (Fernández-Cuenca, 2004) y así proponer acciones que conlleven a la prevención y control de las infecciones por cepas bacterianas productoras de BLEE.

Algunas técnicas de biología molecular prometedoras son: electroforesis de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés de pulsed field gel electrophoresis), polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés de amplified fragment length polymorphism), polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés de restriction fragment length polymorphism) y la amplificación mediante PCR de las regiones consenso intergénicas repetitivas de las enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés de enterobacterial repetitive intergenic consensus) entre otros. (Fernández-Cuenca, 2004).

El presente trabajo utiliza ERIC-PCR como método de genotipificación de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE. El método ERIC-PCR es rápido, sensible, reproducible y confiable (Lang, *et al*, 2013), por lo que, se ha utilizado en la tipificación molecular de enterobacterias. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP, por sus siglas en inglés de repetitive element palindromic) y las secuencias ERIC son algunas de las secuencias repetitivas que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (Fernández-Cuenca, 2004). En los últimos años los métodos de genotipificación se utilizan como herramientas para el análisis epidemiológico de las infecciones asociadas a la atención a la salud, complementando las estrategias utilizadas en la prevención y el control de las enfermedades infecciosas (Fernández-Cuenca, *et.al*, 2013).

Cabe destacar que los métodos de genotipificación molecular no sustituyen a los métodos convencionales de tipificación, empleados en los estudios epidemiológicos, más bien, se proponen como complemento para subsanar las limitaciones de las técnicas de fenotipificación, permitiendo además determinar relaciones clonales entre aislados de una

misma especie (Lin, *et al* 2010). En sí, el alcance de los resultados no solo depende de la técnica seleccionada si no de la aplicación combinada de diversos procedimientos que brinden información suficiente, significativa y útil para el control de infecciones cuyo agente etiológico son cepas productoras de BLEE.

ANTECEDENTES

Antibióticos Beta-lactámicos

Los avances científicos y tecnológicos le han permitido a la humanidad desarrollar estrategias para la prevención, tratamiento y control de las infecciones. En la actualidad se cuenta con una amplia gama de agentes antimicrobianos, de los cuales los más conocidos son los antibióticos, que se dirigen contra las bacterias. La palabra antibiótico hace referencia a sustancias capaces de eliminar bacterias o detener su desarrollo, las cuales han sido purificadas a partir de cultivos de algunas especies de hongos y bacterias, o tienen un origen sintético o semisintético (Todar, 2011). Los antibióticos suelen clasificarse según su mecanismo de acción en grandes grupos o familias, de entre las que destacan los antibióticos denominados beta-lactámicos (Hauser, 2012).

La bencilpenicilina, el primer antibiótico comercializado, descubierta en 1928 por Alexander Fleming, es un antibiótico beta-lactámico. Si bien no se distribuyó entre el público en general en un principio, fue ampliamente utilizado en la Segunda Guerra Mundial, desencadenándose su uso rutinario después de la guerra (CDC, 2013). Fue aclamado como un "medicamento milagroso" y se consideró un futuro libre de enfermedades infecciosas. Fue así como la bencilpenicilina sería solo el primero de muchos antibióticos beta-lactámicos más. Los antibióticos beta-lactámicos son la familia de antibióticos con más miembros aprobados por la agencia Norteamericana de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, Food and Drugs Administration por sus siglas en inglés) (Errecalde, 2004). También son la clase con mayor número de antibióticos críticamente importantes para la medicina humana de acuerdo con la OMS (Dresler *et al*, 2008).

Son considerados antibióticos beta-lactámicos aquellos que posean en su estructura el anillo betalactámico: estructura con un enlace amida cíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno (Nicola *et al*, 2010) y cuyo mecanismo de acción es la inhibición enzimática de las proteínas de unión a penicilina (PBP) que participan en la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general presentan buena distribución y escasa toxicidad (Suárez y Gudiol, 2009). El primer sistema anular de beta-lactámico sintético fue preparado por Hermann Staudinger en 1907. Sin embargo, este método no recibió mucha atención hasta 1945, cuando la estructura de la penicilina fue dilucidada por Dorothy Crowfoot Hodgkin quien demostró, mediante análisis de cristalografía de rayos X, que la penicilina está compuesta por una estructura de anillo beta-lactámico (Crowfoot *et al*, 1949). Algunas modificaciones de la

molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencia limita su uso y su eficacia en determinadas situaciones (Hogberg *et al*, 2010).

Grupos de Antibióticos Beta-lactámicos

Las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas, así como los carbapenémicos y los monobactámicos, son considerados integrantes de la familia de los antibióticos beta-lactámicos (Gudiol y Marín, 2003), como puede apreciarse en la figura 1 y en la tabla 1. Las bacterias a menudo desarrollan resistencia a los antibióticos beta-lactámicos al sintetizar una enzima beta-lactamasa que hidroliza el enlace amida cíclico del anillo beta-lactámico. (Suárez y Gudiol, 2009). Para superar esta resistencia, los antibióticos beta-lactámicos suelen administrarse junto con inhibidores de beta-lactamasas tales como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, que también poseen en su estructura química el anillo característico de la familia (Ghafourian *et al*, 2015). Las diferencias estructurales entre estos antibióticos confieren diferencias en la susceptibilidad a las beta-lactamasas.

Penicilinas. Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico (Fig. 1) (Llarrull *et al* 2010). Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades.

Cefalosporinas y cefamicinas. Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico (Fig. 1) (Llarrull *et al*, 2010). La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas. Por su parte las cefamicinas, son similares a las cefalosporinas, con la única diferencia estructural de que tienen un grupo metoxi en el ácido 7-aminocefalosporánico (Suárez y Gudiol, 2009).

Carbapenémicos. La estructura básica de las carbapenemas consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno (Fig. 1). (Nicola *et al*, 2010). Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un

incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las beta-lactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad (Paterson, 2000).

Monobactámicos. Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA) (Fig. 1). Tienen una estructura beta-lactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario (Hauser, 2012).

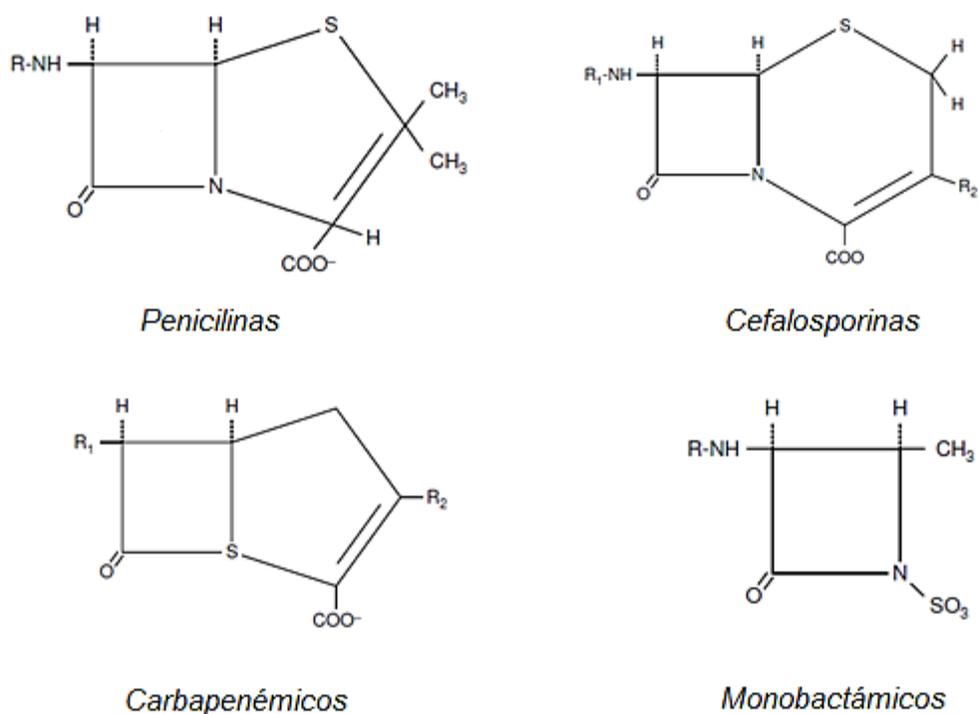


Figura 1. Núcleo estructural de los grupos de antibióticos beta-lactámicos. (Modificada de Gudiol y Marín, 2003).

Tabla 1. Grupos de antibióticos beta-lactámicos y algunos de sus integrantes.

| Grupo | Administración oral | Administración Parenteral |
|--|---|--|
| Penicilinas | | |
| Sensibles a betalactamasas Espectro reducido | Bencilpenicilina | Fenoxibencilpenicilina |
| Activas frente a enterobacterias | Amoxicilina, Ampicilina | Amoxicilina, ampicilina |
| Activas frente a enterobacterias y <i>Pseudomonas</i> | Carbenicilina, mezlocilina, ticarcilina, azlocilina, piperacilina | Indanil-carbenicilina |
| Resistentes a beta-lactamasas | | |
| Antiestafilocócicas | Meticilina, oxacilina, nafcilina | Cloxacilina, dicloxacilina |
| Combinadas con inhibidores de las beta-lactamasas | Ticarcilina-ácido clavulánico, ampicilina- sulbactam, piperacilina-tazobactam, amoxicilina-ácido clavulánico | Amoxicilina-ácido clavulánico |
| Cefalosporinas | | |
| 1° Generación | Cefazolina, cefalotina, cefradina | Cefalexina, cefradina, cefadroxilo |
| 2° Generación Activas frente a <i>Haemophilus</i> | Cefamandol, cefuroxima, cefonicida, ceforanida | Cefaclor, axetil cefuroxima, cefprozilo |
| 3° Generación Espectro ampliado | Ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima | Ceftibuteno, cefdinir, cefixima, cefepodoxima |
| Espectro ampliado y anti- <i>Pseudomonas</i> | Ceftazidima, cefoperazona, cefepima | Ninguna |
| Carbapenémicos | Imipenem-cilastatina, meropenem, ertapenem | Ninguno |
| Monobactámicos | Aztreonam | Ninguno |

(Gudiol y Marín, 2003).

Mecanismo de Acción de los Antibióticos Beta-lactámicos

El peptidoglicano es el material responsable de la rigidez de la pared celular bacteriana y determinante de la forma de la célula (Kitano y Tomasz, 1979). El peptidoglucano de la pared celular bacteriana está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina (Todar, 2011). El ácido murámico

fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (Gram negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (Gram positivos). (Todar, 2011). 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 beta-lactámicos es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular (Livermore y Woodford, 2006).

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. (Gudiol y Marín, 2003). 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 beta-lactámicos, por lo que se llaman PBP, cuya función es alargar, dar forma y dividir la bacteria (Hauser, 2012). 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 sitio activo de la enzima (Todar, 2011). Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes (Livermore y Woodford, 2006).

Resistencia Bacteriana a los Antibióticos

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Los antibióticos han salvado millones de vidas, y además han supuesto una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos (Hamilton-Miller, 2004).

Desafortunadamente, la colosal necesidad de estos valiosos medicamentos ha tenido una desventaja ambiental significativa. En los 60 años desde su introducción, millones de toneladas métricas de antibióticos han sido producidos y empleados para una amplia variedad de propósitos (Levy y Marshall, 2004). Las mejoras en la producción han proporcionado cada vez más compuestos menos costosos que fomentan la no prescripción y usos no aprobados (White *et al*, 2005). El costo del más viejo y más frecuentemente utilizado los antibióticos está (probablemente) principalmente en el empaque. (Davies y Davies, 2010). El planeta es saturado con estos agentes tóxicos, que por supuesto ha contribuido significativamente a la selección de cepas resistentes. (White *et al*, 2005). El desarrollo de generaciones de microorganismos

resistentes a los antibióticos y su distribución en toda la biosfera son los resultados de muchos años de selección incesante, la presión de las aplicaciones humanas de antibióticos a través de la infrutilización, uso excesivo y mal uso. (Davies y Davies, 2010).

La mayoría de los antibióticos en uso hoy en día, son compuestos que se descubrieron entre 1940 y 1960; la era dorada del descubrimiento de antibióticos (Levy y Marshall, 2004). Muchos de estos compuestos se descubrieron mediante la detección de actinomicetos derivados del suelo (Lewis 2013). La mayoría de estos antibióticos han perdido su eficacia a lo largo del tiempo (Hogberg *et al*, 2010). Desde la década de 1960 no se han descubierto nuevos antibióticos. A pesar de que varios productos naturales o sus derivados han sido recientemente desarrollados y aprobados; todos están basados en descubrimientos antiguos (Figura 2) (Lewis 2013).

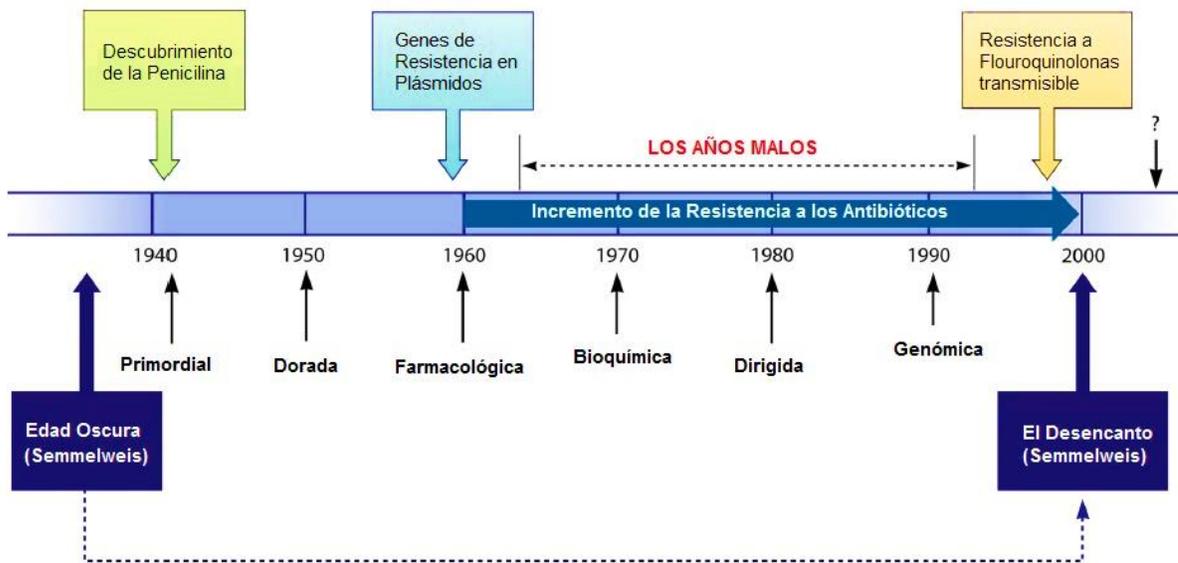


Figura 2. Historia del descubrimiento de antibióticos y desarrollo concomitante de resistencia a los mismos. (Modificada de Davies y Davies, 2010).

Los patógenos Gram negativos más prevalentes, como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*, causan una variedad de enfermedades en humanos y animales, y se ha observado una fuerte correlación entre el uso de antibióticos en el tratamiento de estas enfermedades y el desarrollo de resistencia a antibióticos durante el último medio siglo

(Fair y Torr, 2014). Esto es especialmente evidente con la clase de antibióticos beta-lactámicos y sus enzimas inactivantes relacionadas, las beta-lactamasas (Davies y Davies, 2010).

Tipos de Resistencia a los Antibióticos

Existen diferentes perspectivas desde las cuales puede abordarse el término de resistencia bacteriana. Entre las cuales están:

- Resistencia Genotípica. Se entiende que un microorganismo es resistente genotípicamente cuando posee genes funcionales que codifican para algún mecanismo de resistencia frente a un fármaco en particular (Fair y Torr 2014; Martínez et. al., 2009; Todar, 2011).
- Resistencia Fenotípica. Se entiende que un microorganismo es resistente fenotípicamente a un antibiótico cuando es capaz de sobrevivir y desarrollarse *in vitro* a cierta concentración de dicho fármaco (Martínez et. al., 2009; Todar, 2011).
- Resistencia Clínica. Se entiende que un microorganismo es resistente clínicamente cuando es capaz de reproducirse en un foco infeccioso a concentraciones terapéuticas de un fármaco. (Fair y Torr 2014; Martínez *et al*, 2009).

Por su parte, la resistencia bacteriana a los antibióticos tiene un origen genético intrínseca y uno adquirido (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). A continuación se describirá de manera breve los tipos de resistencia bacteriana que se presentan.

Resistencia natural o intrínseca. Es una característica constante de algunas cepas de una especie bacteriana, determinada genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). La resistencia intrínseca se refiere a la existencia de genes que podrían generar un fenotipo de resistencia. Diferentes géneros, especies, cepas, etcétera exhiben rangos de fenotipos de respuesta antibiótica (Fernández-Riveron *et al*, 2003). La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos humanos existía antes del uso de estos fármacos por el hombre y su prevalencia era baja, los estudios realizados con bacterias obtenidas en los años previos al descubrimiento de los antibióticos o con bacterias de poblaciones humanas que no habían tenido acceso a ellos lo demuestran (Alós, 2015). Desde el inicio de este milenio, la disponibilidad de técnicas de mutagénesis genómicas y la secuenciación rápida del genoma bacteriano ha revelado diversas funciones genéticas potenciales/intrínsecas en las bacterias que pueden conducir a fenotipos de resistencia en situaciones clínicas (Fernández-Cuenca *et al*, 2013).

Resistencia adquirida. Es una característica de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones), son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). Por otro lado, la adquisición de genes de resistencia a partir de una cepa perteneciente a una especie idéntica o diferente, está dada por plásmidos y transposones. Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia (Fair y Torr, 2014). Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una cepa multirresistente (Davies y Davies, 2010).

Mecanismos de Resistencia

Un análisis global del fenómeno de la resistencia a los antibióticos, entendido como un ejemplo de adaptación bacteriana a condiciones estresantes (Hamilton-Miller, 2004), requiere que se aborden las diferentes características de este proceso. La resistencia bacteriana a los antibióticos puede producirse como consecuencia del cambio genético (mutaciones) (Martínez y Baquero, 2000) o de la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Davies, 1997) a través de la transferencia genética horizontal. Algunos organismos tienen un fenotipo característico de baja susceptibilidad a los antibióticos (Bonomo y Szabo, 2006; Fajardo *et al*, 2008), adquiridos antes del uso de antibióticos en medicina. La resistencia bacteriana tanto natural como adquirida se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico (Martínez *et al*, 2009). Como aparece en la Figura 3, los mecanismos de resistencia pueden resumirse en: inactivación del antibiótico por medio de enzimas (como las beta-lactamasas que escinden el anillo beta-lactámico dejando al antibiótico sin actividad), alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad, por medio de las bombas de eflujo o de cambios en las porinas (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente ya que, cada uno es debido a la presencia y expresión de un gen en particular, y cada célula bacteriana puede tener uno o más genes de resistencia diferentes. A continuación se describen brevemente dichos mecanismos.

