



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE
GENES PLASMÍDICOS *qnr* QUE CONFIEREN
RESISTENCIA A QUINOLONAS EN CEPAS
DE *Escherichia coli* CAUSANTES DE
INFECCIONES DE TRACTO URINARIO CON
EXPRESIÓN DE β -LACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Marilyn E. Chivico. G.** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(a)(es): Sandra Fernández Figueiras
Guillermina Alonso

CARACAS-VENEZUELA
Octubre, 2009

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer inicialmente a mi familia, a mis padres, que gracias a ellos, a sus enseñanzas, a sus principios he llegado hasta aquí y he logrado esta meta tan importante para todos, sin ellos jamás lo hubiese logrado, a mis hermanas, mis primos, que contribuyeron con su apoyo de muchas maneras y diferentes momentos ¡GRACIAS, LOS AMO A TODOS!

Además de mi familia a mis amigos que con su constante apoyo e insistencia logré mantenerme en pie hasta ahora, gracias por estar estos últimos tiempos que fueron tan difíciles e importantes para lograr este objetivo, sobre todo Johancito, Diana, Gusti, Yesenia, Lisa, Carola, Ari, Jaily, y muchos otros más, cada uno presente en el momento y en el lugar indicado, por eso los quiero mucho.

También quiero agradecer con todo el alma a mis tutoras, la profesora Guillermina que se arriesgo a confiar en mí y se que logré no defraudarla, que estuvo pendiente hasta el último momento para que saliera rápido y bien de esto, y a Sandra que me acogió de una manera tan especial en su laboratorio, me enseñó todo que necesitaba saber de BLEE, y me apoyó en todo momento, mil gracias de corazón porque sin ustedes no lo hubiese logrado.

Imposible dejar pasar a los chicos del Laboratorio, sobre todo Laynet, Adriana, Amarys, Yuliana y Giovanni, a los que siempre podía encontrar y resolver mis dudas, gracias por su ayuda, por su paciencia, por su apoyo, a ustedes y al resto de los chicos mil gracias por los tips que me dieron, gracias a todo eso esto se acabó así de rápido jejeje.

Todo este trabajo está dedicado a los que ya no están conmigo y que se que estarían orgullosos y complacidos de compartir este triunfo, al fin lo logré y mi fuerza siempre vino de ustedes y por ustedes.

RESUMEN

Las infecciones de tracto urinario (ITU) son un problema de Salud Pública que afecta a gran parte del mundo, no sólo por su incidencia, sino por la rápida diseminación de genes de resistencias a los antibióticos que han surgido en los últimos tiempos en los microorganismos productores de este tipo de infecciones. Estas resistencias se adquieren por mutaciones o por ganancia horizontal de material genético, sobre todo, por el uso indiscriminado de antibióticos, lo cual genera la selección de microorganismos resistentes.

Las cepas productoras de BLEE, resistentes a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, son un claro ejemplo del problema al que nos estamos enfrentado actualmente, debido a que su presencia dificulta la aplicación de un tratamiento eficaz. Para estos casos se utilizan otros antibióticos con mayor espectro de acción como lo son las quinolonas, pero ahora se está observando un aumento en la selección de cepas resistentes a este grupo de antibióticos. La resistencia a las quinolonas aparece principalmente por mutaciones cromosomales, pero también se han reportado genes plasmídicos *qnr*, capaces de conferir resistencia contra estos antibióticos. En Venezuela, existe una frecuencia elevada de cepas de *E. coli* causantes de ITU multiresistentes a los antibióticos comúnmente empleados en su tratamiento, pero no se ha realizado, hasta el momento, la determinación de la incidencia de estos genes plasmídicos codificantes para resistencia a quinolonas, en cepas que concomitantemente expresen BLEEs.

Como un aporte para la vigilancia epidemiológica y el entendimiento de las causas para la prevalencia y la dispersión de estas cepas multiresistentes, en este trabajo se determinó la coexistencia de resistencia a BLEE y a quinolonas en cepas causante de ITU.

En este estudio se reportó que el 76,4% de las ITU en pacientes de consulta ambulatoria fueron causadas por *E. coli*, predominando en pacientes femeninos en un 79,2% de los aislados. Las cepas productoras de BLEE estuvieron representadas por el 3,5% de las cepas de *E. coli* aisladas de ITU, las cuales presentaban un perfil de multiresistencia a distintas familias de antibióticos, con una resistencia elevada a SXT (83,3%), CRO (75%), CTX (79,2%), CIP (87%), OFX (87%), NAL (91,7%), TOB (62,5%), ATM (56,5%), seguidos de GN (34,8%), FOX (21,7%), CAZ (20,8%), AMC (17,4%), mientras que para IMP y AN no se obtuvieron cepas resistentes, constituyendo estos últimos antibióticos la mejor opción terapéutica para estos pacientes en particular.

Se obtuvo predominancia del gen *bla*_{CTX-M} (87,5%) en los aislados seguido del gen *bla*_{TEM} (25%) y del gen *bla*_{SHV} (12,5%), particularmente las cepas positivas para el gen *bla*_{TEM} también estaban asociadas al gen *bla*_{CTX-M}. Además se determinó la presencia de los genes *qnrB* y *qnrS* en 20,8% y 16,7% respectivamente. No fue detectada la presencia de los determinantes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* y *qepA* en las cepas evaluadas. La incidencia de genes *bla* y *qnr* en una misma cepa fue encontrada en 33,3% de los aislados y fue asociada principalmente a los genes *bla*_{CTX-M} y se encontraron en menor proporción en cepas que portaban los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}.

Esta investigación permitió detectar la incidencia de *qnr* en la comunidad, indicando la diseminación de este mecanismo de resistencia fuera de ambientes hospitalarios, representando un serio problema al considerar que las ITU afectan a gran parte de la población y la expresión concomitante de genes *bla* y *qnr* dificulta las opciones terapéuticas, ya que la transferencia horizontal de estos genes de resistencia es muy probable.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	v
Listado de abreviaturas	ix
1. Introducción	1
1.1. Infección de Tracto Urinario (ITU)	1
1.2. <i>E. coli</i> como agente causante de ITU	2
1.3. Tratamiento para las ITU	3
1.3.1 Betalactámicos	3
1.3.2 Quinolonas	6
1.4. Resistencia producto del tratamiento	8
1.5. Tipos de resistencia a β -lactámicos	11
1.5.1. Mecanismo de acción de las β -lactamasas	11
1.5.2. Clasificación de las β -lactamasas	13
1.6. Tipos de resistencias a quinolonas	15
1.6.1. Mecanismo de acción de la proteína Qnr	18
1.6.2. Clasificación de los genes <i>qnr</i>	20
2. Antecedentes	22
2.1. Internacionales	22
2.2. Nacionales	26
2.3. Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (IBE)	27
3. Justificación	32
4. Objetivos	34
4.1. Objetivo general	34
4.2. Objetivos específicos	34

5. Materiales y Métodos	35
5.1. Cepas bacterianas	35
5.2. Identificación de cepas de <i>E. coli</i>	35
5.3. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos e identificación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	38
5.4. Aislamiento de ADN	41
5.5. Detección molecular de β -lactamasas de espectro extendido mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
5.6. Detección molecular de genes <i>qnr</i> mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
5.7. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	50
6. Plan de trabajo y cronograma	51
7. Resultados	52
7.1. Identificación de cepas BLEE	52
7.2. Perfil de resistencia	54
7.3. Confirmación de presencia del ADN molde	56
7.4. Incidencia de genes <i>bla</i>	58
7.5. Incidencia de genes <i>qnr</i> y <i>qepA</i>	63
7.6. Co-existencia de genes <i>bla</i> y <i>qnr</i>	72
8. Discusión	73
9. Conclusiones	82
10. Recomendaciones	83
11. Bibliografía	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Infecciones del tracto urinario en el adulto, patógenos y terapias	4
Tabla 2. Clasificación de Bush-Jacob-Medeiros junto con la clasificación molecular de Ambler	14
Tabla 3. Designación propuesta para los alelos de <i>qnr</i> .	21
Tabla 4. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>E.coli</i> en el período 1995-2004	26
Tabla 5. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E.coli</i>	29
Tabla 6. Características generales de <i>E.coli</i>	38
Tabla 7. Diámetro de la zona de Inhibición de crecimiento para la familia <i>Enterobacteriaceae</i> para la determinación del perfil de resistencia a antibióticos	39
Tabla 8. Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes tipo <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i>	42
Tabla 9. Condiciones de los ciclos de la PCR, para los iniciadores de los genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i>	42
Tabla 10. Controles positivos y negativos para el PCR de los genes tipo <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i>	44
Tabla 11. Condiciones de los ciclos de la PCR, para los iniciadores de los genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrC</i> y <i>qnrD</i>	45
Tabla 12. Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes tipo <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrC</i> y <i>qnrD</i>	45
Tabla 13. Características de los iniciadores para la amplificación del gen <i>16S rRNA</i> .	49
Tabla 14. Condiciones del programa para la PCR con el iniciador <i>16S rRNA</i> .	49
Tabla 15. Perfil de resistencia	54
Tabla 16. Porcentaje de resistencia a los diferentes antibióticos utilizados.	56
Tabla 17. Incidencia de genes <i>bla</i>	63
Tabla 18. Presencia de genes <i>bla</i> , <i>qnr</i> y <i>qepA</i>	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores de virulencia.	3
Figura 2. Mecanismo de acción de las quinolonas	7
Figura 3. Evolución del consumo extrahospitalario de fluoroquinolonas y de la resistencia a ciprofloxacina en <i>Escherichia coli</i> en España	9
Figura 4. Evolución del consumo extrahospitalario de las fluoroquinolonas levofloxacina y moxifloxacina y de la resistencia a ciprofloxacina en <i>Streptococcus pneumoniae</i> en España	9
Figura 5. Principales mecanismo de resistencia a los β -lactámicos	11
Figura 6. Esquematización de Funcionamiento de las β -lactamasas	12
Figura 7. Principales mecanismos de resistencia a quinolonas	16
Figura 8. Modelo de interacción de la proteína MfpA de la familia de pentapéptidos repetidos con la ADN girasa	19
Figura 9. Distribución global de qnr	25
Figura 10. Método de doble difusión de disco	39
Figura 11. Ampliación del halo de inhibición frente a AMC	40
Figura 12. Confirmación de presencia de BLEE	40
Figura 13: Sitios de hibridación de los iniciadores SHV-F y SHV-R de <i>bla_{SHV}</i>	42
Figura 14: Sitios de hibridación de los iniciadores TEM-F y TEM-R de <i>bla_{TEM}</i>	43
Figura 15. Sitios de hibridación de los iniciadores CTX-M-F y CTX-M-R del gen <i>bla_{CTX-M}</i>	43
Figura 16. Sitios de hibridación de los iniciadores QP1 y QP2 en el gen <i>qnrA</i> .	45
Figura 17. Sitios de hibridación de los iniciadores QNRBF y QNRBR en el gen <i>qnrB</i>	46
Figura 18. Sitios de hibridación de los iniciadores S1 y S2 en el gen <i>qnrS</i>	46

Figura 19. Sitios de hibridación de los iniciadores QNRC-F y QNRC-R en el gen <i>qnrC</i>	47
Figura 20. Sitios de hibridación de los iniciadores QNRD-F y QNRD-R en el gen <i>qnrD</i>	47
Figura 21. Sitios de hibridación de los iniciadores QEPA-F y QEPA-R en el gen <i>qepA</i>	48
Figura 22. Urocultivo de muestra con ITU	52
Figura 23. Fotografía de la Tinción Gram.	53
Figura 24. Detección fenotípica de BLEE	53
Figura 25. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>16S rRNA</i>	57
Figura 26. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>16S rRNA</i>	57
Figura 27. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>16S rRNA</i>	58
Figura 28. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla_{SHV}</i>	59
Figura 29. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla_{SHV}</i>	59
Figura 30. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla_{SHV}</i>	60
Figura 31. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla_{TEM}</i>	60
Figura 32. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla_{TEM}</i>	61

Figura 33. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla</i> _{CTX-M}	62
Figura 34. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>bla</i> _{CTX-M}	62
Figura 35. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrA</i>	64
Figura 36. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrA</i>	64
Figura 37. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrB</i>	65
Figura 38. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrB</i>	65
Figura 39. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrS</i>	66
Figura 40. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrS</i>	66
Figura 41. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrC</i>	67
Figura 42. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrC</i>	68
Figura 43. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrC</i>	68
Figura 44. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrD</i>	69
Figura 45. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrD</i>	69

Figura 46. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qnrD</i>	70
Figura 47. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qepA</i>	71
Figura 48. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen <i>qepA</i>	71

LISTADO DE ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina/ Ácido Clavulánico
AMP	Ampicilina
AMX	Amoxicilina
AN	Amikacina
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
CAZ	Ceftazidima
CEP	Cefalotina
CIP	Ciprofloxacina
CMDLT	Centro Médico Docente La Trinidad
CPD	Cefpodoxima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina-5'-trifosfato
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ERT	Ertapenemen
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
GN	Gentamicina
HUC	Hospital Universitario de Caracas
IMP	Imipinem
ITU	Infección de tracto urinario
LB	Luria-Bertani
LBPB	Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos
LOM	Lomefloxacina
LVX	Levofloxacina
NAL	Ácido Nalidixico
NCBI	GenBank del National Center for Biotechnology Information
NIT	Nitrofurantoina
NOR	Norfloxacina
CHL	Cloranfenicol

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
OFX	Ofloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA	Oxaciclina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBP	Proteínas fijadoras de Penicilinas
PIP	Piperaciclina
<i>qnr</i>	Gen que codifica resistencia a quinolonas
QNR	Proteína de resistencia a quinolonas
rRNA	RNA ribosomal
SAM	Ampicilina-sulbactam
SXT	Trimetroprim-Sulfametoxazole
TBE	Tris-Borate-EDTA
TIC	Ticarclina
TIG	Tigeciclina
TOB	Tobramicina
UCV	Universidad Central de Venezuela
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Infección de Tracto Urinario (ITU)

La infección urinaria se presenta cuando ocurre una agresión microbiana al parénquima del tracto urinario e invasión de los tejidos adyacentes, la cual podemos detectar al encontrar microorganismos patógenos en la orina, la uretra, la vejiga, el riñón o la próstata (Motter, 2002). En la orina pueden encontrarse bacterias sin que exista ITU, debido a contaminación producida al pasar la orina por la uretra, por contacto de la orina con los genitales externos, o por multiplicación de un bajo número de bacterias existente en la orina (De la Rosa, 2004).

Sin embargo, la vía urinaria es estéril desde el glomérulo hasta el tercio medio de la uretra, teniendo así que las bacterias pueden invadir el tracto urinario por la ruta ascendente. Este es el principal mecanismo de infección, el cual fue demostrado por primera vez por el médico chileno Ennio Vivaldi, el cual indica que el punto de partida es la flora perineal, vaginal y uretral residente, desde donde los microorganismos migran hacia las porciones más proximales de la uretra, vejiga y uréteres (Guzmán y Valdivieso, 1997). En la mujer, la mayor frecuencia de ITU se debe principalmente al hecho de que la uretra femenina es más corta y anatómicamente vecina del área vulvar y perineal. La puerta de entrada más frecuente para originar bacteremias (pielonefritis) con posible aparición de metástasis sépticas, es la vía urinaria (García, 1998).

Clásicamente la infección urinaria ha sido clasificada en alta (pielonefritis) o baja (cistitis, uretritis). Sin embargo, hay que tomar en consideración que a menor edad hay mayor dificultad para lograr esta diferenciación. Por otro lado, la infección urinaria también se puede dividir en infección complicada y no complicada, dependiendo si existe o no, integridad del tracto urinario. (Córdova y col., 2000).

Las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad ocurren en cuatro grupos de riesgo: adolescentes en edad escolar, mujeres jóvenes sexualmente activas, hombres con obstrucción prostática y ancianos. Sin embargo, el riesgo de desarrollar ITU puede aumentar por la presencia de

condiciones tales como: anormalidades del tracto urinario (adquiridas o congénitas), embarazo, tumores e instrumentación de las vías urinarias (Galue y col., 2000).

1.2. *E. coli* como agente causante de ITU

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, catalasa-positivo y oxidasa-negativo, que fermenta la glucosa y la lactosa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra como parte de la microflora intestinal. La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, no obstante, pueden transformarse en patógenos fuera del intestino e invadir cualquier órgano o tejido, pero sobre todo, las vías urinarias, colonizando el introito vaginal, la región periuretral y uretral antes de causar infección en la vejiga (Galue y col., 2000).

E. coli origina aproximadamente el 80% de las infecciones agudas en personas sin riesgo (Zuliaca y col., 2002). Otros microorganismos, como *Proteus spp*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* o levaduras se comportan como agentes habituales de las vías urinarias (Andreu y Pigrau, 2003). Sin embargo, sólo algunos serotipos de *E. coli*, denominados uropatógenos, causan la mayoría de las infecciones. Estos serotipos tienen algunos factores de virulencia específicos (Figura 1), tales como los antígenos O y las fimbrias presentes en la superficie de la bacteria. Estos factores le confieren mayor adherencia al epitelio vaginal y a la vía urinaria, y con la movilidad propia le facilitan su ascenso por la uretra, y la producción de hemolisina, facilitando la invasión tisular, y una mayor producción de antígenos K capsular, los cuales dificultan o impiden la fagocitosis por los neutrófilos, inhibiendo la activación de la vía alternativa del complemento, que es necesaria para la opsonización en ausencia de anticuerpos específicos (Guzmán y Valdivieso, 1997; Aguado y Lumbreras, 1998; García, 1998; Galue y col., 2000).

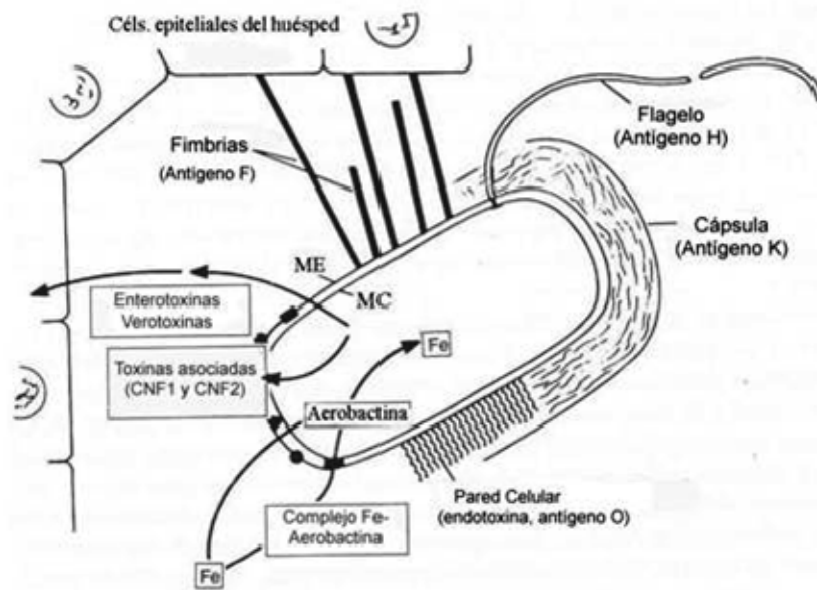


Figura 1. Principales factores de virulencia. Se describen e indica la ubicación específica de los factores de virulencia en una célula de *E.coli*. Tomado de: www.usc.es/ecoli/E.coli2_archivos/image002.jpg

1.3. Tratamiento para las ITU

Dentro de la gran variedad de agentes antimicrobianos disponibles para el tratamiento de las ITU encontramos trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP), amoxicilina (AMX), nitrofurantoína (NIT), entre otros (Tabla 1). Sin embargo, la indicación de su uso varía con el perfil de sensibilidad, motivo por el cual la utilidad de ampicilina (AMP) o SXT en ciertos lugares se invalida por los altos niveles de resistencia (Fogolin y col., 2008).

1.3.1. Betalactámicos

Entre los antibióticos utilizados para el tratamiento de las ITU se encuentran los betalactámicos, los cuales se definen químicamente por la presencia de un anillo betalactámico. Estos antibióticos interfieren en la síntesis de la pared celular del microorganismo, debido a que se unen a las PBPs (Proteínas Fijadoras de Penicilinas- *Penicillin Binding Proteins*), inhibiendo la acción de las mismas, que se encuentran situadas en la cara externa de la membrana bacteriana y, cuya función es llevar a cabo la transpeptidación de los polímeros de mureína (Cabrera, 2008).

Tabla 1. Infecciones del tracto urinario en el adulto, patógenos y terapias.

Categoría	Criterio diagnóstico	Patógenos principales	Terapia de primera línea	Comentarios
• Cistitis aguda no complicada	Análisis de orina con piuria y hematuria	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Otros	Nitrofurantoina Cefalosporinas de 1ª generación TMP-SMX DS Ciprofloxacina Norfloxacina Amoxicilina/ácido clavulánico	Tres días de terapia Quinolonas pueden ser usadas en áreas donde hay resistencia o en pacientes que no toleran el TMP-SMX
• Cistitis recurrente en mujer joven	Presencia de síntomas y urocultivo: > 100 UFC/ mL	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Otros	Ciprofloxacina Norfloxacina	Repetir la terapia, por 7 a 10 días, basada en el resultado del cultivo. Usar profilaxis.
• Cistitis aguda en hombre joven	Urocultivo con un conteo de 1 000 a 10 000 UFC/mL	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Otros	Nitrofurantoina Cefalexina Cefadroxilo TMP-SMX DS Ciprofloxacina Norfloxacina	Terapia por 7 a 10 días
• Pielonefritis aguda no complicada	Urocultivo con un conteo de 100 000 UFC/mL	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Otros	Para gramnegativo: fluoroquinolona Para grampositiva: amoxicilina Si la vía parenteral es necesaria: cefalosporina o fluoroquinolona Gentamicina, amikacina En caso de <i>Enterococcus</i> sp: amoxicilina con o sin gentamicina. Si es resistente usar linezolid	Iniciar con EV, luego pasar a vía oral Terapia de 14 días a 1 mes.
• ITU complicada	Urocultivo: > 10 000 UFC/mL	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Enterococcus</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Otros	Para gramnegativo: fluoroquinolona Si la vía parenteral es necesaria: cefalosporinas antipseudomonas y/o una fluoroquinolona y/o gentamicina, amikacina En caso de <i>Enterococcus</i> sp: amoxicilina con o sin gentamicina. Si es resistente usar linezolid	Terapia por 10 a 14 días
• Bacteriuria asintomática en el embarazo	Urocultivo: > 10 000 UFC/mL	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Otros	Amoxicilina Nitrofurantoina Cefalexina Aztreonam Evitar tetraciclinas y fluoroquinolonas	Terapia por 3 a 7 días
• ITU asociada a catéter	Síntomas y urocultivo > 100 UFC/mL	Depende del tiempo de cateterización	Para gramnegativo: fluoroquinolona Para grampositiva: usar amoxicilina más gentamicina	Si es posible, remover el catéter o cambiarlo. Tratar por 10 días. En uso de catéter de larga data y síntomas, tratar por 5 a 7 días

TMP-SMX= trimetoprima-sulfametoxazol. UFC= unidad formadora de colonias. EV= endovenoso.
Tomado de: <http://www.scielo.org.pe/img/revistas/amp/v23n1/a06tab04a.jpg>

De esta familia de antibióticos se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams, que pueden ser utilizados en combinación con inhibidores de las betalactamasas (enzimas capaces de hidrolizar los betalactámicos). Su espectro de acción y propiedades farmacocinéticas se indica a continuación (Esparza, 2007):

- Penicilinas: presentan actividad frente a microorganismos no productores de β -lactamasa, Gram positivos, algunos fastidiosos y bacterias Gram negativas. Las acilamina penicilinas, AMP y AMX, tienen actividad específica contra más especies de Gram negativos, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae* no productoras de β -lactamasa. Las Carboxi- penicilinas, carbenicilina y ticarcilina (TIC), y ureido-penicilinas, mezlocilina y piperacilina (PIP) tienen un amplio y considerable espectro contra Gram negativos, incluyendo actividad contra *Pseudomonas spp.* Las Penicilinas penicilinasa-resistentes, cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina y oxacilina (OXA), tienen un espectro predominantemente contra microorganismos Gram positivo, incluyendo *Staphylococcus spp.*, que es productor de penicilinas.
- Combinación de β -Lactámicos / Inhibidor de β -lactamasa. Este grupo está formado por una penicilina y un segundo agente que tiene una mínima actividad antibacteriana, pero funciona como un agente inhibidor de algunas β -lactamasas. Los inhibidores de β -Lactamasas en uso son ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.
- Cefemes (incluye Cefalosporinas). Estos compuestos pueden tener un espectro de actividad diferente contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Están clasificados en generaciones de cefalosporinas, según la extensión de su actividad contra la mayoría de bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos:
 - 1^a generación: cefadroxilo, cefalexina, cefradina, cefalotina (CEP), cefapirina, cefazolina.
 - 2^a generación: cefaclor, cefuroxima axetilo, cefprozilo, cefamandol, cefonicida, cefoxitina (FOX), cefuroxima.
 - 3^a generación: cefixima, cefpodoxima (CPD), proxetilo, ceftibuten, cefditoreno, cefminox, cefoperazona, cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), ceftizoxima, ceftriaxona (CRO).
 - 4^a generación: cefepima (FEP), cefpiroma.

- Carbapenems: presentan amplio espectro de actividad contra muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas, por ser mucho más resistentes a la hidrólisis por las enzimas β -lactamasas.
- Monobactams: estructuralmente muestran una significativa actividad sólo contra bacterias Gram negativas aeróbicas. Ejemplo: aztreonam (ATM).

1.3.2. Quinolonas

Las quinolonas representan otro grupo de los antibióticos recomendados para el tratamiento de la ITU. Se definen como compuestos sintéticos, derivados de la 1-8, naftiridina, sistema anular bicíclico y heterocíclico. Se demostró que los más convenientes como quimioterápicos son el ácido nalidíxico (NAL), el ácido oxolínico y el ácido piremídico, el ácido pipemídico y las nuevas quinolonas (Malgor y Valsecia, 2000).

Las quinolonas se han clasificado en generaciones, atendiendo a su espectro de actividad y a las propiedades farmacocinéticas (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Uberos, 2007):

- Quinolonas de primera generación: ácido nalidíxico, ácido oxolínico y cinoxacina, tienen un espectro limitado a bacilos Gram negativos y sólo se utilizan para infecciones de tracto urinario.
- Quinolonas de segunda generación: CIP, norfloxacin, lomefloxacin (LOM) y ofloxacin (OFX), son más activas frente a Gram negativos y ante algunos Gram positivos, pero no tienen actividad contra anaerobios.
- Quinolonas de tercera generación: esparfloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin y levofloxacin (LVX), tienen mejor actividad frente a Gram positivos y organismos fastidiosos.
- Quinolonas de cuarta generación: trovafloxacin, moxifloxacin y gemifloxacin, son muy activas frente a Gram positivos y tienen una buena actividad antianaerobia.

Las quinolonas pertenecientes a la segunda, tercera y cuarta generación son las llamadas nuevas fluroquinolonas, las cuales contienen un átomo de flúor y un anillo piperacínico en su estructura química con lo que se amplía su espectro de acción.

La actividad antimicrobiana de las quinolonas se basa en la inhibición de las Topoisomerasas tipo II o ADN-Girasa y las Topoisomerasas tipo IV. Ambas son enzimas tetraméricas compuestas por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la ADN-Girasa, y *parC* y *parE* en el caso de la Topoisomerasa IV. Las topoisomerasas se acoplan al ADN, provocan un pequeño corte en las hebras de ADN, lo superenrollan y posteriormente el corte es reparado, y quedan de nuevo libres. Las quinolonas, se unen al ADN cortado y a la Topoisomerasa, formando un complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa de forma irreversible, impidiendo que continúe el proceso de transcripción o replicación (Figura 2). Su acción en las topoisomerasas no explica por sí sola su potente actividad bacteriostática, sino que se debe a fenómenos secundarios mal conocidos, entre los que la activación del sistema de reparación de mutaciones SOS parece desempeñar un papel importante (Macero y col., 2005; Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

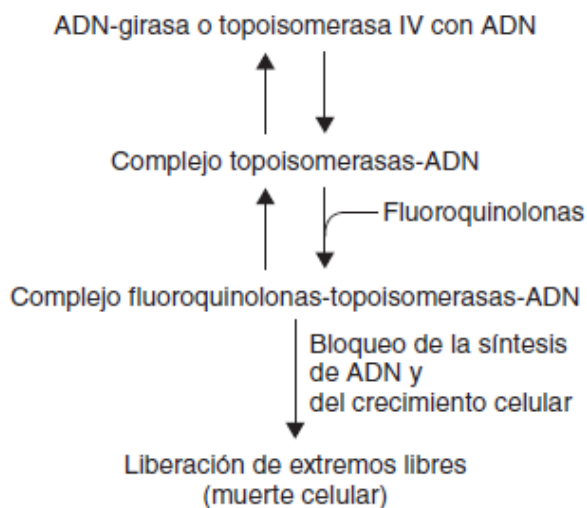


Figura 2. Mecanismo de acción de las quinolonas. Se describe la unión del ADN a las Topoisomerasas y luego de formado este complejo se unen las fluoroquinolonas impidiendo su separación, provocando así la muerte celular. Tomado de Rodríguez-Martínez, 2005.

1.4. Resistencia producto del tratamiento

En las infecciones urinarias, los antimicrobianos empleados se excretan total o parcialmente, según la droga, por la propia vía urinaria, por lo que, los niveles que se alcanzan en la orina vesical son muy elevados y superan con creces la concentración mínima necesaria para inhibir los microorganismos patógenos. Por lo tanto, el tratamiento de las infecciones urinarias bajas en mujeres, no debería ofrecer mayores dificultades.