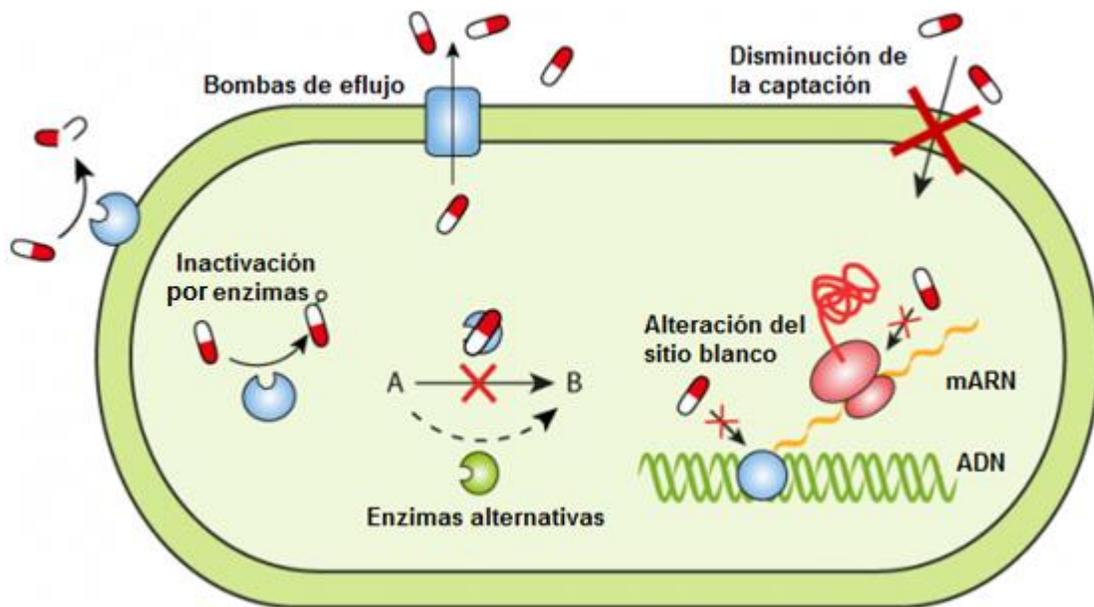


Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana.

(Modificada de la figura disponible en: https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/09/Resistance-mechanisms_Erik-Gullberg.png. Fecha de acceso 10/02/2018.)

Alteración del sitio blanco del antibiótico. Los beta-lactámicos deben unirse a las proteínas de unión a penicilina (PBP, por sus siglas en inglés Penicilin Binding Proteins) para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las PBP implican una pérdida de afinidad de los beta-lactámicos por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad, dicho mecanismo afecta fundamentalmente a cocos Grampositivos (Martínez y Baquero, 2000).

Producción de enzimas. Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a los beta-lactámicos, sobre todo en las bacterias Gram negativas (Martínez *et al*, 2009). Las beta-lactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones (Bush y Jacoby, 2010). Estas enzimas actúan rompiendo el enlace amídico del anillo beta-lactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBP (Martínez *et al*, 2009). El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas (Bush y

Jacoby, 2010). Los genes de beta-lactamasas son antiguos y se han encontrado en entornos remotos y desolados, lo que implica que las lactamasas nuevas con rangos de sustrato alterados se produzcan en el medio ambiente. (Davies y Davies, 2010).

La producción de betalactamasas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (sólo en presencia de un betalactámico), en este sentido no todos los beta-lactámicos tienen el mismo poder de inducción, pudiendo ser desde poco hasta altamente inductores (Rupp y Fey, 2003). En los microorganismos Gramnegativos, las beta-lactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que en los estafilococos suelen ser inducibles. Las beta-lactamasas cromosómicas, que son producidas fundamentalmente por bacterias Gram negativas, pueden ser constitutivas o inducibles (Martínez y Baquero, 2000; Rupp y Fey, 2003).

Las beta-lactamasas identificadas en la actualidad, son demasiadas y muy variadas, por lo que ha sido necesario clasificarlas. Esto se hace más comúnmente según dos esquemas generales: el esquema de clasificación molecular Ambler y el sistema de clasificación funcional Bush-Jacoby-Medeiros (Paterson y Bonomo, 2005). El esquema de Ambler divide las beta-lactamasas en cuatro clases principales (A-D). La base de este esquema de clasificación se basa en la homología de proteínas (similitud de aminoácidos) y no en las características fenotípicas (Bush y Jacoby, 2010). En el esquema de clasificación de Ambler, las beta-lactamasas de las clases A, C y D son lactamasas de serina. Por el contrario, las enzimas de clase B son metalo-betalactamasas. El esquema de clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa betalactamasas de acuerdo con similitudes funcionales como perfil de sustrato e inhibidor (Bush y Jacoby, 2010). Hay cuatro grupos principales y múltiples subgrupos en este sistema. Este esquema de clasificación tiene una relevancia mucho más inmediata para el médico o el microbiólogo en un laboratorio de diagnóstico porque considera los inhibidores de beta-lactamasas y los sustratos de beta-lactamasas que son clínicamente relevantes (Paterson y Bonomo, 2005). Un resumen de la clasificación actual para estas enzimas puede encontrarse en la Tabla 2.

Alteraciones de la permeabilidad. La presencia de membrana externa en los bacilos Gram negativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas. Para poder ingresar a la célula bacteriana, los antibióticos beta-lactámicos requieren utilizar porinas, proteínas de transporte transmembranales tipo beta-barril, que permiten que las moléculas de tamaño pequeño a mediano pasen a través de las membranas celulares (Fair y Torr, 2014).

Tabla 2. Esquemas de clasificación para beta-lactamasas bacterianas.

| <i>Bush-Jacoby (2009)</i> | <i>Bush-Jacoby-Medieros (1995)</i> | <i>Clase Molecular (Subclase)</i> | <i>Sustratos distintivos de las enzimas</i> | <i>Inhibición por CA¹ ó TZB²</i> |
|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| 1 | 1 | C | Cefalosporinas | Ausente |
| 1e | - | C | Cefalosporinas | Ausente |
| 2a | 2a | A | Penicilinas | Inhibida |
| 2b | 2b | A | Penicilinas, cefalosporinas de primera generación | Inhibida |
| 2be | 2be | A | Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos | Inhibida |
| 2br | 2br | A | Penicilinas | Ausente |
| 2ber | - | A | Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos | Ausente |
| 2c | 2c | A | Carbenicilina | Inhibida |
| 2ce | - | A | Carbenicilina y cefepime | Inhibidas |
| 2d | 2d | D | Cloxacilina | Variable |
| 2de | - | D | Cefalosporinas de espectro extendido | Variable |
| 2df | - | D | Carbapenémicos | Variable |
| 2e | 2e | A | Cefalosporinas de espectro extendido | Inhibida |
| 2f | 2f | A | Carbapenémicos | Variable |
| 3 | 3a | B | Carbapenémicos | Ausente |
| 3 | 3b | B | Carbapenémicos | Ausente |

1. Ácido clavulánico, 2. Tazobactam, (-) No incluido.
(Modificada de Bush y Jacoby, 2010).

Modificaciones en las porinas, ya sea en su número, conformación, o su pérdida total, pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplasmático, lo que está determinado por mutaciones en genes cromosómicos (Fajardo *et al*, 2008).

Expresión de bombas eflujo. Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). Las bombas de eflujo se describieron por primera vez como un mecanismo de resistencia a la tetraciclina en *Escherichia coli* (McMurry *et al*, 1980). Este mecanismo se ha demostrado en otros bacilos Gramnegativos, especialmente en *P. aeruginosa* (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). Sin embargo, hoy en día es bien sabido que las bombas de eflujo constituyen el tipo más común de elemento de resistencia, presente en todos los organismos desde las bacterias hasta los mamíferos, incluidos, además de los patógenos bacterianos, las células humanas y los patógenos eucariotas como *Candida albicans* o *Plasmodium falciparum* (Nikaido, y Takatsuka, 2009). Debe notarse que los sistemas de eflujo pueden expulsar activamente una variedad de compuestos; no solo los antimicrobianos convencionales, sino también sustratos no antibióticos como colorantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos. (Blanco *et al*, 2016). Es importante señalar que las bombas de eflujo son determinantes antiguos y altamente conservados, que se han seleccionado mucho antes del uso reciente de antibióticos para la terapia de infecciones humanas. Estas características sugieren que el papel de las bombas de eflujo como relevantes determinantes de resistencia a antibióticos en patógenos bacterianos es un evento reciente, probablemente secundario a otros roles funcionales con relevancia para la fisiología bacteriana (Martínez *et al*, 2009).

Transferencia de la Resistencia a los Antibióticos

Los genes que codifican para moléculas que confieren la resistencia bacteriana pueden ser transferidos de una bacteria a otra ya sea de forma vertical, es decir, por herencia durante la replicación, o de manera horizontal entre células de una misma generación, mediante tres mecanismos principales: conjugación, transducción y transformación. (Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013).

- *Conjugación.* Proceso mediante el cual una bacteria donadora transfiere copias de uno o más de sus elementos genéticos móviles (plásmidos y transposones) a otra bacteria

receptora, dejándola provista de nueva información genética con capacidad de ser transferida a otras bacterias (Bonomo y Szabo, 2006; Martínez *et al*, 2009; Todar, 2011).

- *Transducción*. Proceso mediante el cual una bacteria es provista de información genética nueva por intervención de un fago en su ciclo lítico que le transfiere fragmentos de ADN que ha obtenido de otra bacteria (Bonomo y Szabo, 2006; Martínez *et al*, 2009; Todar, 2011).
- *Transformación*. Proceso mediante el cual una bacteria puede recombinar su información genética con fragmentos de ADN libre que anteriormente perteneció a bacterias muertas de su mismo género (Bonomo y Szabo, 2006; Martínez *et al*, 2009; Todar, 2011).

La transferencia horizontal de genes ha desempeñado un papel predominante en la evolución y la transmisión de la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos entre las bacterias entéricas en infecciones tanto en la comunidad como en el hospital (Davies y Davies, 2010).

Beta-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

Definición y Contexto de las BLEE

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y, funcionalmente, al grupo 2be y enzimas de la familia OXA que pertenecen a la clase D de Ambler y al grupo funcional 2de (Tabla 2). También, se clasifican según su secuencia de aminoácidos en diferentes familias. Aunque existen diferencias en la prevalencia de las distintas familias, las más frecuentemente identificadas son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB (Férrandez-Gonzales, 2012). Otras BLEE aisladas menos frecuentemente son SFO, TLA, GES, IBC y BEL. Así cuando se detecta una nueva enzima se nombra con la familia y el número correspondiente según su orden de aparición, por ejemplo TEM-1 (Férrandez-Gonzales, 2012). Estas enzimas derivan de genes cromosómicos que han sufrido mutaciones, movilización e integración en diferentes estructuras genéticas, siendo la mayoría de ellas codificadas por plásmidos (Paterson y Bonomo, 2005).

La primera beta-lactamasa identificada en un plásmido de bacterias Gram negativas fue la TEM-1, descrita en 1965 en una cepa de *E. coli* aislada a partir de un hemocultivo de una paciente en Grecia (Datta y Kontomichalou, 1965). Mientras que, el primer informe de beta-lactamasas codificadas por plásmidos capaces de hidrolizar las cefalosporinas de espectro

extendido se publicó en 1983 (Paterson y Bonomo, 2005); pronto se descubrieron otras beta-lactamasas que estaban estrechamente relacionadas con TEM-1, pero que tenían la capacidad de conferir resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido (Brun-Buisson *et al*, 1987; Sirot *et al* 1987). Por lo tanto, estas nuevas beta-lactamasas fueron denominadas BLEE. Las BLEE son enzimas beta-lactamasas capaces de conferir resistencia bacteriana a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam (pero no las cefamicinas o carbapenemas) mediante la hidrólisis de estos antibióticos, estas enzimas pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico y son generalmente derivadas de enzimas tipo TEM y SHV (Rupp y Fey, 2003), que corresponden al subgrupo *2be* de la clasificación Bush-Jacoby-Medeiros (Bush y Jacoby, 2010).

Las BLEE se encuentran en bacterias Gram negativas, especialmente en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001; Nordmann y Guibert, 1998). Algunos autores refieren que están presentes predominantemente en especies del género *Klebsiella* y en *Escherichia coli*, pero se han descrito en otros géneros también, incluyendo *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Salmonella* (Paterson y Bonomo, 2005). Un informe reciente de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos considera a *Klebsiella* spp y *E. coli* productores de BLEE entre los seis microorganismos resistentes a los medicamentos para los que se necesitan urgentemente nuevas opciones terapéuticas (Pitout y Laupland, 2008).

La prevalencia de bacterias que expresan BLEE varía en diferentes regiones geográficas. En Suecia, Japón y Singapur menos del 10% de las cepas aisladas expresan BLEE, en comparación con las tasas superiores al 30% en Portugal, Italia, Nueva York y algunos países de América Latina mientras que en Turquía, hasta el 58% de las cepas aisladas expresan BLEE (Paterson y Bonomo, 2005). La investigación sobre BLEE ahora se realiza en más de 30 países diferentes, lo que permitirá valorar la verdadera distribución mundial de organismos productores de BLEE (Ghafourian *et al*, 2015).

En la actualidad, se han descrito más de 1000 variantes diferentes de BLEE (<https://www.lahey.org/Studies/>). Aunque TEM y SHV son las BLEE más comunes, durante la última década las cepas que expresan BLEE CTX-M han comenzado a surgir en muchos países (Bonnet, 2004) y ahora son el tipo de BLEE no TEM no SHV más frecuente. La sustitución de aminoácidos causa el cambio en las estructuras de las enzimas y sus actividades (Bradford, 2001). Las sustituciones son más comunes entre las enzimas TEM, SHV y OXA en posiciones definidas de aminoácidos. La combinación de aminoácidos alterados produce diferentes

fenotipos de enzimas beta-lactamasas con una capacidad variable para hidrolizar la cefalosporinas de tercera generación y ha aumentado el nivel de resistencia a los inhibidores de la beta-lactamasas (Winokur *et al*, 2000). Como el uso de antibióticos betalactámicos ha sido excesivo, con el transcurso de los años se han ido seleccionando cepas productoras de BLEE (Ghafourian *et al*, 2015).

Importancia del Estudio de las BLEE

Las enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación representan una gran amenaza en entornos hospitalarios y comunitarios en todo el mundo (Paterson y Bonomo, 2005). La resistencia está mediada principalmente por genes BLEE adquiridos y transportados por elementos genéticos móviles tales como plásmidos y transposones (Todar, 2011). Esta situación es motivo de gran preocupación, ya que las enzimas BLEE pueden hidrolizar casi todos los betalactámicos (excepto carbapenémicos y cefamicinas) y frecuentemente se asocian con genes que confieren resistencia a otras clases de antibióticos (Ghafourian *et al*, 2015). La presión selectiva, debido al uso masivo de los antibióticos en los últimos 70 años, ha contribuido a la diversificación genética de los genes de resistencia, como puede verse en el número actual de beta-lactamasas TEM, al menos 187 descritas, cuando en 1982, antes de introducirse en la clínica las cefalosporinas de tercera generación, solo se conocían TEM-1 y TEM-2 (Davies y Davies, 2010).

Como se mencionó previamente, durante la última década las enzimas CTX-M han reemplazado gradualmente a las BLEE clásicas (TEM y SHV) en un gran número de países (Oteo *et al*, 2006) Las BLEE son actualmente muy importantes en el campo de la medicina, ya que limita el uso de cefalosporinas, antibióticos de primera línea en los hospitales (Delgado-Valverde *et al*, 2013). Cualquier retraso en la identificación y la falta de tratamiento de las infecciones graves causadas por organismos productores de BLEE da lugar a un aumento de la morbilidad y la mortalidad (Ghafourian *et al*, 2015) Como las cepas de los productores de BLEE a menudo muestran resistencia a múltiples fármacos, como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, las opciones terapéuticas asociadas con estas cepas son limitadas (Martínez *et al*, 2009). Por lo tanto, es obvio que hay una prevalencia creciente de productores de BLEE y las cepas productoras de BLEE están causando mayores niveles de morbilidad, mortalidad y costos asociados con la atención de la salud (Rupp y Fey, 2003; Delgado-Valverde *et al*, 2013; Ventola, 2015).

En otro orden de ideas, la producción de BLEE por parte de diversos patógenos de importancia clínica constituye un importante problema en los pacientes hospitalizados debido a las implicaciones clínicas, terapéuticas y económicas (Bantar *et al*, 2000). En este sentido, un estudio recientemente realizado en Israel, demostró que existe un incremento en los costos de hospitalización de 9.620 dólares por cada paciente infectado por microorganismos productores de BLEE (Martínez *et al*, 2009).

Prevalencia de las BLEE

La aparición inicial de las BLEE en Europa oriental probablemente se debió a que las cefalosporinas de tercera generación fueron inicialmente introducidas para la utilización clínica en esta zona geográfica, pero en poco tiempo su uso se extendió y condujo a la emergencia de las BLEE en el mundo (Bradford, 2001; Coehlo *et al*, 2006).

Al parecer la primera BLEE reportada en Latinoamérica fue SHV-5 en 1987, en una cepa de *K. pneumoniae* en Chile (Gutmann *et al*, 1989): En ese mismo año se detectaron las enzimas SHV-2 y SHV-5 en Argentina producidas por cepas de *K. pneumoniae* en una unidad de cuidados intensivos (UCI) de Buenos Aires (Casella y Goldberg, 1989). Adicionalmente, se han identificado nuevos tipos de BLEE en otras regiones geográficas de América, como la enzima TLA-1 encontrada por primera vez en México a finales de los 90s en un aislamiento de *E. coli* (Silva *et al*, 2000).

Las BLEE son un problema de salud pública con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil (Mendes *et al*, 1999). Las enzimas más comúnmente encontradas en Latinoamérica son SHV- 2, SHV-4, SHV-5, CTX-M-2, CTX-M-8 y PER-2 (Gutmann *et al*, 1989; Casella y Goldberg, 1989). En América del Norte, la prevalencia de BLEE entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* se encuentra en un intervalo de 5-10% (*E. coli* 7.5% y *K. pneumoniae* 12.3%) (Turner, 2005). Los tipos de enzimas más frecuentes en esta región son TEM-26, TEM-6, TEM-10 y TEM-12 (Bradford *et al*, 1994).

Debido a la gravedad e importancia de algunas infecciones por cepas productoras de BLEE, a la dificultad de tratamiento que entrañan, al comportamiento epidemiológico, a la posibilidad de que puedan transmitirse a otros enfermos o a bacterias de la microbiota comensal, y a las limitaciones con los criterios habituales de sensibilidad, el papel del laboratorio de microbiología es crucial (Máttar y Martínez, 2007).