Este es el caso de las cefalosporinas de primera generación y los β -lactámicos más inhibidores, cuya concentración en orina supera altamente la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de los microorganismos resistentes y por ende sería una buena opción de tratamiento pese a la resistencia (Fogolin y col., 2008). Debido a que *E. coli* viene mostrando una resistencia cada vez más creciente a la ampicilina, a la amoxicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones, estos agentes no deberían ser usados para el tratamiento empírico de la pielonefritis (infección urinaria alta) (Hooton y Stamm, 1997). En estos casos, el tratamiento más efectivo son fluoroquinolonas, porque son útiles tanto en la ITU complicada como en la no complicada; de estas las más usadas son CIP y NOR. Sin embargo, el uso de fluoroquinolonas como terapia de primera línea para el tratamiento de la ITU baja, no complicada, debería ser evitado, a excepción de los pacientes que no pueden tolerar sulfonamidas o trimetoprim.

El uso extenso y poco adecuado de los agentes antimicrobianos, tanto en la medicina humana como veterinaria, ha favorecido la emergencia y diseminación de cepas resistentes. Los porcentajes de resistencia se encuentran relacionados con determinadas especies bacterianas, condición clínica, origen de las cepas, localización geográfica, pautas establecidas en la utilización de los agentes antimicrobianos y factores epidemiológicos (Harris y col., 1999).

La relación causa-efecto entre el uso de antibióticos y la aparición de resistencias a los mismos, se basa en distintas líneas de evidencia. Aunque dicha relación es compleja y dependiente a su vez de múltiples factores, ha sido demostrada en numerosos estudios. En las figuras 3 y 4, se muestran los resultados de la asociación entre el uso de los antibióticos y la resistencia a los

mismos, en algunos patógenos bacterianos comunes, como *E. coli* y *Streptococcus pneumoniae* (Tomado de: www.antibioticos.msc.es).

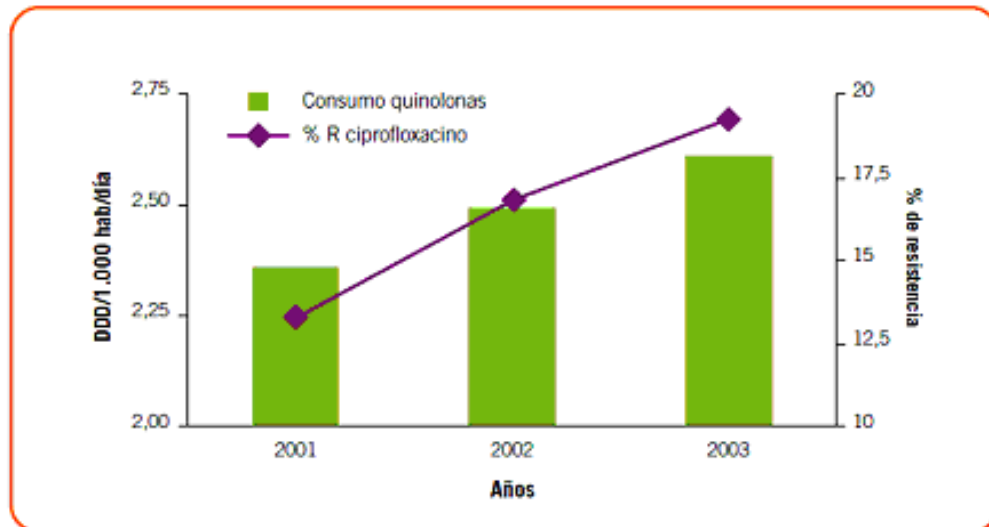


Figura 3. Evolución del consumo extrahospitalario de fluoroquinolonas y de la resistencia a ciprofloxacina en *Escherichia coli* en España, según las redes oficiales europeas de vigilancia del consumo (ESAC) y la resistencia (EARSS) a antibióticos. DDD: dosis diaria definida. Se observa un aumento en la resistencia a ciprofloxacina directamente proporcional al aumento en el consumo de las mismas. Tomado de <http://www.antibioticos.msc.es/PDF/antibioticos.pdf>

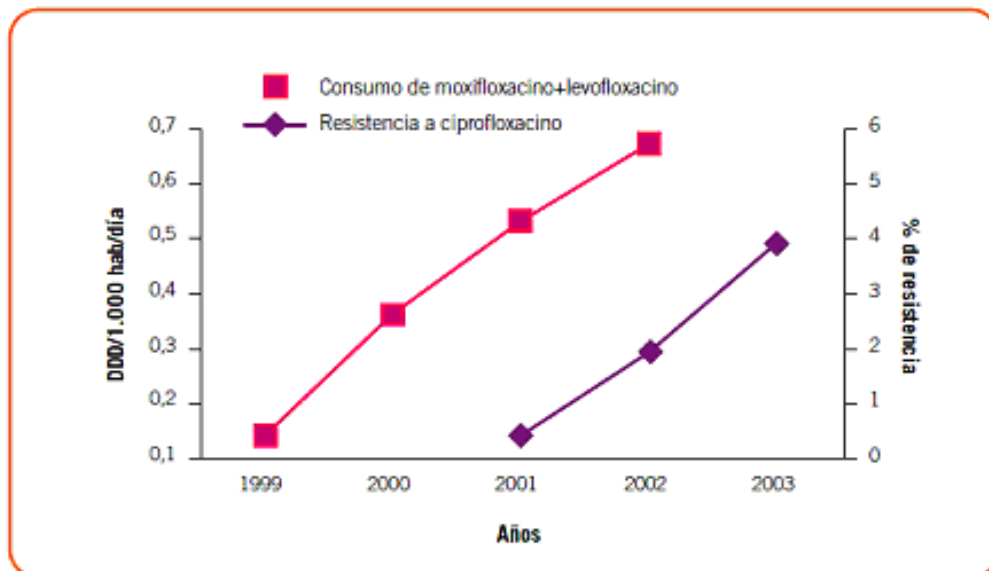


Figura 4. Evolución del consumo extrahospitalario de las fluoroquinolonas levofloxacina y moxifloxacina y de la resistencia a ciprofloxacina en *Streptococcus pneumoniae* en España, según las redes oficiales europeas de vigilancia del consumo (ESAC) y la resistencia (EARSS) a antibióticos. DDD: dosis diaria definida. Se observa un aumento en la resistencia a ciprofloxacina directamente proporcional al aumento en el consumo de otras fluoroquinolonas. Tomado de <http://www.antibioticos.msc.es/PDF/antibioticos.pdf>

Los mecanismos mediante los cuales las bacterias resisten la acción de un antibiótico son complejos, pero se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. Los generados como consecuencia de mutaciones espontáneas en genes constitutivos de las bacterias. Este mecanismo afecta preferentemente la acción de ciertos antibióticos: quinolonas, rifampicina, ácido fusídico, fosfomicina, antituberculosos y a veces cefalosporinas. Un buen ejemplo de ello es la resistencia al grupo de las fluoroquinolonas por mutaciones en los genes que codifican las Topoisomerasas (Bastida y col, 2003).

Este mecanismo de resistencia para las quinolonas como consecuencia de mutaciones en los genes de estas enzimas, se da específicamente en regiones denominadas QRDR (Macero y col., 2005). Así, la *E. coli*, resistente al ácido nalidíxico (NAL), es sin embargo habitualmente susceptible a la CIP. La resistencia a veces no se pone clínicamente de manifiesto, porque las concentraciones que se alcanzan con las nuevas quinolonas en los distintos fluidos corporales, es significativamente mayor a la CIM. La resistencia bacteriana, se ha encontrado con mayor frecuencia en *Pseudomona aeruginosa*, *Serratia marcescens*, y en Estafilococos (Malgor y Valsecia., 2000)

2. Los que se derivan de la adquisición de material genético por la vía horizontal y que le confiere a la bacteria alguna capacidad que le permite sobrevivir ante la presencia del antibiótico. Entre los antibióticos particularmente afectados por este mecanismo están los β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas; cloranfenicol, sulfamidas. La producción de β -lactamasas, capaces de destruir antibióticos β -lactámicos, mediada por genes presentes en plásmidos o transposones, es un ejemplo típico de este tipo de resistencia (Oteo y col, 2006).

Una vez adquirida, la resistencia puede diseminarse de dos formas; primero, la duplicación y dispersión de una misma cepa resistente. Segundo, la dispersión de los genes que la genera a través de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones, cuya transferencia puede producirse entre bacterias de la misma especie o de especies diferentes. Está demostrado que la administración de antibióticos favorece la selección de cepas resistentes, además de contribuir a la multiplicación de las bacterias con resistencia natural, al inhibir el crecimiento de la flora competitiva sensible.

1.5. Tipos de resistencia a β -lactámicos

La resistencia de las bacterias a las cefalosporinas, como a los demás antibióticos betalactámicos, se debe, en último término, a la imposibilidad de lograr su mecanismo de acción, es decir, su fijación a las PBP (Figura 5). Esto último puede ser debido a dificultades de penetración del antibiótico en la célula bacteriana (principalmente en el caso de los bacilos Gram negativos, por la barrera que puede suponer su membrana externa lipopolisacárida) o a la acción de diversas β -lactamasas que, escindiendo el anillo betalactámico, lo inactivan, pues pierde la capacidad de fijarse a las PBP (Gudiol y Fernández, 2000).

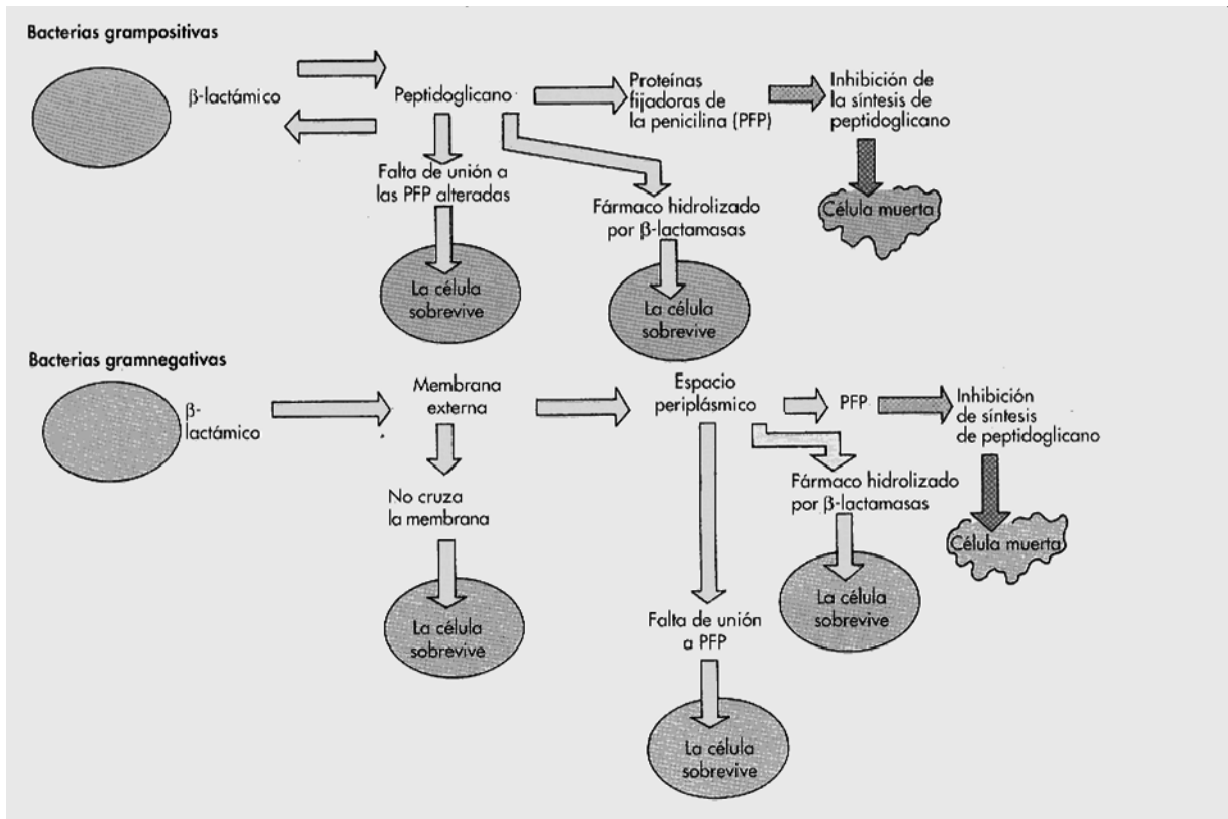


Figura 5. Principales mecanismo de resistencia a los β -lactámicos. Se describen los mecanismos de resistencia a β -lactámicos en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Tomado de: <http://www.monografias.com/trabajos11/resanti/Image78.gif>

1.5.1. Mecanismo de acción de las β -lactamasas

Las β -lactamasas son proteínas globulares que presentan una masa 100 veces superior a su substrato. En consecuencia, una vez que el antibiótico ingresa al sitio activo, son muchas las

interacciones químicas que se producen con las moléculas de β -lactamasas. Estas enzimas destruyen por hidrólisis, penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes.

La mayoría de estas enzimas actúan a través de la formación de un complejo acilpenicilina (merced a la presencia de una serina en la posición 70) que se hidroliza rápidamente, regenerando la enzima (Figura 6). Las β -lactamasas ejercen un efecto de “tensión” sobre el grupo carboxilo, que tiende a romper el grupo amida del anillo betalactámico. La íntima proximidad que se genera entre el grupo hidroxilo de la serina 70 y el grupo amida del anillo culmina la acción, generando la hidrólisis del betalactámico. Por último, la presencia de una molécula de agua en el sitio activo de estas enzimas produce la liberación del antibiótico (deacilación), devolviendo la actividad enzimática (Vignoli y Seija, 2008).

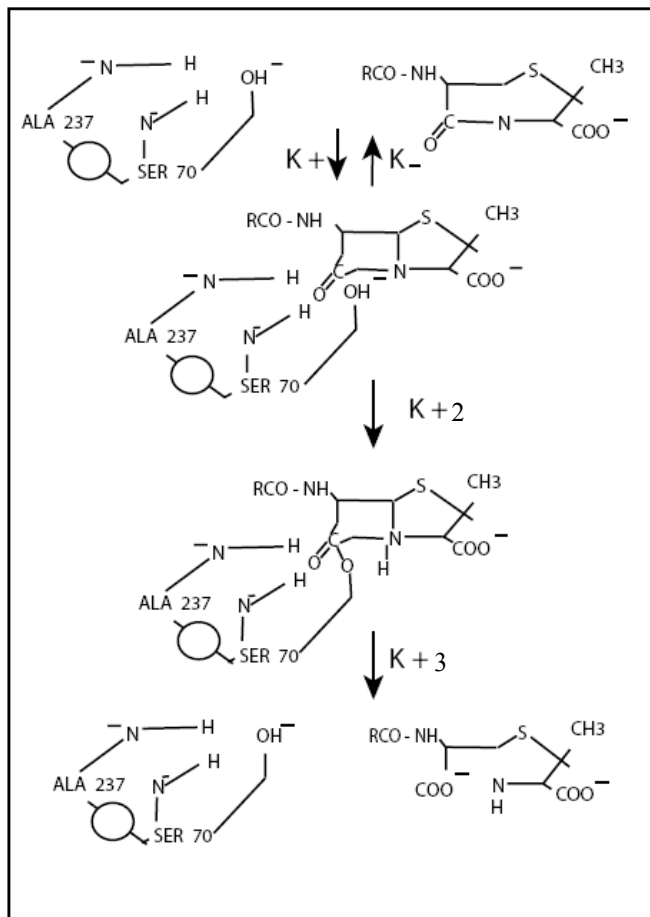


Figura 6. Esquemización de Funcionamiento de las β -lactamasas. Se describe la interacción β -lactamasa- β -lactámico. La enzima está representada por los extremos amino de la alanina 237 y la serina 70, así como el grupo hidroxilo de esta última. La primera interacción ES está gobernada por un valor constante representado por $K+1/K-1$. Una vez que se produce la acilación representado por $K+2$ la reacción es irreversible. Cuando la enzima es activa sobre el sustrato, la reacción culmina con la deacilación ($K+3$), con la consiguiente liberación del antibiótico hidrolizado y la recuperación de la enzima en su estado original. Sin embargo cuando la enzima no es capaz de hidrolizar al sustrato, la reacción se detiene a este nivel, produciéndose la inactivación de la misma. Esto es lo que ocurre con los inhibidores del tipo del Sulbactam o ácido clavulánico. Tomado de Vignoli y Seija, 2008.

Las β -lactamasas están codificadas por genes localizados en el cromosoma, plásmidos, transposones y se pueden producir de manera constitutiva o inducible. Las β -lactamasas codificadas por plásmidos por lo general son producidas de forma constitutiva, y las codificadas cromosomalmente también son producidas constitutivamente y pueden ser inducibles.

1.5.2. Clasificación de las β -lactamasas

Existen varios modelos de clasificación para éstas de acuerdo con su espectro de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores, ubicación en genes (plásmido o cromosoma) y, secuencia de genes o de proteínas.

La clasificación de Bush se basa en los sustratos que la β -lactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA y ATM u OXA. Este modelo funcional de clasificación de las β -lactamasas, define 4 grupos principales que incluyen los grupos determinados por Ambler en base a su estructura molecular (Tabla 2) (Bush y col., 1995).

Las enzimas β -lactamasas de Espectro Ampliado (BLEA) son capaces de hidrolizar fundamentalmente penicilinas y cefalosporinas de primera generación, perteneciendo al grupo 2b que son inhibidas por ácido clavulánico según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, son predominantes en bacilos Gram negativos y generalmente están codificadas en plásmidos (Vignoli y Seija, 2008)

Las enzimas correspondientes a esta clase son las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, las dos primeras difieren entre sí por una sustitución de un solo aminoácido. Esto causa un cambio en el punto isoeléctrico de la proteína, pero no se producen cambios en el perfil del sustrato hidrolizable. La TEM-1 fue el primer reporte de este tipo de enzimas, en el año 1965, y fue identificada en una cepa de *E.coli* aislada de un cultivo de sangre de un paciente griego llamado Temoneira. La β -lactamasa tipo SHV-1 (*Sulphydryl reagent variable*) es originaria del cromosoma de *K. pneumoniae* y ha sido frecuentemente localizada en plásmidos de *E.coli* y *K. pneumoniae*. Al igual que las enzimas tipo TEM este tipo de β -lactamasa ha sufrido mutaciones y generado diversas

variantes. En la actualidad se han descrito aproximadamente 150 variantes de β -lactamasas tipo TEM y 88 tipo SHV (Blanc, 2007).

Tabla 2. Clasificación de Bush-Jacob-Medeiros junto con la clasificación molecular de Ambler. Se describen las características de los grupos funcionales y su correspondencia entre ambas clasificaciones excepto por las penicilinasas que no fueron tomadas en cuenta en la clasificación de Ambler.

Grupo Funcional de Bush, Jacoby-Medeiros		Molecular de Ambler Tipo	Atributos de las Beta-Lactamasas en el Grupo Funcional
Grupo	Subgrupo		
1		C	AmpC beta-lactamasas en bacteria gram-negativa. Los genes a menudo son cromosómicos pero pueden ser plásmido-codificados. Confiere resistencia a todos los tipos de beta-lactámicos, excepto los carbapenemes (a menos que se combinen con cambios en porinas). No son inhibidas por el ácido clavulánico.
2		A, D	La mayoría de enzimas del Grupo 2 son inhibidas por el ácido clavulánico (a menos que se indique lo contrario).
	2a	A	Incluyen penicilinasas estafilocócica y enterocócica. Confiere alta resistencia a las penicilinas.
	2b	A	Beta-lactamasas de amplio espectro, incluyen TEM-1 y SHV-1, primordialmente de bacterias gram negativas.
	2be	A	Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) confieren resistencia a las penicilinas, oxyminocefalosporinas y monobactámicos.
	2br	A	Beta-lactamasas tipo TEM (IRT) y una tipo SHV que son resistentes a los inhibidores.
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la cloxacilina-(oxacilina)-; inhibidas moderadamente por el ácido clavulánico.
	2e	A	Cefalosporinasas.
	2f	A	Enzimas que hidrolizan los carbapenemes con serina en la zona activa.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo-beta-lactamasas que confieren resistencia a los carbapenemes y todos los tipos de beta-lactámicos excepto los monobactames. No inhibidas por el ácido clavulánico.
4		?	Penicilinasas misceláneas que no caben en otros grupos. No son inhibidas por el ácido clavulánico.

Tomado de: www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/02.pdf

La mayoría de las BLEE reportadas en la actualidad pertenecen a las familias de las β -lactamasas de tipo TEM y SHV (Hugo, 2006). A partir de mutaciones puntuales ocurridas en los genes que codifican las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, se originaron las BLEE, que presentan un espectro incrementado de actividad hidrolítica, contra las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y sobre ATM. En la literatura se encuentran descritas más de 200 enzimas tipo BLEE.

La diseminación de las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 se produjo como consecuencia directa de la presión selectiva ejercida por la introducción de la ampicilina, carbenicilina y las primeras cefalosporinas en los años 60. En 1969 se detectaron enzimas TEM en *Pseudomonas aeruginosa* y de 1973 a 1975 se encontraron en *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*. En 1983 se detectaron en Alemania los primeros aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Posterior a su análisis, se demostró que la resistencia era debida a la producción de una β -lactamasa plasmídica transferible, estas enzimas se denominaron β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ya que eran capaces de hidrolizar un buen número de antibióticos β -lactámicos (Torres y col., 2005).

A nivel mundial han aparecido otras familias de BLEE, como las tipo CTX-M, codificadas en megaplásmidos y frecuentemente reportadas en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. mirabilis*, entre otros. Los tipos CTX-M y PER tienen orígenes diferentes y una escasa relación estructural con las TEM y SHV (Torres y col., 2005).

1.6. Tipos de resistencias a quinolonas

La resistencia a las quinolonas en bacterias Gram negativas está causada fundamentalmente por mutaciones cromosómicas en los genes que codifican para las topoisomerasas II ó IV.

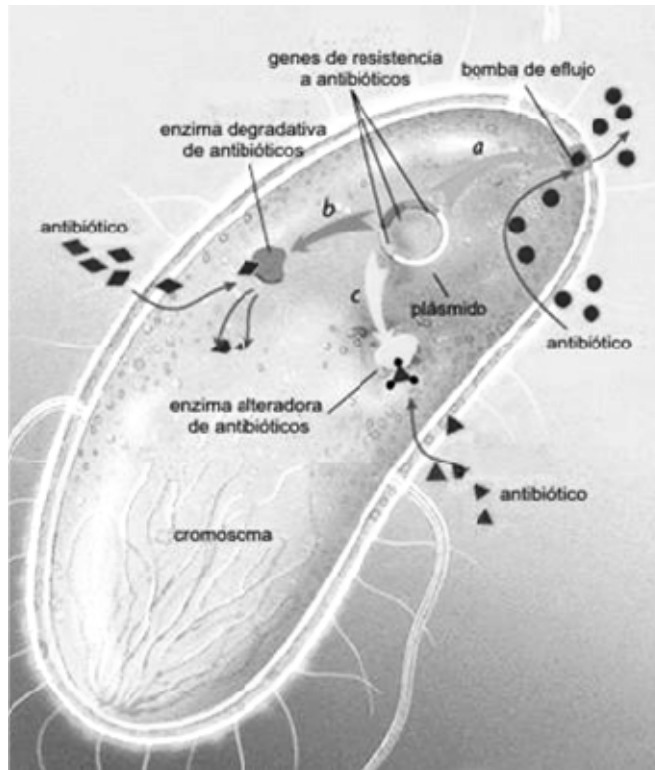


Figura 7. Principales mecanismos de resistencia a quinolonas. Se describen la presencia de genes de resistencia en un plásmido de *E.coli* y su mecanismo de acción sobre el antibiótico. a. las bombas de eflujo. b. hidrólisis del antibiótico. c. modificación de la diana
Tomado y modificado de: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Actualmente se han reportado 6 mecanismos principales de resistencias a las quinolonas (Figura 7):

1. En los organismos Gram negativos el blanco principal es la proteína GyrA y en Gram positivos es la proteína ParC. En los genes que las codifican se encuentran las mutaciones más frecuentes. En GyrA la región donde se detectan las mutaciones implicadas en el desarrollo de la resistencia a quinolonas se nombra con las siglas QRDR (*Quinolone Resistant Determining Region*), y comprende desde el codón 67 hasta el 106. Sin embargo se han descrito mutaciones fuera de esta región (Cabrera, 2008).
2. *E.coli* puede regular la permeabilidad de la membrana mediante las porinas OmpF y OmpC que forman canales de difusión pasiva. Este mecanismo depende del grado de hidrofobicidad de cada quinolona, ya que todas pueden penetrar al interior de las bacterias por las porinas, pero solo las más hidrofóbicas pueden atravesar la bicapa lipídica. Se ha

asociado un descenso en la expresión de la porina OmpF con un incremento de los niveles de resistencia a determinadas quinolonas (Jacoby, 2005).

3. Se han descrito 37 tipos de bombas de expulsión de quinolonas en *E.coli* junto con una mutación en el codón 83 de la QRDR GyrA, que en presencia de determinados inhibidores de las bombas de expulsión como la Phe-Arg- β -naftilamida, no puede producir resistencia a NAL por si misma (Cabrera, 2008).
4. En 1998 se describió en cepas clínicas de *K. pneumoniae* la existencia de un plásmido conjugativo que confiere resistencia a quinolonas incrementando la resistencia a NAL de 4 a 32 mg/l, y a CIP de 0,008 a 0,25 mg/l²³. El *locus* responsable de la resistencia a quinolonas en este plásmido se designó *qnr* (Quinolone Resistance). El gen *qnr* se ha localizado también formando parte de una estructura tipo integrón. La resistencia producida por este gen se basa en la producción de la proteína Qnr, que al unirse a la girasa, la protege de la acción de la quinolona, por lo que la actividad de la enzima no se ve afectada en presencia del antibiótico (Martínez-Martínez y col., 2003; Perozo-Mena y col., 2007).
5. En el año 2003 se describió por primera vez un incremento de la resistencia a quinolonas mediante una disminución en los niveles de expresión de la Topoisomerasa IV. Esta disminución de la expresión se asocia con la presencia de mutaciones en el promotor del gen que hacen reducir su nivel de transcripción (Cabrera, 2008). Niveles reducidos de ParE son compatibles con la supervivencia bacteriana, aunque debe suponer un costo sobre la velocidad de división celular. Parece que este fenómeno debe llevar asociado otros mecanismos compensatorios que no revierten el fenotipo de resistencia (Rodríguez-Martínez, 2005).
6. Se puede producir una inactivación enzimática de ciertas quinolonas. Se reporta que la variante “*cr*” del gen *aac(6’)-Ib*, que codifica para una aminoglucósidos acetiltransferasa, puede conferir susceptibilidad disminuida a CIP por N-acetilación de su grupo amino piperazinil (Park y col., 2006; Perichon y col., 2007).

La mayoría de los mecanismos descritos se producen por cambios en el cromosoma, pero la detección reciente del gen *qnr*, responsable de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, puede permitir la transferencia horizontal de la resistencia entre diferentes cepas.

1.6.1. Mecanismo de acción de la proteína Qnr

La proteína Qnr está formada por 230 aminoácidos aproximadamente y pertenece a la familia de los pentapéptidos repetidos, de la que hasta el momento se conocen más de 90 miembros. Esta familia se define por la presencia de repeticiones en tándem de motivos A(D/N)LXX, donde X es cualquier aminoácido. Estos dominios de pentapéptidos se han propuesto que están involucrados en interacciones proteína-proteína. Los microorganismos que producen microcina B17 también generan otros pentapéptidos repetidos (McbG) que protegen la ADN girasa de la acción de microcina y de algunas quinolonas.

La proteína MfpA se clonó del genoma de *Mycobacterium smegmatis* (*MtMfpA*) en base a estudios sobre bombas de expulsión activa que contribuyen a la resistencia a quinolonas. Los plásmidos artificiales que codifican MfpA, incrementan la resistencia a ciprofloxacina hasta 4 veces. La relación estructura-función de los miembros de esta familia y Qnr es difícil de establecer, entre otras razones porque el porcentaje de homología entre Qnr y McbG o MfpA es del 19,6% y 18,9%, respectivamente (Rodríguez-Martínez, 2005).

Se ha propuesto un modelo de interacción de la proteína MfpA con la ADN girasa que permite explicar el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas, para la familia de pentapéptidos repetidos (Figura 8). Este modelo sugiere que la proteína MfpA inhibe la girasa mediante la unión competitiva con el ADN, debido a su estructura tridimensional y su distribución de cargas eléctrica que se asemejan al ADN. La unión de MfpA a la girasa la protegería, en parte, de la acción de las quinolonas al minimizar las oportunidades de unión del complejo quinolona-ADN-girasa y, al mismo tiempo podría explicar el fenotipo de resistencia (Falco y Takiff, 2008). Esto podría retardar el efecto bactericida de las fluoroquinolonas y activar otros mecanismos de resistencia que le

permitan a las bacterias la expresión de bombas de eflujo o la aparición de mutaciones en los genes que codifican para la ADN girasa (Vetting y col., 2006).

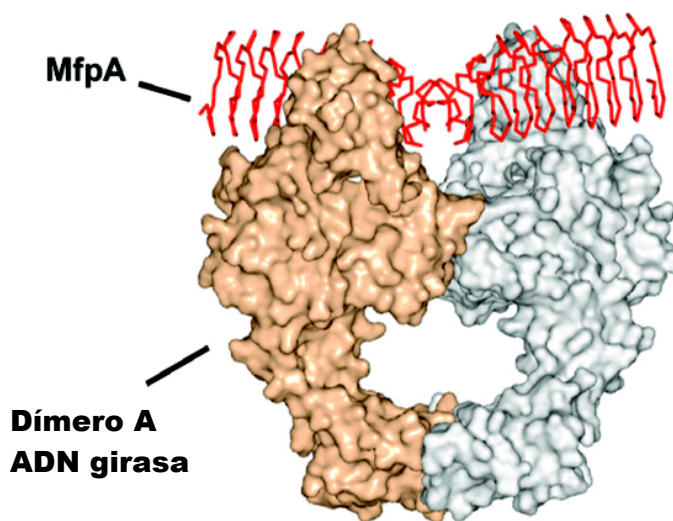


Figura 8. Modelo de interacción de la proteína MfpA de la familia de pentapéptidos repetidos con la ADN girasa. Se observa la inclusión de la proteína MfpA en el sitio blanco de la ADN girasa en lugar del ADN. Tomado y modificado de Vetting y col., 2006.