Métodos para la Detección de BLEE

La detección de aislamientos que expresan BLEE, en el laboratorio de microbiología clínica, no es una tarea trivial. Existen varios métodos para la detección de BLEE como son: métodos fenotípicos tradicionales, procedimientos para el estudio bioquímico de las enzimas, métodos automatizados y métodos genotípicos. La identificación de este tipo de enzimas es de gran importancia ya que requiere un plan de acción para el control de las infecciones que pudieran producirse por microorganismos productores de este tipo de enzimas. Es por ello que se hace necesario diferenciar entre la producción de BLEE y otros mecanismos de resistencia. El CLSI (antes NCCLS) ha establecido recomendaciones para el tamizaje y confirmación de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella spp* (CLSI, 2017), cabe mencionar que las pruebas sugeridas por este organismo no son las únicas. Básicamente, las pruebas disponibles actualmente para la detección de BLEE pueden agruparse en tamizaje inicial (doble disco y combinación de disco) y confirmación (Concentración Mínima Inhibitoria [CMI] en caldo, Etest® instrumentos automatizados, y pruebas genotípicas) (Máttar y Martínez, 2007)

Métodos fenotípicos. El CLSI ha aprobado como pruebas fenotípicas de tamizaje la de difusión de disco (CLSI, 2005b) y como confirmatoria la de CMI (CLSI, 2005a) cuyos puntos de corte se pueden consultar en la Tabla 3. Además, el CLSI también describe los métodos recomendados para la detección de BLEE cuando no se hace uso de los puntos de corte recomendados en su manual M100-S27 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI, 2017)., lo anterior es útil cuando se desea realizar investigación epidemiológica.

La técnica fenotípica más utilizada en el laboratorio de microbiología clínica, para la búsqueda de BLEE, es la de aproximación de doble disco (Tzelepi *et.al.*, 2000). La prueba consiste en colocar un disco de amoxicilina/ clavulanato [20/10 µg/ml] en el centro de una placa de agar Mueller Hinton a distancia de 30 mm de uno de ceftazidima [30 µg] y cefotaxima [30 µg] (CLSI, 2017). El sinergismo observado entre algunas de las cefalosporinas y la amoxicilina/ clavulanato expresa la producción de la BLEE (CLSI, 2010).

Otra técnica fenotípica de tamizaje es la combinación de disco que compara los diámetros de inhibición de los discos de cefotaxima o ceftazidima en combinación con clavulanato [10 ug] (Carter *et al*, 2000; M'Zali *et al*, 2000). Un incremento igual o mayor a 5 mm en el diámetro de la zona de inhibición de la combinación cefalosporina/clavulanato, comparado con las zonas de los antibióticos sin inhibidor confirma la detección de BLEE (Pfaller y Sagreti, 2006).

Tabla 3. Tamizaje para la detección de BLEE por la técnica de difusión de disco y concentración mínima inhibitoria.

| <i>Antibióticos</i> | <i>Difusión en disco</i> | <i>CMI</i> |
|---------------------|--------------------------|------------|
| Ceftazidima | ≤ 22 mm | ≥ 2 ug/mL |
| Cefpodoxima | ≤ 17 mm | ≥ 8 ug/mL |
| Cefotaxima | ≤ 27 mm | ≥ 2 ug/mL |
| Ceftriaxona | ≤ 25 mm | ≥ 2 ug/mL |
| Aztreonam | ≤ 27 mm | ≥ 2 ug/mL |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Modificada de CLSI, 2005a y CLSI, 2005b.

Una técnica fenotípica adicional, pero de carácter confirmatorio, es la evaluación de la CMI. Esta técnica utiliza cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima) con la adición de una concentración de 4 µg/ml de ácido clavulánico; una disminución en la CMI igual o mayor a 3 diluciones dobles de ceftazidima y cefotaxima en combinación con el clavulanato comparada con la CMI de las cefalosporinas sin el inhibidor confirma la producción de BLEE (Pfaller y Sagreti, 2006).

Se suma a la lista el Etest®-ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden). Etest consiste en tiras impregnadas de antibióticos, en un gradiente de menor a mayor concentración del mismo. Este sistema posee excelente sensibilidad y especificidad para detectar y confirmar la presencia de BLEE (Pfaller y Sagreti, 2006). Actualmente el uso de la tira cefepime y cefepime/clavulanato es útil cuando se usa en conjunto con las tiras ceftazidima y ceftazidima/clavulanato, así como con cefotaxima y cefotaxima/clavulanato para detectar la producción de BLEE en microorganismos productores de enzimas AmpC. Esto debido a que esta cefalosporina (cefepime) es bastante estable a la hidrólisis de las enzimas AmpC y el sinergismo con el clavulanato puede observarse en las cepas productoras de AmpC y BLEE (Máttar y Martínez, 2007). La utilización de tiras Etest® presenta algunas veces dificultades para la interpretación, debido a la presencia de zonas fantasmas ocasionadas por las bajas CMI expresadas a las cefalosporinas y la difusión del Clavulanato hacia el lado de la tira que contiene la cefalosporina sin el inhibidor (Pfaller y Sagreti, 2006). A pesar de ser la prueba más fácil de usar para detectar las BLEE, su uso rutinario en los laboratorios clínicos es limitado.

Métodos automatizados. Existen sistemas automatizados confiables como el sistema Micro-Scan® ESBL plus (Dade Behring, Ca, USA) que permite confirmar las BLEE en *Klebsiella*

sp y *E. coli*. También está disponible el sistema Vitek® ESB (Biomerieux, Durham, NC, USA), que permite la detección inicial de β -lactamasas mediante la evaluación de resistencia a cualquier cefalosporina de amplio espectro y el reporte de resistencia extendida a todas las cefalosporinas (Pfaller y Sagreti, 2006; Máttar y Martínez, 2007).

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 valores de concentración inhibitoria al 50% (IC50) para diferentes inhibidores de beta-lactamasas. En la actualidad, se utiliza poco debido a la descripción de diferentes BLEE que comparten idéntico puntos isoeléctricos (Álvarez, 2010). 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 (Máttar y Martínez, 2007).

Métodos genotípicos. Este tipo de procedimientos permiten identificar las BLEE y llevar a cabo investigación epidemiológica. En la búsqueda de una explicación a la aparición de brotes, se puede diferenciar la proliferación clonal de una cepa productora de una única BLEE, la diseminación de diversas BLEE en el mismo brote, o quizá por la proliferación clonal de varias cepas con distintas BLEE, de acuerdo a la existencia de diferentes plásmidos entre los miembros de una misma cepa (Máttar y Martínez, 2007). Adicionalmente, microorganismos no relacionados genotípicamente pueden producir la misma BLEE mediante transferencia plasmídica y la misma BLEE puede ser mediada por plásmidos distintos (Álvarez, 2010). La capacidad de propagación de las BLEE es extraordinaria y, de hecho, se ha comprobado la transmisión interhospitalaria, interurbana e incluso entre países. De lo que se deduce que toda precaución para controlar este fenómeno es poca. Los métodos más utilizados son el análisis de perfiles plasmídicos, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), ribotipificación y otros métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis de los fragmentos de restricción amplificados del ADN ribosómico (PCR-RFLP) parece resultar de especial utilidad en este contexto (Pfaller y Sagreti, 2006).

Aplicación de Métodos Genotípicos en Análisis Epidemiológicos

La aparición de un cuadro infeccioso en un paciente, de un brote en una comunidad u hospital pone en marcha una serie de medidas destinadas a su control; en primera instancia, se realiza el aislamiento del patógeno y su clasificación, posteriormente deben definirse con precisión su

origen, la cadena epidemiológica que ha conducido a la infección y las medidas de control adecuadas (Sabria-Leal y Montoya, 1992).

En ocasiones, para identificar al patógeno, su origen o las vías y patrón de diseminación, se requiere determinar las similitudes o diferencias filogenéticas entre diversos aislados (Vilchez y Alonso, 2009). Para realizar este análisis se trabaja bajo el supuesto de que las cepas filogenéticamente relacionadas se han derivado, recientemente, de la expansión clonal de un precursor único, por lo tanto poseen un nivel de similitud entre sus genotipos, significativamente superior al que se encontraría entre cepas no relacionadas del mismo taxón, escogidas al azar (Sabria-Leal y Montoya, 1992). Los aislados no relacionados clonalmente, tendrán genotipos diferentes ya que provienen de ancestros distintos. Los supuestos señalados anteriormente pueden no cumplirse en aquellos casos en los cuales la diversidad genética dentro de la especie o grupo sea limitada (Singh *et al*, 2006).

Para determinar la clonalidad entre microorganismos se debe definir el nivel de relación genética necesario para diferenciar los clones y el, o los marcadores que permitan establecer dicha diferencia (Vilchez y Alonso, 2009). El punto de corte a partir del cual se considera que dos microorganismos no se encuentran clonalmente relacionados es arbitrario y dependerá del problema concreto y de la herramienta utilizada para resolverlo. En este sentido, se debe tener especial cuidado ya que el establecimiento incorrecto de los parámetros, o la utilización de una técnica inadecuada, puede conducir a interpretaciones erradas. Finalmente debe evaluarse el procedimiento de tipificación según los criterios enumerados anteriormente, colocando especial interés en su concordancia epidemiológica (Sabria-Leal y Montoya, 1992).

Los métodos de tipificación fenotípicos tienen un valor discriminatorio insuficiente para definir las relaciones filogenéticas entre microorganismos de la misma especie, lo que no permite establecer la clonalidad entre los aislados (Singh *et al*, 2006). En este sentido, las técnicas de genotipificación permiten determinar si los microorganismos analizados se encuentran genéticamente relacionados y por lo tanto, pueden ser considerados como representantes de una misma cepa o clon. En las últimas décadas, el uso de procedimientos de caracterización genotípica se ha popularizado y perfeccionado para incrementar su capacidad discriminatoria, reproducibilidad y versatilidad (Labarca, 2002).

La determinación de la clonalidad entre bacterias es necesaria en diferentes situaciones, por ejemplo, en los casos en los cuales se requiere la diferenciación entre infección y contaminación (Vilchez y Alonso, 2009). También puede ser necesario evaluar el origen clonal frente a infecciones recurrentes, lo que permitirá discriminar entre re-infección por el mismo clon o infección por un clon distinto. Si el microorganismo causante del segundo cuadro infeccioso

es el mismo que causó la infección original, se puede considerar la posibilidad que se esté aplicando un tratamiento antimicrobiano inadecuado o poco efectivo, siendo necesario entonces la implementación de una terapia alternativa (Singh *et al*, 2006).

A nivel epidemiológico, también se hace indispensable la evaluación de la clonalidad entre aislados, cuando se estudian brotes de infecciones intra o extrahospitalarias (Vilchez y Alonso, 2009). Por ejemplo, para establecer la relación genética entre aislados de una misma fuente, pero que manifiestan diferencias a nivel fenotípico o, por el contrario, aislados provenientes de distintos pacientes pero que muestran características fenotípicas similares. La confirmación de la relación genética entre estos microorganismos permitiría determinar la fuente de la infección, el número de clones circulantes, el vehículo, la ruta y el patrón de distribución. (Singh *et al*, 2006). El conocimiento que brindan las técnicas de genotipificación permite la implementación de nuevos programas que contribuyan al control y prevención de los brotes infecciosos (Vilchez y Alonso, 2009).

Regiones Consenso Intergénicas Repetitivas de las Enterobacterias (ERIC)

Una de las características más interesantes de los genomas bacterianos son la serie de secuencias repetitivas cortas e interespaciadas que poseen y de las que no se sabe mucho. Hasta ahora, se conocen muy poco sobre su origen, evolución, generación y funciones. Estas secuencias se encuentran en algunas especies de bacterias, mientras que otras están desprovistas de ellas, lo que sugiere que tienen una función determinada, aunque permanece siendo desconocida en la actualidad (Das y Dash, 2015).

Las secuencias ERIC han sido encontradas y caracterizadas en *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* incluyendo *Vibrio cholerae* y *Klebsiella pneumoniae* (Hulton *et al*, 1991). Las secuencias de ERIC son palíndromos imperfectos de 126-127 pares de bases. La característica distintiva de las secuencias de ERIC es que se encuentran en las regiones intergénicas dentro de las regiones transcritas (Wilson *et al*, 2006). En los operones donde se han mapeado las transcripciones, las regiones ERIC siempre se localizan dentro de secuencias transcritas, ya sea en regiones intercistónicas de operones policistónicos, entre el promotor y el gen estructural, o en secuencias 3' no traducidas. (Hulton *et al*, 1991). También se han descrito secuencias más cortas producidas por deleciones internas (Sharp y Leach 1996), así como secuencias más largas debido a inserciones de aproximadamente 70 pb en sitios internos específicos (Sharp 1997).

Sin embargo, hasta ahora no se sabe nada sobre la movilidad y la naturaleza de estos elementos genéticos, así como tampoco queda claro cuál es su función biológica. Evidencia encontrada al realizar comparaciones de copias ortólogas entre especies reveló que las secuencias ERIC están sorprendentemente conservadas, lo que implica que han adquirido alguna función, tal vez relacionada con la estabilidad del ARNm (Wilson y Sharp, 2006). La mayoría de las secuencias repetitivas bacterianas cortas son palíndromos imperfectos, con el potencial de formar estructuras secundarias, que pueden potenciar la estabilidad del ARNm (Newbury *et al*, 1987). Todas las secuencias ERIC incluyen la misma repetición central invertida que podría formar una estructura de bucle en el ARN, aunque la estructura del resto del elemento parece variar de una secuencia ERIC a otra (Das y Dash, 2015). Significativamente, en ciertos casos en los que las secuencias ERIC difieren del consenso, se observa un cambio de base compensador en el brazo complementario del tallo-bucle previsto, lo que implica que el mantenimiento de la estructura secundaria es importante (Hulton *et al*, 1991).

Alternativamente, la mayoría de los elementos repetitivos pueden contener información no funcional (Das y Dash, 2015). El número de copias de la secuencia ERIC varía según la especie (Hulton *et al*, 1991), información que es confirmada por los resultados presentados por Wilson, y colaboradores, los cuales indican que las secuencias de ERIC muestran una variación intraespecífica en sus sus ubicaciones. Derivado de esa propiedad, se ha utilizado ampliamente un método para distinguir entre cepas bacterianas usando cebadores de PCR derivados de secuencias de ERIC (Versalovic *et al*, 1991). Los cebadores están diseñados para que la amplificación se produzca entre copias de la secuencia ERIC, si las posiciones de las copias varían entre diferentes cepas, los productos de amplificación proporcionan a cada uno una huella digital única cuando se evalúan los productos de amplificación mediante electroforesis en geles. Existe una considerable variación entre las cepas con respecto a la presencia de un elemento en cualquier región intergénica particular (Wilson *et al*, 2006).

La presencia de secuencias ERIC ha resultado útil para el desarrollo de técnicas de caracterización molecular, especialmente para revelar las relaciones filogenéticas entre los organismos a estudiar. Dichos métodos de tipado molecular de bacterias son extremadamente confiables, rápidos y altamente discriminativos, así como reproducibles (Lang *et al*, 2013). El fundamento de ERIC-PCR es metodológicamente similar al de una PCR convencional, pero con un par iniciadores que son complementarios a secuencias de ADN repetitivas y altamente conservadas presentes en múltiples copias, pero en distintas posiciones intergénicas a lo largo todo el genoma de la mayoría de las bacterias, y especialmente de las Enterobacterias.

La reacción puede amplificar segmentos de ADN de cualquier genoma variando la distribución del tamaño de los segmentos amplificados entre diferentes especies o cepas bacterianas. Por lo tanto, los organismos estrechamente relacionados poseen distribuciones de segmentos similares, mientras que los de los organismos distantemente relacionados son más divergentes, por lo tanto el empleo e interpretación de ERIC-PCR como técnica de genotipificación proporciona información filogenética considerable (Espinasa y Borowsky, 1998). Las técnicas de caracterización molecular, como ERIC PCR, proporcionan información que puede utilizarse para evaluar asociaciones epidemiológicas con un alto grado de confianza (Saravanan *et al*, 2015).

En ERIC-PCR se utilizan iniciadores que hibridan con secuencias de ADN repetitivas a lo largo del cromosoma bacteriano de las enterobacterias. Las secuencias ERIC son palíndromos imperfectos que se presentan en múltiples copias a lo largo de los genomas de las enterobacterias. (Wilson y Sharp, 2006). Estas secuencias están altamente conservadas al nivel de la secuencia de nucleótidos, pero sus localizaciones cromosómicas difieren entre las especies (Hulton *et al*, 1991) por lo que, la utilidad de esta técnica radica en amplificar las regiones que separan las secuencias repetitivas, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas de las secuencias repetitivas (Wilson y Sharp, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Estudio

Se trata de un estudio transversal, prospectivo, de muestreo no probabilístico, de aislamientos clínicos recuperados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora. Los aislamientos clínicos así como la identificación presuntiva de los organismos productores de BLEE se obtuvieron a través de sistemas de identificación automatizados (VITEK o Microscan), durante el periodo comprendido entre el 15 de febrero y el 15 de agosto de 2016, por los Laboratorios Clínicos de cada Institución participante.

La información referente a las características de las instituciones clínicas participantes se detalla como sigue:

- Hospital Dr. Fernando Ocaranza del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), esta institución atiende a derechohabientes trabajadores del gobierno federal, cuenta con 101 camas y diariamente atiende 212 pacientes.
- Hospital San José (HSJ), de carácter privado, cuenta con 120 camas y diariamente atiende 150 pacientes.
- Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDIC), atiende a pacientes derechohabientes trabajadores del gobierno estatal (ISSSTESON), cuenta con 113 camas censables y 55 no censables, diariamente atiende entre 3,500 y 4,500 pacientes en sus distintas áreas.
- Centro Integral de Atención a la Salud (CIASS) Unidad Sur perteneciente al ISSSTESON es una policlínica donde no hay pacientes hospitalizados y solamente se atiende a pacientes de consulta externa; en el laboratorio clínico de esta institución diariamente son atendidos cerca de 65 pacientes.

Extracción de ADN de Aislamientos Clínicos

A partir de cultivos puros de los aislamientos clínicos proporcionados por cada institución de salud, se extrajo y purificó el ADN bacteriano. Los cultivos fueron realizados sembrando cada aislamiento en agar tripticasa soya, e incubando durante 18 a 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis. Posteriormente se procedió a realizar el procedimiento de extracción con un equipo comercial: QIAamp DNA Mini kit. (Qiagen, U.S.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se procedió a la verificación de la concentración y pureza del ADN obtenido en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific, U.S.A.). Las muestras purificadas y cuantificadas se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

ERIC-PCR

Para la caracterización genotípica de los aislamientos clínicos, se utilizó una mezcla de reacción que contenía: dNTP's (200 μ M cada uno), iniciadores ERIC-1 (0.4 μ M) y ERIC-2 (0.4 μ M) ver Tabla 4, MgCl₂ (2 mM), buffer 5X, 1 U de Taq ADN (Promega, U.S.A.) y 100 ng de ADN previamente purificado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C100 iCycler (Biorad, U.S.A.), utilizando las siguientes condiciones: 1 periodo a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos a: 95°C por 60 segundos, 50°C por 60 segundos, 72°C por 8 minutos y finalmente 1 periodo a 72°C por 16 minutos (modificado de Cabral *et al*, 2012 y Durmaz *et al*, 2015). La amplificación por ERIC-PCR se realizó por triplicado y en días no consecutivos para cada aislamiento ensayado.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% con GelStar (Lonza, U.S.A.). Se utilizaron dos marcadores: 100bp DNA Ladder (Promega, U.S.A.) y fago λ , digerido con *Hind*III (N.E. Biolabs, U.S.A.). Los perfiles de bandas fueron capturados por fotodocumentador (WiseDoc, Korea) y posteriormente el tamaño y número de las bandas se determinó mediante el programa TotalLab TL100 (Nonlinear Dynamics, Ltd., United Kingdom).

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en ERIC-PCR.

| | |
|--------|------------------------------|
| ERIC-1 | 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' |
| ERIC-2 | 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' |

Análisis de la Información

Los dendrogramas para establecer patrones de similitud entre perfiles ERIC se generaron por el método de apareamiento por media aritmética sin ponderación (UPGMA, por sus siglas en inglés de unweighted pair group method using arithmetic averages) y el algoritmo Dice (Durmaz, *et al*, 2015) en el programa Bionumerics versión 6.5 (Applied Maths, Belgium). Dos dendrogramas más fueron generados utilizando el mismo programa, por el método UPGMA y el algoritmo Dice, para establecer patrones de similitud entre los perfiles de resultado de electroforesis en campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés de pulsed field gel electrophoresis), a partir de información con la que se contaba previamente de 34 aislamientos de *E. coli* y ocho aislamientos de *K. pneumoniae*. Los dendrogramas para establecer patrones de similitud entre los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos entre cada aislamiento

ensayado, se generaron por el método de UPGMA y el coeficiente de Pearson (Magurran, 1988). Un resumen gráfico de toda la metodología seguida en el presente trabajo puede apreciarse en la Figura 4.

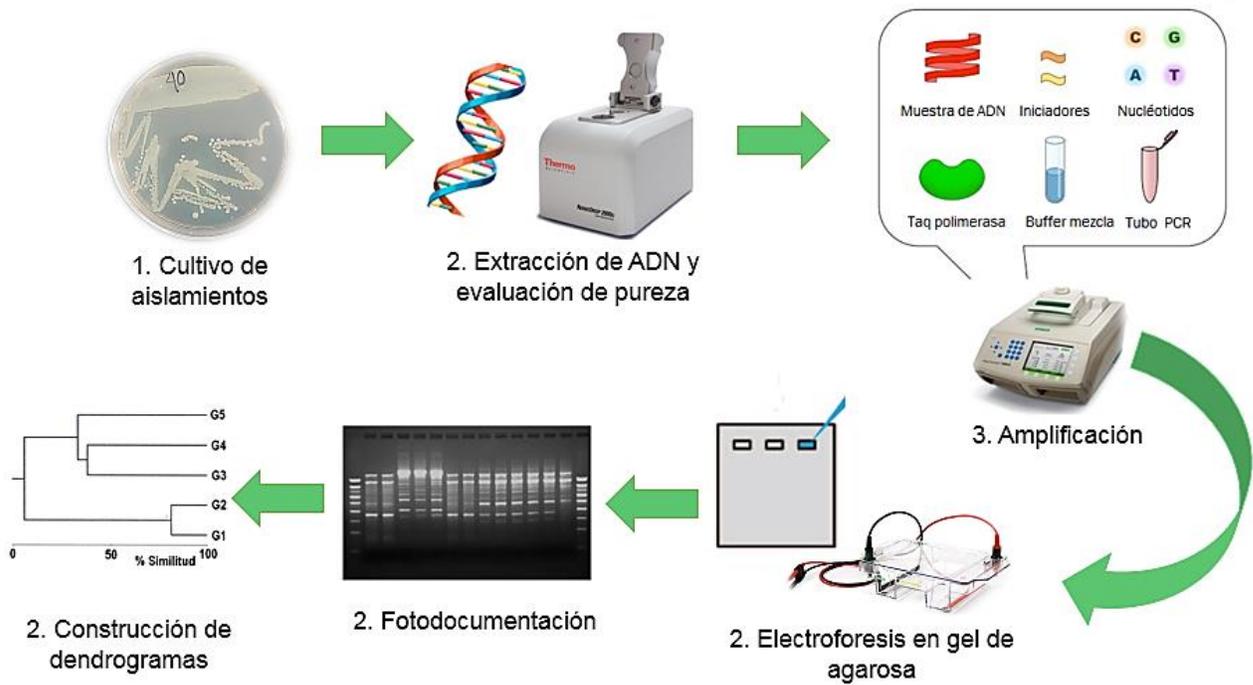


Figura 4. Metodología a seguir para la realización de ERIC-PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las técnicas de genotipificación son útiles en el estudio de brotes intrahospitalarios para descubrir el origen, las rutas y el alcance de la transmisión de infecciones; y el uso de esta información puede servir para el control de estos brotes (Barbier *et al*, 2010; Espinal *et al*, 2004). Considerando lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se caracterizaron, mediante la técnica de ERIC-PCR, un total de 215 aislamientos, 13 de *K. pneumoniae*, y 202 de *E. coli*, todos productores de BLEE, recuperados de cuatro instituciones de salud de la ciudad. La distribución por institución se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución, por institución de salud, de 215 aislamientos clínicos recuperados.

| <i>Institución de salud participante</i> | <i>Aislamientos de Escherichia coli</i> | <i>Aislamientos de Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Total</i> |
|--|---|--|--------------|
| CIAAS | 24 | 2 | 26 |
| CMDIC | 140 | 5 | 145 |
| ISSSTE | 21 | 2 | 23 |
| HSJ | 17 | 4 | 21 |
| Total | 202 | 13 | 215 |

En las últimas décadas, cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE han sido responsable de brotes epidémicos en países de todo el mundo (Kitchel *et.al.*, 2009). Diversos estudios han concluido que la prevalencia de cepas productoras de BLEE puede ser muy variable entre diferentes países, ciudades e incluso hospitales de una misma ciudad, además, las BLEE detectadas pueden variar de una institución a otra (DiPersio *et al*, 2005; Livermore *et al*, 2007). Algunos estudios de seguimiento en centros hospitalarios de Latinoamérica y España, evidencian esta distinta distribución e incidencia de microorganismos productores de BLEE (Sabaté *et.al*, 2005; Oteo *et al*, 2002; Cantón *et al*, 2002; Durmaz *et al*, 2015; Garza-Gonzales *et al*, 2011).

La metodología ERIC-PCR ha sido empleada para el estudio de múltiples especies bacterianas, para las cuales se han obtenido perfiles heterogéneos que permiten diferenciar genotípicamente los aislamientos analizados. Los patrones ERIC mostraron clones distintos para ocho especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae* y ocho clones diferentes para cepas de *Acinetobacter baumannii* que eran resistentes a carbapenémicos y que circulaban en el 68.7% de los hospitales encuestados en una investigación brasileña en la que se distinguió la

alta capacidad discriminatoria de la técnica ERIC-PCR (Ribeiro *et al.*, 2016). La transmisión clonal de otras especies bacterianas como *A. baumannii* ha sido evidenciada por los perfiles de segmentos de ADN amplificados mediante ERIC-PCR en aislamientos resistentes a múltiples fármacos anteriormente (Chen *et al.*, 2014). Algunos estudios demuestran que, las técnicas de caracterización molecular basadas en PCR, tales como ERIC-PCR, son métodos rápidos para genotipar las cepas de *K. pneumoniae* (Natoubi *et al.*, 2016) y muestra de ello es que, en otros estudios, los brotes nosocomiales de *E. coli* y *K. pneumoniae* en el Hospital Regional de Novosibirsk fueron caracterizados mediante ERIC-PCR (Edelstein *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se planteó realizar la caracterización molecular por el método ERIC-PCR de los aislamientos recuperados de cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, del cual se desprenden los resultados que se describen a continuación.

En las Figuras 5 y 6 se ejemplifica la observación de los geles obtenidos, así como su análisis en el programa Bionumerics, con el fin de establecer los patrones de bandas generados.

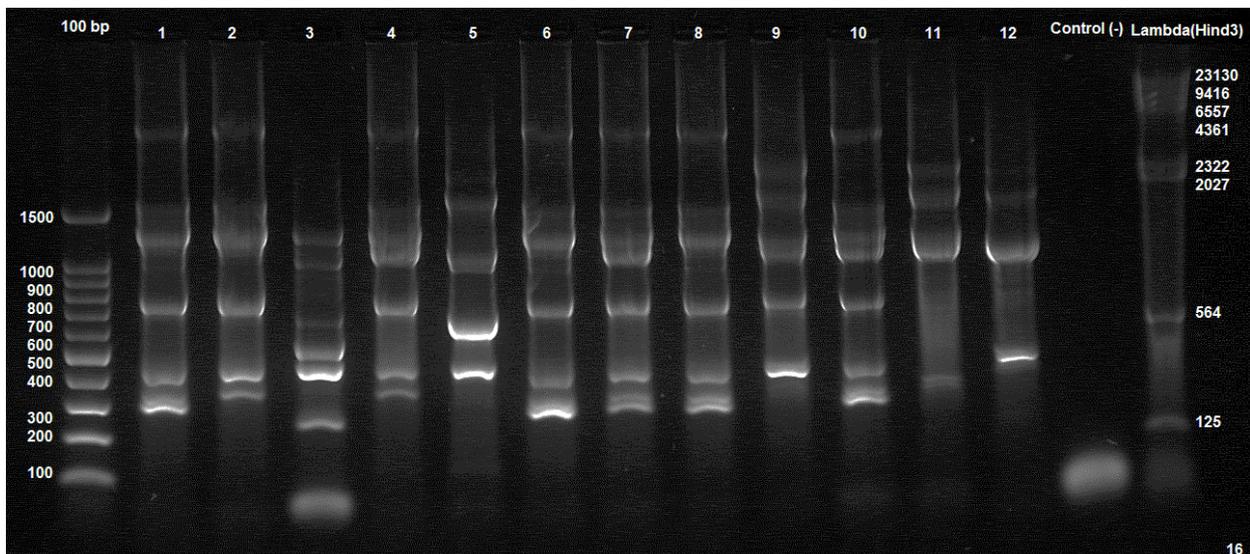


Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa obtenido después de electroforesis en agarosa al 1.5% de los productos de ERIC-PCR. Se utilizaron dos marcadores de peso molecular, 100 bp y Lambda Hind III. Los carriles numerados del uno al 12 contenían el producto amplificado de un aislamiento en particular. Un control negativo sin ADN se agregó en el carril final de cada gel.

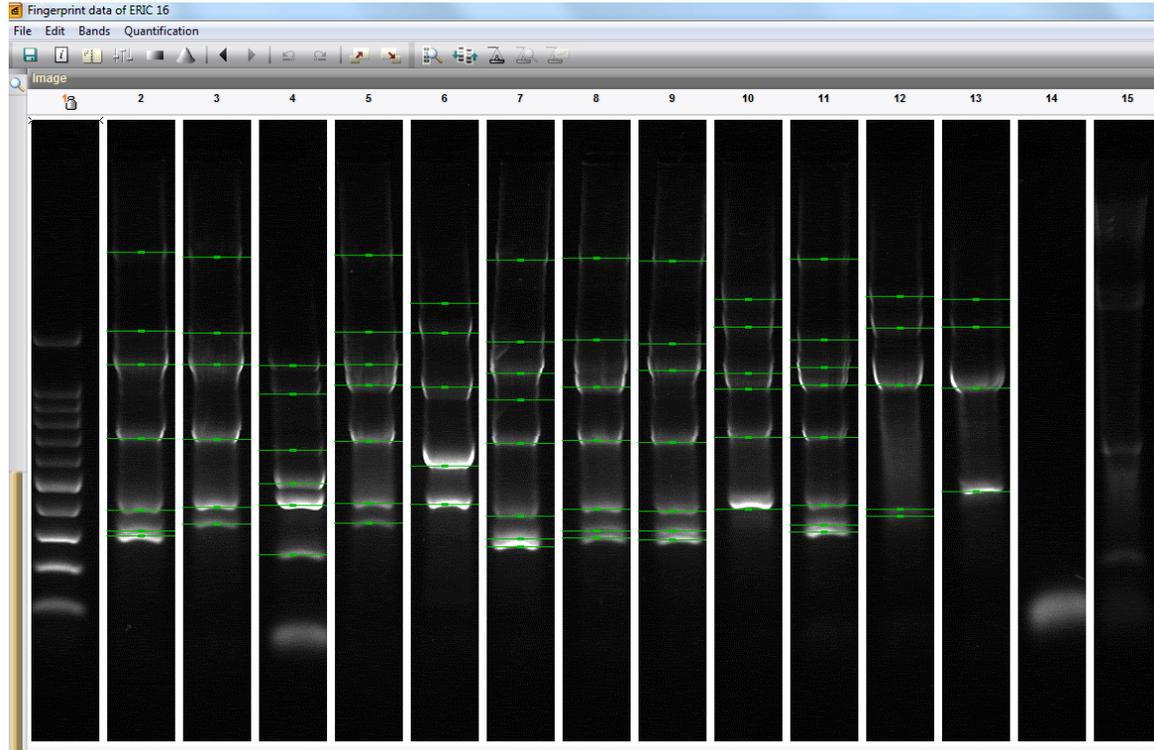


Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa obtenido después de electroforesis en agarosa al 1.5% de los productos de ERIC-PCR y su análisis con el programa Bionumerics. Los carriles numerados del dos al 12 contenían el producto amplificado de un aislamiento en particular.

Los aislados fueron agrupados mediante el algoritmo UPGMA y su porcentaje de similitud se calculó a través del coeficiente Dice, teniendo en cuenta la presencia y/o ausencia de bandas (su número y pares de bases) observadas en los geles de agarosa. El intervalo de valores para este coeficiente va de 0 cuando no hay similitud entre aislamientos, hasta 1 cuando los dos aislamientos tienen el mismo patrón ERIC (Magurran, 1988). Los análisis de ERIC-PCR mostraron una alta heterogeneidad genética dentro de la colección de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* Productoras de BLEE

En el presente estudio, los ensayos de ERIC-PCR, revelaron 13 perfiles ERIC claramente distintos para todos los aislamientos analizados, lo cual indica gran diversidad entre los aislamientos de las instituciones participantes. Investigaciones realizadas anteriormente muestran que el análisis de ERIC-PCR ha sido discriminatorio y que puede ser empleado para

la genotipificación molecular de *K. pneumoniae*, como el estudio realizado por Bailón *et. al.* en el que el análisis por ERIC-PCR mostró un mejor poder discriminatorio que REP-PCR para la genotipificación de *K. pneumoniae* en un estudio previo (Bailón y Sacsquispe, 2013); pero el mejor resultado se obtuvo del análisis por PFGE, método recomendado para la confirmación de brotes causados por *K. pneumoniae* (Hansen *et. al.*, 2002). Se ha demostrado que esta metodología resulta útil también para el análisis de muestras de diversas índoles, como es el caso de un estudio realizado en Indonesia, en el cual se utilizó ERIC-PCR para la caracterización genotípica y análisis de la diversidad genética de aislamientos de *Klebsiella* spp obtenidos a partir de muestras de alimentos. El resultado mostró que el análisis de secuencias de ERIC-PCR fue más discriminatorio que las secuencias de ARNr 16S que se habían analizado paralelamente en el mismo estudio (Barus *et al*, 2013).

En un estudio previo, se informó un alto nivel de diversidad genética entre aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (Cabral *et al*, 2012), similar a los resultados del presente estudio. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en Marruecos, la tipificación molecular de aislados de *K. pneumoniae* de dos hospitales en Teherán, se detectó relación de clonalidad entre varios de los aislamientos mediante ERIC-PCR. La mayoría de las cepas tipo se aislaron de infecciones urinarias en un hospital, donde un solo tipo nosocomial fue el más frecuente (Natoubi *et al*, 2016). Se observó una gran similitud genética entre los aislados analizados, que se obtuvieron del mismo hospital, no obstante en el presente estudio los aislamientos analizados presentaron gran diversidad genética.

Wasfi y colaboradores (2016) caracterizaron genotípicamente aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* en Egipto. Los resultados mostraron que los coeficientes de correlación más altos se observaron con el genotipado por ERIC-PCR, lo que indica que este método puede ser más valioso en la predicción de los patrones de resistencia de *K. pneumoniae* en comparación con otro método de genotipado de elementos repetitivos utilizado en la misma investigación. Adicionalmente, ERIC-PCR, reveló correlaciones estadísticamente significativas con los determinantes de virulencia de *K. pneumoniae* en el mismo estudio.

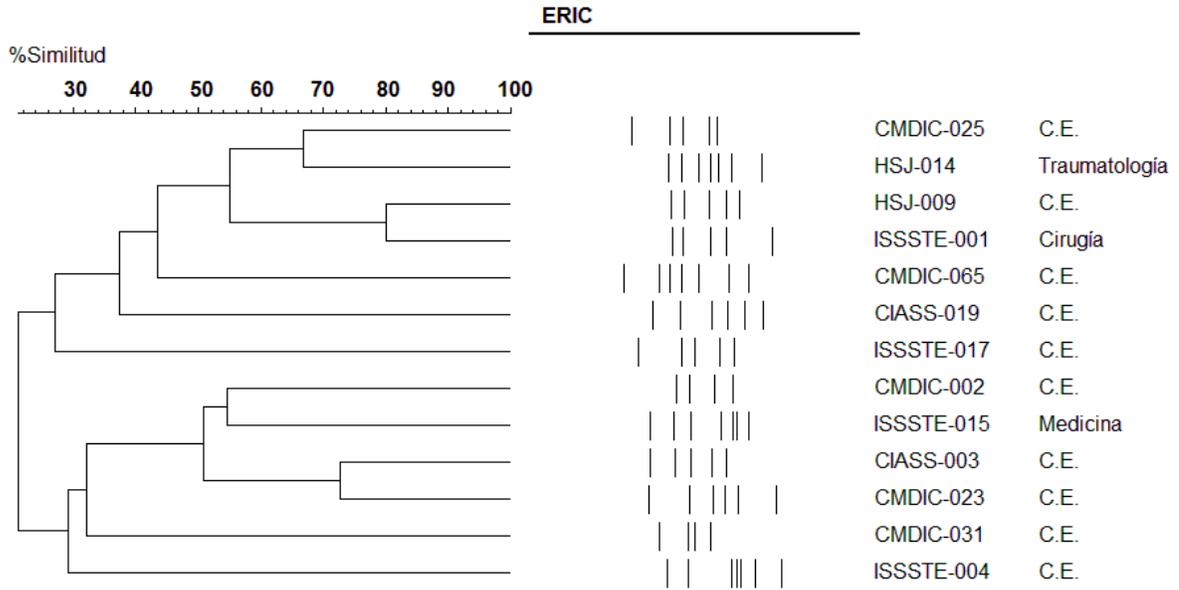


Figura 7. Dendrograma de 13 aislamientos de *K. pneumoniae*, resultado del agrupamiento de los patrones ERIC con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice. En la parte central se muestra el patrón de bandas obtenido mediante ERIC-PCR para cada aislamiento analizado.

Los patrones ERIC-PCR mostraron 13 clones distintos que eran resistentes a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam, 10 de los 13 provenían de pacientes de consulta externa, uno de Traumatología, uno de Medicina Interna y uno del servicio de Cirugía.