La proteína Qnr se purificó y se evaluó su interacción con las quinolonas y sus dianas (ADN-girasa y topoisomerasa IV) mediante estudios de movilidad electroforética. Se demostró que, al menos *in vitro*, Qnr protege a la ADN-girasa de *E. coli* de la inhibición por CIP. Esta protección es proporcional a la concentración de Qnr e inversamente proporcional a la concentración de CIP. La topoisomerasa IV, diana secundaria de las quinolonas en *E. coli*, parece también ser protegida de las quinolonas por Qnr (Tran y Jacoby, 2002).

Según el modelo, la formación del complejo Qnr-girasa ocurre antes del establecimiento del complejo de ruptura y por lo tanto, no depende de los cambios conformacionales inducidos por la unión del ATP a la enzima, el ADN o la CIP. Se ha propuesto que Qnr, al unirse a la enzima ADN girasa, altere la conformación de bolsillo donde se une el antibiótico a la enzima, motivo por el cual se minimizan las oportunidades de unión del complejo quinolona-ADN-girasa (Tran y col., 2005).

Recientemente se cristalizó la proteína QnrB4 y se reportó que esta proteína inhibe la actividad de la girasa de *E. coli* sólo en concentraciones más altas a 30 μ M. También se evaluó la actividad de la proteína MfpAMt en *M. tuberculosis* dando como resultado la inhibición de todas las

reacciones catalíticas de la girasa descritas para esta enzima (superenrollamiento, escisión y relajación), con una concentración inhibitoria del 50% a 2 μ M. Experimentos cruzados mostraron que MfpAMt también inhibió la función de la girasa de *E. coli*, mientras que QnrB4 no revirtió la inhibición de las quinolonas de la girasa de *M. tuberculosis*. Estos experimentos *in vitro* mostraron que MfpAMt y QnrB4 exhiben efectos opuestos en la ADN-girasa y que estos efectos se deben a la especificidad de las proteínas y de las especies (Mérens y col., 2009).

1.6.2. Clasificación de los genes *qnr*

En la familia *Enterobacteriaceae* se ha identificado tres grupos principales de genes *qnr* que confieren resistencia a quinolonas: el grupo *qnrA*, que incluye 6 variantes; el grupo *qnrB*, que incluye 19 variantes y el grupo *qnrS*, que incluye 3 variantes (Tabla 3). Entre las familias de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, las secuencias de nucleótidos difieren un 40% o más, mientras que dentro de cada familia la diferencia sólo es del 10%, y esta variación en la secuencia ha definido un creciente número de alelos. Para las familias *qnrA* y *qnrS*, el número de variantes se ha mantenido estable, mientras el número de secuencias de *qnrB* en el GenBank ha presentado una explosión, e incluso el mismo alelo *qnrB* se presenta con diferentes números de acceso (Jacoby y col., 2008).

En estudios más recientes se han descrito dos nuevos genes *qnr*, *qnrC* y *qnrD*, que codifican proteínas de la familia de pentapéptidos repetidos y confieren resistencia a fluoroquinolonas. Se ha reportado que el gen *qnrD* presenta similitud en su secuencia de aminoácidos de 48% con el gen *qnrA1*, 61% con el gen *qnrB1*, y 41% con el *qnrS1*, mientras *qnrC* presenta similitud en 64%, 42%, 59% y 43% con los genes *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*, y *qnrD*, respectivamente. (Cavaco y col., 2009; Wang y col., 2009).

Aunque las proteínas Qnr sólo producen un bajo nivel de resistencia, proporcionan una base favorable para un aumento de la resistencia a quinolonas, cuyo efecto podría ser letal si la agrupamos con cambios *a posteriori* en el ADN-Girasa y la topoisomerasa IV, Porinas, o sistemas de eflujo del antibiótico (Vasilaki y col., 2008).

Tabla 3. Designación propuesta para los alelos de *qnr*.

Allele	GenBank accession number		GenBank designation
	Nucleotide	Protein	
QnrA1	AY070235	AAAL60061	
QnrA2	AY675584	AAT79355	
QnrA3	DQ058661	AAZ04782	
QnrA4	DQ058662	AAZ04783	
QnrA5	DQ058663	AAZ04784	
QnrA6	DQ151889	AAZ78355	
QnrB1	DQ351241	ABC86904	
QnrB2	DQ351242	ABC86905	
QnrB3	DQ303920	ABC17629	
QnrB4	DQ303921	ABC17630	
QnrB5	DQ303919	ABC17628	
QnrB6	EF520349	ABP87778	
QnrB7	EU043311	ABW03156	
QnrB8	EU043312	ABW03157	
QnrB9	EF526508	ABP88094	QnrB8
QnrB10	DQ631414	ABG56269	
QnrB11	EF653270	ABS30107	QnrB9
QnrB12	AM774474	CAO82104	
QnrB13	EU273755	ABX72042	QnrB12
QnrB14	EU273757	ABX72044	
QnrB15	EU302865	ABX72227	
QnrB16	EU136183	ABV66096	QnrB11
QnrB17	AM919398	CAP45902	QnrB16
QnrB18	AM919399	CAP45903	QnrB17
QnrB19	EU432277	ACA28712	
QnrS1	AB187515	BAD88776	
QnrS2	DQ485530	ABF47470	
QnrS3	EU077611	ABU52984	

Tomado de Jacoby y col., 2008.

2. ANTECEDENTES

2.1 Internacional

Con frecuencia, la resistencia a los antibióticos se extiende a múltiples familias de los mismos, lo cual disminuye las opciones terapéuticas alternativas y aumenta las posibilidades de coselección. Se han realizado numerosos estudios sobre este tema, y a continuación se destacan sólo algunos de los más recientes y significativos.

La producción de β -lactamasas de espectro extendido coexiste con la resistencia a otros antibióticos que son codificados por plásmidos. Delgado y colaboradores, reportan esta asociación con cotrimoxazole (74%), gentamicina (GEN) (75%) y fluoroquinolonas (91-96%), en un estudio realizado en México. Los antibióticos CIP, CRO y amikacina (AN) fueron los antibióticos a los cuales las cepas bacterianas aisladas mostraron menor resistencia (Delgado y col., 2006).

En un estudio realizado en cepas de *E. coli* aisladas de orina de pacientes extrahospitalarios de España, se encontró que la resistencia global a ácido nalidíxico (NAL) es del 20-30% y a las fluoroquinolonas del 10-20%, habiéndose incrementado significativamente en los últimos años, no obstante, este porcentaje varía significativamente dependiendo del sexo, de la edad, de la historia previa de ITU, y del tipo de ITU (Alós, 2003). Otro estudio realizado en España en muestras provenientes igualmente de pacientes con ITU, comprobó la asociación entre la edad del paciente y la resistencia a CIP, en edades >65 años presentan mayores tasas de resistencia a CIP (29%) (Gobernado y col., 2007).

En EEUU y Canadá se realizó un estudio, durante el 2004-2005, con muestras de *E. coli* resistente a CIP provenientes de infecciones urinarias y se encontró resistencia a AMP en 79,8% de las cepas y a SXT de 66,5%. Sólo el 10,8% de las cepas fueron resistentes únicamente a CIP. Los autores concluyen que las cepas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias que son resistentes a fluoroquinolonas presentan patrones de multiresistencia (Karlowsky y col., 2006). Mientras, en un estudio más reciente realizado en México se encontró que también se ha incrementado progresivamente la resistencia de cepas de *E. coli* a CIP, comparando los valores de los

aislamientos entre el período 2002-2006, presentaron una diferencia del 51 %, lo que representó el incremento más significativo (Espinosa y col., 2008).

En un estudio realizado con 78 cepas de *E.coli* resistentes a CIP aisladas de Hospitales de Shangai, los investigadores reportaron que el 7,7% de las cepas de *E.coli* portaban el gen *qnr* (Wang y col., 2003). Posteriormente, en un hospital de Korea también se reportaron 2 cepas de *E.coli* portadoras de genes *qnr* de un total de 260 aislados colectados durante el periodo 2001-2003, este fue el primer reporte para este país de presencia de genes *qnr* (Jeong y col., 2005). En otro estudio, 113 cepas de *E. coli* resistentes a CIP fueron tomadas al azar de las colecciones de los laboratorio, de cuatro hospitales en Grecia entre los años 2006 y 2007. Los resultados reportados demostraron la presencia de los genes *qnr* en 10% del total de los aislados, identificando una predominancia de la variante *qnrS1* (Vasilaki y col., 2008).

Por otro lado, en un estudio realizado en Brasil con 144 aislados de *E.coli* provenientes de 17 Hospitales, recolectados entre el período 2002-2003, los autores reportaron sólo un aislado positivo para el gen *qnrA*, el cual se encontraba en un plásmido conjugativo de 41kb, siendo este el primer reporte de *qnrA* en Latinoamérica (Castanheira y col., 2007). Mientras, en un estudio de la prevalencia de *qnr* realizado en Bolivia y Perú se encontró *qnrB* (54%) y, en un nivel inferior, *qnrS* (14%), en aislados de Enterobacterias provenientes de 310 niños sanos, y estando *qnrB* presente principalmente en *E.coli* y *qnrS* en *K.pneumoniae* (Pallecchi y col., 2009).

En otro estudio de prevalencia de genes *qnr* fue realizado en Suecia, en 319 aislados clínicos de Enterobacterias productoras de BLEE. Se identificaron 12 cepas que llevaban genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) siendo poco frecuente en *E. coli* (6 / 288; 2,1%), pero al parecer más frecuentes en *K. pneumoniae* (4 / 25, 16%) y *E. cloacae* (2 / 3; 66,7%). Todos los aislados positivos para los genes *qnr* fueron resistentes a ácido nalidíxico y la susceptibilidad a diversas fluoroquinolonas fue variable. Su alto nivel de resistencia se asoció con múltiples sustituciones cromosómicas en *gyrA* y *parC*, y se observó en estos aislamientos alteraciones en los codones Ser-83 y Asp-87 en *gyrA* y en codones Ser-80 y Glu-84 en el *ParC* (Fang y col., 2009).

Se ha reportado que otro de los elementos de diseminación de genes de resistencia son los integrones, que pueden encontrarse en elementos conjugativos, cromosómicos o plasmídicos. Este tipo de elementos son los responsables de la reciente diseminación a nivel mundial de genes de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro como algunas cefotaximasas (*bla*_{CTXM-2}, *bla*_{CTXM-9}) y cefamicinasas (*bla*_{DHA-1}, *bla*_{CMY-9}, *bla*_{CMY-10}, *bla*_{CMY-11}) y la transferencia horizontal de la resistencia a quinolonas (*qnr*) (Coque-González, 2005; Lavigne y col., 2006).

Un estudio realizado en China determinó la prevalencia de los genes *qnr* en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, en un período de 1999-2005. Los autores reportaron que 7,8% de las cepas de *E. coli* y 0,6% de las cepas de *K. pneumoniae* presentaban los genes *qnrB2*, *qnrB4* y *qnrS1*. Determinaron los genes BLEE presentes en los aislados y detectaron genes tipo SHV-5, CTX-M-14, CTX-M-3, CMY-2, DHA-1 y la IMP-8 y su combinación con *qnr* la encontraron para el gen *bla*_{DHA-1} en *E. coli* y el gen *bla*_{SHV-5} en *K. pneumoniae*. Finalmente comprobaron la co-transferencia de los genes *bla*_{SHV-12}, *bla*_{DHA-1} y *bla*_{SHV-5} con *qnrB2*, *qnrB4* y *qnrS1*, respectivamente (Wu y col., 2008; Robiseck, 2006).

En un estudio realizado en Japón en aislados de *E. coli* y *K. oxytoca*, los autores encontraron 73 cepas productoras de BLEE y una *K. oxytoca* que producía metalo-betalactamasas (MBL). Obtuvieron 8 aislados positivos para CTX-M-9/SHV-12, de estos 6 poseían genes *qnr* y todos llevaban AAC (6)-Ib que confería resistencia a aminoglucósidos, y por último determinaron que la transferencia de la resistencia a los β-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas fueron co-transferidos con un plásmido de aproximadamente 140 kb (Ode y col., 2009).

En estudio realizado en Canadá con 34 cepas de *E. coli* aisladas de ITU con expresión de BLEE, de las cuales 27 cepas eran resistentes a CIP y 7 cepas presentaban un fenotipo multiresistentes, determinó que el genotipo de BLEE CTX-M-15 está fuertemente asociada con un fenotipo de multiresistencia, mientras el genotipo de BLEE CTX-M-14 está asociado sólo con la resistencia a fluoroquinolonas (Lagacé-Wiens y col., 2007; Song y col., 2009).

Un estudio realizado en Kenya, en cepas de *E.coli* aisladas de ITU de la comunidad durante los años 2004-2005, demostró en 17 cepas multiresistentes la presencia de mutaciones puntuales cromosomales, además de la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr2*. Los autores también reportaron que las cepas de *E.coli* productoras de BLEE contenían un plásmido de 42 kb que codifica la enzima CTX-M-15, mediadora de la hidrólisis de CTX, siendo este el primer reporte para esta región (Kariuki y col., 2007).

En Japón se ha descrito recientemente el gen *qepA*, el cual codifica para una proteína de expulsión de quinolonas (Yaname y col., 2007; Yaname y col., 2008; Perichon y col., 2007) y que puede ser transferido por plásmidos o formar parte de integrones. También se ha reportado la co-prevalencia del gen *qepA* gen con determinantes de *qnr* y BLEE (Liu y col., 2008; Cattoir y col., 2008)

En la Figura 9, se muestra que la distribución de los genes *qnr* a nivel mundial es realmente amplia.

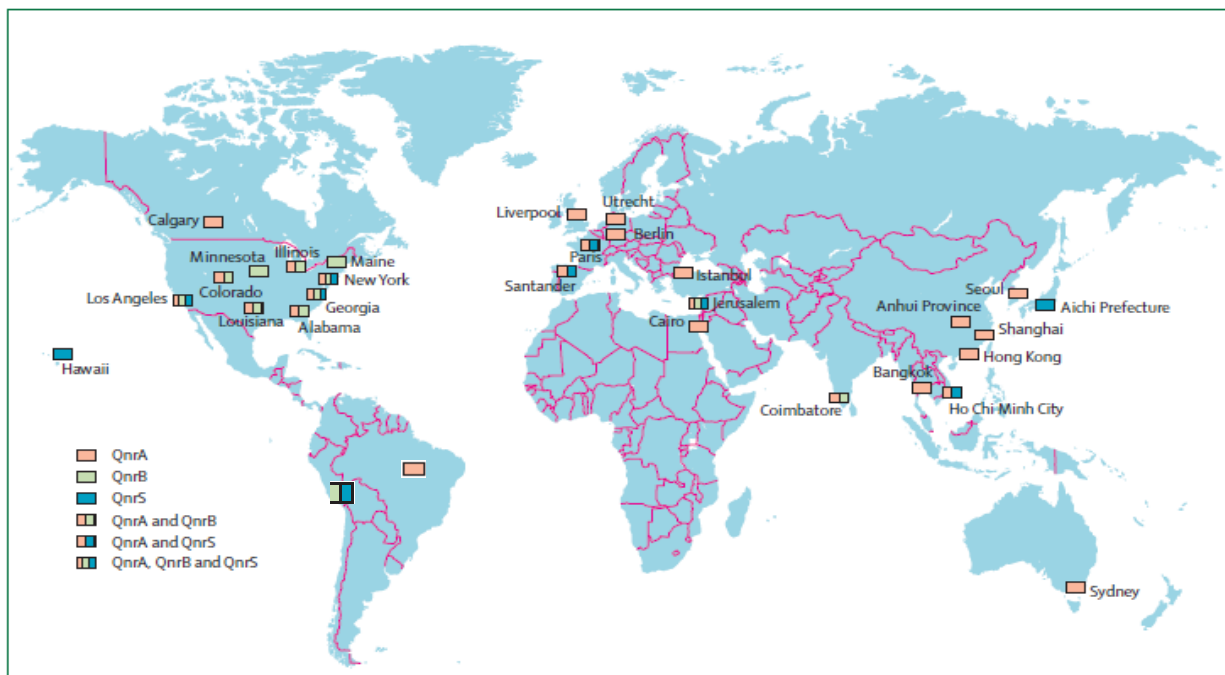


Figura 9. Distribución global de qnr. Se señalan los países con reportes de incidencia de los distintos tipos de genes *qnr*. Tomado y modificado de <http://infection.thelancet.com>

2.2 Nacional

A nivel internacional se han realizado numerosos trabajos para estudiar a los organismos causantes de ITU. En Venezuela estos estudios se refieren fundamentalmente a determinaciones epidemiológicas de la presencia de la bacteria causante de la infección y la resistencia asociada.

A partir de los urocultivos realizados en el Laboratorio Microbiológico del Este en Valencia, durante cinco años, se evaluaron 237 casos positivos para ITU encontrando que el microorganismo más frecuente fue *E. coli*, con 131 casos (55,3%) seguido por *P. aeruginosa* con 18 casos (7,6%). Mas del 25% de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a CIP, AMC y ampicilina-sulbactam (SAM) mientras que más del 50% fueron resistentes a AMP, SXT y a CEP. Sólo con gentamicina (GN) se observaron porcentajes bajos de resistencia (4,85%). Los otros Gram negativos entéricos presentaron también porcentajes elevados de resistencia a los mismos antibióticos, siendo más bajos para las quinolonas y la GN. Estos resultados presentan cifras alarmantes de resistencia en los últimos 5 años a los antibióticos de uso común en infecciones urinarias (Álvarez y col., 2005).

En un trabajo retrospectivo, descriptivo, realizado por Serrano y colaboradores en el 2005 en el Instituto de Biomedicina de la UCV, se presentaron los cambios en la resistencia de cepas de *E.coli*, aisladas de muestras de orina provenientes de pacientes ambulatorios, desde 1995 al 2004. De 112 muestras positivas, en 72 (64%) se aisló *E. coli*. Los porcentajes de resistencia agrupados por bienios se muestran en la Tabla 4, indicando un aumento en la resistencia a CIP, lo cual coincide con los reportes de otros autores a nivel internacional (Serrano y col., 2005).

Tabla 4. Resistencia antimicrobiana en cepas de *E.coli* en el período 1995-2004

Antibiótico	Porcentaje de Resistencia (%)				
	1995-1996	1997-1998	1999-2000	2001-2002	2003-2004
AMC	100	67	55	63	37
AN	0	11	20	21	8
CIP	25	30	38	41	36
CTX	25	29	33	0	17
NIT	0	0	29	21	0
SXT	75	33	82	46	33

AMC: amoxicilina clavulánico. AN: amikacina. CIP: ciprofloxacina. CTX: cefotaxima. NIT: nitrofurantoína. SXT: sulfametoxazol-trimetopim. Tomado de Serrano y col., 2006.

En un estudio realizado sobre la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos, los autores observaron que en el caso de los aminoglucósidos, las cepas de *K. pneumoniae* presentaron niveles de resistencia mucho más altos que las cepas de *E. coli*, por el contrario, las cepas de *E. coli* presentaron niveles de resistencia a quinolonas, mayores que las cepas de *K. pneumoniae* (Perozo-Mena y col., 2005).

Macero y colaboradores, determinaron la prevalencia de cepas de Enterobacterias que pudieran presentar una o más mutaciones en los genes de las topoisomerasas, mediante la interpretación de la lectura del antibiograma, en 150 cepas de Enterobacterias resistentes a NAL aisladas en el periodo 01/12/04 – 18/05/05. Del total, 11% de las cepas resultaron resistentes a NAL y sensibles a fluoroquinolonas, evidenciándose que es necesaria una segunda mutación para que estas enterobacterias adquieran una resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas. Entonces, es importante informar la presencia de estas cepas debido a que presentan mayor probabilidad de adquirir resistencia a fluoroquinolonas con el consiguiente riesgo de fracaso terapéutico (Macero y col., 2005).

Torres y colaboradores realizaron la detección fenotípica y molecular de BLEE a 224 aislados de enterobacterias provenientes de ocho Centros de Salud de Caracas. El 91,1% de las cepas analizadas fueron productoras de BLEE y los resultados del PCR confirmaron el predominio de SHV-BLEE (72%) y CTX-M-BLEE (21,1%) (Torres y col., 2006).

2.3 Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (IBE)

A nivel nacional el aumento creciente en la presencia y la diseminación de los determinantes de resistencia en cepas de bacterias Gram negativas multiresistentes a agentes antimicrobianos es de gran interés, por ello en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos se han venido realizando diferentes estudios para determinar la base molecular asociada a estas resistencias y se mencionan a continuación.

Alonso y colaboradores realizaron un estudio en el año 2001, para la caracterización de los plásmidos presentes en bacterias autóctonas, que habitan en ambientes naturales y en medios hospitalarios. Las cepas fueron aisladas de pacientes de diferentes áreas del del Hospital Universitario de Caracas (HUC) durante los años 1997 y 1998. Los resultados mostraron cepas con resistencias entre 13 a 14 antibióticos, llegando a casos extremos de resistencias a 17 antibióticos diferentes. Los autores demostraron la transferencia de los plásmidos por conjugación, lo cual confirió a las bacterias receptoras resistencia a varios de los antibióticos ensayados. El 37% de las cepas presentó más de un plásmido, indicando que ocurrió transferencia de más de una molécula plasmídica (Alonso y col., 2001).

En otro estudio, Alonso y colaboradores reportaron la presencia de integrones Clase 1 en aislados bacterianos venezolanos multiresistentes, encontrándose estas moléculas en bacterias procedentes de las distintas zonas del país estudiadas, lo que sugiere que estos elementos tienen una amplia distribución en Venezuela (Alonso y col., 2005).

Un estudio realizado por Hugo en el año 2006, evaluó la presencia β -lactamasas en cepas provenientes de los embalses de agua La Mariposa y Pao-Cachinche, como también de varios centros de salud del área metropolitana, reportando que el 95% de las cepas hospitalarias codifican enzimas β -lactamasas y sólo el 35% de las cepas de ambientes naturales. De éstas últimas, el 10% codifica genes bla_{SHV} y el 30% codifica genes bla_{TEM} y entre las cepas hospitalarias el 60% presentó los genes bla_{SHV} , el 75% genes bla_{TEM} y el 14% los genes bla_{CTX-M} , sugiriendo que los genes bla_{TEM} son predominantes en los ambientes clínicos del área metropolitana (Hugo, 2006).

En el año 2007, Redondo y Alonso, evaluaron 83 cepas multiresistentes, de las cuales 60 pertenecían a la especie *E. coli* y 23 a la especie *K. pneumoniae*, aisladas de pacientes hospitalizados en cuatro centros de salud del Área Metropolitana de Caracas, para determinar la presencia de plásmidos conjugativos y su relación con la adquisición, estabilización y diseminación de múltiples genes de resistencia. Los autores tuvieron como resultado la presencia de plásmidos conjugativos en el 67% de las cepas analizadas. Los perfiles de resistencia de las cepas

transconjugantes revelaron que se transfirieron determinantes de resistencia contra todas las familias de antibióticos analizadas, evidenciándose la contribución de los plásmidos al fenotipo de múltiple resistencia. Cabe resaltar que un 5% (2 cepas) de las cepas transconjugantes adquirieron determinantes de resistencia a CIP. La ganancia de genes plasmídicos *qnr* podría estar implicada en estos resultados, e indicar la emergencia y diseminación de este mecanismo de resistencia a quinolonas entre las cepas clínicas (Redondo y Alonso, 2007).

En un estudio realizado durante el período de noviembre-2006 a mayo-2007, se evaluó el perfil de resistencia en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE. Las muestras se recolectaron de pacientes de varios servicios del HUC, los porcentajes de resistencia de las cepas productoras de BLEE se muestran en la Tabla 4. Todas las cepas analizadas presentaron patrones de resistencia a más de 4 clases de antibióticos (Portale y col., 2007).

Tabla 5. Resistencia antimicrobiana en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*

Antibiotico	% de Resistencia
ATM	83
CAZ	74
CTX	65
FEP	41
IPM y ERT	0
TOB	69
GN	43
AN	33
CIP y LVX	50
SXT	54
CHL	56
TIG	28

AMC: amoxicilina clavulánico. CAZ: ceftazidima. FEP: cefepime. IMP: imipinemen. ERT: ertapenemen. TOB: tobamycin. GN: gentamicina. AN: amikacina. CIP: ciprofloxacina. LVX: levofloxacina. CTX: cefotaxima. SXT: sulfametoxazol-trimetropim. CHL: cloranfenicol. TIG: tigeciclina. Tomado de Portale y col., 2007.

Un estudio realizado por López sobre la incidencia y caracterización de los genes *qnr* plasmídicos en cepas bacterianas aisladas de Centros Hospitalarios de Caracas reveló que 22,6% de las cepas hospitalarias presentan algún gen *qnr*, y el 3,5% de las cepas ambulatorias y, particularmente las cepas de *E. coli* causantes de ITU provenientes del servicio ambulatorio del CMDLT no evidencian presencia de estos genes (López, 2007).

Redondo y colaboradores evaluaron en una cepa de *K. pneumoniae* aislada de un niño recluido en UTIP del Hospital Dr. Domingo Luciani y determinaron la presencia de plásmidos

conjugativos portadores de genes que codifican para las proteínas BLEE tipo CTX-M y las proteínas Qnr. Mediante los ensayos de conjugación y el análisis de los plásmidos se demostró la presencia de un plásmido conjugativo de 58 kb, portador de determinantes de resistencia a AMP, CEP, CAZ, CXT, AMK y NAL. En el plásmido se detectaron los genes *bla*_{CTX-M} y *qnrB*. Estos resultados constituyen el primer reporte a nivel nacional de un plásmido portador de genes de *bla*_{CTX-M} y *qnrB* y evidencian la alta probabilidad de diseminación de un plásmido que confiere resistencia frente a los principales antibióticos utilizados en el tratamiento de las infecciones nosocomiales (Redondo y col., 2007).

Posteriormente en otro estudio del mismo laboratorio, Angiolillo determinó el perfil de resistencia de *E.coli*, resistentes a SXT, al igual que la transferencia de moléculas plasmídicas capaces de portar genes que posiblemente conferirían resistencia a este antibiótico en particular. Las cepas fueron aisladas de pacientes ambulatorios con ITU de un total de 358 muestras procesadas, el 64% fueron positivas para ITU de las cuales el 67% eran causadas por *E.coli* y de estas el 32,3% fueron resistentes a SXT. El 32% de las cepas resistentes a SXT, transfirieron, al menos, una molécula plasmídica mediante conjugación, confiriendo a las cepas receptoras resistencia hasta 4 antibióticos. Al analizar los plásmidos presentes en las cepas donantes y en las cepas transconjugantes se encontraron diferentes patrones de restricción y por ello el autor concluye que a pesar de estar aumentando el porcentaje de resistencia a SXT, el 32% está asociado a moléculas transferibles (Angiolillo, 2007).

En un estudio más reciente se evaluó la capacidad de transferencia de plásmidos causantes de multiresistencias en cepas de *E.coli* y *K.pneumoniae* productoras de BLEE aisladas HUC, encontrando que los mayores porcentajes de resistencia en *E.coli* fueron para TOB, GEN, STX, CIP, LEV y NAL. El 84% de las cepas transconjugantes expresaron el fenotipo de BLEE y el análisis comparativo de las cepas transconjugantes con las respectivas cepas donantes, demostró la naturaleza plasmídica de los determinantes de resistencia contra los antibióticos: FEP, CTX, ATM, CAZ, TOB, GN, tetraciclina (TCY), AN, SXT, CHL y AMC. Los autores concluyen que las cepas

de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de pacientes del HUC demostraron multiresistencia, transferida mediante plásmidos conjugativos o movilizables, portadores de genes BLEE y genes de resistencia contra otros antibióticos no β -lactámicos (Portale y Silva, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Las ITU son un problema importante de salud pública, no sólo por su frecuencia de aparición y por su ocurrencia en pacientes de todas las edades; sino también porque pueden ser el sitio de origen de invasión de bacterias o de sus productos a la circulación y a otros tejidos (Ginestre y col., 2001).

En numerosos reportes a nivel nacional, *E. coli* ha sido la bacteria más identificada en ITU. La aparición de cepas multiresistentes, con diversos mecanismos de resistencia, conlleva a modificaciones en las pautas terapéuticas de las infecciones producidas por estos microorganismos basadas obligatoriamente en patrones de susceptibilidad de cada región. Se han reportado cepas productoras de BLEE que han ocasionado brotes de infección intrahospitalaria y en la comunidad, con multiresistencia a los antibióticos, dificultando el tratamiento. Es frecuente enfrentarse a un patrón de multiresistencia, asociado a la producción de BLEE en aislados de *Enterobacteriaceae*, lo cual limita enormemente las opciones terapéuticas.

Factores como el uso de los antibióticos en los animales en pequeñas cantidades y el abuso en clínica que promueven la resistencia antimicrobiana, son cada vez más frecuentes. Esto se ha vuelto un problema de salud pública a nivel mundial. En Venezuela, en 1987, con auspicio de las Sociedades Venezolanas de Infectología, Microbiología y Farmaceutas, se fundó el Grupo de Vigilancia de Resistencia Bacteriana, constituido actualmente por 36 instituciones públicas y privadas, formando parte del Sistema Internacional de Vigilancia de Resistencia WHONET, que depende de la OMS, donde participan 135 países y más de 1000 laboratorios en el mundo. Este grupo reporta periódicamente la resistencia bacteriana de cepas aisladas en los hospitales que forman parte del estudio.

Los genes implicados en estas resistencias se movilizan entre diferentes bacterias. En muchos casos la resistencia se transfiere conjuntamente con el gen responsable de la BLEE en el mismo transposón, integrón o plásmido. Los reportes muestran una asociación significativa entre la

producción de BLEE y la resistencia a antibióticos como la fluoroquinolonas, especialmente en cepas de *E. coli* causantes de infección urinaria en la comunidad.

En general, estamos presenciando una diseminación espectacular tanto de genes de resistencia como de vehículos de transmisión horizontal en el ámbito extrahospitalario, probablemente como consecuencia de una intensa selección. Una vez adquiridas y diseminadas las resistencias, es difícil revertir el proceso, por lo que sin duda el procedimiento más eficaz para el control de las resistencias es la prevención mediante las prácticas de uso responsable de los antibióticos.

La caracterización molecular de todos los elementos de captura génica implicados en la diseminación de genes de resistencia y el estudio de los factores asociados con su diseminación en los diferentes ecosistemas, resultará imprescindible para comprender y controlar el problema de la resistencia a los agentes antimicrobianos.

En este trabajo nos proponemos evaluar la presencia de genes plasmídicos que confieren resistencia a quinolonas en cepas de *E.coli* provenientes de pacientes con ITU productoras de BLEE. Esta corresponsencia no ha sido descrita en nuestro país para este microorganismo en particular, por lo cual nuestros resultados podrán contribuir con un mejor conocimiento de los mecanismos de diseminación de resistencias a antibióticos y así poder diseñar estrategias de control antibiótico para estas infecciones.

4. OBJETIVOS

En el ámbito nacional se conoce que existe una frecuencia elevada de cepas de *E. coli* multiresistentes causantes de Infecciones del Tracto Urinario. Como un aporte para la vigilancia epidemiológica y el entendimiento de las causas de la prevalencia y dispersión de estas cepas multiresistentes, en este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

4.1 Objetivo general:

Evidenciar la presencia de genes que codifican las proteínas BLEE y QNR, que confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos y a las quinolonas, respectivamente, en cepas de *E.coli* provenientes de pacientes ambulatorios con ITU.

4.2 Objetivos específicos:

- Aislamiento e identificación de las cepas de *E.coli* en muestras de pacientes ambulatorios con ITU, a través del análisis de urocultivos, tinción Gram y pruebas bioquímicas.
- Determinación fenotípica de cepas BLEEs de *E.coli* en muestras de pacientes con ITU, mediante el análisis de antibiogramas.
- Detección de la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos pertenecientes a las familias SHV, TEM, y CTX-M mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Detección de la presencia de las variantes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* de genes de resistencia a quinolonas pertenecientes a la familia *qnr* mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *E.coli* fueron aisladas de muestras de orina de pacientes que asistieron a consulta ambulatoria del Centro Médico Docente La Trinidad (CMDLT) en un período de 6 meses (Noviembre, 2008 – Mayo, 2009).

Las muestras de orina se sembraron en placas con medio CLED (cisteína lactosa deficiente en electrolitos) y agar Sangre. Se realizó un recuento semicuantitativo, empleando asas de platino calibradas, depositando sobre la superficie del medio de cultivo un volumen determinado de orina (0,001 ml ó 0,01 ml). Después de incubar las siembras a 37° durante 24-48 horas, se cuenta el número de colonias desarrolladas.

Consideramos urocultivos positivos aquellos recuentos $> 10^5$ UFC/ml, debido a que cuando se obtienen dos recuentos sucesivos con más de 100.000 colonias por ml., la probabilidad de infección es de 80%, cifra que se eleva a 95% si el mismo resultado se logra en tres recuentos sucesivos.

5.2. Identificación de cepas de *E.coli*

Se realizó la observación microscópica utilizando la coloración de Gram de una colonia de las cepas de los urocultivos positivos. Los bacilos Gram negativos se caracterizaron bioquímicamente utilizando los siguientes medios y el perfil bioquímico para *E.coli* se describe en la Tabla 6:

➤ Medio Kliger

Medio de cultivo frecuentemente usado en microbiología para la diferenciación de Enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico. Debido a la fermentación de los azúcares en el medio, se producen ácidos, que se detectan por el indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido.

Lectura de resultados:

- Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
- Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
- El oscurecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

➤ **Medio Simmons-Citrato:**

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento, lo cual resulta en un cambio de alcalinidad detectable en el medio.

El medio para la fermentación del citrato también contiene sales inorgánicas de amonio. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como su única fuente de carbono también utiliza las sales de amonio como su única fuente de nitrógeno; estas son degradadas a amoníaco, lo cual aumenta la alcalinidad.

Lectura de resultados:

- Positivo: crecimiento con o sin un color azul intenso.
- Negativo: ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color (verde).

➤ **Prueba de Urea:**

Determina la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad.

La urea es hidrolizada por una enzima específica, la ureasa (o urea amidohidrolasa). En solución, la urea se hidroliza a carbonato de amonio como producto final.

Lectura de resultados:

- Positivo: color cereza (púrpura rojizo)
- Negativo: sin cambio de color

➤ **Medio LIA**

Este medio es usado para la identificación de Enterobacterias basado en la decarboxilación / desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

La dextrosa es un hidrato de carbono fermentable, la lisina es el sustrato para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color púrpura y en medio ácido es amarillo.

Lectura de resultados:

- La reacción positiva a la lisina está dada por un color púrpura del medio. Debido a la fermentación de la glucosa se reduce el pH produciendo una condición ácida y originando que el indicador de pH púrpura de bromocresol vire al amarillo. Por decarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color púrpura.
- La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

➤ **Medio MIO**

Usado para la identificación de Enterobacterias en base a su movilidad, actividad de la enzima ornitina descarboxilasa y producción de indol.

Contiene dextrosa, ornitina que es el sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa y púrpura de bromocresol como indicador de pH.

Lectura de resultados:

- La movilidad se demuestra por un enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación.
- La reacción positiva a la ornitina está dada por un color púrpura del medio. Debido a la fermentación de la glucosa se reduce el pH produciendo una condición ácida, que promueve la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa, la cual descarboxila la ornitina presente. Por descarboxilación, se alcaliniza el medio, con el consecuente viraje del indicador hacia el color púrpura.
- El indol, es producido a partir del triptófano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa. El desarrollo de un color rojo luego de agregar unas gotas de reactivo de Kovac's o de Erlich, indica un resultado positivo.

Tabla 6. Características generales de *E. coli*

Morfología y tinción	Bacilos Gram negativos
Movilidad	Positivo
Fermentación de Glucosa	Positivo Acido/Gas
Fermentación de Lactosa	Positivo Acido/Gas
Citrato	Negativo
Ureasa	Negativo
Producción H ₂ S	Negativo
Indol	Positivo
Lisina descarboxilasa	Positivo

5.3. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos e identificación fenotípica de BLEE

La sensibilidad antimicrobiana se realizó a través del ensayo de difusión con discos en medio Muller-Hinton (Método de Kirby- Bauer), empleando discos de papel impregnados con el antibiótico correspondiente (Bauer y col., 1966). La sensibilidad estuvo determinada por el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano en el medio. La lectura es estandarizada de acuerdo al criterio del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009), para bacilos Gram negativos pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae*. Se utilizaron discos comerciales y los puntos de corte, indicados en la Tabla 7, como criterios para la clasificación de las cepas como posibles productoras de BLEE.

Tabla 7. Diámetro de la zona de Inhibición de crecimiento para la Familia *Enterobacteriaceae* para diferentes antibióticos

	Antibióticos	Sensible	Intermedio	Resistente
	*Amoxicilina-Clavulanico (30µg)	≥18	14-17	≤13
	**Cefotaxima (30µg)	≥23	15-22	≤14
	*Ceftriaxona (30µg)	≥21	14-20	≤13
	*Cefoxitina (30µg)	≥18	15-17	≤14
	**Ceftazidima (30µg)	≥18	15-17	≤14
	**Cefpodoxima (10µg)	≥21	18-20	≤17
	*Aztreonam (30µg)	≥22	16-21	≤15
	*Imipinem (10µg)	≥16	14-15	≤13
	*Gentamicina (10µg)	≥15	13-14	≤12
	*Amikacina (30µg)	≥17	15-16	≤14
	*Tobramicina (10µg)	≥15	13-14	≤12
Fluoroquinolonas	*Ciprofloxacina (5µg)	≥21	16-20	≤15
	*Ofloxacina (5µg)	≥16	13-15	≤12
	*Acido Nalidíxico (30µg)	≥19	14-18	≤13
	*Trimetoprim-Sulfametoxazole (SXT) (1.25µg/23.75µg)	≥16	11-15	≤10

*Casa Comercial BBL™ (Becton, Dickinson and Company). ** Casa Comercial Oxoid, Basingstoke, UK. Tomado de CLSI, 2009.

Se utilizó el método de detección de BLEE basado en la utilización de inhibidores de β -lactamasas, descrito por Jarlier 1988. Consiste en la disposición de un disco convencional de AMC en el centro de una placa a una distancia de 20mm de otros discos con cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (CAZ, CTX, CRO, CPD) y monobactámicos (ATM). La presencia de BLEE se manifiesta por el efecto sinérgico del inhibidor (también llamado efecto tapón de corcho), bajo la forma de ampliación del halo de inhibición de crecimiento en uno o varios de los discos con β -lactámicos demostrando la inhibición de la expresión BLEE por el ácido clavulánico (Jarlier y col., 1988) (Figuras 10 y 11).

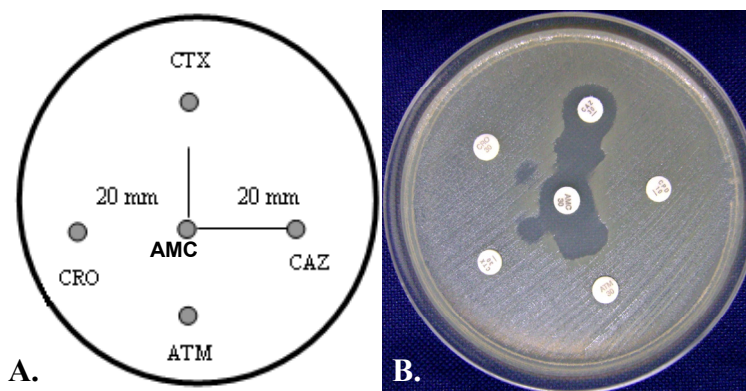


Figura 10. Método de doble difusión de disco. A. Esquema de disposición de discos en el antibiograma. **B.** Deformación del halo de inhibición con AMC: amoxicilina/ácido clavulánico hacia las cefalosporinas CXT: cefotaxima, CRO: ceftriaxone, CAZ: ceftazidima y con Aztreonam (ATM). Tomado y modificado de Hugo, 2006

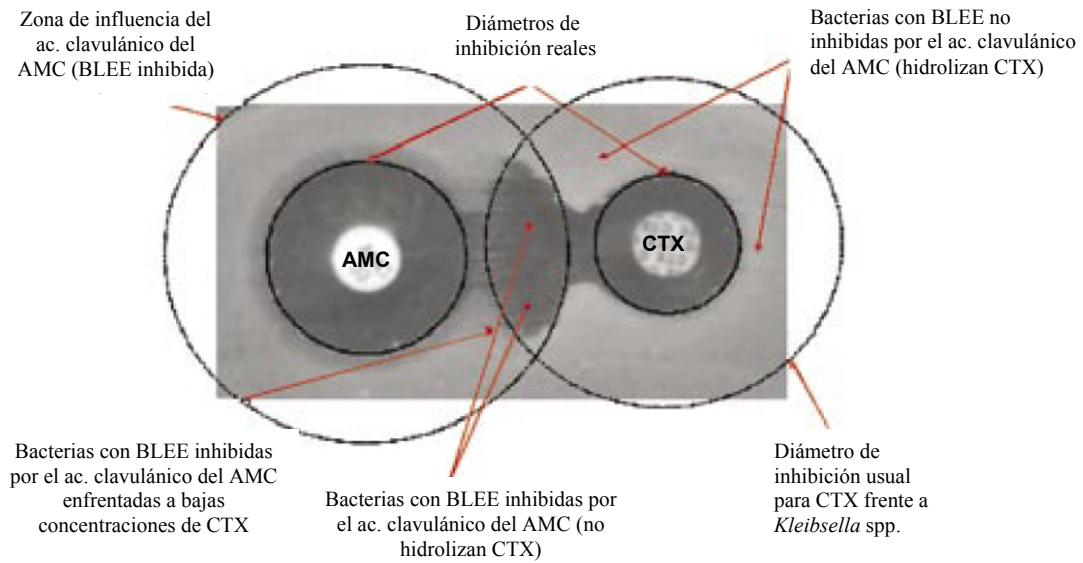


Figura 11. Ampliación del halo de inhibición frente a AMC. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico. CXT: cefotaxima. Se explica en detalle el efecto de sinergia que se produce entre el disco de AMC que contiene ac. clavulánico (inhibidor de BLEE) y CTX. Tomado y modificado de <http://amro.who.int/Spanish/AD/DPC/CD/amr-brochure-2008-inside.pdf>

Como método de confirmación se realizó la comparación de los halos de inhibición de los discos de CTX con discos de este antibiótico a los que se les ha añadido ácido clavulánico CTX-CLA (10 µg), este método indica que un aumento de al menos 5mm en el halo de inhibición de crecimiento establece la presencia de BLEE debido a la inhibición de su expresión por el ácido clavulánico (Figura 12).

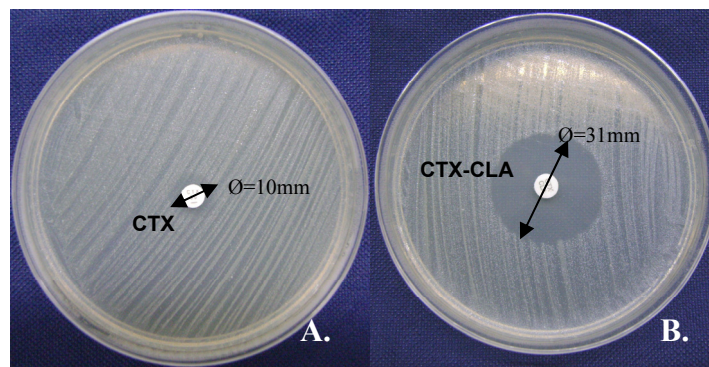


Figura 12. Confirmación de presencia de BLEE. A. Halo de inhibición de crecimiento con cefotaxima (CTX) B. Aumento de l halo de inhibición de crecimiento mayor a 5mm de diámetro con disco con cefotaxima/ácido clavulánico (CTX-CLA). Se observa que el halo de inhibición incremento su diámetro en 21mm, revelando la presencia de BLEE.

Las muestras se conservaron en microviales (volumen 1,5ml) con agar Tripticasa de Soya (ATS) sembradas por punción (entre 9-11 punciones) para su posterior análisis.

5.4. Aislamiento de ADN

Las cepas se sembraron en placas de Agar Luria-Bertani (LB) sin antibiótico. Para el análisis molecular y una vez obtenidas las colonias de las cepas puras, se procedió a la siembra en caldo LB para el aislamiento y la obtención de ADN de cada cepa por el método propuesto por Levesqué y colaboradores, en 1995 y el cual fue utilizado por Hugo en el 2006, por ser más eficiente, sencillo y rápido.

Este método consiste en tomar una alícuota de 200 μ l del cultivo en medio líquido, sembrado 24h antes e incubado en estufa a 37°C con agitación en caldo LB, y agregarlo en 800 μ l de agua miliQ contenida en un tubo eppendorf. Se somete a ebullición durante 10min y se centrifuga a 12.000xg durante 2min, descartando el precipitado y almacenando el sobrenadante a 20°C para su posterior análisis (Hugo, 2006).

5.5. Detección molecular de *bla* mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se les realizó a cada cepa un PCR, para determinar la presencia de genes que codifican para BLEE pertenecientes a las familias SHV, TEM, y CTX-M. Este método fue estandarizado en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (LBPB) por Hugo en el año 2006.

La amplificación de los genes se realizó por la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un termociclador (Applied Biosystems) y la *Taq* polimerasa (polimerasa de ADN termoestable), aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, de la casa comercial Fundaim. La solución del PCR contenía desoxinucleotidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) para una concentración final de 200 μ M; la enzima polimerasa *Taq*, para una concentración final de 20 unidades.mL⁻¹ y MgCL₂, para una concentración final de 1,5mM. Además la mezcla contenía cada iniciador (R y F) (Tabla 8), a una concentración final de 4 μ M y agua ultra pura para un volumen de 23 μ L, al cual se le añadieron 2 μ L de la muestra de DNA obtenido por el método previamente descrito, el volumen final para la reacción de PCR fue de 25 μ L. Las condiciones generales de la reacción se muestran en la Tabla 9 (Hugo, 2006).

En las figuras 13, 14 y 15 se muestran la secuencia nucleotídica y los sitios de anclaje de los iniciadores empleados para la amplificación de cada gen.

Tabla 8. Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes tipo *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}

Gen	Iniciadores	Secuencias	T _m	Tamaño amplificado	Referencia
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	5' ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG 3'	60°C	475 pb	Essack y col., 2004
	SHV-R	5' CGT TTC CCA GCG GTC AAG G 3'			
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	5' ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG 3'	47°C	374 pb	Kaye y col., 2004
	TEM-R	5' CGG GAG GGC TTA CCA TCT G 3'			
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	5' TTT GCG ATG TGC AGT ACC AG 3'	47°C	543 pb	Edelsteinn y col., 2003
	CTX-M-R	5' GAT ATC GTT GCT GGT GCC AT 3'			

T_m: temperatura de fusión del ADN

Tabla 9. Condiciones de los ciclos de la PCR, para los iniciadores de los genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}

Condición	Temperatura (°C)			Tiempo (min.)	Ciclos
Calentamiento	94			5	1x
Desnaturalización	94			1	30x
Hibridación con los iniciadores (annealing)	<i>bla</i> _{SHV} 60	<i>bla</i> _{TEM} 47	<i>bla</i> _{CTX-M} 47	1	
Extensión de los iniciadores	72			1	
Extensión final	72			10	
Preservación	4			∞	1x

1	atg	cg	ttata	t	tattatctcc	ctg	ttagcca	c	cctg	c	ccgct	gg	cggtacac
61	tac	gca	aatat	aag	cg	gacac	→	gca	aat	taa	caa	agc	gaa
	g	cc	agccc	g	g	cc	gcttga	g	caa	at	taa	g	g
121	gg	cat	gatag	aa	tggatct	gg	ccagcggc	cg	cac	gctga	cg	cctggcg	cg
181	cg	ctt	tcca	t	gatgagcac	ctt	taaagta	gt	gctctgcg	g	cg	cagtgc	gg
241	gat	gcc	gggtg	ac	gaacagct	gg	agcgaag	at	ccactatc	g	cc	agcagga	t
301	tac	tc	gccc	g	gcg	g	g	g	g	g	g	g	g
361	g	cc	gccatta	c	catgagcga	ta	acagcgc	g	cca	atctgc	t	gctggccac	cg
421	ccc	gc	aggat	t	gactgcctt	ttt	gcgccag	at	cg	gcgaca	ac	gtcacc	cg
481	t	gg	aa	ac	g	g	g	g	g	g	g	g	g
	acc	ctt	ttgc	a	actgaatga	gg	cgcttccc	gg	cg	acgccc	g	cg	acaccac
541	ag	cat	ggccg	cg	accctgcg	ca	agctgctg	acc	ag	ccagc	g	tctgagcgc	cc
601	cg	gc	agctgc	t	gcagtgat	g	gtggacgat	cg	gg	tcg	ccg	gaccgttgat	cc
661	ct	g	ccggcgg	g	ctggtttat	cg	ccgataag	acc	cg	gagc	t	gcaagcgggg	t
721	att	gt	gc	ccc	tgcttgccc	ga	atacaaaa	gc	ag	agcgc	a	ttgtggtgat	tt
781	g	at	acgccc	cg	agcatggc	cg	agcgaat	c	ag	caaatcg	cc	gggatcgc	cg
841	at	cg	agcact	g	gcaacgcta	a							

Figura 13: Sitios de hibridación de los iniciadores SHV-F y SHV-R de *bla*_{SHV}. Número de acceso AY293070. La selección en rojo señala el sitio de hibridación y los azules a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación.

```

1 aattcttgaa gacgaaagg cctcgtgata cgcttatttt tataggtaa tgcatgata
61 ataatggttt ctagacgtc agtgggcact ttcggggaa atgtgcgcyg aaccctatt
121 tgtttatttt tctaaataca ttcaaatacg tatccgctca tgagacaata accctgtaa
181 atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagatttc aacattttcg tgtcgcccct
241 attccctttt ttgcygcatt ttgccttccct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa
301 gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtggytt acatcgaact ggatctcaac
361 agcygtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgct gagcactttt
421 aaagttctgc tatgtggtgc ggtattatcc cgtggtgacg ccgggcaaga gcaactcgyt
481 gcgcgcatag actattctca gaatgacttg gttaagtact caccagtcac agaaaagcat
541 cttacgygatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacat gagtgataac
601 actgcygcca acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgctttttt
    tgacgcyggt tcaatgaaga c →
661 cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcattggy aaccgygct gaatgaagc
721 ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgcagcaa tggcaacaac gttgcgcaa
781 ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccgyaac aattaataga ctggytggy
841 gcgataaag ttgcaggyac acttctgcgc tcggccctc cggctggyt gtttattgct
901 gataaatctg gagccgytga gcgtggytct cgcggtatca ttgcagcact ggggcyagat
    ←
961 ggytaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgygga gtcaggyaac tatggytga
    ccattcgyca gggc
1021 cgaatatagc agatcgytga gataggytgc tcaactgatta agcattggyt a

```

Figura 14: Sitios de hibridación de los iniciadores TEM-F y TEM-R de blaTEM. Número de acceso AY628175. La selección en rojo señala el sitio de hibridación y los azules a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación.

```

1 atggttaaaa aatcactgcy ccagttcacg ctgatggyca cggcaaccgt cacgctggtg
61 ttaggaagtg tgccgctgta tgcgcaaacg gcggyacgtac agcaaaaact tgccgaatta
121 gagcygcyt cgggaggyca actggytgyt gcattgatta acacagcyca taattcgyca
181 atactttatc tgctgatga gcgctttgcy atgtgcagca ccagtaaat gatggyccgy
    aaacgc tacacgctcy ggtc →
241 gccgcytgc tgaagaaaag tgaagcyga ccgaatctgt taaatcagcy agttgagatc
301 aaaaaatctg acctgttaa ctataatccg attgcygaaa agcagctca tgggacgyt
361 tcaactggyt agcttagcy gcgcgcyta cagtacagcy ataactggy gatgaataag
421 ctgattgctc acggtgcy cccggytagc gtcaccgyt tcgcccgaca gctggygac
481 gaaacgttc gtctcagcy taccgagcy acgttaaaaca ccgccattcc gggcyatccg
541 cgtgatacca cttcacctcy ggcaatggy caaactctcy ggaatctgac gctggyttaa
601 gcattggyt acagccaacg ggcgcytgy gtgacatgga tgaaggyca taccaccgyt
661 gcagcygca ttcaggytgy actgcctcy tcctggytgy tgggggataa aaccgycgc
721 ggtgactatg gcaccaccaa cgatatcgy gtgatctgcy caaagatcy tgcgcytgy
    ←
781 attctggytca cttacttcac ccagcctca cctaaggyca aaagccgyt cgatgtatta
841 gcgtcgycgy ctaaaatcy caccgacgyt ttgtaa

```

Figura 15: Sitios de hibridación de los iniciadores CTX-M-F y CTX-M-R del gen blaCTX-M. Número de acceso AY293071. La selección en rojo señala el sitio de hibridación y los azules a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación.

Para comprobar la presencia e integridad del ADN en la muestras analizadas por PCR y descartar la contaminación de las mismas, utilizamos controles positivos para cada gen (Tabla 10) y el control negativo la cepa *E. coli* J6-2 (F⁻, *lac*, *prol*, *met*, *trip*, RIF^R), que no posee ningún gen *bla*.

Tabla 10. Controles positivos y negativos para el PCR de los genes tipo *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}

Tipo de Gen	Controles Positivos	Origen	Control Negativo
<i>bla</i> _{SHV}	<i>K. pneumoniae</i> 700603 (codifica una SHV-18 y una TEM-1)	ATCC	} <i>E.coli</i> (J6-2)
<i>bla</i> _{TEM}	<i>K. pneumoniae</i> 700603 (codifica una SHV-18 y una TEM-1)	ATCC	
<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>E.coli</i> 2944 (codifica una CTX-1)	UCV	

ATCC: American Type Culture Collection. UCV: Universidad Central de Venezuela

5.6 Detección molecular de genes *qnr* mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se les realizó un PCR a cada cepa, para determinar las variantes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, como está descrito en el apartado anterior y las condiciones de la reacción a utilizar, se describen en las Tablas 11 y 12, las cuales fueron estandarizaras por López en el año 2007 en el LBPB.

Adicionalmente, se realizó un PCR para determinar las nuevas variantes *qnrC* y *qnrD* reportadas recientemente y también para la bomba de eflujo QepA, con iniciadores específicos para estos genes cuyas características y condiciones están descritas en las Tablas 10 y 11.

En las figuras 16, 17, 18,19, 20 y 21 se muestran la secuencia nucleotídica y los sitios de anclaje de los iniciadores empleados para la amplificación de cada gen.

Tabla 11. Condiciones de los ciclos de la PCR, para los iniciadores de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD*

Condición	Temperatura (°C)						Tiempo (min.)	Ciclos
Calentamiento	94						5	1x
Desnaturalización	94						1	30x
Hibridación con los iniciadores (annealing)	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qepA</i>	45	
	56	60	60	50	56	60		
Extensión de los iniciadores	72						1	
Extensión final	72						7	1x
Preservación	4						∞	1x

Tabla 12. Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes tipo *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD*

Gen	Iniciadores	Secuencias	Tm	Tamaño amplificado	Referencia
<i>qnrA</i>	QP1	5'- GAT AAA GTT TTT CAG CAA GAG G-3'	56 °C	593pb	Jacoby y col., 2003
	QP2	5'- ATC CAG ATC GGC AAA GGT TA -3'			
<i>qnrB</i>	QNRBF	5'- GTA CGT GAA AGC CAG AAA GG -3'	60 °C	469pb	Robicsek y col., 2006
	QNRBR	5'- ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC -3'			
<i>qnrS</i>	S1	5'-ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA-3'	60 °C	417pb	Robicsek y col., 2006
	S2	5'-TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC-3'			
<i>qnrC</i>	QNRC-F	5'- GGGTTGTACATTTATTGAATC- 3'	50 °C	447pb	Wang y col., 2009
	QNRC-R	5'- TCCACTTTACGAGGTTCT- 3'			
<i>qnrD</i>	QNRD-F	5'-CGAGATCAATTTACGGGGAATA- 3'	56 °C	582pb	Cavaco y col., 2009
	QNRD-R	5'-AACAAGCTGAAGCGCCTG-3'			
<i>qepA</i>	QEPA-F	5'-GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG-3'	60°C	218pb	Yaname y col., 2008
	QEPA-R	5'-CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG-3'			

Tm: temperatura de fusión del ADN

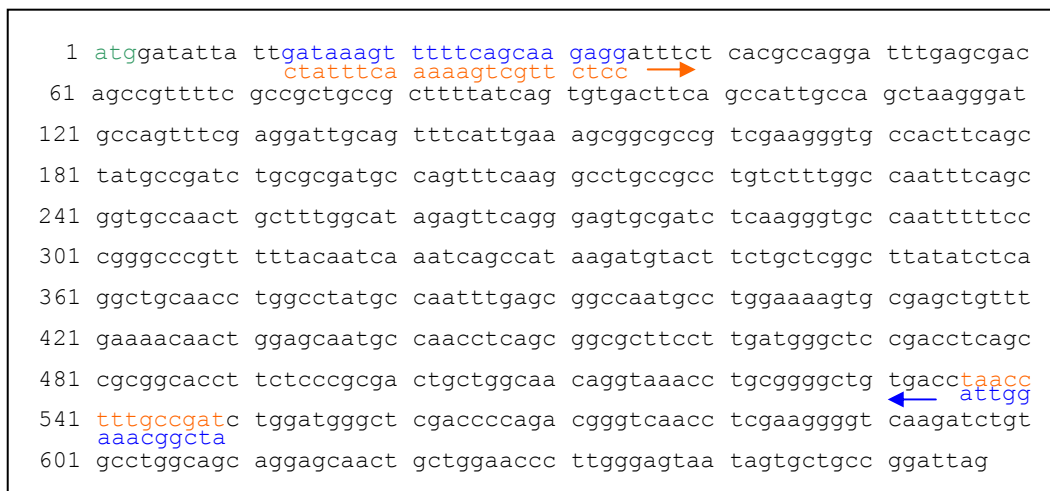


Figura 16. Sitios de hibridación de los iniciadores QP1 y QP2 en el gen *qnrA*. La selección en anaranjado señala el sitio de hibridación en la secuencia de DNA y la selección azul a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación. Tomado de Gene Bank, número de acceso AY070235.

```

1 atgacgccat tactgtataa aaaaacaggt acaaatatgg ctctggcact cgttggcgaa
61 aaaattgaca gaaaccgttt caccgggtgag aaaattgaaa atagtacatt ttttaactgt
121 gattttttcag gtgccgacct gagcggcact gaatttatcg gctgtcagtt ctatgatcgt
181 gaaagccaga aagggtgcaa ttttagtcgt gcgatgctga aagatgccat ttttaaaagc
cttcgggtct ttcc →
241 tgtgatttat ccatggcgga ttttcgcaat gccagtgcgc tgggcattga aattcgccac
301 tgccgcgcac aaggcgcaga tttccgcggc gcaagcttta tgaatatgat caccacgcgc
361 acctggtttt gtagcgcata taccacgaat accaatctaa gctacgcaa tttttcgaaa
421 gtcgtggttg aaaagtgtga gctgtgggaa aaccgttga tgggtgcca ggtactgggc
481 gcgacgttca gtggttcaga tctctccggc ggcgagtttt cgactttcga ctggcgagca
541 gcgaacttca cacattgcga tctgaccaat tcggagttgg gtgacttaga tattcggggc
601 gttgatttac aaggcgttaa gctggacaac taccaggcgt cgttgctcat ggagcggcct
← cctgttg atggtccgca gca
661 ggcatcgcgg tgattggtta g