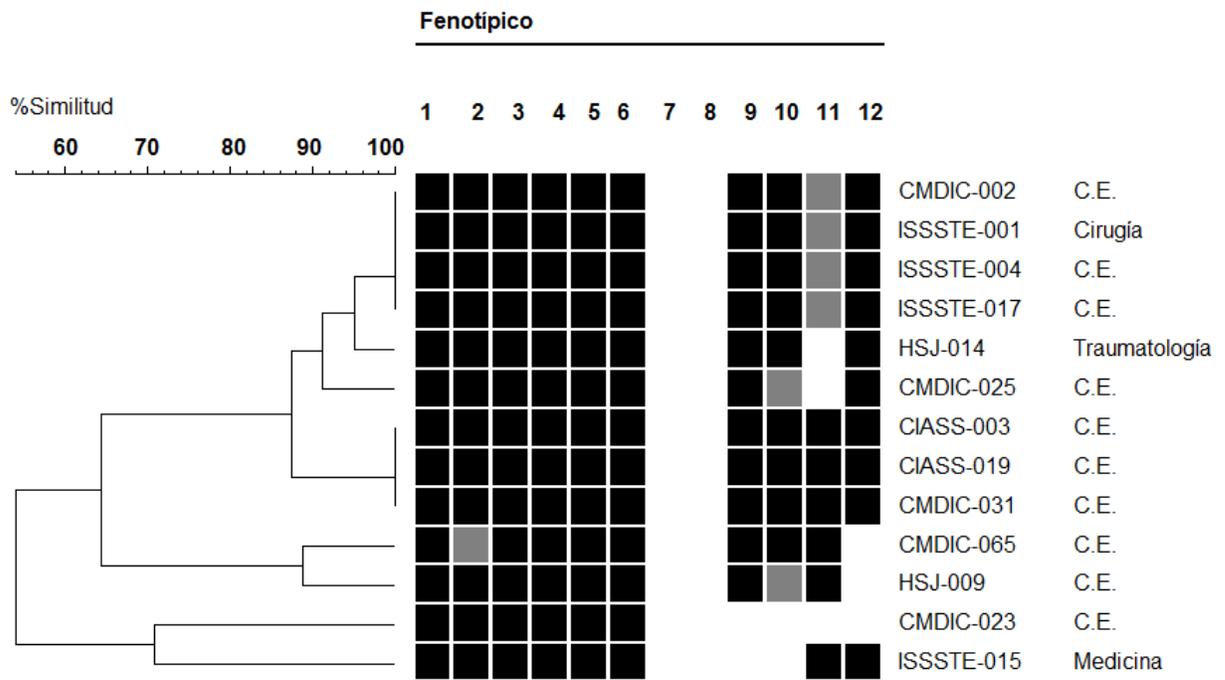


Figura 8. Dendrograma de 13 aislamientos de *K. pneumoniae* evaluando la similitud de su perfil de susceptibilidad mediante el coeficiente de Pearson.

Mientras que haciendo uso sólo del análisis fenotípico el agrupamiento por el coeficiente de Pearson mostró dos grupos con integrantes de idéntico perfil de susceptibilidad a los doce antimicrobianos evaluados.

Adicionalmente, se compararon aquellos aislamientos para los cuales se contaba con perfil de PFGE y ERIC. Resultados publicados en investigaciones previas sugieren que ERIC-PCR tiene un poder discriminador similar al de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Por lo tanto, es una técnica aceptable para la clasificación molecular en comparación con PFGE, como un método estándar de oro (Cartelle *et.al.*, 2004).

Los análisis revelaron que ambas técnicas mostraron ocho aislamientos diferentes, es decir, que ambas técnicas fueron igualmente eficaces para la diferenciación de los aislamientos (figuras 9 y 10). La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es la técnica considerada el estándar de oro para este fin, (Espinal *et al*, 2004; Kiratisin *et al*, 2008), no obstante los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la detección de elementos extragénicos repetitivos palindrómicos [REP] (Versalovic *et al*, 1991; Mantilla *et al*, 2004) y de elementos consenso repetitivos intergénicos de enterobacterias [ERIC] (Lim *et al*, 2009;

Versalovic *et al*, 1991), han sido ampliamente utilizados para la caracterización molecular, ya que son menos costosos y en ocasiones, como el presente estudio, muestran una capacidad discriminatoria adecuada.

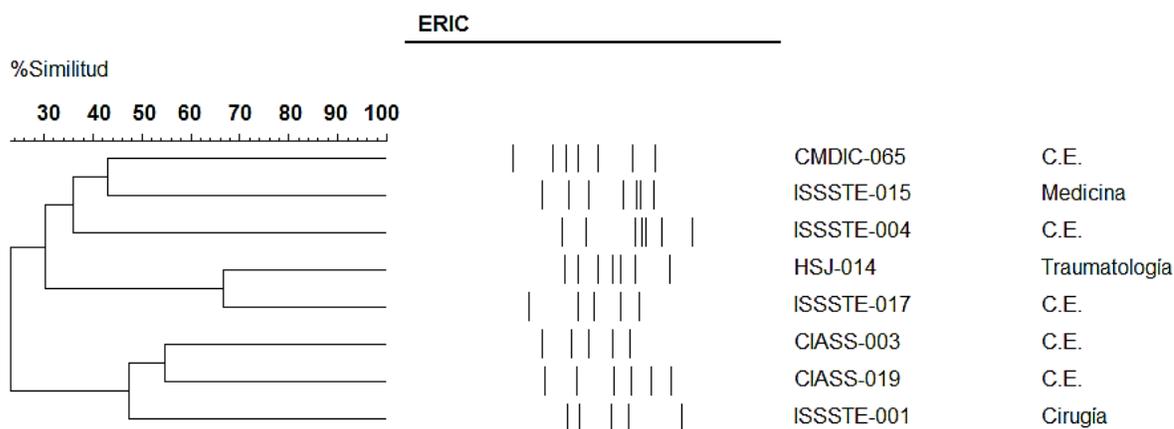


Figura 9. Dendrograma de 8 aislamientos de *K. pneumoniae*, resultado del agrupamiento de los patrones ERIC con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice. En la región central se muestra el patrón de bandas amplificado por ERIC-PCR para cada aislamiento analizado.

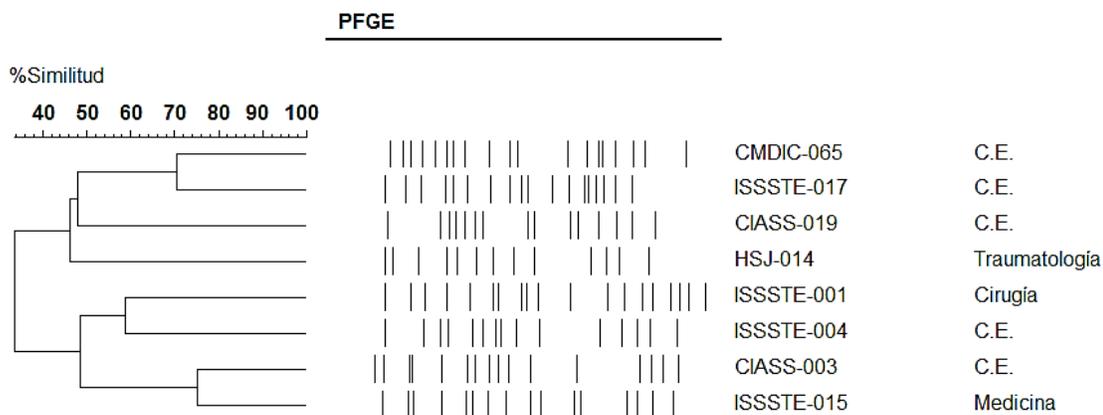


Figura 10. Dendrograma de 8 aislamientos de *K. pneumoniae*, resultado del agrupamiento de los patrones PFGE con el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice. En la región central se muestra el patrón de bandas amplificado por PFGE para cada aislamiento analizado.

Aislamientos de *Escherichia coli* Productoras de BLEE

Los ensayos de ERIC-PCR revelaron 192 perfiles ERIC claramente distintos para todos los aislamientos analizados, de los cuales seis perfiles corresponden a pares de clones idénticos en perfil ERIC. El dendrograma completo se muestra en el Anexo 1.

Estudios previos afirman que ERIC-PCR demuestra ser un método de genotipificación rápido y rentable para la discriminación efectiva de cepas de *E. coli* en función de su genotipo. (Sekhar *et al*, 2017). Evidencias similares han derivado de investigaciones que utilizan aislamientos obtenidos de diversas fuentes, como lo muestran los resultados de una investigación en Brasil donde el análisis de perfiles ERIC-PCR reveló un alto grado de diversidad entre los aislados de *E. coli* que se obtuvieron a partir de muestras de efluentes acuosos; sin embargo, la presencia de aislamientos con un 100% de similitud y patrones de resistencia idénticos indicaron la presencia de una población clonal (Canal *et al*, 2016).

Un estudio similar realizado en Irán, en el que analizaron la diversidad genética de aislamientos clínicos de *E. coli*, la epidemiología molecular realizada mediante el análisis de los segmentos de ADN amplificados mediante ERIC-PCR mostró que los aislados exhibían perfiles similares, que demostraron la transmisión clonal de bacterias en entornos hospitalarios (Ramazanzadeh *et.al.*, 2013).

Por otra parte, se compararon aislamientos de los que se contaba con perfil de PFGE y ERIC. Los análisis revelaron que ambas técnicas mostraron 34 cepas diferentes (figuras 11 y 12). Estudios previos realizados en la India con aislamientos de *Salmonella sp.*, mostraron que tanto la PFGE como otras técnicas de caracterización basadas en ADN (ERIC-PCR y PCR múltiple) proporcionan información que puede utilizarse para evaluar asociaciones epidemiológicas con un alto grado de confianza (Saravanan *et al*, 2015). Adicionalmente, una investigación realizada por Ventura y Zink en 2002, arrojó que los patrones de ERIC-PCR para cada cepa individual, obtenidos mediante amplificaciones diferentes e independientes fueron constantemente reproducibles, independientemente de los parámetros variables, aunado a que, sus resultados sugieren que los métodos de tamizaje de PCR como ERIC-PCR, son de mayor utilidad debido a su rápido y fácil rendimiento.

La PFGE es el método recomendado para la confirmación de brotes causados por enterobacterias (Hansen *et al*, 2002). Sin embargo, es un método laborioso, costoso, con un número limitado de muestras para analizar al mismo tiempo, como todos los métodos basados

en electroforesis utilizados para el tipado molecular a menudo requiere mucho tiempo, requiere personal con experiencia en el desarrollo del proceso, una estandarización estricta y no es probable que se realicen en análisis de rutina en un laboratorio de microbiología estándar (Ventura y Zink, 2002). En un estudio realizado en Brasil donde se estudió la diversidad genética de *Shigella sonnei*, el dendrograma generado por los datos de ERIC-PCR para 72 aislamientos fue muy similar al generado por los datos de PFGE, con solo cuatro cepas en diferentes grupos (Seribelli *et al*, 2016). Las metodologías PFGE y ERIC-PCR fueron eficientes y discriminaron de manera muy similar las cepas de *S. sonnei* estudiadas de acuerdo con el índice de discriminación, lo que indica que incluso organismos monomórficos como *Shigella spp.* pueden ser bien discriminado por estas técnicas (Seribelli *et al*, 2016).

En un estudio se compararon cuatro métodos de tipado molecular para la diferenciación de aislamientos de *Salmonella spp* y se concluyó que ERIC-PCR fue el procedimiento más eficiente (Lim *et al*, 2005). Resultados similares fueron reportados previamente en algunos estudios cuando ERIC-PCR se comparó con otros métodos de tipificación molecular (Nath *et al*, 2010; Kumar *et al*, 2008). Además, la precisión, simplicidad y menor costo de ERIC-PCR, en comparación con otros métodos de tipado, aumentan su utilidad para el análisis molecular de un gran número de enterobacterias (Fendri *et al*, 2013). Adicionalmente, ERIC-PCR tiene ventajas específicas en comparación con otros métodos moleculares, ya que esta técnica analiza el genoma bacteriano completo y no solo una región específica de genes individuales (Bolado-Martínez y Acedo-Félix, 2009). El análisis del genoma completo permite que el análisis genotípico sea más robusto, dado que el poder de interpretación de información basado, por ejemplo en ARNr (es decir, el uso de un solo gen u operón) en el análisis de tipado molecular en ocasiones podría ser cuestionable (Tannok *et al*, 1999).

Con excepción de la secuenciación total del genoma, los métodos genotípicos no son definitivos para identificar todas las posibles diferencias entre cepas. Por el contrario, estos métodos agrupan los aislamientos de acuerdo con la presencia de sitios de restricción comunes (PFGE y ribotipificación) o la presencia de productos de PCR de tamaño variable (ERIC-PCR). La elección del método de tipado depende de factores que incluyen el tiempo, el costo, la reproducibilidad y la capacidad de un método para distinguir correctamente entre aislados clonales y no clonales. Los marcadores identificados mediante PFGE o ERIC-PCR pueden no tener ningún significado biológico directo. Por lo tanto, los métodos de tipificación deben usarse en conjunto con datos epidemiológicos adicionales que permitan hacer inferencias significativas (Pettigrew *et al*, 2002).

Por otra parte, cabe destacar que cuando se agruparon sólo los aislamientos de *E. coli* de acuerdo con las salas de estancia hospitalaria, se detectó que dos aislamientos presentaban un perfil de ERIC-PCR idéntico en la misma institución de salud (figura 13). Esto lleva a considerar que posiblemente se involucraban en Infecciones Asociadas a la Atención a la Salud (IAAS).

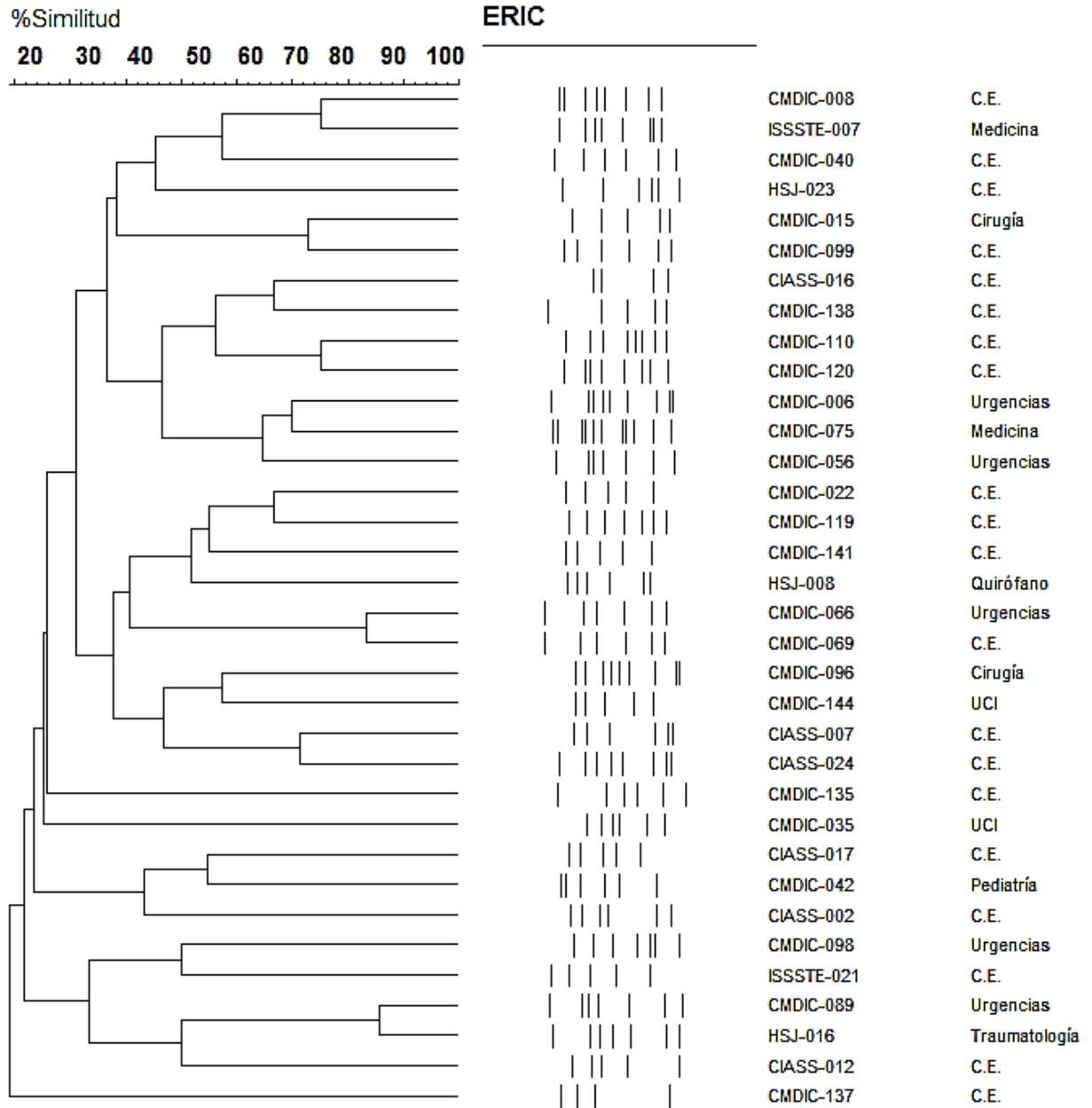


Figura 11. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 34 aislamientos de *E. coli* de acuerdo a perfiles ERIC-PCR obtenidos.

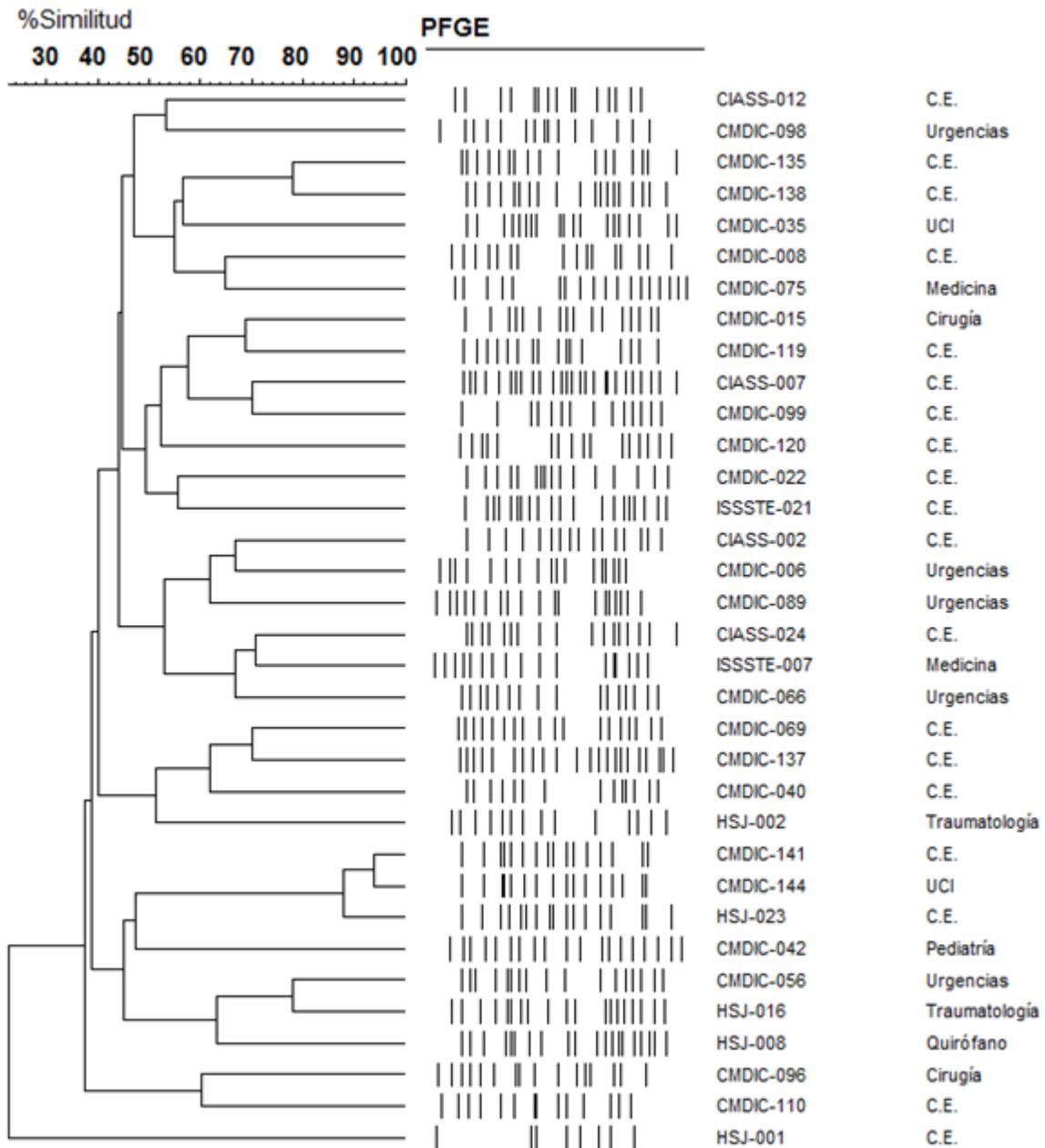


Figura 12. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 34 aislamientos de *E. coli* de acuerdo a perfiles de PFGE obtenidos

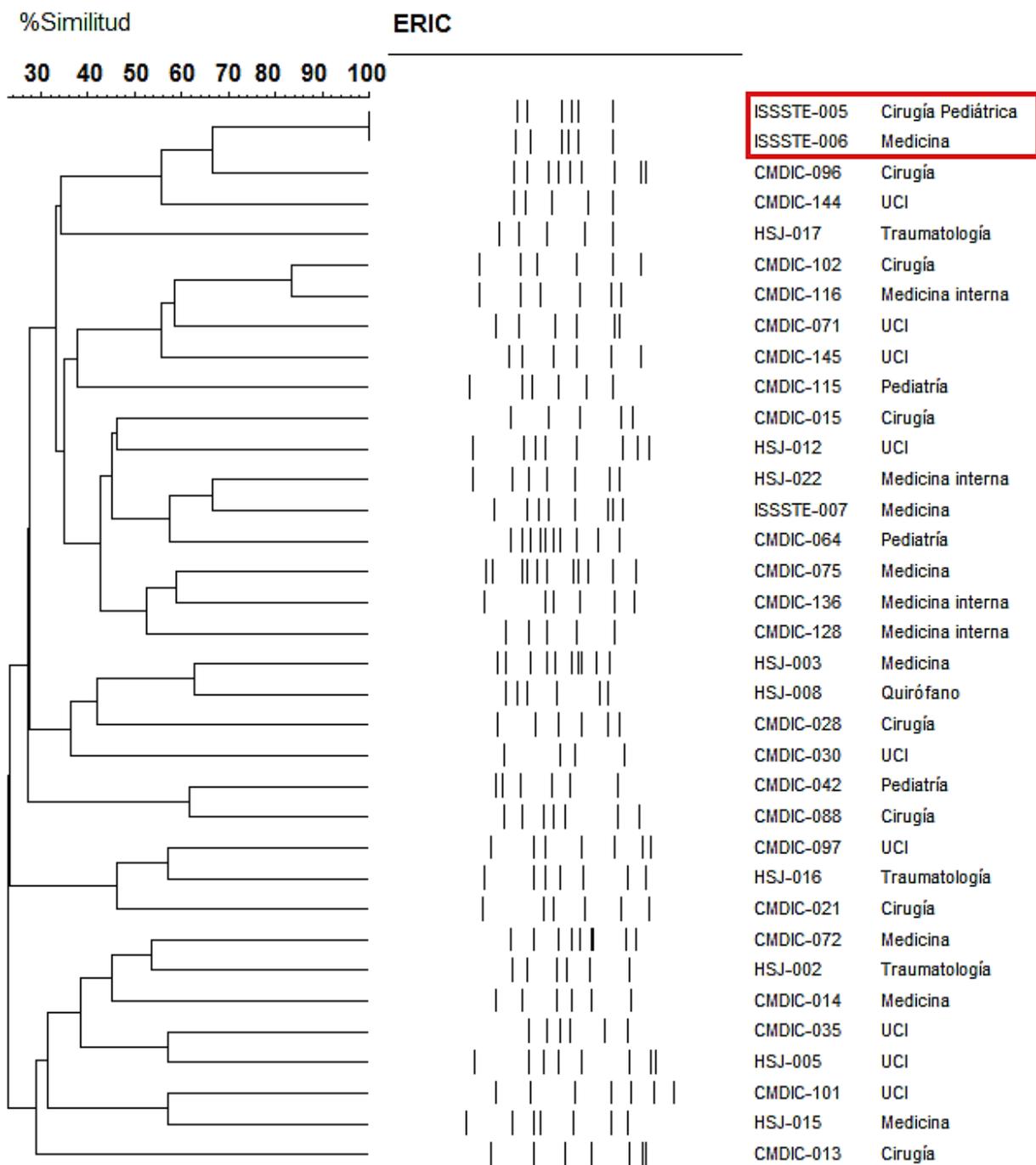


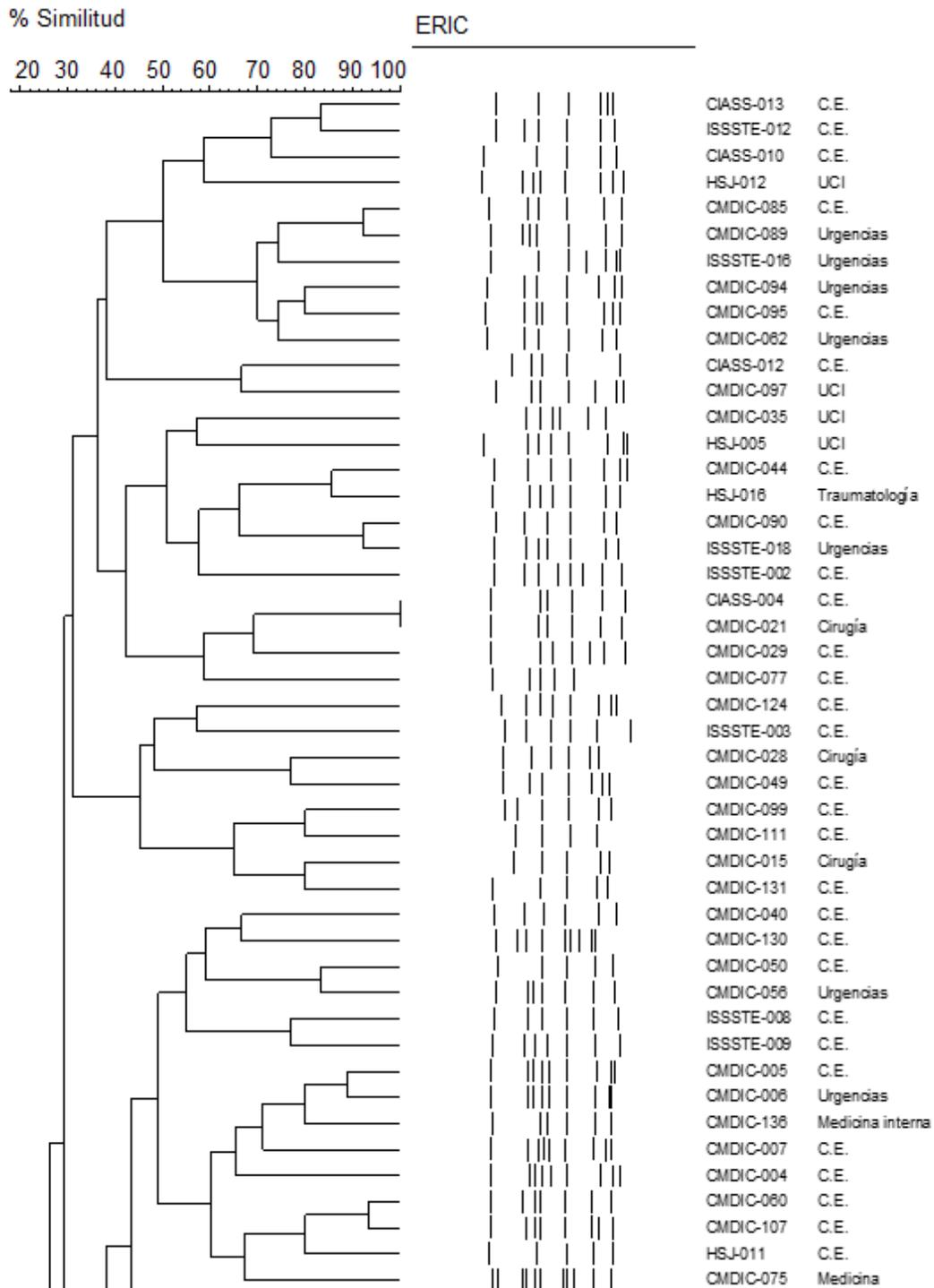
Figura 13. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 34 aislamientos de *E. coli* de acuerdo a perfiles ERIC-PCR y servicio hospitalario.

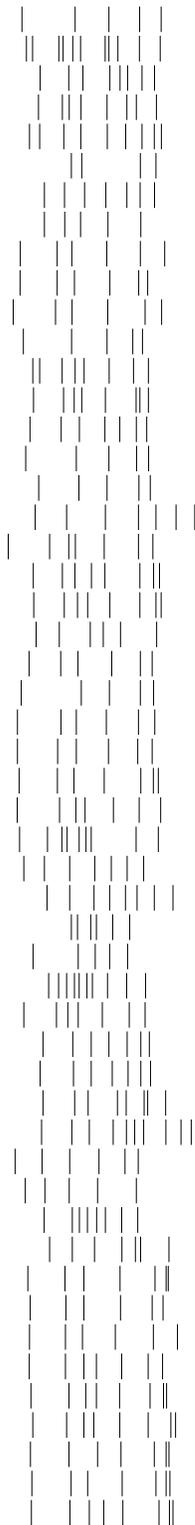
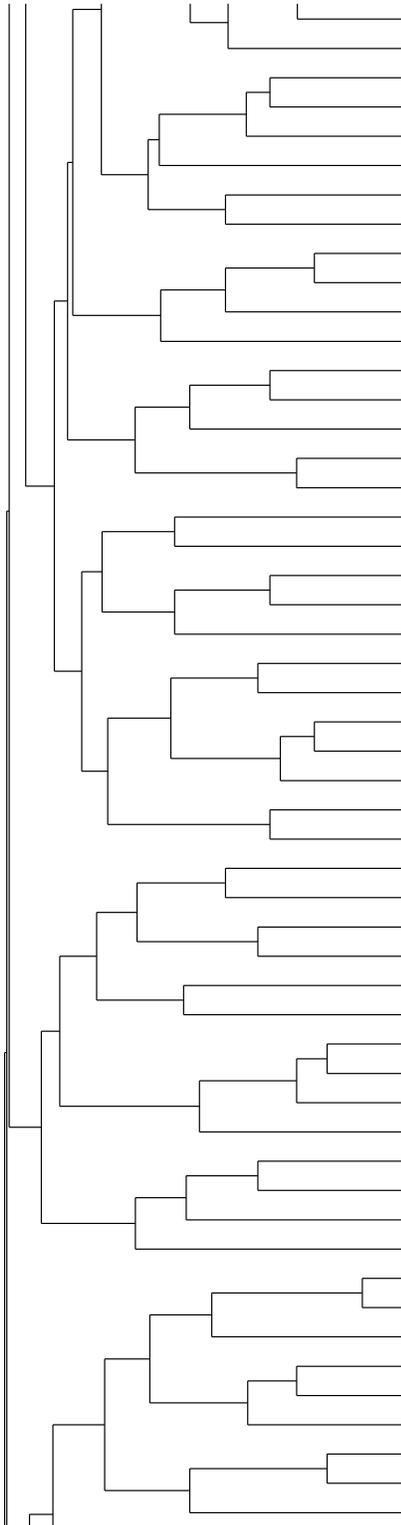
CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que, llevar a cabo la caracterización genotípica de manera sistemática, mediante ERIC-PCR, de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE, en las cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, participantes en este estudio, sería utilidad y apoyo para el estudio epidemiológico de la variedad de cepas BLEE circulantes en tales instituciones, en un nivel comparable de confianza con el que nos ofrecen otras técnicas de genotipificación molecular.

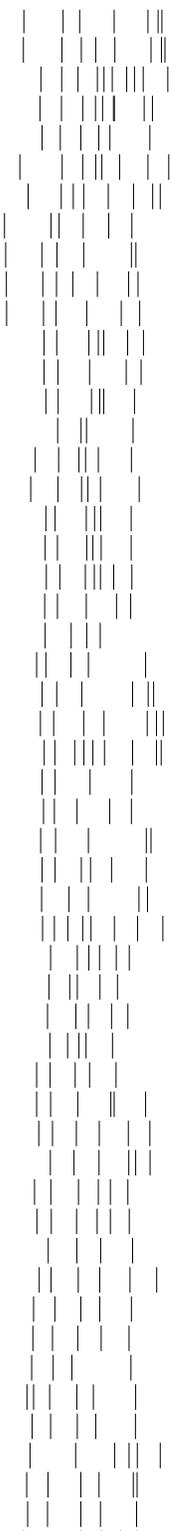
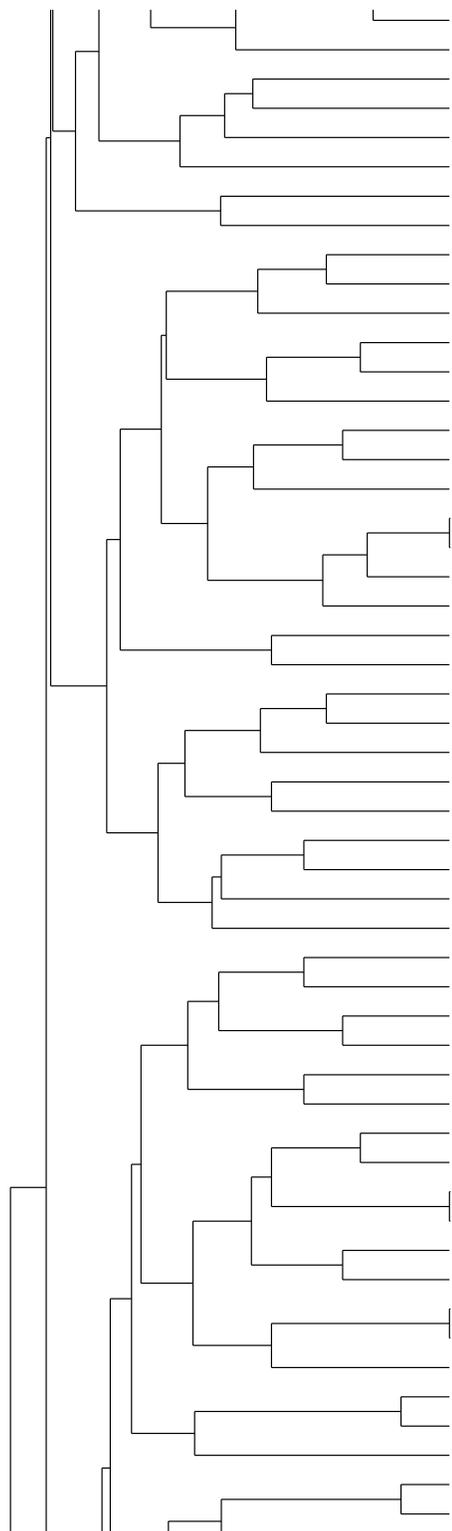
Resulta evidente que por la sola presencia tal variedad de cepas productoras de BLEE en instituciones de salud de la ciudad, y más aún por su distribución en la comunidad, que es urgente atacar el problema de la resistencia antibiótica por múltiples vías, para evitar que la diseminación de estas cepas continúe en nuestra comunidad.

Anexo 1. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de similitud Dice, de 202 aislamientos de *E. coli* de acuerdo a perfiles ERIC-PCR obtenidos.