```

Figura 17. Sitios de hibridación de los iniciadores QNRBF y QNRBR en el gen *qnrB*. La selección en anaranjado señala el sitio de hibridación en la secuencia de DNA y la selección azul a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación. Tomado de Gene Bank, número de acceso EU093091.

```

1 atggaaacct acaatcatac atatcggcac cacaactttt cacataaaga ctaagtgtat
61 ctcacettca ccgcttgcac attcattcgc agcgaacttc gacgtgctaa cttgcgtgat
121 acgacattcg tcaactgcaa gttcattgaa cagggtgata tcgaaggctg ccactttgat
tgctgtaagc agttgacgtt →
181 gtcgcagatc ttcgtgatgc aagtttccaa caatgccaac ttgcgatggc aaacttcagt
241 aatgccaatt gctacggtat agagtccgt gcgtgtgatt taaaaggctg caacttttcc
301 cgaacaaact ttgccatca agtgagtaat cgtatgtact tttgctcagc atttatttct
361 ggatgtaatc tttcctatgc caatatggag agggtttggt tagaaaaatg tgagtgtgtt
421 gaaaatcgct ggataggaac gaacctagcg ggtgcatcac tgaagagtc agacttaagt
481 cgagggtgtt tttccgaaga tgtctggggg caatttagcc tacaggggtgc caatttatgc
← cgg atgtcccacg gttaaat
541 cacgccgaac tcgacggtt agatccccgc aaagtcgata catcaggtat caaaattgca
601 gcctggcagc aagaactgat tctcgaagca ctgggtattg ttgtttatcc tgactaa

```

Figura 18. Sitios de hibridación de los iniciadores S1 y S2 en el gen *qnrS*. La selección en anaranjado señala el sitio de hibridación en la secuencia de DNA y la selección azul a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación. Tomado de Gene Bank, número de acceso EU195834

```

1  ttagtcttaa tttaaattaa tcaagaggtt ataacattga attattccca taaaacgtac
61  gatcaaattg atttttccgg ccaagatttg agctctcatc acttttctca ctgtaaattt
121 tttggttgta attttaacg agtgaattta cgtgatgcta aattcatggg ttgtacattt
181 attgaatcga atgattttga aggatgtaat tttatctatg cagacctacg agatgcttca
    taacttcg →
241 tttatgaatt gcatgctttc aatggcgaat ttccaagggg caaactgttt tggccttgaa
301 ttgagagaat gcgatttaaa aggtgcta atctcacagg caaactttgt taatcatggt
361 tctaacaaaa tgtatttttg ctctgcttac attacggggt gtaatttgtc ttatgcta at
421 ttcgataagc aatgccttga aaagtgtgat ttatttgaaa ataaatgggt aggtgcaagc
481 ctgcaagggg cctcttttaa agagttagac ttaagtaggg gatcattttc tgatgacttt
541 tgggagcaat gcagaattca ggggtgtgat ctactcatt cagaattaaa tggcttagaa
    ggagcatttc acct ←
601 cctcgtaaag tggatttaac tggcgtgaaa atttgttcat ggcaacaaga gcagcttttg
661 gagcagttgg gggtgattgt tattccagac aaagtgtttt

```

Figura 19. Sitios de hibridación de los iniciadores QNRC-F y QNRC-R en el gen *qnrC*. La selección en anaranjado señala el sitio de hibridación en la secuencia de DNA y la selección azul a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación.
Tomado de Gene Bank, número de acceso EU917444

```

1  aggtgtagca tgtatggaaa agcactttat caatgaaaag ttttccgag atcaatttac
    gcta tagttaaatg
61  ggggaataga gttaaaaata ttgccttttc aaattgtgat ttttcagggg ttgatttaac
    ccccttat →
121 tgatactgaa tttgttgatt gtagttttta cgacaggaat agcttggaag ggtgtgattt
181 taatagagcc aaactaaaaa acgctagctt taaaagctgc gatttatcaa tgagtaattt
241 taaaaacatt agcgccttag gtcttgaat tagtgagtgt ttagctcaag gagctgattt
301 tcgaggggct aattttatga atatgataac tacaaggcca tggttttgta gtgcttatat
361 aaccaagaca aatcttagtt acgctaattt ttctagagtc atattagaaa agtgcgaaact
421 gtgggaaaat cgctggaatg gcaactgtgat aactggcgcc gtgtttcgtg gctccgatct
481 ttcttgtggg gagttttcat cgtttgattg gtctttggct gattttactg gttgtgattt
541 aacgggtggg gcgcttggcg agcttgatgc aaggcgaatt aatttagatg gagtgaagtt
    gtccgcgaag tcgaacaa ←
601 ggatggagag caggcgcttc agcttgttga gagtttaggt gttattgttc accgataaaa
661 tctaggtaaa aaacgcctaa tgcccaatg tggtaactaat caaacggag cgaagcgaca

```

Figura 20. Sitios de hibridación de los iniciadores QNRD-F y QNRD-R en el gen *qnrD*. La selección en anaranjado señala el sitio de hibridación en la secuencia de DNA y la selección azul a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación.
Tomado de Gene Bank, número de acceso FJ228229

```

1  gtcaaccaga tgcgagcgt gggcgcttgc gcagcaggcg gccaccagc ccagcggcca
61  ccagcaccag caccgcgccg gccaggcccg tggcctgcag cgcacgggtg aagcccgcgc
121 gtgcggccgc cagcaaggcc ggcacctgcc acgccggcag ggtgtcggcc agtgacacgg
181 cgccccgag cgaggcaccg gccgcctgca ggcacatcggc cggcaggccg ggacgcgccg
241 cgctggtcag cgctgcccgg tagaccacca ggccgacgct gccgaacagc gcgatgccca
301 ggcgcgccgt gaattcggac accgtctccg acaaggccga ggccgcgccg gcgcgctcgg
361 acggcgccgt ggtgatgatg atctcgttgc cgatggtgaa caccggcgcc aggccaggc
421 ccatgacgat cgtggccggc accagccacc acaggccctg cccagcccc agcacggcga
481 agccgaacgc cgctgccgac aggccacga cgaggatgcy gccgcggcgc cagcgcgccg
541 cgagctgcgg cgacaacagc gaaccgatga cgaagcacag ggaccagggc agcgtggcca
601 gccggcctg cagcggcgac agccccagca cgagctgcag gtactgcgct atgaagatgt
661 agacgccgaa catggccagc ggcggccagc catacgcgc cagcgcgcgc cgaacggcg
721 cgtgcgcgaa cagccgagg tccagcagcg ggtaggcgtat gtggccctgg cggcgcagga
      cgtcc agtctcgtcgc ccatac →
781 acagcgcgcc gaccgccagc ccggccagca ggcagccat cgaggcgagg cccgctccat
841 gctcggccaa ctgcttgagc ccgtagatcg tcagcagcac cgccgccagc gacagcagca
      ← gtgctat gagccgctcc ttc
901 cgctggccag gtccaggtgc cccgcgtccg gatcacgata ctcgggcagg aagcgagggc
961 cgagcgcagc cgtcagcagc atcaccggca cgttgagcca gaacacggcg cccagtgga
1021 agaactccag caacacgccg ccgaccagcg gaccgatcgc gctgccagc gaaaacgcgg
1081 cgatccacac gccgatggcg aactggcgtt ggcgcgggtc gtggaacatg ttgcggacca
1141 ggcctatggt ggacggcgcg atggtggcgc cggccaggcc gagcaaggcg cgcgcgcgca
1201 tcaacagcgc ggcggtatcg gccagcgcgc cgagaccgga ggcaaatgcy aagaacgccg
1261 cgccgatcaa caacagccgg cgcggccgca tgcggtcgc cagcgtgccc atggtgatca
1321 ggaagccggc gacgaagaag ccgtagatgt ccaggatcca gagaagctgg gcgctggagg

```

Figura 21. Sitios de hibridación de los iniciadores QEPA-F y QEPA-R en el gen *qepA*. La selección en anaranjado señala el sitio de hibridación en la secuencia de DNA y la selección azul a los iniciadores utilizados. Las flechas indican la dirección de la amplificación.

Tomado de Gene Bank, número de acceso AB263754

El control positivo utilizado para el PCR del gen *qnrA* fue la cepa de *K. pneumoniae* UAB1, que contiene el plásmido pMG252 portador del gen *qnrA*. Para el gen *qnrB* se utilizó la cepa nro.59 y por último para el gen *qnrS* la cepa nro. 55 obtenidas por López en el 2007 y que contienen estos genes y como control negativo se utilizó un lisado de la cepa *E. coli* J6-2, que no posee ningún gen *qnr*.

El control negativo para los reactivos de la reacción de PCR para los genes *bla*, *qnr* y *qepA* fue agua ultra pura.

Para confirmar la presencia de ADN bacteriano en los casos en que no hubo producto de ampliación para ambos grupos de genes y así descartar falsos negativos utilizamos la secuencia genética del rRNA 16S, una región altamente conservada entre los diferentes organismos, que nos garantiza la presencia e integridad de DNA molde en la muestra. Los iniciadores y condiciones para realizar el PCR se describen en las Tablas 13 y 14, respectivamente.

Tabla 13: Características de los iniciadores para la amplificación del gen *16S rRNA*.

Gen	Iniciadores	Secuencias	Tm	Tamaño amplificado
<i>16S rRNA</i>	U1:	5'CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3'	55°C	996 pb
	U2:	5' ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC3'		

Tm: temperatura de fusión del ADN

Tabla 14: Condiciones del programa para la PCR con el iniciador *16S rRNA*.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Ciclos
Calentamiento	95	5	1x
Desnaturalización	94	1	35x
Hibridación de los iniciadores (<i>annealing</i>)	50	1	
Extensión de los iniciadores	72	2	
Extensión final	72	10	1x
Preservación	4	∞	1x

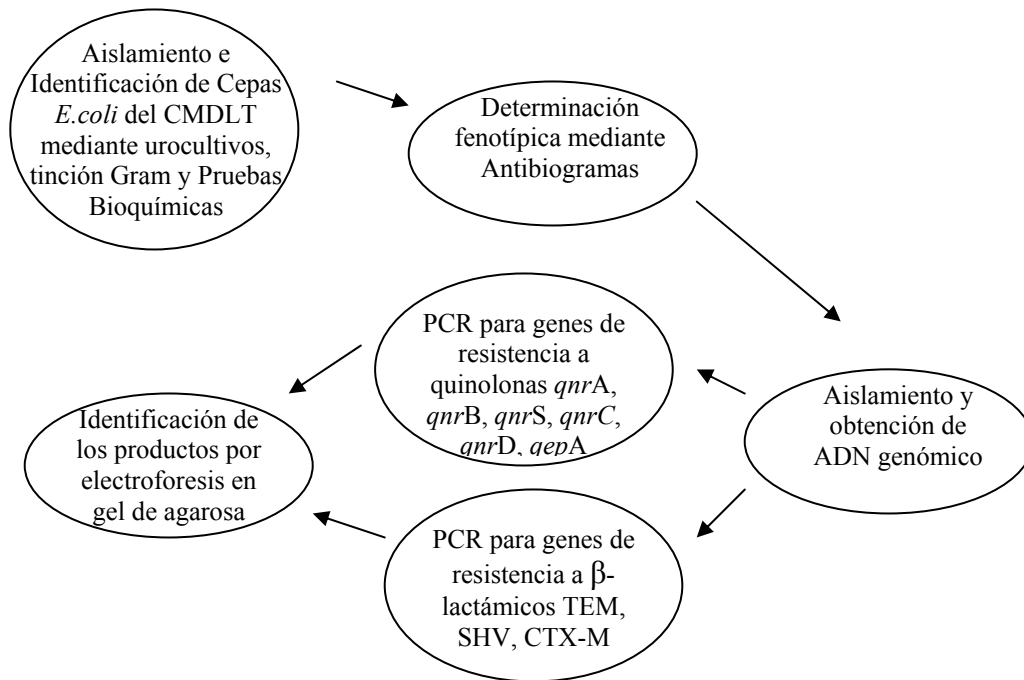
5.7 Electroforesis de ADN en gel de agarosa:

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para la identificación de los productos de PCR. La agarosa se preparó disolviendo la cantidad adecuada de agarosa en buffer TBE 1X para obtener una concentración de 1,2%. El buffer TBE 1X se prepara a partir de un stock 10X: Tris Base 0,89 M, ácido bórico 0,89M y EDTA 0,02M, pH: 8,0 (Hugo, 2006).

Se mezcló la muestra de amplificación con el buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30%). Además de las muestras, el gel de agarosa contenía en uno de sus bolsillos un marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder o 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA).

Una vez culminada la corrida, se trató el gel con una solución de bromuro de etidio, a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, durante 10min. y el exceso se eliminó con agua destilada por 5min. Por último, se observó el ADN corrido en el gel en un equipo Gel Doc 1000, de la casa comercial *Bio Rad*, que permite observar y analizar la imagen en un computador mediante el programa *Multy Analyst*.

6. PLAN DE TRABAJO



7. Resultados

7.1. Identificación de cepas BLEE

Se analizaron un total de 2981 muestras de orina de pacientes que asistieron a consulta ambulatoria al CMDLT. Se detectaron 905 muestras positivas (Figura 22) para ITU (30,35%). La incidencia de ITU en mujeres fue de 79,2% y en hombres fue del 20,8%. En cuanto a la edad se encontró una incidencia de ITU en la comunidad de 25% en edades <50 años, para las edades comprendidas entre 50 años y 65 años se obtuvo el 20,8%, mientras en edades >65 años la incidencia alcanzó valores de 50%.

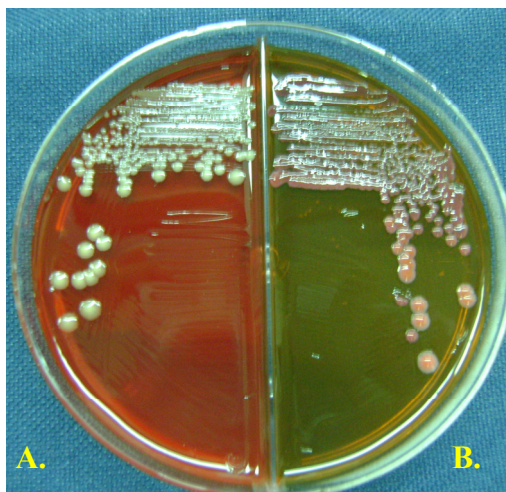


Figura 22. Urocultivo de muestra con ITU. A. Siembra en agar Sangre. B. Siembra en agar CLED. Se observa urocultivo positivo por recuento $> 10^5$ UFC/ml.

A las 905 muestras positivas para ITU, se le realizó la identificación de las cepas de *E. coli* mediante tinción Gram (Figura 23) y 6 pruebas bioquímicas. Se encontró que 691 fueron causadas por *E. coli* (76,4%) y el resto por una variedad de otros microorganismos. A las cepas de *E. coli* se les determinó el perfil de resistencia a los 15 antibióticos utilizados y finalmente la detección fenotípica de BLEE mediante el método de doble disco (Figura 24). Se obtuvieron 24 cepas (3,5%) productoras de BLEE y fueron identificadas con la siguiente numeración del registro de muestras del CMDLT: 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771, 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160.

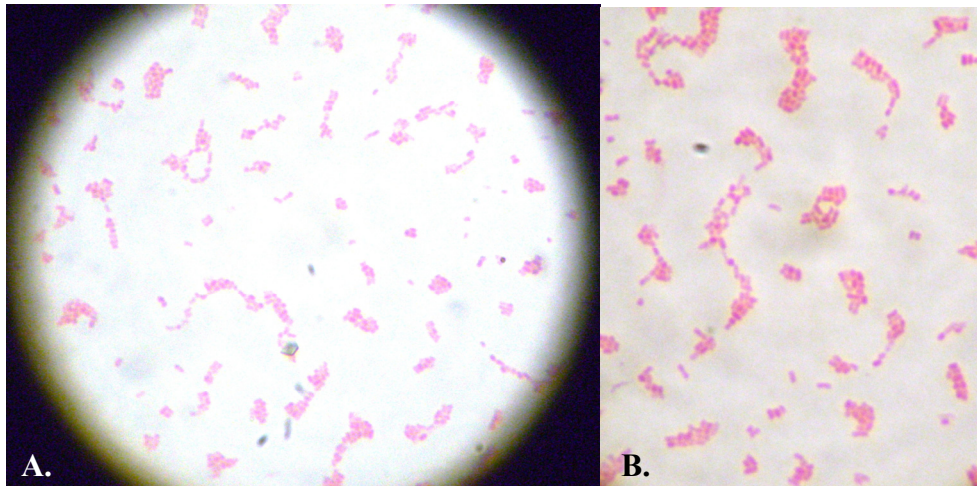


Figura 23. Fotografía de la Tinción Gram. A. Vista al microscopio con objetivo de 100X. B. Zoom de fotografía A. Se observan los bacilos Gram negativos de *E.coli*.

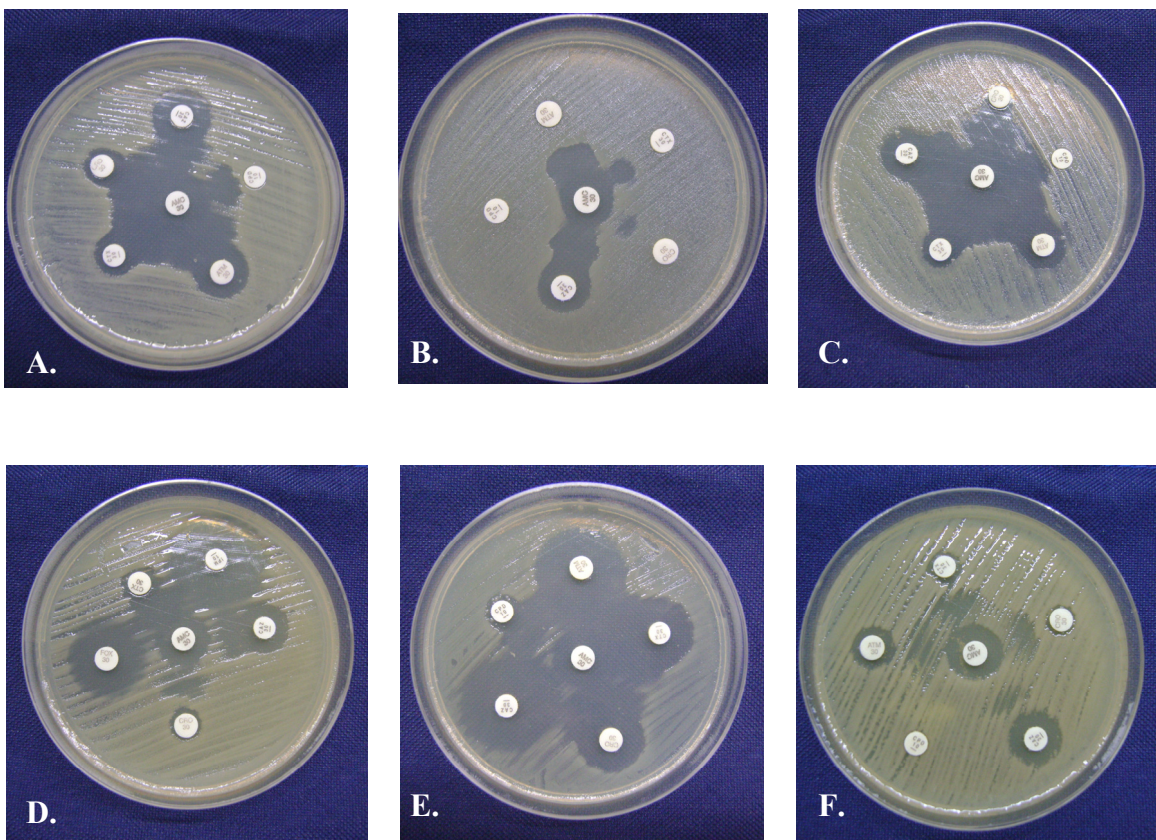


Figura 24. Detección fenotípica de BLEE. A, B, C, D E, F: cepas de *E.coli* con expresión de BLEE. Se observa el ampliamiento del halo de inhibición de crecimiento por efecto de sinergia ente el disco de AMC ubicado en el centro del antibiograma hacia los discos de cefalosporinas (CTX, CRO, CAZ, CPD) y ATM, indicando la inhibición de la expresión BLEE por el ácido clavulánico.

A las cepas que presentaron sensibilidad a los β -lactámicos y no se observaba claramente el efecto de sinergia con AMC, se les realizó la prueba confirmativa para BLEE. Se identificaron las cepas que mostraran una ampliación del halo de inhibición de crecimiento por encima de 5mm como fue el caso de las cepas 2977, 2997, 3323, 3926 y 4646.

7.2. Perfil de resistencia

Se obtuvo que las 24 cepas de *E.coli* resistentes a β -lactámicos, presentan un perfil de multirresistencia a diferentes antibióticos de los diferentes grupos de las cefalosporinas, carbapenems, monobactámicos, aminoglucósidos, quinolonas e inhibidores de la ruta de folato (Tabla 15).

Tabla 15. Perfil de resistencia.

Antibióticos	NRO.MUESTRA																							
	*11714	11762	12078	12108	*12306	714	791	1250	1551	1771	1890	2164	2739	*2977	2997	3267	3323	3610	3926	4383	4372	4476	4646	5160
Amoxicilina-Clavulánico (AMC)	S	R	S	R	S	I	I	S	S	R	S	S	S	S	I	S	S	I	-	S	I	S	S	I
Cefotaxime (CTX)	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	-	R	R	R	S	I
Ceftriaxone (CRO)	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
Cefoxitine (FOX)	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R
Ceftazidime (CAZ)	S	R	S	R	S	I	S	I	I	R	S	I	S	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cefpodoxime (CPD)	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R
Imipinem (IMP)	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S	S	S
Aztreonam (ATM)	R	R	R	-	R	R	S	R	I	R	R	R	I	R	R	I	I	R	S	S	I	R	I	S
Gentamicina (GN)	S	S	S	-	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S
Amikacina (AN)	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina (TOB)	S	R	R	S	S	R	R	S	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R
Ciprofloxacina (CIP)	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ofloxacina (OFX)	S	R	R	-	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acido Nalidíxico (NAL)	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Trimetroprim-Sulfametoxazole (SXT)	S	R	R	-	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S: sensible, I: sensibilidad intermedia. R: resistente, (-): no se determino. (*): cepas sensibles a fluoroquinolonas.

Del total de las cepas analizadas encontramos que 21 de ellas son resistentes a fluoroquinolonas y 3 son sensibles CIP y OFX, de estas últimas la cepa 2977 es resistente a NAL. Estas 3 cepas se evaluaron como posibles controles negativos para la presencia de genes *qnr*.

El grupo de antibióticos al cual las muestras de estudio presentaron mayor resistencia fueron las quinolonas, para las cuales el 87% de las cepas de *E.coli* fueron resistentes a CIP y OFX, y para NAL se obtuvo el 91,7% de resistencia. Seguido de este grupo, como era de esperarse por ser productoras de BLEE, fueron las cefalosporinas de 3ra y 4ta generación teniendo como resultado que el 79,2% era resistente a CTX, el 75% a CRO, el 100% a CPD, pero sólo el 20,8% fueron resistentes a CAZ, indicando que las BLEE no hidrolizan las distintas cefalosporinas por igual. Sólo el 21,7% de las cepas fueron resistentes a FOX y esto se debe a que este antibiótico es menos hidrolizado por productores de BLEE y por otro lado, las cepas resistentes a FOX también pueden poseer una β -lactamasa cromosómica inducible (AmpC) capaz de hidrolizar eficientemente este antibiótico. Adicional a este grupo de antibióticos tenemos que el 56,5% de las cepas pueden hidrolizar ATM que también es indicador de producción de BLEE (Tabla 16).

En el grupo de los aminoglucósidos el porcentaje de mayor resistencia lo encontramos en TOB con un 62,5%, seguido de GN al cual presentaron un 34,8 % de resistencia las cepas de estudio, mientras que la resistencia a SXT fue de 83,3%. Hasta ahora la resistencia de las cepas en estudio está por encima del 50% de los antibióticos evaluados y sólo mostraron 100% de sensibilidad a IMP y AN, constituyendo estos últimos antibióticos la mejor opción terapéutica para estos pacientes en particular.

Una vez caracterizado el perfil de resistencia de cada cepa a estudiar, se procedió a crecerlas en caldo LB, para aislar su material genético por el método de Levesqué y con este realizar la detección de los genes *bla*, *qnr* y *qepA*.

Tabla 16. Porcentaje de resistencia a los diferentes antibióticos utilizados. Se indica el número de muestras resistentes a cada antibiótico y su porcentaje.

Antibióticos	N (%)
Amoxicilina-Clavulánico (AMC)	4 (17,4)
Cefotaxima (CTX)	19 (79,2)
Ceftriaxona (CRO)	18 (75)
Cefoxitina (FOX)	5 (21,7)
Ceftazidima (CAZ)	5 (20,8)
Cefpodoxima (CPD)	24 (100)
Imipinem (IMP)	0 (0)
Aztreonam (ATM)	13 (56,5)
Gentamicina (GN)	8 (34,8)
Amikacina (AN)	0 (0)
Tobramicina (TOB)	15 (62,5)
Ciprofloxacina (CIP)	20 (87)
Ofloxacina (OFX)	20 (87)
Acido Nalidíxico (NAL)	22 (91,7)
Trimetoprim-Sulfametoxazole (SXT)	20 (83,3)

N: número de cepas resistentes. (%): porcentaje de cepas resistentes

7.3. Confirmación de presencia del ADN molde

La confirmación de presencia de ADN amplificable para todas las muestras en general se realizó mediante el PCR universal, con el juego de iniciadores que amplifican el gen rRNA 16S, U1 y U2. Todas las muestras amplificaron la región del gen con el producto esperado de 996pb y una banda inespecífica de 100pb aproximadamente la cual esta reportada que también amplifica con estos iniciadores (figuras 25, 26 y 27). Este resultado descarta los posibles falsos negativos para las muestras en las cuales no se obtuvieron amplificados para los genes del estudio.

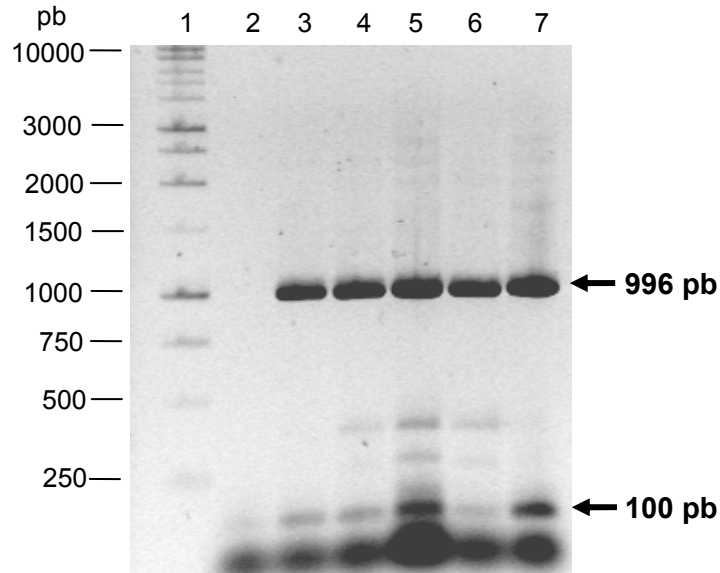


Figura 25. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *16S rRNA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Negativo (Agua). Carril 3: Control Positivo cepa J-62. Carriles del 4 al 7: Cepas de estudio número 5160, 3267, 791, 11714. Se destaca el fragmento de aproximadamente 996pb que garantiza la presencia e integridad de ADN molde en la muestra y un fragmento no específico de 100pb.

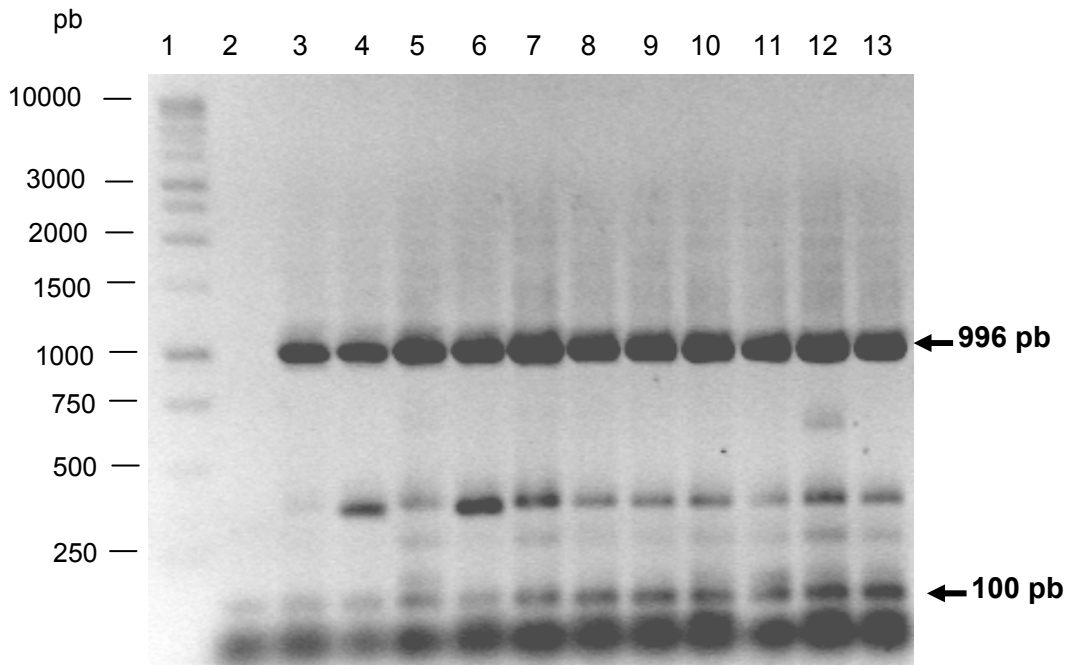


Figura 26. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *16S rRNA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Negativo (Agua). Carril 3: Control Positivo (*E. coli* J-62). Carriles del 4 al 13: Cepas de estudio número 4383, 2739, 1890, 1551, 1250, 714, 12306, 12108, 12078, 11762. Se destaca el fragmento de aproximadamente 996pb que garantiza la presencia e integridad de ADN molde en la muestra y un fragmento no específico de 100pb.

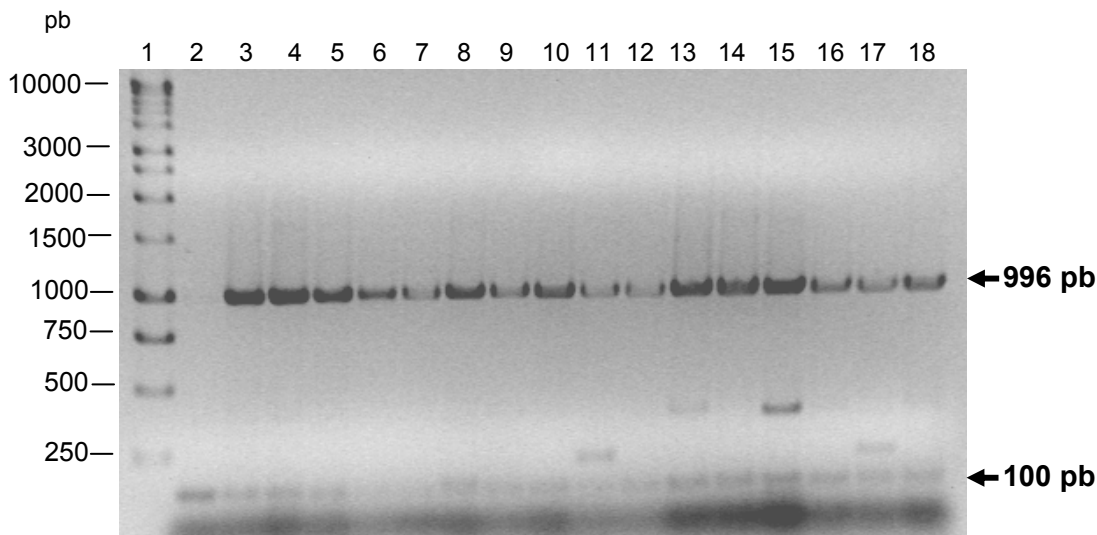


Figura 27. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *16S rRNA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Negativo (Agua). Carril 3: Control Positivo (*E. coli* J-62). Carriles del 4 al 8: Controles positivos para *qnrS* (*E. coli* # 55), *qnrB* (*E. coli* # 59), *qnrA* (*K. pneumoniae* UAB1), *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}* (*K. pneumoniae* 700603), y *bla_{CTX-M}* (*E. coli* 2944). Carriles del 9 al 18: Cepas de estudio número 4372, 3323, 2164, 3926, 2977, 2997, 4476 3610, 4646, 1771. Se destaca el fragmento de aproximadamente 996pb que garantiza la presencia e integridad de ADN molde en la muestra y un fragmento no específico de 100pb.

7.4. Incidencia de genes *bla*

La identificación del gen *bla* con material purificado de cada una de las cepas de estudio se realizó mediante PCR con iniciadores específicos que amplifican la región de los genes *bla* de tipo SHV, TEM y CTX-M. Los amplificadores de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* se observaron en geles de 1,2%, debido al tamaño que amplifica cada juego de iniciadores.

La incidencia del gen *bla_{SHV}* en las muestras se determinó utilizando el juego de iniciadores SHV-F y SHV-R y se obtuvieron 3 cepas portadoras de este gen (12,5%). Estos aislados amplificaron la banda de 475pb esperada para el gen *bla_{SHV}*, teniendo así que las cepas productoras de este tipo de BLEE son las cepas 12108 (carril 4, figura 28), 2977 (carril 4, figura 29), 5160 (carril 16, figura 29).

En el registro fotográfico de los productos amplificados para este gen (figuras 28 y 29) se observa una banda de un tamaño aproximado de 600pb que corresponde a inespecificidades de la reacción de PCR. Esta suposición fue confirmada al variar las condiciones iniciales de la reacción,

ya que al modificar las condiciones disminuye la afinidad por este producto (figura 30), y no se obtuvo la banda en esas muestras probables positivas.

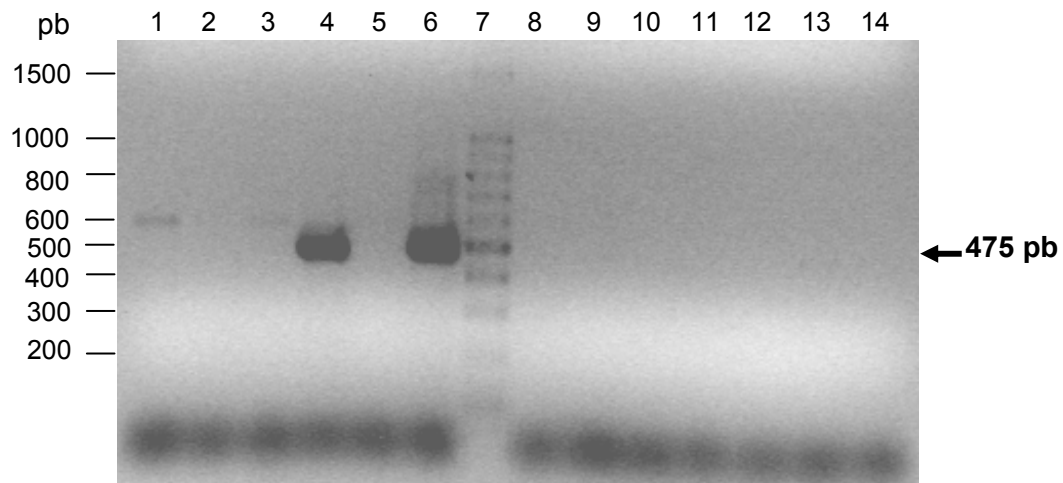


Figura 28. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla_{SHV}*. Carriles del 1 al 5 y del 9 al 13: Cepas de estudio número 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771. Carril 6: Control Positivo. Carril 7: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 8: Control Negativo. Carril 14: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 475pb que corresponde al gen *bla_{SHV}* en la cepa 12108 (carril 4).

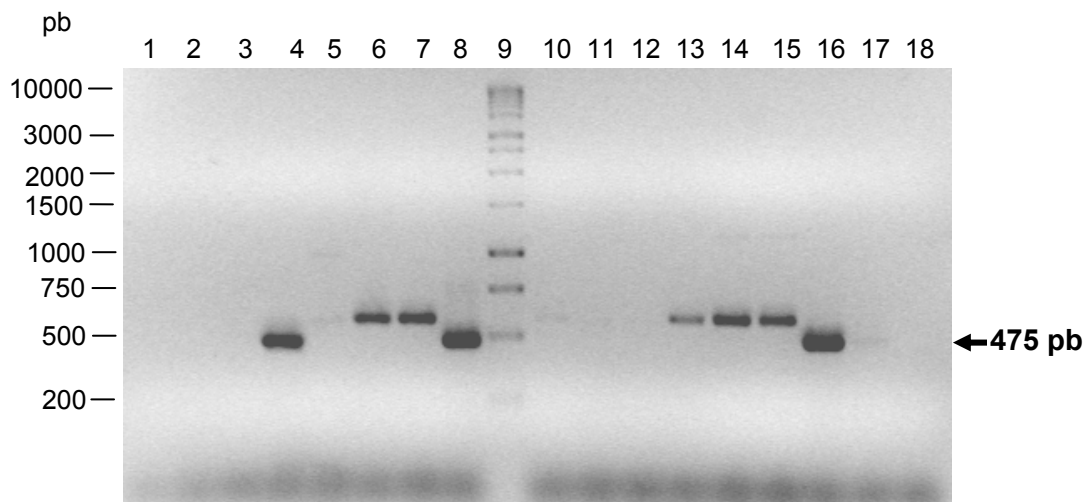


Figura 29. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla_{SHV}*. Carriles del 1 al 7 y del 11 al 17: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 10: Control Negativo. Carril 18: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 475pb que corresponde al gen *bla_{SHV}* en las cepas 2977 y 4646.

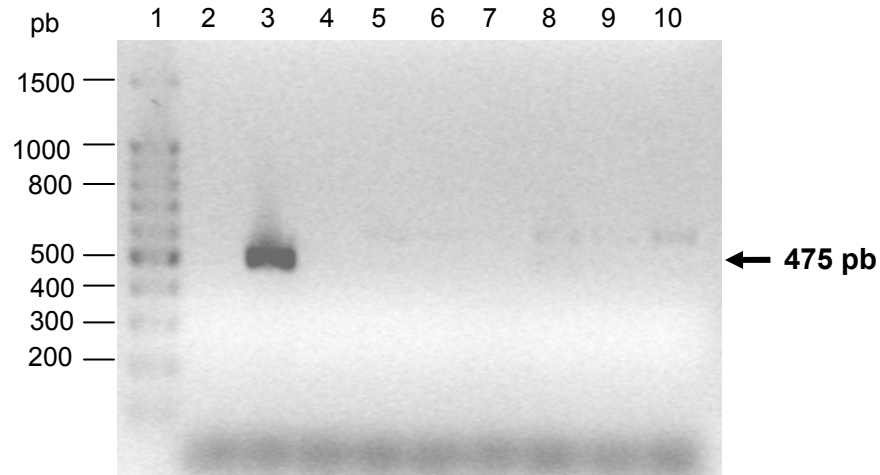


Figura 30. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla_{SHV}*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Negtivo. Carril 3: Control Positivo. Carriles del 4 al 10: Cepas de estudio número 11714, 12078, 3267, 3323, 4372, 4383, 4476. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 475pb correspondiente al gen *bla_{SHV}*.

La incidencia del gen *bla_{TEM}* en las cepas de estudio fue determinado mediante la reacción de PCR con el juego de iniciadores TEM-F y TEM-R. Los resultados demostraron 25% de incidencia, correspondiente a 6 cepas portadoras de este gen, las cuales amplificaron una banda de 374pb como se muestra en el registro fotográfico de de la corrida electroforética (figuras 31 y 32).

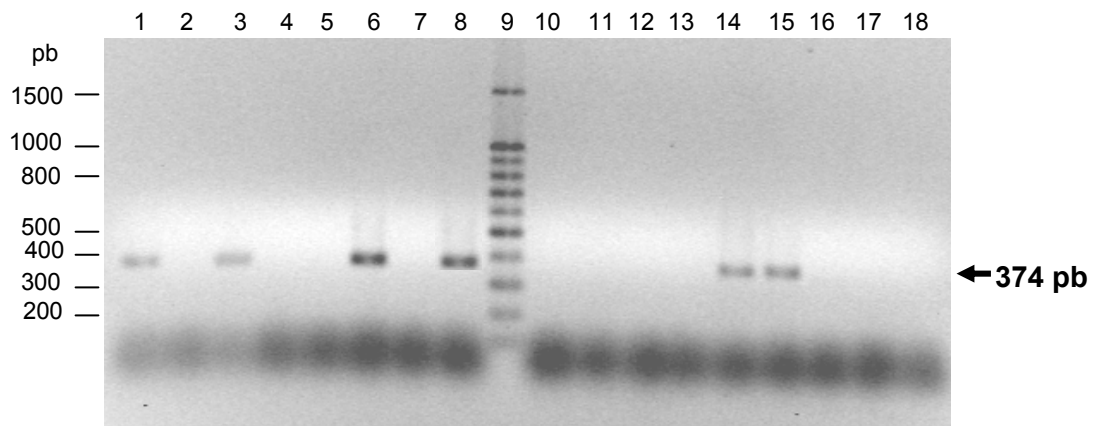


Figura 31. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla_{TEM}*. Carriles del 1 al 7 y del 11 al 17: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 10: Control Negativo. Carril 18: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 367pb que corresponde al gen *bla_{TEM}* en las cepas 1890, 2739, 3267, 4383 y 4476.

Se obtuvieron algunas bandas inespecíficas en la reacción de PCR para el gen *bla*_{TEM} (datos no mostrados), por lo cual se ensayaron nuevamente esas muestras en otra PCR variando las condiciones, con los mismos iniciadores para este gen (figura 32) y se obtuvo que solo la cepa 12108 (carril 7, figura 32) era positiva para este gen.

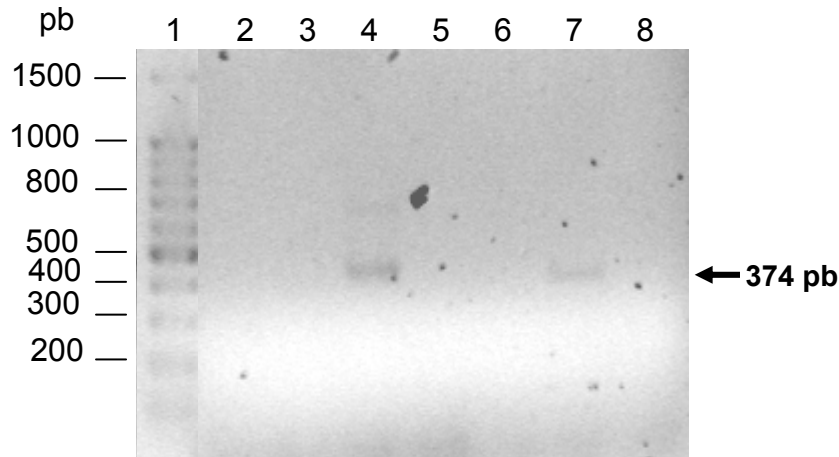


Figura 32. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla*_{TEM}. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Agua. Carril 3: Control Negativo. Carril 4: Control Positivo. Carriles del 4 al 10: Cepas de estudio número 1551, 791, 12078, 11714. Se destaca el fragmento de aproximadamente 367pb que corresponde al gen *bla*_{TEM} en la cepa 12078.

Las 6 cepas portadoras de este tipo de BLEE fueron la 1890 (carril 1, figura 31), 2739 (carril 3, figura 31), 3267 (carril 6, figura 31), 4383 (carril 14, figura 31), 4476 (carril 15, figura 31) y 12078 (carril 7, figura 32).

Para el gen *bla*_{CTX-M} la incidencia en las muestras se determinó utilizando el juego de iniciadores CTX-M-F y CTX-M-R. Se obtuvieron 21 cepas portadoras de este tipo de BLEE (87,5%). Estas cepas amplificaron la banda esperada para este gen de 543pb como se observa en el registro fotográfico de la corrida electroforética (figuras 33 y 34), estas cepas fueron 11714 (carril 1, figura 33), 11762 (carril 3, figura 33), 12078 (carril 4, figura 33), 12306 (carril 6, figura 33), 714 (carril 10, figura 33), 791 (carril 11, figura 33), 1250 (carril 12, figura 33), 1551 (carril 13, figura 33), 1771 (carril 14, figura 33), 1890 (carril 1, figura 34), 2164 (carril 2, figura 34), 2739 (carril 4, figura 34), 2997 (carril 5, figura 34), 3267 (carril 6, figura 34), 3323 (carril 7, figura 34), 3610

(carril 11, figura 34), 3926 (carril 12, figura 34), 4372 (carril 13, figura 34), 4383 (carril 14, figura 34), 4476 (carril 15, figura 34) y 5160 (carril 17, figura 34).

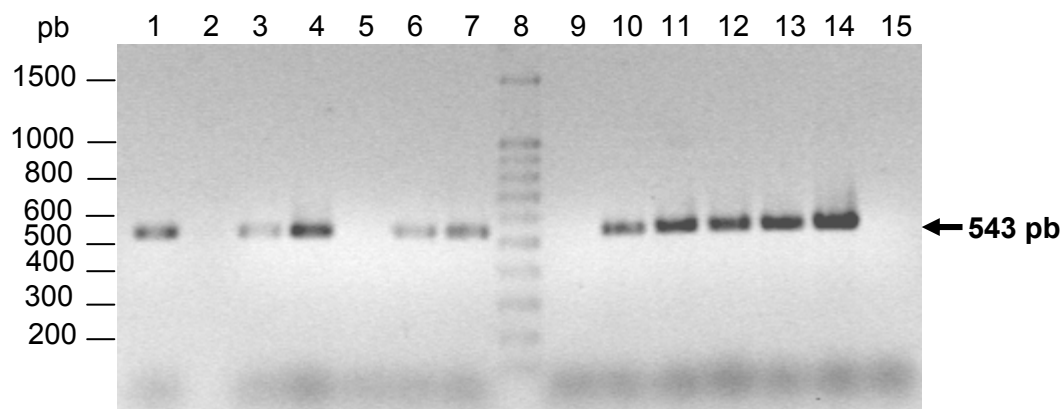


Figura 33. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla*_{CTX-M}. Carriles 1, del 3 al 5 y del 9 al 13: Cepas de estudio número 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771. Carril 2: vacío. Carril 7: Control Positivo. Carril 8: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 9: Control Negativo. Carril 15: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 543pb que corresponde al gen *bla*_{CTX-M} en las cepas 11714, 11762, 12078, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771.

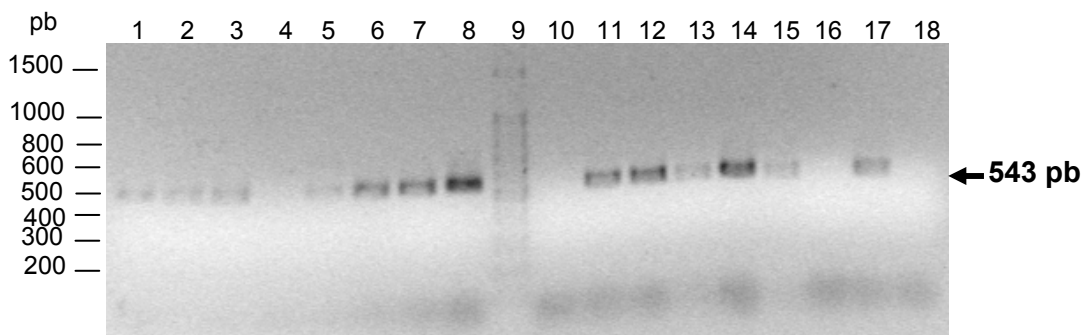


Figura 34. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *bla*_{CTX-M}. Carriles del 1 al 7 y del 11 al 17: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 10: Control Negativo. Carril 18: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 543pb que corresponde al gen *bla*_{CTX-M} en las cepas 1890, 2164, 2739, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476 y 5160.

En particular, los resultados demuestran que 6 cepas portadoras del gen *bla*_{CTX-M} (25%) tienen también asociados el gen *bla*_{TEM}, (12078, 1890, 2739, 3267, 4383 y 4476).

La amplificación por PCR con los iniciadores específicos para cada gen, reveló que el fenotipo de BLEE cefotaximasas encontrado en el perfil de resistencia de las cepas de estudio, concuerda con los resultados obtenidos para el gen *bla*_{CTX-M}. Estas enzimas se caracterizan por

conferir resistencia de alto nivel a la CTX y CPD, prácticamente sin incrementar las CMI de CAZ, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Estos resultados corresponden al mayor porcentaje de incidencia de los genes *bla* evaluados (Tabla 17).

Tabla 17. Incidencia de genes *bla*.

Gen <i>bla</i>	n/(%)
SHV	3 (12,5)
TEM	6 (25)
CTX-M	21 (87,5)

} 6 (25)

n: número de cepas resistentes. (%): porcentaje de cepas resistentes

7.5. Incidencia de genes *qnr* y *qepA*

La identificación de los genes *qnr* y *qepA* también se realizó con material purificado de cada una de las cepas de estudio, mediante PCR con iniciadores específicos que amplifican la región de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* y *qepA*. Los amplificados de estos genes se observaron en geles de 1,2%, debido al tamaño que amplifica cada juego de iniciadores.

La incidencia del gen *qnrA* en las muestras se determinó utilizando el juego de iniciadores QP1 y QP2, para los cuales se esperaba un amplificado de 593pb (figuras 35 y 36). Sin embargo, en ninguna de las muestras de estudio se observó dicho producto de PCR, indicando que estas cepas no son portadoras de este gen, lo cual coincide con los datos incidencia reportados por López en el 2007 para nuestro país, al igual que en otros países de Latinoamérica donde se ha reportado en una baja incidencia del gen *qnrA*.

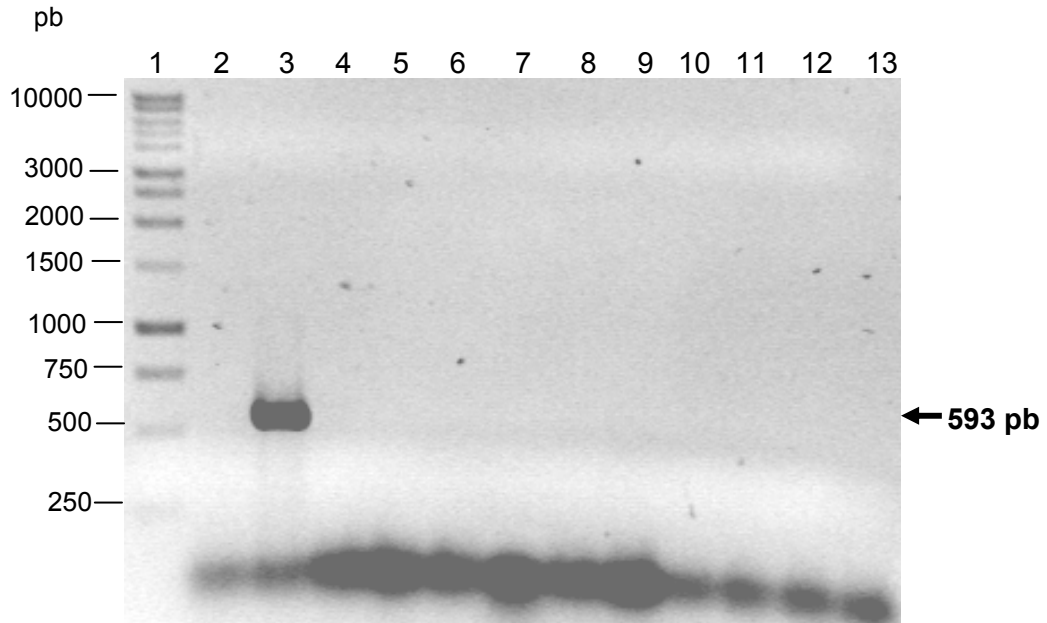


Figura 35. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Negativo. Carril 3: Control Positivo. Carriles del 4 al 13: Cepas de estudio número 11714, 791, 4383, 1890, 1250, 2739, 5160, 1551, 3267, 714. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 593pb que corresponde al gen *qnrA*.

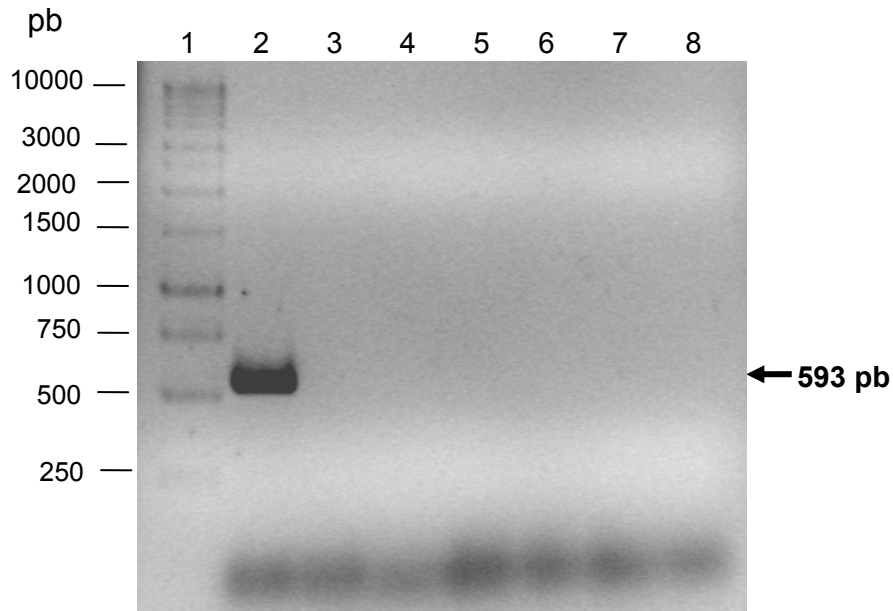


Figura 36. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Positivo. Carril 3: Control Negativo. Carriles del 4 al 7: Cepas de estudio número 1771, 4476, 2997, 4372. Carril 3: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 593pb que corresponde al gen *qnrA*.

Para detectar la presencia del gen *qnrB* en las cepas de estudio, se utilizó el juego de iniciadores QNRBF y QNRBR que generan un producto de amplificación de de 469pb (figuras 37 y

38). Se obtuvieron 5 cepas positivas para este gen que fueron 12306 (carril 4, figura 37), 4646 (carril 6, figura 37) y 2977 (carril 13, figura 37), 1551 (carril 11, figura 38) y 3267 (carril 12, figura 38). La incidencia de este gene fue de 20,8%. Particularmente las cepas 12306 y 2977 son sensibles a quinolonas (CIP, OFX, NAL), lo cual indica que efectivamente este gen sólo confiere bajos niveles de resistencia a quinolonas.

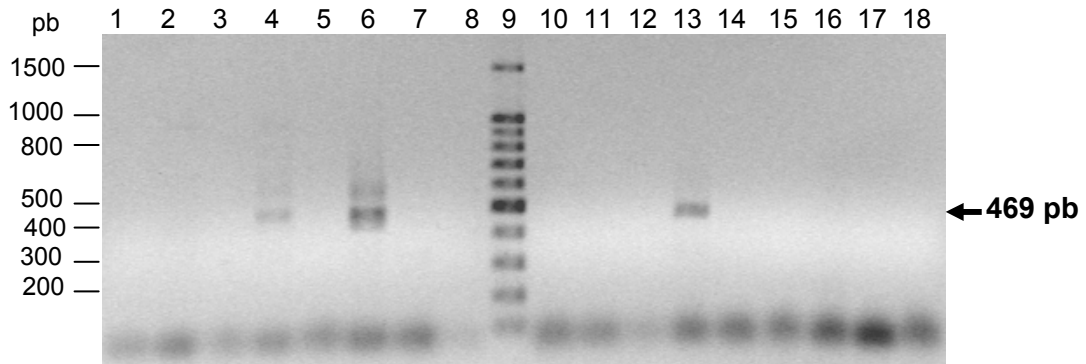


Figura 37. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrB*. Carriles del 1 al 7 y del 11 al 17: Cepas de estudio número 11762, 12078, 12108, 12306, 1771, 4646, 3610, 4476, 2997, 2977, 3926, 2164, 3323, 4372. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 10: Control Negativo. Carril 18: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 469pb que corresponde al gen *qnrB* en las cepas 12306, 4646 y 2977.

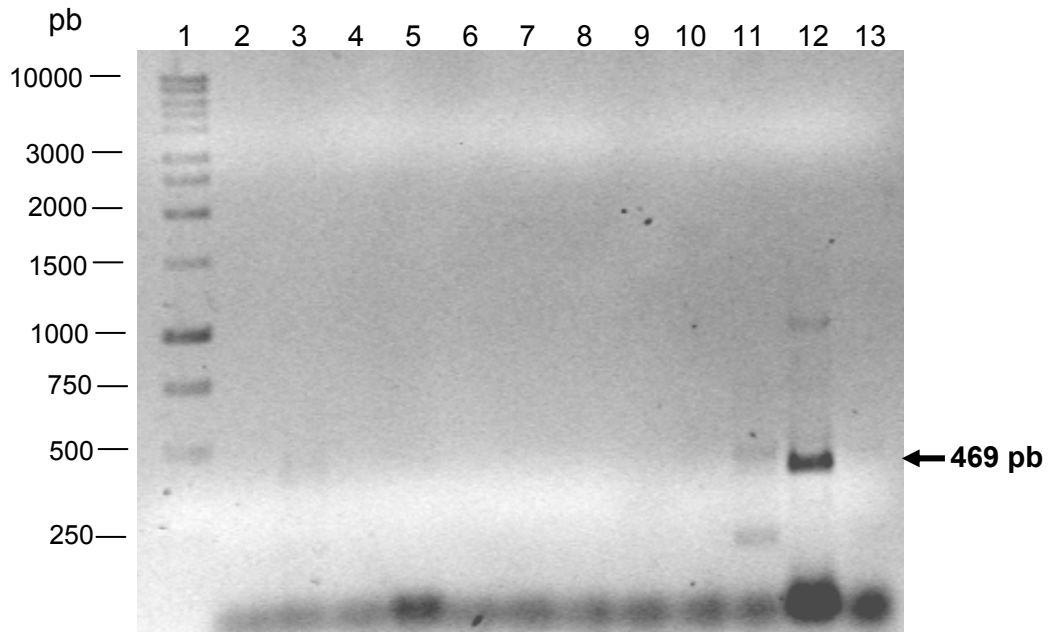


Figura 38. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrB*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 2: Control Negativo. Carril 3: Control Positivo. Carriles del 4 al 13: Cepas de estudio número 11714, 791, 4383, 1890, 1250, 2739, 5160, 1551, 3267, 714. Se destaca el fragmento de aproximadamente 469pb que corresponde al gen *qnrB* en las cepas 1551 y 3267.

Para determinar la incidencia del gen *qnrS* en las cepas de estudio, se realizó la reacción utilizando el juego de iniciadores S1 y S2, con los cuales se obtuvieron 4 cepas portadoras de este gen (16,7%) que amplifican un producto de 417pb como se muestra en el registro fotográfico de la corrida electroforética (figuras 39 y 40). Estas cepas fueron 11714 (carril 1, figura 39), 1771 (carril 13, figura 39), 2739 (carril 3, figura 40), y 2977(carril 4, figura 40).