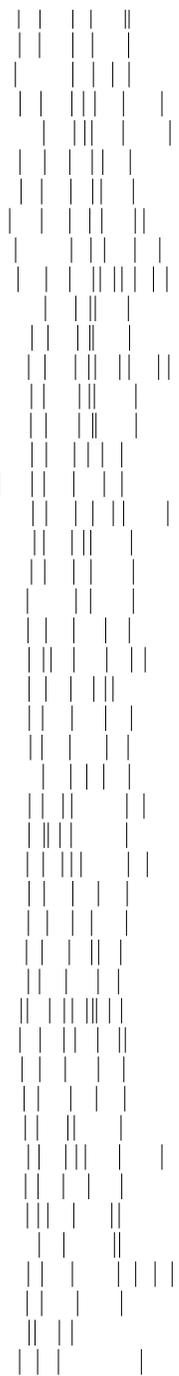
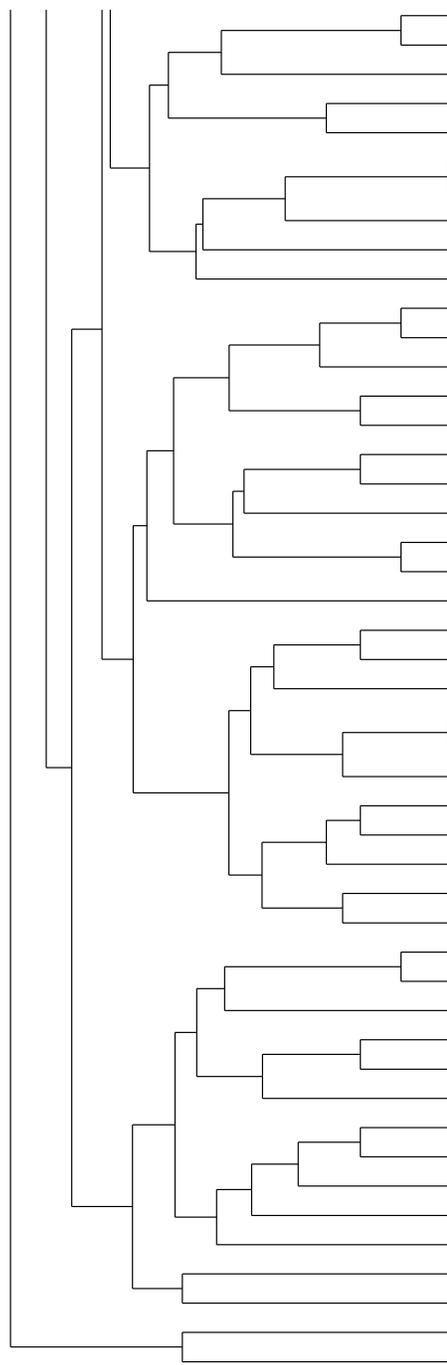




- HSJ-011 C.E.
- CMDIC-075 Medicina
- CMDIC-110 C.E.
- CMDIC-120 C.E.
- CIASS-015 C.E.
- CIASS-016 C.E.
- CMDIC-119 C.E.
- CMDIC-128 Medicina interna
- CMDIC-102 Cirugía
- CMDIC-116 Medicina interna
- CMDIC-081 C.E.
- CMDIC-121 C.E.
- CMDIC-008 C.E.
- ISSSTE-007 Medicina
- CIASS-025 C.E.
- CIASS-018 C.E.
- ISSSTE-010 C.E.
- CMDIC-101 UCI
- HSJ-015 Medicina
- CIASS-024 C.E.
- CMDIC-129 Urgencias
- CMDIC-014 Medicina
- CMDIC-078 C.E.
- CMDIC-138 C.E.
- CMDIC-066 Urgencias
- CMDIC-069 C.E.
- CMDIC-112 C.E.
- CIASS-026 C.E.
- CMDIC-054 C.E.
- CMDIC-048 C.E.
- CMDIC-113 C.E.
- CMDIC-083 C.E.
- ISSSTE-014 C.E.
- CMDIC-064 Pediatría
- CMDIC-084 C.E.
- CMDIC-132 C.E.
- CMDIC-133 C.E.
- CMDIC-134 C.E.
- CMDIC-027 C.E.
- CMDIC-142 C.E.
- ISSSTE-021 C.E.
- CMDIC-055 C.E.
- CMDIC-098 Urgencias
- CMDIC-009 C.E.
- HIES-001
- CMDIC-038 C.E.
- CMDIC-010 C.E.
- CMDIC-024 C.E.
- CMDIC-093 C.E.
- CMDIC-013 Cirugía
- CMDIC-017 C.E.
- CMDIC-012 C.E.

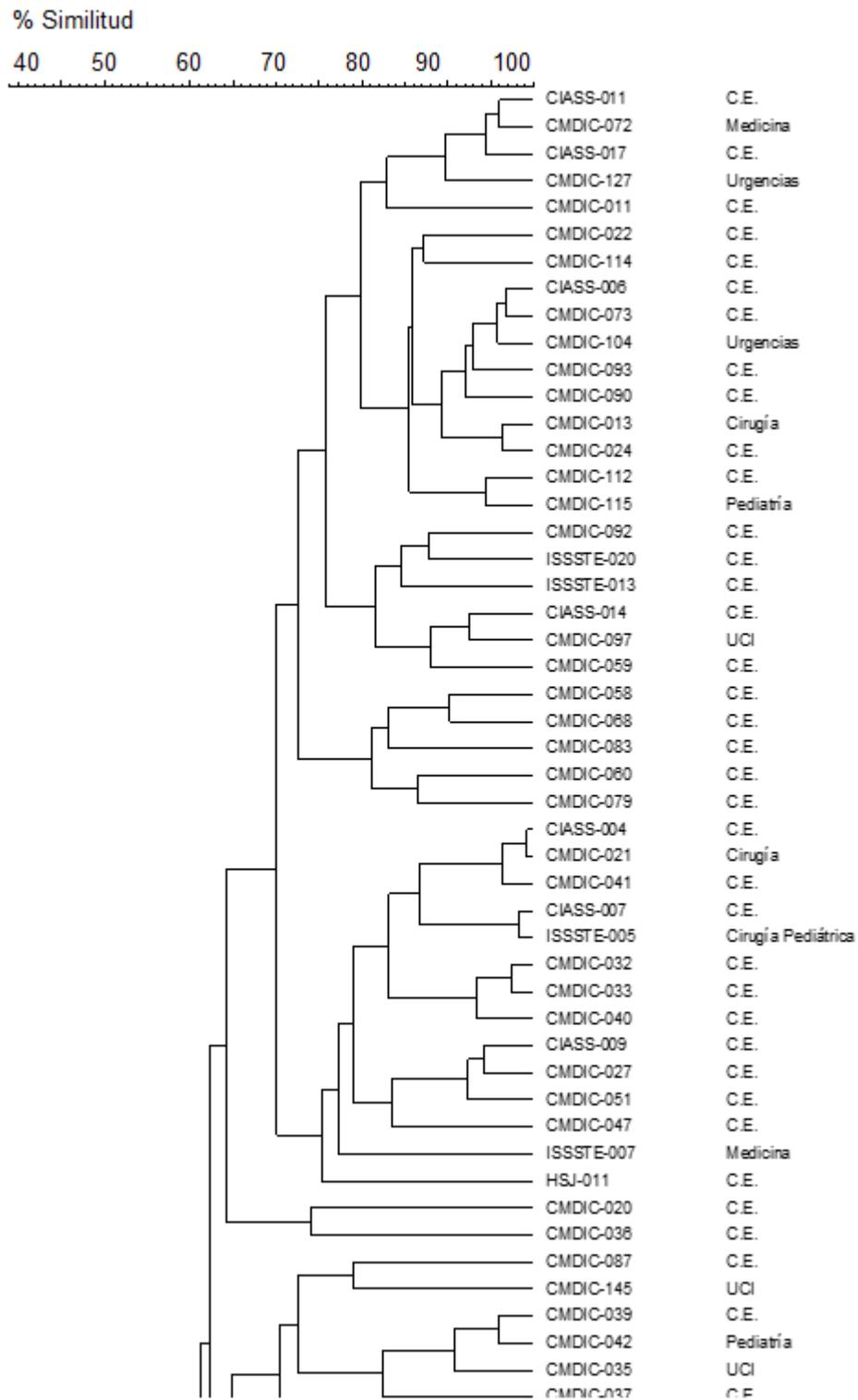


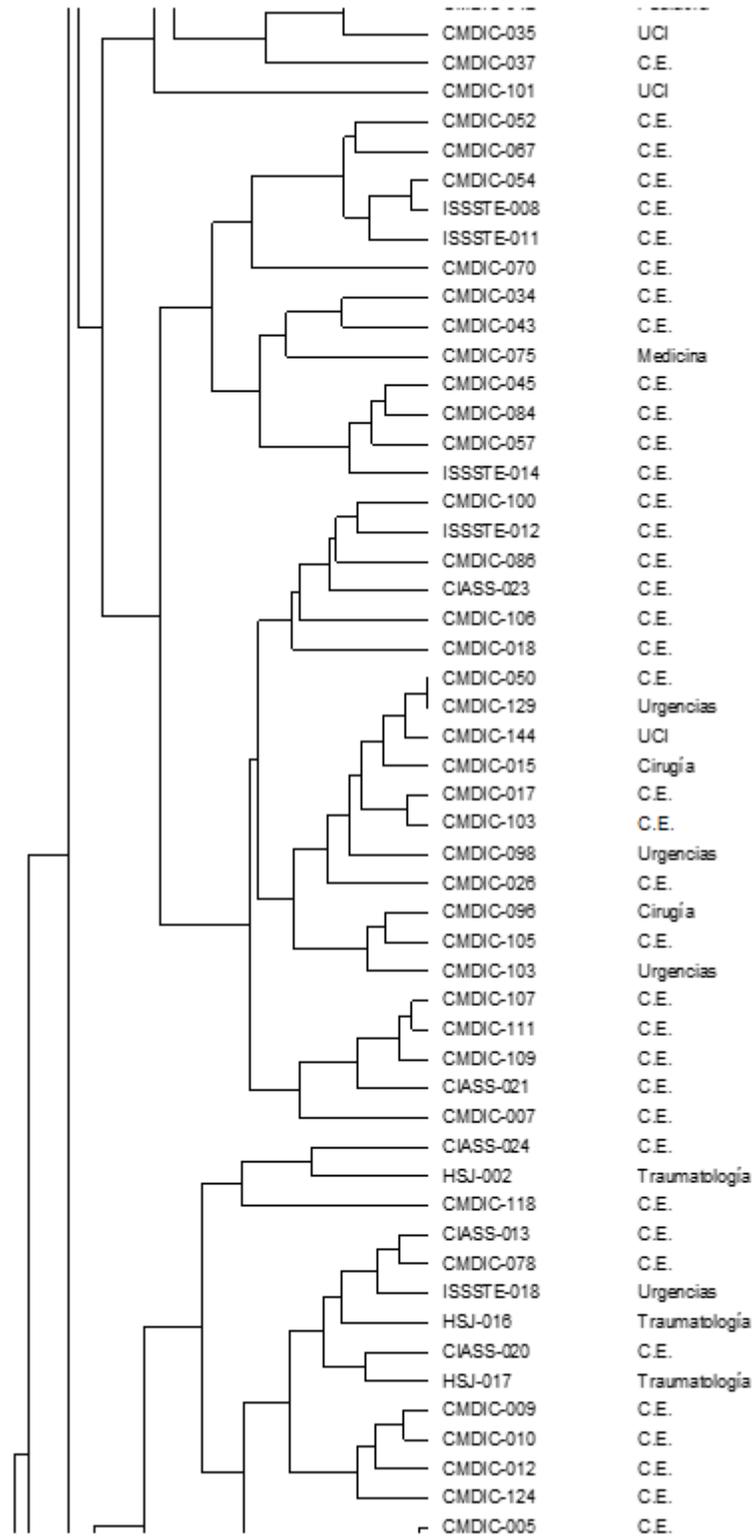
- CMDIC-017 C.E.
- CMDIC-012 C.E.
- CMDIC-051 C.E.
- CMDIC-072 Medicina
- ISSSTE-013 C.E.
- HSJ-004 C.E.
- CMDIC-046 C.E.
- CMDIC-115 Pediatría
- CIASS-021 C.E.
- HSJ-022 Medicina interna
- CIASS-020 C.E.
- CIASS-023 C.E.
- CMDIC-011 C.E.
- CMDIC-127 Urgencias
- CMDIC-052 C.E.
- ISSSTE-011 C.E.
- CIASS-001 C.E.
- ISSSTE-005 Cirugía Pediátrica
- ISSSTE-006 Medicina
- CMDIC-092 C.E.
- CMDIC-047 C.E.
- CMDIC-037 C.E.
- CMDIC-104 Urgencias
- CIASS-007 C.E.
- CMDIC-087 C.E.
- CMDIC-096 Cirugía
- CMDIC-036 C.E.
- CMDIC-144 UCI
- CMDIC-026 C.E.
- HSJ-002 Traumatología
- CMDIC-082 Urgencias
- CMDIC-103 Urgencias
- CMDIC-045 C.E.
- CMDIC-067 C.E.
- CMDIC-059 C.E.
- CMDIC-070 C.E.
- CIASS-017 C.E.
- CMDIC-105 C.E.
- CMDIC-068 C.E.
- CMDIC-140 C.E.
- HSJ-018 C.E.
- ISSSTE-019 C.E.
- CMDIC-043 C.E.
- CMDIC-145 UCI
- CMDIC-022 C.E.
- CMDIC-117 Urgencias
- CMDIC-125 C.E.
- CMDIC-042 Pediatría
- CMDIC-109 C.E.
- HSJ-023 C.E.
- CMDIC-071 UCI
- CMDIC-074 C.E.

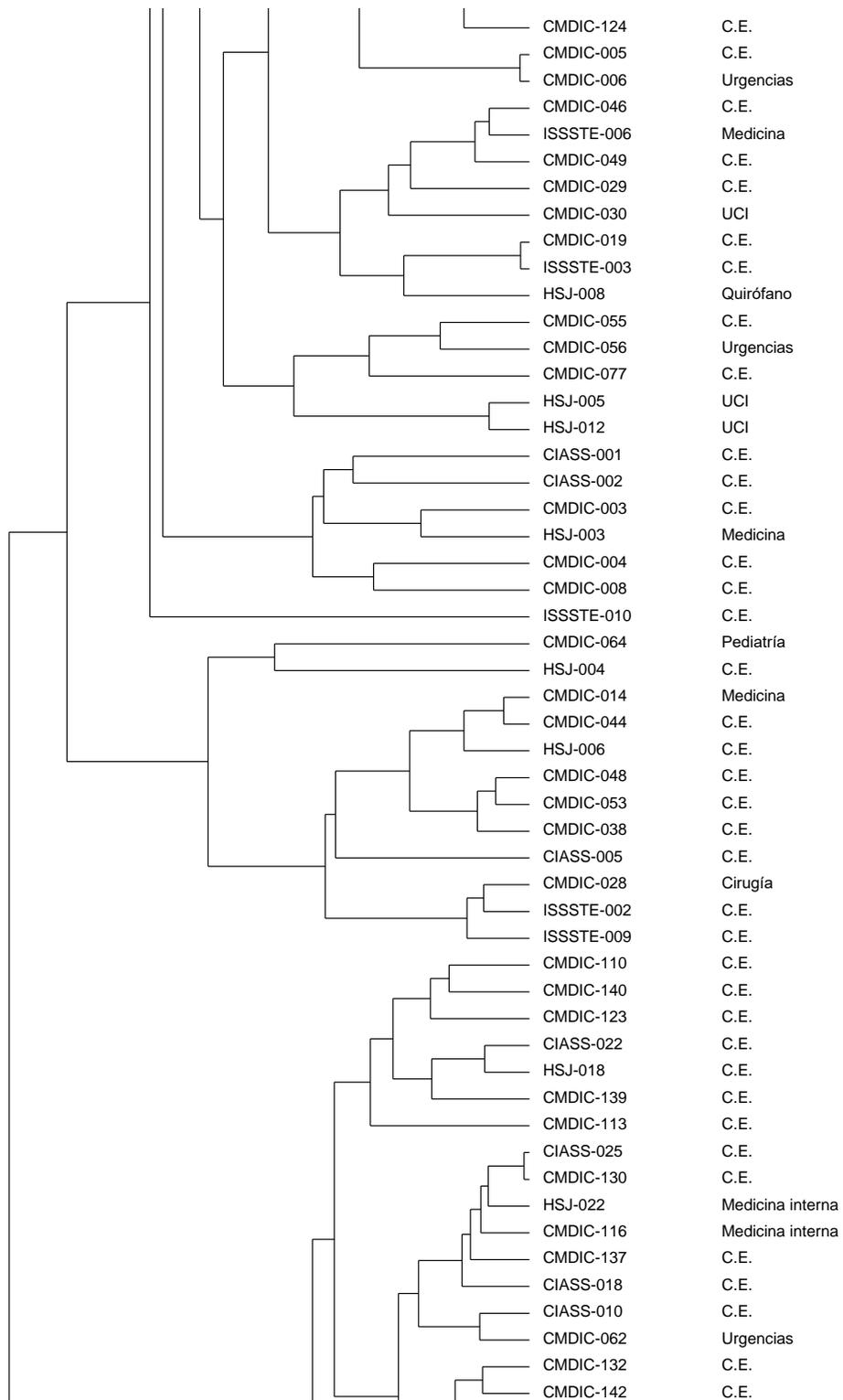


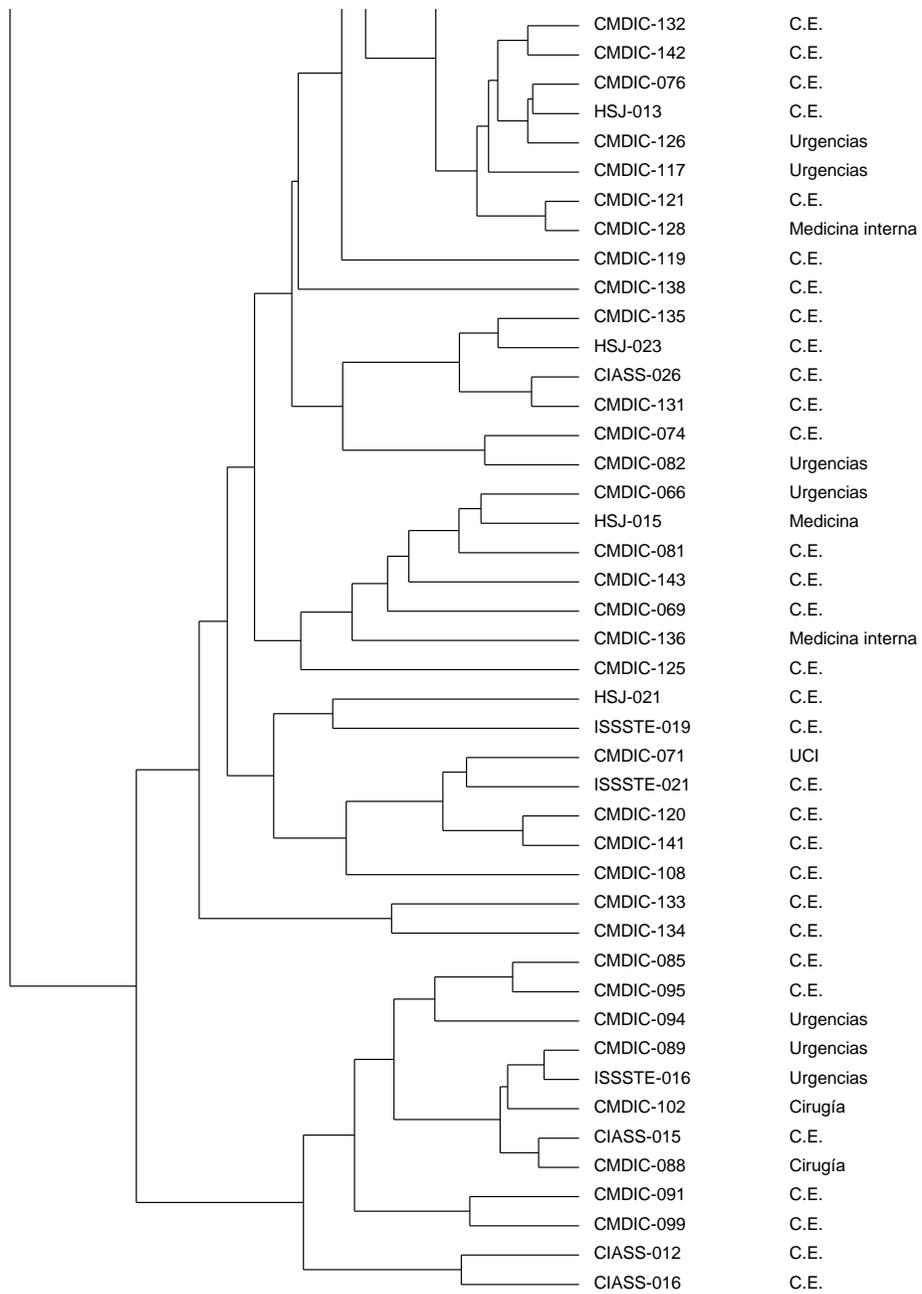
- CMDIC-071 UCI
- CMDIC-074 C.E.
- CMDIC-076 C.E.
- CIASS-009 C.E.
- CMDIC-018 C.E.
- CMDIC-106 C.E.
- CMDIC-118 C.E.
- CMDIC-086 C.E.
- CMDIC-135 C.E.
- HSJ-021 C.E.
- CMDIC-019 C.E.
- CMDIC-073 C.E.
- CMDIC-041 C.E.
- CIASS-005 C.E.
- CMDIC-100 C.E.
- CMDIC-020 C.E.
- ISSSTE-020 C.E.
- CMDIC-108 C.E.
- CMDIC-032 C.E.
- CMDIC-033 C.E.
- CMDIC-030 UCI
- CIASS-014 C.E.
- CMDIC-003 C.E.
- CIASS-006 C.E.
- CMDIC-114 C.E.
- HSJ-006 C.E.
- CMDIC-053 C.E.
- CIASS-002 C.E.
- CMDIC-034 C.E.
- CMDIC-088 Cirugía
- CIASS-011 C.E.
- CMDIC-126 Urgencias
- CIASS-022 C.E.
- CMDIC-079 C.E.
- HSJ-003 Medicina
- CMDIC-139 C.E.
- HSJ-017 Traumatología
- HSJ-013 C.E.
- CMDIC-057 C.E.
- CMDIC-058 C.E.
- CMDIC-141 C.E.
- HSJ-008 Quirófano
- CMDIC-123 C.E.
- CMDIC-091 C.E.
- CMDIC-143 C.E.
- CMDIC-039 C.E.
- CMDIC-137 C.E.