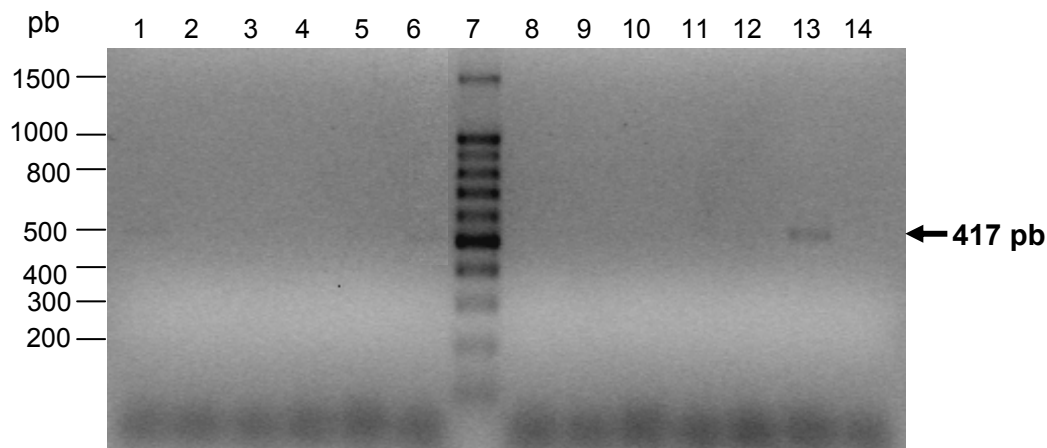


Figura 39. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrS*.
 Carriles del 1 al 5 y del 9 al 13: Cepas de estudio número 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771. Carril 6: Control Positivo. Carril 7: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 8: Control Negativo. Carril 14: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 417pb que corresponde al gen *qnrS* en las cepas 11714 y 1771.

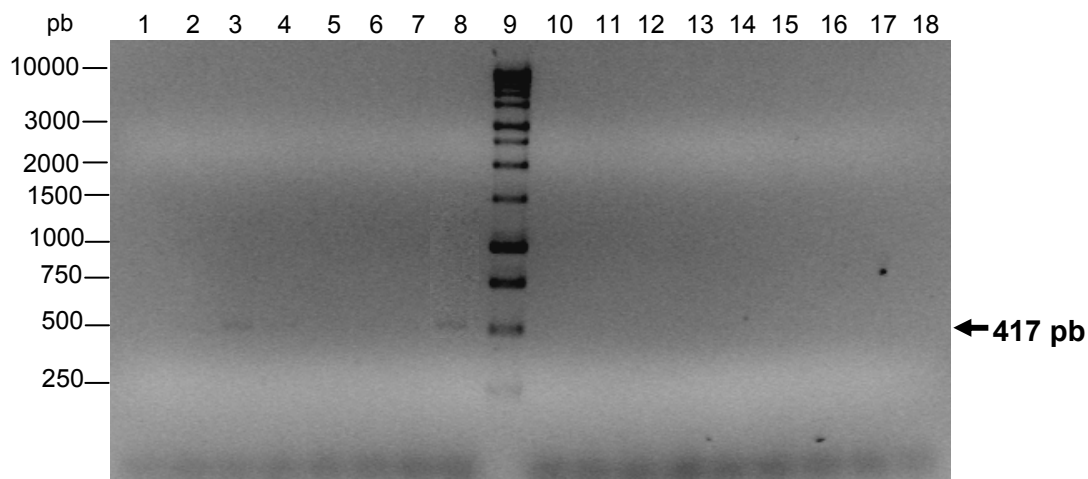


Figura 40. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrS*.
 Carriles del 1 al 7 y del 11 al 17: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 10: Control Negativo. Carril 18: Agua. Se destaca el fragmento de aproximadamente 417pb que corresponde al gen *qnrS* en las cepas 2739 y 2977.

La cepa 11714 presenta sensibilidad al grupo de las quinolonas y se determinó que posee el gen *qnrS*. La cepa 2977 es portadora del gen *qnrS* y también tiene asociado el gen *qnrB*, se caracteriza por ser sensible a fluoroquinolonas (CIP y OFX) pero resistente a NAL. Estos resultados nos permiten sugerir que la presencia de estos genes eleva la probabilidad de producir cepas resistentes a este tipo de antibióticos y la resistencia a este antibiótico en particular es indicador de presencia de *qnr*.

En vista de la baja incidencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en las cepas de estudio, se decidió evaluar la presencia de otros genes que produjeran resistencia a quinolonas, entre los cuales ensayamos los genes *qnrC*, *qnrD* y *qepA*.

Como resultado se obtuvo que ninguno de los aislados fue positivo para ninguno de estos genes *qnrC*, *qnrD* ni *qepA*, pues no se obtuvo los productos de amplificación esperados como se muestra en el registro fotográfico de la corrida electroforética para cada gen (figuras 41, 42, 44, 45, 47 y 48). Estos resultados coinciden con los reportes para estos genes a nivel mundial, los cuales indican una baja incidencia de estos genes en cepas de *E.coli*.

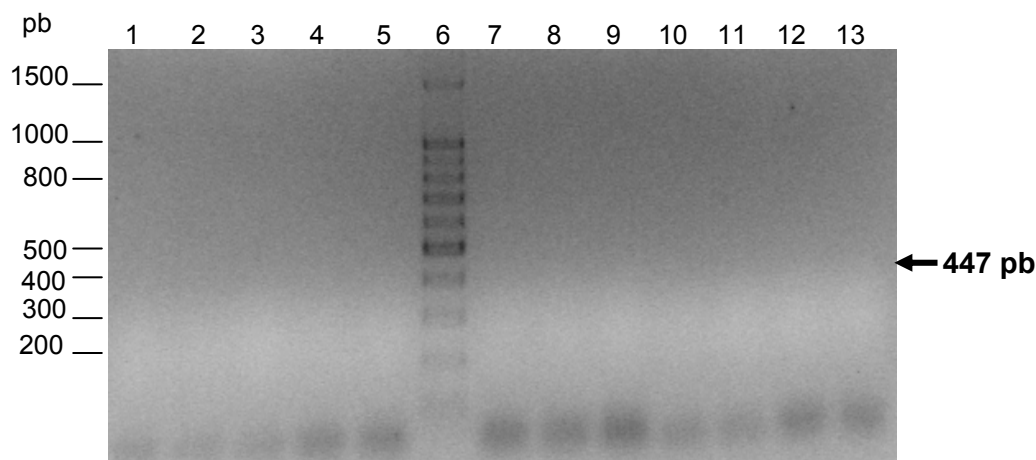


Figura 41. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrC*.
Carriles del 1 al 5 y del 7 al 11: Cepas de estudio número 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771. Carril 6: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 12: Control Negativo. Carril 13: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 447pb correspondiente al gen *qnrC*.

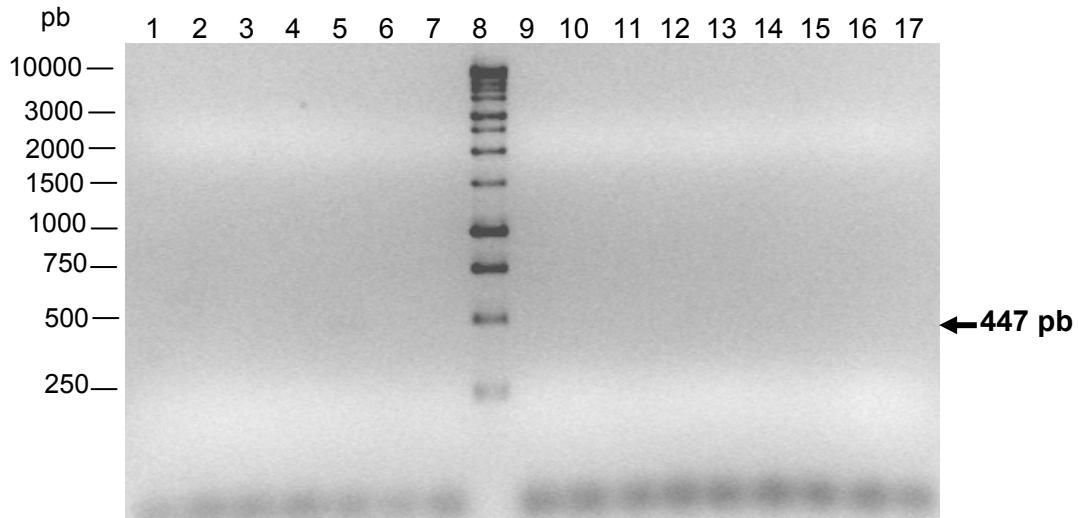


Figura 42. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrC*.
 Carriles del 1 al 7 y del 9 al 15: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 16: Control Negativo. Carril 17: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 447pb correspondiente al gen *qnrC*.

En la figura 42 se observa una producto de amplificado de tamaño aproximado al esperado para el gen *qnrC* en el carril 5 muy tenue. Para confirmar la presencia de este gen en la muestra se verificó en otra reacción de PCR con mayor cantidad de ADN (figura 43), sin embargo no se obtuvo ningún producto amplificado, indicando que la banda correspondía a inespecificidades producto de la reacción.

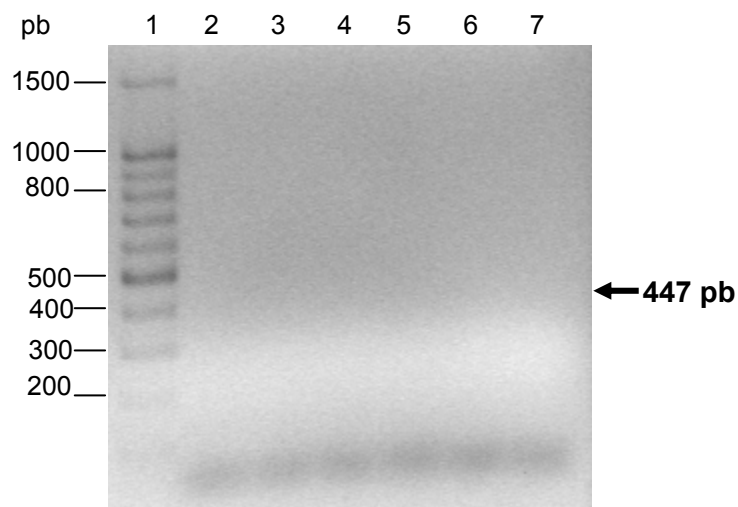


Figura 43. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrC*.
 Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carriles del 2 al 6: Cepas de estudio número 2997, 12078, 12108, 12306, 2739. Carril 7: Control Negativo. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 447pb correspondiente al gen *qnrC*.

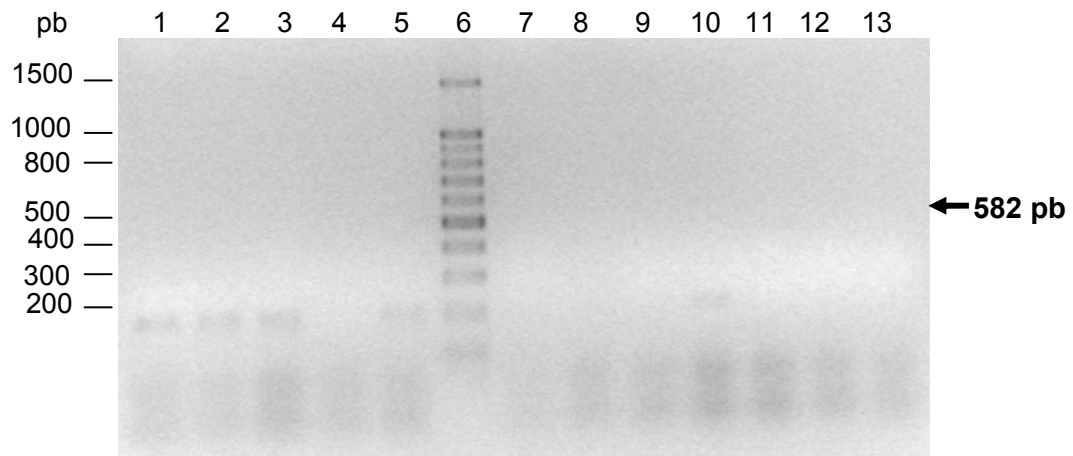


Figura 44. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrD*.
 Carriles del 1 al 5 y del 7 al 11: Cepas de estudio número 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771. Carril 6: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 12: Control Negativo. Carril 13: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 582pb correspondiente al gen *qnrD*. Las bandas de diferentes pesos moleculares del fragmento esperado corresponden a inespecificidades de las condiciones al momento de la realización del PCR.

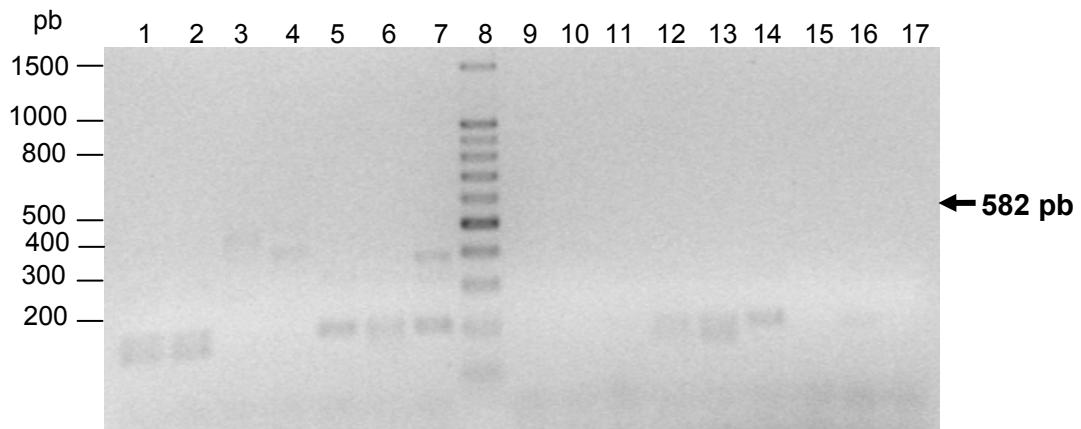


Figura 45. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrD*.
 Carriles del 1 al 7 y del 9 al 15: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Control Positivo. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 100Pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 16: Control Negativo. Carril 17: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 582pb correspondiente al gen *qnrD*. Las bandas de diferentes pesos moleculares del fragmento esperado corresponden a inespecificidades de las condiciones al momento de la realización del PCR.

En las figuras 44 y 45 se observan un producto amplificado de 200pb de base aproximadamente que corresponde a asociaciones de iniciadores (primer dimers) que pueden ocurrir en la reacción de PCR, ya que se verificaron las secuencias con las cuales amplifican los iniciadores utilizados para el gen *qnrD* con la base de datos GenBank del National Center for

Biotechnology Information (NCBI), empleando los servicios BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vía Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y sólo está reportado el producto de 582pb. Sin embargo, en la figura 45, aparecen bandas inespecíficas de otros tamaños y en los carriles 3 y 4, hay productos de peso molecular cercano al esperado por lo cual se evaluó la presencia de este gen en otra reacción de PCR con más cantidad de ADN. Los resultados demuestran que ninguna de las muestras amplificó el producto esperado (figura 46).

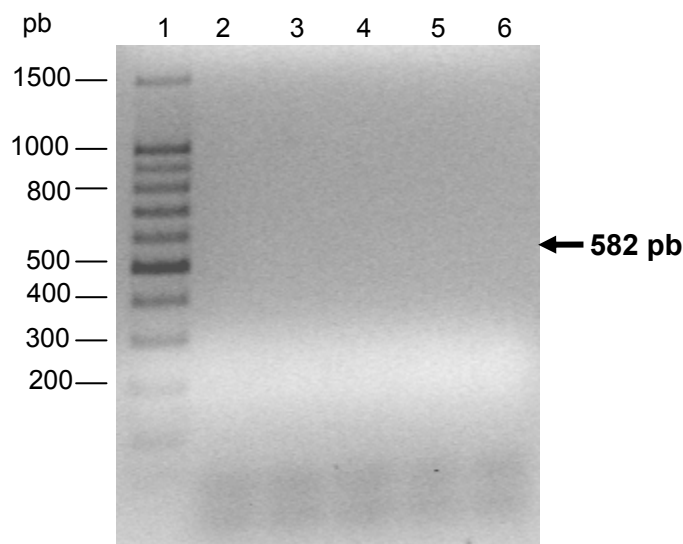


Figura 46. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificadores de PCR con iniciadores específicos para el gen *qnrD*.
Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carriles del 2 al 4: Cepas de estudio número 11714, 2977, 2997. Carril 5: Control Negativo. Carril 6: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 582pb correspondiente al gen *qnrD*.

En el registro fotográfico de la corrida electroforética para el gen *qepA* se observa un producto de amplificación de 400pb aproximadamente que no corresponde al producto esperado para este gen (figuras 47 y 48), por lo cual se verificó en la base de datos del GenBank, empleando la herramienta BLAST, las secuencias con las cuales amplifican los iniciadores utilizados para este gen y se encontraron reportes solo para un amplificado de 218pb de bases, sugiriendo que la banda de 400pb es una inespecificidad producto de la PCR.

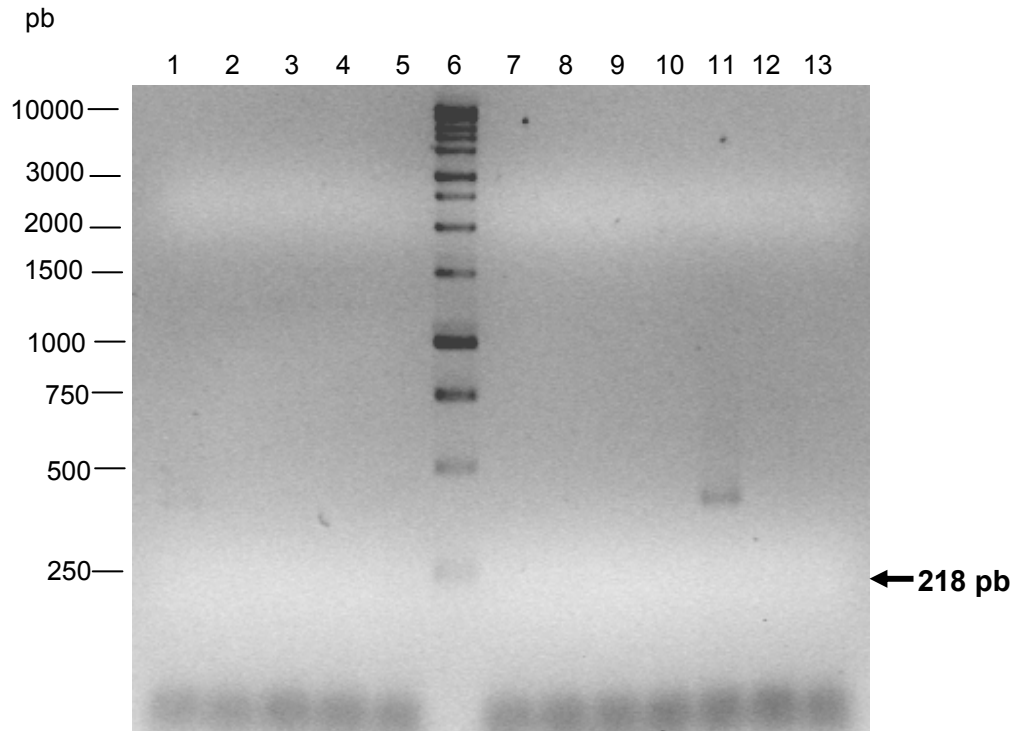


Figura 47. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qepA*.

Carriles del 1 al 5 y del 7 al 11: Cepas de estudio número 11714, 11762, 12078, 12108, 12306, 714, 791, 1250, 1551, 1771. Carril 6: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 12: Control Negativo. Carril 13: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 218pb correspondiente al gen *qepA*. Las bandas de diferentes pesos moleculares del fragmento esperado corresponden a inespecificidades de las condiciones al momento de la realización del PCR.

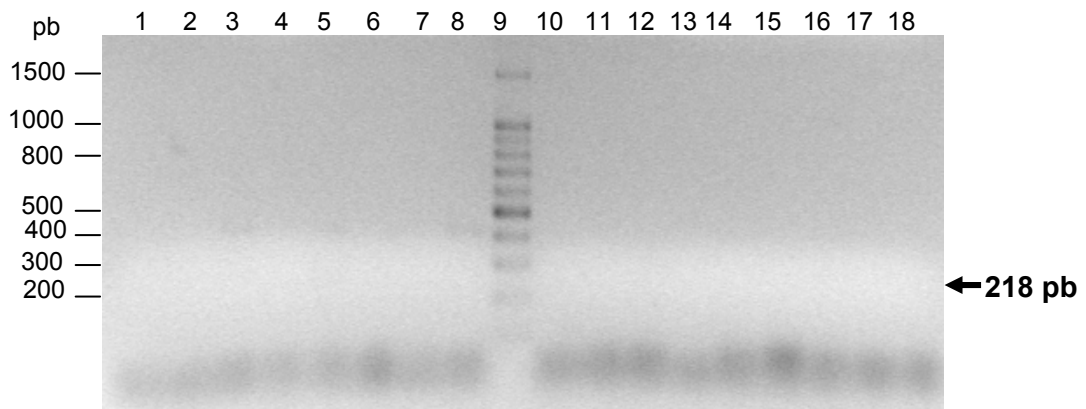


Figura 48. Registro fotográfico de corrida electroforética de los amplificados de PCR con iniciadores específicos para el gen *qepA*.

Carriles del 1 al 7 y del 11 al 17: Cepas de estudio número 1890, 2164, 2739, 2977, 2997, 3267, 3323, 3610, 3926, 4372, 4383, 4476, 4646, 5160. Carril 8: Cepa 1771. Carril 9: Marcador de Peso Molecular 100pb DNA Ladder (Promega Co., Madison, WI, USA). Carril 10: Control Negativo. Carril 17: Agua. Se observa que ninguna de las cepas de estudio amplificó la banda de aproximadamente 582pb correspondiente al gen *qepA*. Las bandas de diferentes pesos moleculares del fragmento esperado corresponden a inespecificidades de las condiciones al momento de la realización del PCR.

En este trabajo se obtuvo para las cepas en estudio una incidencia de genes *qnr* del 37,5%, con presencia sólo de genes *qnrB* y *qnrS*. Estos resultados parecen indicar que deben estar presentes otros mecanismos de resistencia a quinolonas en las cepas que carecen de genes *qnr* y *qepA*.

7.6. Co-existencia de genes *bla* y *qnr*

La co-existencia de genes *qnr* en estas cepas productoras de BLEE está evidenciada en 8 cepas de estudio (33,3%) (Tabla 18), de las cuales 4 cepas presentan *qnr* con el gen *bla*_{CTX-M}, 2 cepas con el gen *bla*_{SHV} y 2 cepas presentan simultáneamente genes *qnr* y genes *bla*_{TEM}/*bla*_{CTX-M}.

Tabla 18. Presencia de genes *bla*, *qnr* y *qepA*

Nro.Aislado	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qepA</i>
11714*	-	-	+	-	-	+	-	-	-
11762	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12078	+	-	+	-	-	-	-	-	-
12108	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12306*	-	-	+	-	+	-	-	-	-
714	-	-	+	-	-	-	-	-	-
791	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1250	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1551	-	-	+	-	+	-	-	-	-
1771	-	-	+	-	-	+	-	-	-
1890	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2164	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2739	+	-	+	-	-	+	-	-	-
2977*	-	+	-	-	+	+	-	-	-
2997	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3267	+	-	+	-	+	-	-	-	-
3323	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3610	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3926	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4372	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4383	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4476	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4646	-	+	-	-	+	-	-	-	-
5160	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(*) Cepas sensibles a fluoroquinolonas, (+) Aislados Positivos, (-) Aislados Negativos

8. Discusión

Entre las infecciones más importantes del ser humano, la infección de tracto urinario constituye un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año. La ITU es considerada como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas y, cuando su cuantificación es al menos 10^5 unidades formadoras de colonias UFC/mL de orina (Echeverría-Zarate y col., 2006).

E. coli es un comensal normal del tubo digestivo que puede causar infecciones en determinadas circunstancias. Se han identificado los determinantes genéticos para una serie de factores de virulencia que le facilitan la colonización de los diversos tejidos, con los cuales este microorganismo puede emigrar desde el intestino al tracto urinario, produciendo infección urinaria baja y eventualmente bacteremia o infecciones focales por vía hematológica (Zulaica y col., 2002).

E. coli es la causa más común de infección urinaria, especialmente entre las adquiridas en la comunidad, siendo responsable del 75% a 80% de los casos y, el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *S. saprophyticus*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella sp.*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* (Echeverría-Zarate y col., 2006). Algunas cepas tienen mayor predisposición para producir infección urinaria que otras, y las cepas que son resistentes de forma natural a la acción bactericida del suero humano, tienen mayor tendencia para producir infecciones urinarias bacteriémicas (García, 1998).

Más de la mitad de todas las mujeres tiene al menos una ITU durante su vida y su presentación más común es durante el embarazo. Un estudio realizado en Valencia, mostró que 188 de los casos con ITU (79,3%) correspondían al sexo femenino (Álvarez, 2005). La proporción de frecuencia de UTI entre mujeres y hombres jóvenes es de 30:1; sin embargo, conforme el hombre envejece, esta proporción tiende a igualarse (Echeverría-Zarate y col., 2006).

Los resultados de nuestro trabajo, en el que se analizaron 2981 muestras de orina recolectadas en el período de Noviembre 2008 a Mayo 2009, obtenidas de pacientes que asistieron a consulta ambulatoria al CMDLT, demuestran que el 30,4% de los pacientes atendidos presentan

ITU. La población que se encontró mas afectada fue la femenina (79,2%), con una incidencia mayor en personas con edades >65 años, siendo el microorganismo predominante *E.coli* representando el 76,4% de todos los aislados de ITU analizados. Estos resultados son consistentes con los diversos estudios, tanto a nivel nacional e internacional, que reportan una frecuencia alta de *E.coli* como agente etiológico de ITU y su predominio en el sexo femenino, debido a la constitución anatómica del tracto genital de la mujer.

Las estrategias de control diseñadas para combatir las infecciones han sido dirigidas a la creación de fármacos que actúan sobre los procesos celulares fundamentales que realizan las bacterias. Los antibióticos forman parte de este grupo de fármacos.

Las ITU son causa frecuente de consulta en atención primaria. La aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos usados para el tratamiento de estas infecciones ha ido aumentando, dificultando cada vez más la toma de decisiones con respecto al tratamiento inicial.

Se ha reportado un cambio significativo en la resistencia a antibióticos de las Enterobacterias, mostrando un incremento en la población bacteriana resistente a los antibióticos orales de uso común, excediendo el 20% de resistencia y con tendencia al aumento, sobretodo para beta-lactámicos y fluoroquinolonas (Valenzuela y col., 2005; Barela y col., 2005; Serrano y col., 2005).

La incidencia de la resistencia a las fluoroquinolonas se ha visto incrementada drásticamente en los últimos años, como ya hemos descrito, por el uso indiscriminado en los tratamientos con este tipo de antibióticos (Gottesman y col., 2009), y ha sido descrita principalmente en aislamientos nosocomiales. Sin embargo, reportes a nivel mundial, describen la resistencia a diversos antibióticos entre bacterias responsables de ITU adquiridas en la comunidad (Gupta y col., 2001).

En nuestros resultados de las cepas de *E.coli* aisladas de los pacientes con ITU del CMDLT, se obtuvieron 24 cepas (3,5%) productoras de enzimas tipo BLEE, que presentan un perfil de resistencia a diferentes familias de antibióticos, entre 4 a 11 antibióticos. Los valores de resistencia

más elevados están representados principalmente por las quinolonas NAL, CIP y OFX, 91%, 87% y 87% respectivamente, y las cefalosporinas, CTX, CRO y CPD con 79%, 75% y 100% respectivamente. Estos valores concuerdan con otros reportes a nivel nacional e internacional donde se encuentra asociación de bacterias productoras de BLEE con resistencia a fluoroquinolonas (Perozo-Mena, 2005; Delgado y col., 2006; Lavigne y col., 2006; Lagacé-Wiens y col., 2007; Song y col., 2009).

Todas las cepas evaluadas también presentaron resistencia elevada a SXT 83,3%, TOB 62,5% y ATM 56,5%, unos valores menores de resistencia para CAZ, FOX, GN, AMC y no presentaron resistencia a IMP ni AN. Dado que el mecanismo principal de resistencia de las enzimas BLEE es de naturaleza plasmídica, es de esperarse estos perfiles de multiresistencia, ya que los plásmidos conjugativos que transportan los genes que codifican BLEE, simultáneamente portan genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol, entre otros (Guzmán y col., 2008).

La predominancia de las resistencias a diferentes antibióticos varía en diferentes países y en distintas poblaciones, teniendo así que las resistencias a los antibióticos en America del Sur, España y Turquía son mas elevados que los reportados en EE.UU y Europa Central (Erb y col., 2007).

En concordancia con nuestros resultados, existe un reporte en Kenya, en cepas de *E.coli* productoras de BLEE provenientes de pacientes de la comunidad que presentaban ITU, en el cual se encontró una predominancia en la resistencia de AMP, CTX, CRO, NAL, CIP, LEV, CAZ, GN y susceptibilidad a IMP. Este trabajo resaltó la emergencia que presenta la alta tasa de resistencia de las bacterias causantes de estas infecciones, a los antibióticos comúnmente utilizados para su tratamiento y, plantea un reto importante en la gestión de la terapia antibiótica de las infecciones urinarias (Kariuki y col., 2007).

Los valores reportados a nivel nacional de resistencia a SXT en comparación con nuestros resultados, indican que hubo un incremento en la resistencia para este antibiótico en particular en este tipo de infecciones, partiendo de valores de 32,3% de cepas con resistencia hasta 83,3%, lo cual

sugiere orientar la investigación sobre la relación entre los determinantes de resistencia a BLEE y fluoroquinolonas con SXT en microorganismos causantes de estas infecciones (Angiolillo, 2007).

Esta situación en las bacterias Gram negativas se vuelve compleja, ya que al parecer no hay límite a la serie de β -lactamasas que se pueden desarrollar, y a su propagación en todo el mundo, ya que se siguen reportando cada vez más variantes de las mismas, causando grave preocupación. En los últimos años se ha producido un aumento en la incidencia de Enterobacterias productoras de BLEE, principalmente *E. coli*, teniendo una explosión de publicaciones que cubre a todos los continentes y a más de 30 países (Díaz, 2008). Por otra parte, su vinculación con los elementos genéticos móviles portadores de determinantes de resistencia a aminoglucósidos y/o quinolonas garantizan un rápido aumento de la resistencia a múltiples antibióticos. Las BLEE tipo CTX-M están dejando de ser un problema hospitalario y se están extendiendo a la comunidad, desafiando el tratamiento oral de muchas infecciones como las ITU, ya que estas cepas también son a menudo resistentes a las quinolonas, tetraciclinas y SXT, considerándose un problema serio de salud pública por sus implicaciones clínicas y económicas (Gould, 2009).