Anexo 2. Agrupamiento, utilizando el algoritmo UPGMA, 202 aislamientos de *E. coli* de acuerdo a perfiles ERIC-PCR obtenidos y al perfil de susceptibilidad a los antibióticos correspondiente.









BIBLIOGRAFÍA

- Alós J. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 33(10):692–699.
- Álvarez D. 2010. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Rev Haban Cienc Med*; 9(4): 516-524.
- Bailón H., Sacsquispe R. 2013. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing (ESBL) strains of *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infections in a neonatal unit in Lima, Peru. *Rev Med Hered*; 24:101-108.
- Bantar C., Famiglietti A., Goldberg M. 2000. Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group. *Int J Infect Dis*; 4:85-90.
- Barbier F., Ruppe E., Giakkoupi P. 2010. Genesis of a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* after *in vivo* transfer from an imported greek strain. *Euro Surveill*; 15(1):234-245.
- Barus T., Hanjaya I., Sadeli J., Widiyati B., Suwanto A., Yulandi A. 2013. Genetic Diversity of *Klebsiella* spp. Isolated from Tempe based on Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). *HAYATI J Biosci*; 20 (4):171-176.
- Blanco P., Hernando-Amado S., Reales-Calderón J.A., Corona F., Lira F., Alcalde-Rico M., Bernardini A., Sanchez M.B., Martínez J.L. 2016. Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*; 4:14-25.
- Bolado-Martínez E., Acedo-Félix E. 2009. Differentiation of porcine wild-type lactobacilli strains, with ERIC-PCR and PFGE band patterns included in polyphasic taxonomy. *Czech J Anim Sci*; 54(7): 307–314.
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum betalactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 1-14.
- Bonomo R.A., Szabo D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*; 43(Supl 2): 49–56.
- Bradford P., Cherulin C., Idemyor V., Rasmussen B., Bush K. 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum

- TEM-12 and TEM-10 ceftazidime hydrolyzing β -lactamases in single isolate. *Antimicrob Agents Chemother*; 38:761-76
- Bradford, P.A. 2001. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and the detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 14: 933-951.
- Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., Duval J. 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*; 2(8554): 302–306.
- Bush, K., Jacoby G. A. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:969–976.
- Cabral A.B., Melo R. de C., Maciel M.A., Lopes A.C. 2012. Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 45(5):572-578.
- Canal N., Meneghetti K.L., Ponzi de Almeida C., Bastos M.R., Muner L.M., Corcao G. 2016. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Braz J Microbiol*; 47: 337–344.
- Cantón R., Oliver A., Coque T., Varela M., Pérez-Díaz J., Baquero F. 2002 Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter* isolates in a spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol*; 40:1237-43.
- Cartelle M., Tomas M., Pertega S., Beceiro A., Dominguez M.A., Velasco D. 2004. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol*; 42(9):4242–9.
- Carter M., Oakton K., Warner M., Livermore D. 2000. Detection of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid combination disk method. *J Clin Microbiol*; 38: 4228-4232.
- Casella J., Goldberg M. 1989. Incidence to strains producing extended spectrum β -lactamases in Argentina. *Infection*; 17:434-436.

- CDC, Centers for Disease Control. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> (Fecha de acceso: 10/02/2018).
- Chen Z., Liu W., Zhang Y., Li Y., Jian Z., Deng H. 2014. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Xiang Ya hospital, in Hunan province, China. J Basic Microbiol; 53:121-127.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Informational. 6th ed. Approved standard M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005b. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Informational .8° ed. Supplement M100-S15 document M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27° ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Coelho J., Woodford N., Afzal M., Livermore D. 2006. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. Antimicrob Agent Chemother; 50: 756-758
- Crowfoot D., Bunn C.W., Rogers-Low B.W., Turner-Jones A. 1949. X-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin. En: Clarke, H.T., Johnson, J.R. & Robinson, R., Chemistry of Penicillin. Princeton University Press: Princeton; 310-367.
- Das S., Dash H.R. 2015. Microbial Biotechnology. A laboratory Manual for Bacterial Systems. 1° ed. Springer. India. 166-173.

- Datta N., Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*; 1965; 208(5007):239-41.
- Davies J., Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*; 74(3): 417–433.
- Davies J.E. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba F Symp*; 207: 15–35.
- Delgado-Valverde M., Sojo-Dorado J., Pascual A., Rodríguez-Baño. 2013. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ther Adv Infect Dis*; 1(2): 49-69.
- DiPersio J., Deshpande L., Biedenbach D., Toleman A., Walsh R., Jones R. 2005. Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 51:1-17.
- Dreser A., Wirtz V.J., Corbett K.K., Echániz G. 2008. Uso de antibióticos en México: Revisión de problemas y políticas. *Salud Pub Mex*; 50 (4): S480-S487.
- Durmaz S., Bal E.B.B., Gunaydin M, Yula E, Percin D. 2015. Detection of β -lactamase genes, ERIC-PCR typing and phylogenetic groups of ESBL producing quinolone resistant clinical *Escherichia coli* isolates. *Biomed Res*; 26(1):43-50.
- Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 3724-3732.
- Errecalde J.O. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. *FAO producción y sanidad animal*; Pp. 20-30.
- Espinal P., Mantilla J., Saavedra C., Leal A., Alpuche C., Valenzuela E. 2004 Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido. *Biomédica*; 24(3):252-261
- Espinasa L., Borowsky R. 1998. Evolutionary divergence of AP-PCR (RAPD) patterns. *Mol Biol Evol*; 15(4):408-14.

- Fair R.J., Tor Y. 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*; 6: 25–64
- Fajardo A., Martínez-Martin N., Mercadillo M. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE*; 3: e1619.
- Fendri I., Ben-Hassena A., Grosset N., Barkallah M., Khannous L. 2013. Genetic diversity of food-isolated *Salmonella* strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR). *PLoS ONE* 8(12): e81315.
- Fernández-Cuenca F. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22(6):355-60.
- Fernández-Cuenca F., López-Cerero L., Pascual-Hernández A. 2013. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 31(Supl 1):20-25
- Fernández-Riverón F., López Hernández J., Ponce- Martínez L.M., Machado-Betarte C. 2003. Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit*; 32(1):44-48.
- Garza-Gonzalez E., Mendoza-Ibarra S.I., Llaca-Díaz J.M., González G.M. 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum b-lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary care centre in Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol*; 60: 84–90
- Ghafourian S., Sadeghifard N., Soheili S., Sekawi Z. 2015. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology *Curr. Issues Mol. Biol*; 17: 11-22.
- Gudiol, F., Marín M. 2003. Antibióticos betalactámicos *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*; 21(1):42-55.
- Gutmann L., Ferré B., Goldstein F., Rizk N., Pinto E., Acar J., Collatz E. 1989. SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother*, 33:951-956.
- Hamilton-Miller J.M. 2004. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *Int J Antimicrob Ag*; 23:209–212.

- Hansen D., Skov R., Bened J., Sperling V., Kolmos H. 2002. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. Clin Microbiol Infect; 8: 397–404.
- Hauser, A.R. 2012. Antibiotic basics for clinicians. Choosing the right antibacterial agent. . 1° ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA. 125-224.
- Hogberg, L.D., Heddini, A., Cars, O. 2010. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. Trends Pharmacol Sci; 31: 509-515.
- Hulton C. S. J., Higgins C. F., Sharp P. M .1991. ERIC sequences a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol Microbiol 5(4), 825-834.
- Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Laesripa C., Saifon P. 2008. Molecular characterization and epidemiology of extended spectrum betalactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemoth; 52(8): 2818–2824.
- Kitano, K., Tomasz, A. 1979. Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother; 16: 838-848.
- Kitchel B., Rasheed K., Patel J. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother; 53(8): 3365– 3370.
- Kumar R., Surendran P.K., Thampuran N. 2008. Molecular fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. enterica Thyphimurium and *Salmonella enterica* subsp. Enterica Derby isolated from tropical seafood in South India. Mol Biotechnol; 40: 95–100.
- Labarca J. 2002. Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: comparación con la epidemiología molecular. Rev Chil Infect; 19:S157-60.
- Lahey Clinic. 2017. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Disponible en: <https://www.lahey.org/Studies/> (Fecha de acceso: 10/02/18).

- Lang X.Y., Zhang Y., Jiang H., Liu J., Ni H. 2013. Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin. Development of an enterobacterial repetitive. Afr J Microbiol Res; 7(31):4001-4005.
- Levy, S. B., Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med; 10(Supl.):122–129.
- Lewis, K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov; 12: 371-387.
- Lim H., Lee K.H., Hong C.H., Bahk G.J., Choi W.S. 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. Int J Food Microbiol; 105: 411-418.
- Lim K., Yasin R., Yeo C., Puthuchery S., Thong K. 2009. Characterization of multidrug resistant ESBL producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia. J Biomed Biotechnol; 15: 243-256.
- Lin C.F., Hsu S.K., Chen C.H., Huang J.R., Lo H.H. 2010. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. J Med Microbiol; 59(Pt6): 665-671.
- Livermore D., Cantón R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G. y Arlet G. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother; 59:165-74.
- Livermore D., Cantón R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G., Arlet G. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother; 59:165-74.
- Livermore, D.M., Woodford, N. 2006. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol; 14: 413-420.
- Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F., Mobashery S. 2010. The future of the B-lactams. Curr Opin Microbiol; 38: 551-557.
- Lucet J.C., Decré D., Fichelle A. 1999. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a University Hospital. Clin Infect Dis; 29:1411-8.

- M'Zali F., Chanawong A., Kerr K., Birkenhead D., Hawkey P. 2000 Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother*; 45:881-885.
- Magurran A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. 2° ed. Princenton University Press. Princeton, New Jersey, U.S.A. 124-136.
- Mantilla J., García I., Espinal P., Valenzuela E. 2004. Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Col Cienc Quim Farm*; 33 (1): 48-58.
- Martínez J.L., Baquero F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 1771–1777.
- Martínez J.L., Fajardo A., Garmendia L., Hernández A., Linares J.F., Martínez-Solano L., Sánchez M.B. 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*; 33:44-65.
- Máttar S., Martínez P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología, *Infectio*; 11(1): 23-35.
- McMurry L., Petrucci R.E. Jr., Levy S.B. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Nat. Acad Sci*; 77: 3974–3977.
- Mendes C., Rossi A., Prado V., Zurita J., Robledo J., Guzman M., Colichon A., Sifuentes J., Pedreira W., Herrera M., Mejia-Villatoro C., Orantia R. 1999. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The Resisnet Group Summaries of the IDSA 37 Annual Meeting Philadelphia. Philadelphia, USA. 57p [Abstract 99].
- Nath G., Pushpa M., Gulati A.K. 2010. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella typhi* strains isolated over a period of two decades. *Infect Genet Evol*; 10: 530–536.

- Natoubi S., Barguigua A., Zriouil S., Baghdad N., Timinouni M., Hilali A., Amghar S., Zerouali K. 2016. Incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* among patients and in the environment of Hassan II hospital, Settat, Morocco. *Adv Microbiol*; 6:152-161
- Navarro- Navarro M., Robles-Zepeda R.E., Garibay-Escobar A., Ruiz-Bustos E. 2011. Hospital and community- acquired β - lactamases- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Hermosillo, Sonora. *Salud Pub Mex*; 53(4): 341-344.
- Navarro-Navarro M., Moreno-Noriega B.O., López-Munguía B.E., Fragoso-Carmelo M.C., Sánchez-Padilla J.A. 2005. Detección de Cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -Lactamasas de Espectro Extendido en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*; 22(2): 64-70.
- Newbury S. F., Smith N. H., Robinson E. C., Hiles I. D., Higgins C. F. 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell*; 48:297–310.
- Nicola, G., Tomberg, J., Pratt, R.F., Nicholas, R.A., Davies, C. 2010. Crystal structures of covalent complexes of beta-lactam antibiotics with *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity. *Biochemistry*; 49: 8094-8104.
- Nikaido, H., Takatsuka, Y. 2009. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*; 1794: 769–781.
- Nordmann, P. y Guibert, M. 1998. Extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*; 42:128-131.
- Oteo J., Campos J., Baquero F. 2002. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *J Antimicrob Chemother*; 50:945-52.
- Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., Garcia, C., Miguelanez, S., Perez-Vazquez, M., Garcia-Cobos, S., Aracil, B., Bautista, V., Campos, J. 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol*; 44(7): 2359-66.
- Paterson D., Bonomo R. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical Up-date. *Clin Microbiol Rev*; 18:657-686.

- Paterson D., Yu V. 1999 Extended spectrum β -lactamases: a call for improve detection and control. *Clin Infect Dis*; 29:1419-1422.
- Paterson, D.L. 2000. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect*; 6: 460-463.
- Pérez-Cano H.J., Robles-Contreras A. 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*; 4, (3) 187-191.
- Pettigrew M.M., Foxman B., Ecevit Z., Marrs C.F., Gilsdorf J. 2002. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*; 40(2): 660–662
- Pfaller M., Sagreti J. 2006. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum- β -lactamasas. *Clin Infect Dis*; 42:S153-S163.
- Pitout J.D., Laupland K.B. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*; 8 (3):159-66.
- Ramazanzadeh R., Zamani S., Zamani S. 2013. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iran. J Microbiol*; 5(2): 126-131.
- Ribeiro P.C., Monteiro A. S., Marques S.G., Monteiro S.G., Monteiro-Neto V., Coqueiro M. M., Marques A.G., Turri R., Santos S.G., Bomfim M.Q. 2016. Phenotypic and molecular detection of the *blaKPC* gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis*; 16:737.
- Rupp M.E., Fey P.D. 2003. Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*; 63 (4): 353-365.
- Sabaté M., Miró E., Navarro F., Verges C., Aliaga R., Mirelis B. 2002, Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother*; 49:989-97.

- Sabria-Leal M., Montoya P. 1992. Epidemiología molecular. Med Clin; 99: 137-9.
- Saravanan S., Purushothaman V., Ramasamy T., Sukumar K., Srinivasan P., Gowthaman V., Balusamy M., Atterbury R., Kuchipudi S.V. 2015. Molecular epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* in poultry and poultry products in India: implications for human health; Indian J Microbiol; 55(3):319–326
- Sekhar M. S., Sharif M., Rao T. S., Metta M. 2017. Genotyping of virulent *Escherichia coli* obtained from poultry and poultry farm workers using enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction. Vet World; 10: 2231-0916.
- Seribelli A. A., Frazao M. R., Medeiros M. I., Falcao J. P. 2016. Molecular and phenotypic characterization of strains of *Shigella sonnei* isolated over 31 years suggests the circulation of two prevalent subtypes in Sao Paulo State, Brazil. J Med Microbiol; 65: 666–677.
- Sharp P. M. 1997. Insertions within ERIC sequences. Mol Microbiol; 24:1314–1315.
- Sharp P. M., Leach D. R. 1996. Palindrome-induced deletion in enterobacterial repetitive sequences. Mol Microbiol; 22:1055–1056.
- Silva J., Aguilar C., Ayala G., Estrada M., Garza R., Lara L., Ledesma L. 2000. TLA-1, a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother; 44:997-100
- Singh A., Goering R., Simjee S., Foley S., Zervos M. 2006 Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev; 19: 512 - 30.
- Sirot, D., Sirot J., Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille- Michaud A., Perroux D., Cluzel R. 1987. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. J Antimicrob Chemother; 20:323–334.
- Suárez, C., Gudiol, F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin; 27(2):116–129.
- Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Ng J., Munro K., Alatossava T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt

- by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparison. *Appl Environ Microbiol*; 65, 4264-4276.
- Todar K. 2011. *Todar's Online Textbook of Bacteriology. Bacterial Resistance to Antibiotics.* Disponible en: www.textbookofbacteriology.net (Fecha de acceso: 10/02/2018).
- Turner P. 2005. Extended-spectrum- β -lactamases. *Clin Infect Dis*; 15(Supl 4):273-275.
- Tzelepi E., Sofianou G., Loukova V., Kermeroglu A., Tsakris A. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol*; 38:542-546.
- Valencia-Ramos J.M., Cano- Rangel M.A., Peralta-Cruz P. 2003. Microbiología de las infecciones nosocomiales en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*; 20 (2): 109-113.
- Ventola-Lee C. 2015. The antibiotic resistance crisis. Part 1: causes and threats. *P&T*; 40(4): 273-286
- Ventura M., Zink R. 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis *FEMS Microbiol Let*; 217: 141-154.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genome. *Nucleic Acids Res*; (19)24: 6823-6831.
- Vílchez G., Alonso G. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Ven Microbiol*; 29:6-12.
- Wasfi R., Elkhati W.F., Hossam M. A. 2016. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from egyptian hospitals. *Sci Rep*; 6:38929.
- White D. G., Alekshun M.N., McDermott P.F. 2005. *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy.* 1^oed. ASM Press. Washington, USA. 183p.
- Wilson L.A., Sharp P.M. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol*; 23(6):1156–1168.

Winokur P.L, Brueggemann D.L. DeSalvo Hoffmann, L., Apley M. D., Uhlenhopp E. K., Pfaller M.A., Doern G. V. 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC betalactamase. Antimicrob Agents Chemother; 44: 2777-2783.