En Latinoamérica las proporciones de prevalencia de BLEE son alarmantes, alcanzan tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil. La producción de BLEE en estos países mostraron variaciones marcadas de un país a otro, con rangos entre un 5% a 73%. Las enzimas comúnmente encontradas en Latinoamérica son SHV-2, SHV-4, SHV-5, CTX-M-2, CTX-M-8 y PER-2 (Máttar y Martínez, 2007; Pallecchi y col., 2007)

Este estudio se basó en la identificación molecular de los genes que confieren resistencia a β -lactámicos y quinolonas, *bla*, *qnr* y *qepA*, presentes de forma simultánea en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes que asistieron a consulta ambulatoria con ITU. Los resultados obtenidos para los genes *bla* señalan un predominio de cepas portadoras de los genes *bla*_{CTX-M} con una incidencia del 87,5%, seguido por el gen *bla*_{TEM} con una incidencia del 25% y, estas cepas estaban asociadas al gen *bla*_{CTX-M}, y por último el gen *bla*_{SHV} con una incidencia menor del 12,5% (Tabla 17).

Nuestros resultados difieren de los reportados a nivel nacional para genes *bla* en cepas de origen hospitalario del área metropolitana, los cuales indican que los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} están presentes en mayor proporción que *bla*_{CTX-M} (Torres y col., 2006; Hugo, 2006). Un estudio realizado en Korea, indica que las infecciones adquiridas en la comunidad están causadas por microorganismos productores de enzimas BLEE de tipo CTX-M, por lo general en ITU causadas por *E. coli*, debido a que sólo en las cepas portadoras de *bla*_{CTX-M} identificaron la proteína *Iha*, involucrada en la adherencia a las células del epitelio urinario y su presencia estuvo asociado a un mayor riesgo de recurrencia de infecciones urinarias (Song y col., 2009; Montell y Vidal, 2008).

Es importante destacar la co-expresión de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} en nuestros resultados (25%), ya que previamente se ha descrito su asociación en nuestro país en un porcentaje mucho menor para cepas de origen hospitalario (8%) (Hugo, 2006). No obstante, recientemente en Japón, reportaron la combinación de genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} en aislados clínicos de *E. coli* en un 43,5%, indicando una incidencia mayor de este tipo de cepas en la comunidad (Ode y col., 2009).

La preocupación que promueve este tipo de investigaciones científicas es la selección de mecanismos de resistencia mediados por plásmidos que se diseminan rápidamente en la población bacteriana causante de infecciones en la comunidad. La coexistencia en organismos productores de BLEE y quinolonas ha sido previamente reportada en otros países. Sin embargo, hasta hace unos años, no se había descrito que fuera ocasionada por la presencia de genes plasmídicos (Guzmán y col., 2008).

Como se describió, existe un mecanismo asociado a plásmidos que confiere resistencia a quinolonas, genes *qnr*, que han sido encontrados formando parte de integrones complejos de tipo I y cuyo producto, la proteína Qnr, pertenece a la familia de los pentapéptidos repetidos, que protege a la DNA girasa de la acción de las quinolonas, produciendo un nivel bajo de resistencia bacteriana, pero se facilita la selección de bacterias con resistencias de alto nivel a estos antibióticos (Rodríguez-Martínez, 2005; Lavigne y col., 2006). Otro de los mecanismos asociados a la resistencia de quinolonas descrito recientemente, son las bombas de eflujo que se han localizado en

plásmidos, codificadas por el gen *qepA*. En nuestro estudio se evaluaron las variantes del gen *qnr* descritas hasta el momento y también la presencia del gen *qepA* en cepas productoras de BLEE. Los resultados demuestran la presencia de genes *qnr* en un 37,5% de los aislados, representado por las variantes *qnrB* y *qnrS*, con una incidencia de 20,8% (5 genes) y 16,7% (4 genes) respectivamente, y 1 de estas cepas positivas para los genes *qnr* presentó simultáneamente la asociación de ambos genes.

Estos resultados indican una incidencia mucho mayor que lo reportado por López en el año 2007 para cepas clínicas, quien encontró que la incidencia de genes *qnr* fue 16% (8 genes *qnrB* y 5 genes *qnrS*), y también difiere con reportes internacionales como en Suecia, donde la prevalencia de genes *qnrB* y *qnrS* en cepas productoras de BLEE es de 3,8% (Fang y col., 2008). En Latinoamérica la incidencia de estos genes en muestras aisladas de pacientes de la comunidad es mucho mayor que en los ambientes hospitalarios, lo cual coincide con nuestros resultados (Pallecchi y col., 2009).

Así mismo, la co-existencia de genes *qnr* sólo ha sido reportada en una cepa de *E.cloacae* en Francia, productora de β -lactamasas tipo SHV-12, de penicilinasas TEM-1 y LAP-1, resistente a fluoroquinolonas e identificaron un plásmido de 160kb portador de los genes *qnrB* y *qnrS* (Cattoir y col., 2007). Nuestros resultados coinciden parcialmente con este estudio, debido a que la cepa que contiene ambos genes *qnr*, es también portadora del gen *bla_{SHV}*, es sensible a fluoroquinolonas y sólo presenta resistente a NAL, corroborando que estos genes sólo confieren resistencia de bajo nivel a las fluoroquinolonas. Por otra parte, las cepas 11714 y 12306, portadoras de genes *qnrB* y *qnrS*, respectivamente y, presentan sensibilidad a NAL y a las fluoroquinolonas evaluadas (Macero y col., 2005; Harris y col., 1999). Este resultado representa el primer reporte a nivel Latinoamericano de la asociación de dos genes *qnr* en un mismo aislado de *E.coli*.

En el estudio aquí descrito no fue observada la presencia de los genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* ni *qepA*, cuyos productos confieren resistencia a fluoroquinolonas. Los resultados en relación al gen *qnrA* eran de esperarse, debido a que los pocos reportes de prevalencia de genes *qnr* en

Latinoamérica indican que los alelos de los genes *qnrB* y *qnrS* son los más frecuentes (Pallecchi y col., 2009) y esto corresponde con la alta incidencia reportada en nuestro estudio para estos genes. Para los genes *qnrC*, *qnrD* no existen reportes a nivel Latinoamericano, su presencia sólo ha sido reportada en China (Cavaco y col., 2009; Wang y col., 2009), mientras que los resultados obtenidos para el gen *qepA* coinciden con los otros reportes que indican que la incidencia de este gen en cepas de *E.coli* varía desde 0,8% en cepas que expresan concomitantemente la enzima BLEE tipo CTX-M, hasta 58,3% en cepas no asociadas a enzimas BLEE (Liu y col., 2008; Cattoir y col., 2008).

En nuestro país no se habían realizado estudios que relacionaran la co-existencia de genes *bla* y *qnr* en cepas de *E.coli* causantes de ITU en paciente de consulta ambulatoria. Nuestros resultados indican la co-existencia de genes *qnr* en estas cepas productoras de BLEE con una incidencia de 33,3%. Previamente en el año 2007, se reportó en una cepa de *K.pneumoniae* de origen hospitalario, la presencia de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *qnrB* en un plásmido transferible, con capacidad de diseminación entre géneros bacterianos diferentes (Redondo y col., 2007). En nuestro caso, las cepas que expresan *qnr* están asociadas a los diferentes genes *bla*: 4 de ellas al gen *bla*_{CTX-M}, 2 cepas al gen *bla*_{SHV} y 2 cepas a los genes *bla*_{TEM}/*bla*_{CTX-M}. Esto coincide con un reporte en Brasil, donde se describe la incidencia de genes *qnr* en cepas productoras de BLEE tipo CTX-M (Minarini y col., 2008). En Francia también se reportó la presencia del gen *qnrA* en cepas de *E.coli* productoras de BLEE tipo CTX-M en un 7,7% de los aislados (Lavigne y col., 2006), mientras en EEUU otro estudio realizado a cepas resistentes a CAZ presentaban genes *qnr* en 20% de los aislados de *K. pneumoniae*, 31% en los aislados de *Enterobacter* sp. y sólo 4% de los aislados de *E.coli* (Robicsek y col., 2006). Otro estudio realizado en Taiwan reportaron la asociación de genes *qnr* y genes *bla* en 41,7% de las cepas de *E.coli* evaluadas y en 82% de las cepas de *K. pneumoniae* (Wu y col., 2008). Un estudio realizado en Japón en aislados de *E. coli* y *K. oxytoca*, en 6 aislados positivos para CTX-M-9/SHV-12 que poseían genes *qnr* y todos llevaban *aac(6')*-Ib de resistencia aminoglucósidos, reportó que la transferencia de la resistencia a los β-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas fueron co-transferidos con un plásmido de aproximadamente 140 kb

(Ode y col., 2009). Estos resultados sugieren que la fuerte correlación de la expresión de BLEE y la resistencia a las fluoroquinolonas, puede ser transferida en gran medida por plásmidos (Portale y Silva, 2008; Carattoli, 2009).

Resulta sorprendente que casi todas las cepas de *E. coli* productoras de BLEE (N = 21) fueron resistentes a fluoroquinolonas, independientemente de la presencia de los genes *qnr*. Esto indica que otros mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas, como las mutaciones cromosomales en GyrA y ParC, pueden conferir los niveles de resistencia observados en las cepas que no portaban ningún gen *qnr*. Un estudio realizado en Canadá indica que una vez establecida la mutación en la región QRDR, se produce la resistencia a fluoroquinolonas, aunque no haya presencia de plásmidos con determinantes de *qnr* (Lagacé-Wiens y col., 2007). Estos resultados revelan que el principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas puede ser a través de la acumulación de mutaciones en los genes que codifican la ADN-girasa y la topoisomerasa IV (Song y col., 2009). Adicionalmente se ha descrito de manera reciente otro mecanismo de resistencia a quinolonas, siendo responsable el producto del gen *acc(6')Ib-cr* que pudiera estar presente en estas cepas, y esta posibilidad podrá ser ensayada en experimentos futuros. Nuestros resultados concuerdan con un estudio realizado en EEUU en el cual los autores reportan que todas las cepas de *E.coli* del estudio resistentes a fluoroquinolonas presentaban mutaciones en GyrA y de estos aislados el 85% presenta mutaciones en ParC, además el 23% de los aislados poseía el gen *acc(6')Ib-cr* y no fue observada la presencia de genes *qnr* (Morgan-Linell y col., 2009). Es importante destacar que la ausencia de genes *qnr* en estas cepas productoras de BLEE reduce sustancialmente la probabilidad, pero no absolutamente, de la transmisión horizontal de genes de resistencia.

Nuestro estudio sugiere que la resistencia a quinolonas basada en la presencia de genes *qnr* mediada por plásmidos podría estar surgiendo en Venezuela en cepas con producción de BLEE tipo CTX-M. Hasta la fecha, ningún vínculo genético se ha encontrado entre los dos mecanismos emergentes de resistencia. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la incidencia en la

co-expresión de genes *bla* y genes *qnr* es 33,3% y representa una primera señal de alarma que estimula a continuar con este tipo de investigación en estas patologías que afectan a la población en general.

Es importante resaltar que diferentes especies bacterianas no sólo poseen enzimas BLEE, sino también mecanismos de resistencia como disminución en la expresión de porinas, bombas de eflujo y sistemas complejos de islas genéticas e integrones que complican aun más el panorama y sobre todo se dificulta la detección a nivel de laboratorio (Máttar y Martínez, 2007).

Basados en esta investigación se destaca la necesidad de realizar este tipo de estudios a nivel molecular, en diferentes ambientes para establecer los mecanismos de resistencia circulantes, que permiten determinar no sólo las cepas multiresistentes a antibióticos, sino también los posibles mecanismos de diseminación de estas resistencias y determinar la población que se ve principalmente afectada, para así poder realizar una gestión terapéutica más efectiva y contribuir al diseño de medidas que disminuyan la selección de cepas resistentes.

Cabe destacar que la epidemia mundial de resistencia a los antibióticos está conduciendo a que la terapia empírica sea cada vez mucho más difícil de lograr. Las opciones para combatir cepas resistentes a los antibióticos están con frecuencia restringidas, y la derivación de la terapia al uso de otros antibióticos puede generar riesgos secundarios. La resistencia no se puede prevenir, pero su desarrollo y la dispersión puede ser más lenta. Lograr estos objetivos requiere la implementación de diversas estrategias, entre las cuales la utilización de técnicas moleculares es una de las más importantes para el desarrollo de la epidemiología molecular, sabiendo que el trabajo interdisciplinario es la vía para la búsqueda de soluciones al grave problema de la resistencia a los antibióticos.

9. CONCLUSIONES

- El 76,4% de las ITU en pacientes de consulta ambulatoria fueron causadas por *E.coli*, predominando en pacientes femeninos, en un 79,2% de los aislados, el 50% se presentó en pacientes con edades >65 años en ambos sexos.
- Las cepas productoras de BLEE estuvieron representadas por el 3,5% de las cepas de *E.coli* aisladas de ITU, las cuales presentaban un perfil de multiresistencia a distintas familias de antibióticos, con una resistencia elevada a SXT 83,3%, CRO 75%, CTX 79,2%, CIP 87%, OFX 87%, NAL 91,7%, TOB 62,5%, ATM 56,5%, seguidos de GN 34,8%, FOX 21,7% , CAZ 20,8%, AMC 17,4%, mientras que para IMP y AN no se obtuvieron cepas resistentes.
- En los aislado analizados se obtuvo predominancia del gen *bla*_{CTX-M} (87,5%) seguido del gen *bla*_{TEM} (25%) y por último el gen *bla*_{SHV} (12.5%), todas las cepas positivas para *bla*_{TEM} estaban asociadas a *bla*_{CTX-M}.
- La presencia de genes *qnr* estuvo representada por los tipos *qnrB* y *qnrS*, 20,8% y 16,7% respectivamente. Se observó la presencia de estos genes en una cepa sensible a fluoroquinolonas, pero resistente a NAL.
- La presencia de los determinantes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* y *qepA* no fue detectada en ninguna de las cepas evaluadas.
- En pacientes con ITU la incidencia de genes *bla* y *qnr* en una misma cepa fue encontrada en 33,3% de los aislados.

10. RECOMENDACIONES

La recomendación inicial para el tratamiento de las infecciones bacterianas es establecer el uso racional de los antibióticos en la atención primaria de las mismas y así evitar la selección de resistencias bacterianas. El uso de los antibióticos debe ser absolutamente en casos que lo ameriten, utilizando las dosis adecuadas y durante períodos establecidos.

La herramienta fundamental para la detección de ITU es el urocultivo, seguido de la elaboración de los antibiogramas que detectan los perfiles de sensibilidad de los microorganismos. Es imperiosa su realización para establecer un tratamiento adecuado, y disminuir las tasas de recurrencia y resistencia bacteriana a los antibióticos utilizados de rutina en el tratamiento de ITU.

Es necesario tener en cuenta que se están detectando nuevos mecanismos de resistencias a diversos antibióticos provocando el uso de la terapia hacia antibióticos de amplio espectro, de reciente desarrollo o con efectos secundarios no deseables. Los estudios que indiquen la naturaleza de los mecanismos de resistencias a los mismos, conducirá a un control mas efectivo para evitar la diseminación de resistencias entre las bacterias.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguado, J.M., Lumbreras, C. 1998. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. **7(78)**: 3622-3628
2. Alonso, G., Narváez, P., Toba, F., Gomes, C., Pedroza, R., Rodríguez Lemoine, V. 2001. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *Mem.Inst.Biol.Exp.* **3**:93-96
3. Alonso, G., Malaver, E., Guzmán, M., Rodríguez Lemoine, V. 2005. Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multiresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. *Mem.Inst.Biol.Exp.* **4**:81-84.
4. Alós, J. 2003. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **21(5)** :261-8
5. Álvarez, G., Querales, E., Aponte, L., Moro, J., Mago, H. Patrones de resistencia a antibióticos en agentes de infecciones urinarias de pacientes ambulatorios. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual Venezuela, 2005. <http://caibco.uev.ve> (consulta: 7/04/09)
6. Andreu, A., Pigrau, C. 2003. Guía diagnóstico-terapéutica de la infección urinaria baja en el ámbito extrahospitalario. http://www.zambon.es/infeccionesurinarias/index01_02_03.htm (consulta: 13/03/2009)
7. Angiolillo, R.G. 2007. Caracterización de los plásmidos presentes en cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas con resistencia a Trimetoprim-Sulfametoxazol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
8. Bastida T, Perez-Vazquez M, Campos J. 2003. Levofloxacin treatment failure in *Haemophilus influenzae Pneumonia*. *Emerg Infect Dis*. **9**:1475-8.
9. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**: 493-6.
10. Blanc, V. 2007. Caracterización de cepas y de plásmidos de *Enterobacteriaceae* portadores de betalactamasas de espectro extendido. Tesis de grado. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
11. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A Functional Classification Scheme for Betalactamases and its Correlation to Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother*. **39**:1211-1233.

12. Cabrera, R. 2008. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella spp.* Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona. España. http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0521108-14252//RCO_TESIS.pdf
13. Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27(1)**: 44–52
14. Castanheira, M., Pereira, A., Nicoletti, A., Pignatari, A., Barth, A., Gales, A. 2007. First Report of Plasmid-Mediated qnrA1 in a Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(4)**: 1527–1529
15. Carattoli, A. 2009. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53(6)**: 2227–2238
16. Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P. 2007. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrB4 Identified in France in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Coexpressing a QnrS1 Determinant. *Antimicrob Agents Chemother* **51(7)**: 2652–2653
17. Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P. 2008. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(10)**: 3801–3804
18. Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M. 2009. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* **53(2)**: 603–608
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement. M100–S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. Coque-González, M. Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **23(5)**: 251-3
21. Córdova R.L., Siciliano L., Villalobos H., Vancampenhoud M., Troncone A., Ferraro S. 2000. Consenso de expertos: Manejo ambulatorio de infecciones urinarias pediátricas en Venezuela. <http://www.svinfectologia.org/urinarias2.html> (consulta 21/04/09)
22. De la Rosa, M. 2004. Capítulo 3. Diagnóstico microbiológico Jefe Servicio Microbiología Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada. http://www.zambon.es/inf_urinaria/curso/cap_3.htm (consulta: 13/03/2009)
23. Delgado, M., Moreno, E., Rodríguez, A., Debrosse, Z. 2006. Infección hospitalaria. Resultados microbiológicos y estudio de la resistencia bacteriana en el Hospital Docente Clínico-Quirúrgico “Dr. Miguel Enríquez” durante el año 2002. *Rev Mex Patol Clin.* **53(1)**: 39-45

24. Echevarria-Zarate, J., Sarmiento, E., Osoro-Plenge, F. 2006. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta méd. Peruana* **23(1)**: 26-31
25. Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 3724-3732.
26. Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., Brenner, H. 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26(2)**:83-90
27. Esparza, M.J. 2007. Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. Ver 1.1. Guía_ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano. <http://infodoctor.org/gipi/> (consulta 21/04/09)
28. Espinosa, F., Hart, M., Halley, M., Martínez, M., Pardo, A. 2008. Resistencia bacteriana de cepas aisladas en el Hospital “Hermanos Ameijeiras”. *Rev Cubana Med.* **47(4)**
29. Essack, S.Y., Hall, L.M.C., Livermore, D.M. 2004. *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents* **23**: 398-400.
30. Falco, A., Takiff, H. 2008. Caracterización molecular del gen MfpA de *Mycobacterium smegmatis* y su relación con el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas. *Mem.Inst.Biol.Exp.* **5**:117-120
31. Fang, H., Huang, H., Shi, Y., Hedin, G., Nord, C. y Ullberg, M. 2009. Prevalence of *qnr* determinants among extended-spectrum β -lactamase-positive Enterobacteriaceae clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. *International J Antimicrob Agents* **34**: 268–270
32. Fogolin, N., Gribaudo, G., Azzaroni, M., Simoncini, D., Sommer, G. 2008. Infecciones urinarias en pacientes ambulatorias de un sanatorio privado de la ciudad de Rafaela. Revisado en: <http://www.cobisfel.org.ar>
33. Galué, N.; Ginestre, M.; Martínez, A.; Romero, S., Rincón, G., Harris, B. 2000. Etiología de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Un estudio de 9 años. *Kasmera.* **28(3)**:163-176
34. García, J. 1998. Principales infecciones causadas por enterobacterias. Enfermedades infecciosas. Sección 17. www.sepeap.org (consulta: 09/04/2009)
35. García, F. 2004. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos in Vitro. www.netropica.org/bacteriologia/Fundamentos.pdf (consulta: 07/04/2009)

36. Ginestre Pérez, M., Romero Añez, S., Martínez García, A., Rincón Villalobos, G., Harris Socorro, B., Castellano González, M., Avila Roo, Y. y colaboradores. 2001. *Gardnerella vaginalis* y uropatógenos convencionales en pacientes ambulatorios. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **21(2)**:6-9
37. Gobernado, M., Valdés, L., Alós, J.I., García-Rey, C., Dal-Ré, R., García de Lomas, J., y the Spanish Surveillance Group for *E. Coli* Urinary Pathogens. 2007. Quinolone resistant in female outpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: Age-related difference. *Rev Esp Quimioterap.* **20(2)**: 206-210
38. Gottesman, B.S., Carmeli, Y., Shitrit, P., Chowers, M. 2009. Impact of Quinolone Restriction on Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated from Urine by Culture in a Community Setting. *Clin Infect Dis* **49**:869–75
39. Gould, I.M. 2009. Antibiotic resistance: the perfect storm. *Int J of Antimicrob Agents.* **34(3)**
40. Gudiol, F., Fernández, P. 2000. Cefalosporinas. Módulo 5. Antibióticos. Criterios De Uso Racional Y Guía Práctica Terapéutica (II). Tomado de: www.sepeap.org (consulta: 07/04/2009)
41. Gupta, K., Hooton, T.M., Stamm, W.E. 2001. Increasing Antimicrobial Resistance and The Management of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Annals of Internal Medicine* **135(1)**:41-50
42. Guzmán, A., Valdivieso, A. 1997. Infección urinaria: Diagnóstico y tratamiento. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. **26**: 150-155
43. Harris, B, Castellano, M, Ginestre, M., Martínez, A., Romero, S., Rincón, G. 1999. Evolución de la resistencia a ciprofloxacina y otras quinolonas en bacterias clínicamente significantes. *Kasmera.* **27(3)**: 161-179
44. Hooton, T.M., Stamm, W.E. 1997. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* **11**:551-81.
45. Hugo, E. 2006. Estudios de la incidencia de los genes de β -lactamasas en aislados bacterianos venezolanos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
46. Jacoby, G.A., Chow, N., Waites, K.B. 2003. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47(2)**: 559–562
47. Jacoby, G.A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **41(2)**: 120–126
48. Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martnez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L. y colaboradores. 2008. *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 2297–2299

49. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum b-lactamases conferring transferable resistance to newer b-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **10**: 867–78.
50. Jeong, J., Yoon, H.J., Kim, E.S., Lee, Y., Choi, S., Kim, N.J., Woo, J.H. y colaboradores. 2005. Detection of *qnr* in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(6)**: 2522–2524
51. Kariuki, S., Revathi, G., Corkill, J., Kiiru, J., Mwituria, J., Mirza, N., Hart, C.A. 2007. *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. *J Infect Developing Countries.* **1(3)**: 257-262.
52. Karlowsky, J.A., Hoban, D.J., Decorby, M.R., Laing, N.M., Zhanel, G.G. 2006. Fluoroquinolone-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatients are frequently multidrug resistant: results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance-Quinolone Resistance study. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(6)**: 2251-4
53. Kaye, K.S., Gold, H.S., Schwaber, M.J., Venkataraman, L., Qi, Y., De Girolami, P.C. y colaboradores. 2004. Variety of β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the Northeastern United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1520-1525.
54. Lagacé-Wiens, P, Nichol, K., Nicolle, L. 2007. ESBL genotypes in fluoroquinolone-resistant and fluoroquinolone-susceptible, ESBL-producing *Escherichia coli* urinary isolates in Manitoba. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* **8(2)**:133-137.
55. Lavigne, J., Marchandin, H., Delmas, J., Bouziges, N., Lecaillon, E., Cavalie, L., y colaboradores 2006. *qnrA* in CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(12)**: 4224–4228
56. Liu, J.H., Deng, Y.T., Zeng, Z., Gao, J.H., Chen, L. y Arakawa, Y. 2008. Coprevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA Methylase RmtB-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **52 (8)**: 2992–2993
57. López, D. 2007. Incidencia y caracterización de genes *qnr* plasmídicos en cepas bacterianas aisladas de Centros Hospitalarios de la zona metropolitana de Caracas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
58. Macero, C., Moreno, X., León, Y. Enterobacterias con fenotipo de resistencia típico debido a mutaciones en los genes de las topoisomerasas. XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología, Cumaná, Noviembre 2005. http://caibco.ucv.ve_caibco_vitae_vitaeveinticinco_jornadamicrobiologia (consulta:09/04/09)

59. Malgor, L.A. y Valsecia, M.E. Farmacología Antimicrobiana. Farmacología Dermatológica. Farmacología Médica. 3. http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/indice_v3.htm (consulta: 06/04/09)
60. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G.A. 2003. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. **351**: 797-9.
61. Máttar, S., Martínez, P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. *Infect* **11(1)**: 23-35
62. Mérens, A., Matrat, S., Aubry, A., Lascols, C., Jarlier, V., Soussy, C.J., y colaboradores. 2009. The Pentapeptide Repeat Proteins MfpAMt and QnrB4 Exhibit Opposite Effects on DNA Gyrase Catalytic Reactions and on the Ternary Gyrase-DNA-Quinolone Complex. *J Bacteriol*. **191 (5)**: 1587–1594
63. Minarini, L., Poirell, L., Cattoir, V., Darini, A.L., Nordmann, P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **62**: 474-478
64. Montell, O., Vidal, A. 2007. Actualización sobre Infección Urinaria. Propuesta de Estrategia de Intervención Educativa. *Rev med electro*. **30(2)**
65. Morgan-Linnell, S., Becnel, L., Steffen, D., Zechiedrich, L. 2009. Mechanisms Accounting for Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **53(1)**: 235–242
66. Motter, R. 2002. Infecciones Urinarias. Guía bioquímica para diagnóstico y seguimiento. www.raymundomotter.com.ar (Consulta: 13/03/2009)
67. Ode, T., Saito, R., Kumita, W., Sato, K., Okugawab, S., Moriya, K. y colaboradores. 2009. Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *International J Antimicrob Agents* **34**: 347–350
68. Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B. y colaboradores. 2006. High-level of cefotaxime and ceftazidime. Resistance in *Escherichia coli*: Spread of clonal and unrelated isolates between the community, long-term Care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol*. **44**: 2359-66.
69. Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H. y colaboradores. 2007. Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. **51(8)**: 2720–2725

70. Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Bartalesi, F., Sennati, S., Gamboa, H. y colaboradores. 2009. High Prevalence of *qnr* Genes in Commensal Enterobacteria from Healthy Children in Peru and Bolivia. *Antimicrob Agents Chemother* **53(6)**: 2632–2635
71. Park, C.H., A. Robicsek, G.A. Jacoby, D. Sahn, D.C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib.cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3953-3955
72. Périchon, B., Courvalin, P., Galimand, M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of g1405 in 16s rrna and to hydrophilic fluoroquinolones by Qepa-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 2464-2469
73. Perozo-Mena, A., Castellano-González, M., Ginestre-Pérez, M., López, E., Tórres, E., Parra, A. Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de blee aisladas de pacientes de unidades de cuidados intensivos. XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología, Cumaná, Noviembre 2005. http://caibco.ucv.ve_caibco_vitae_vitaeveinticinco_jornadamicrobiologia (consulta: 09/04/2009)
74. Perozo-Mena, A., Castellano-González, M., Ginestre-Pérez, M., Harris, B. 2007. Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera.* **35(2)**: 91-106
75. Portale, P., Silva, M, Redondo, C., Alonso, G. Perfil de resistencia en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido, aisladas en el Hospital Universitario de Caracas. XVI Jornadas Nacionales de Infectología. XIII Jornadas Nororientales de Infectología, Noviembre 2007.
76. Portale, P. y Silva, M. 2008. Estudio de los plásmidos conjugativos causantes de multiresistencia en cepas de *E.coli* y *K.pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en el HUC. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
77. Redondo, C., López, D., Alonso, G. Primer reporte de resistencia a quinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación mediada por plásmidos en una cepa nosocomial de *K. pneumoniae* en Venezuela. XVI Jornadas Nacionales de Infectología XIII Jornadas Nororientales de Infectología, Noviembre 2007.
78. Redondo C. y Alonso G. 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **27**:100-107.

79. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. 2006. *qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother* **50 (8)**: 2872–2874
80. Rodríguez-Martínez, J. 2005. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **23(1)**:25-31
81. Serrano, N., Sánchez, D., Urrestarazu, M.I. Evolución de la resistencia a los antimicrobianos de *Escherichia coli* aisladas en orina. Revisión de 10 años. XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología, Cumaná, Noviembre 2005.
82. Song, S., Lee, E., Koh, E.U. 2009. Antibiotic Resistance Mechanisms of *Escherichia coli* Isolates from Urinary Specimens. *Korean J Lab Med*. **29**:17-24
83. Tran, J.H., Jacoby, G.A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci*. **99**:5638-42.
84. Tran, J.H., Jacoby, G.a., Hooper, D.C. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**:118–125.
85. Torres, L., Benítez, M., Domínguez, M., Torres, O., Gagliotta, V., Calvo, A., Rodríguez, N. y colaboradores. Detección de integrones clase 1 en cepas de Enterobacterias productoras de B-lactamasas de espectro expandido tipo SHV y CTX-M grupo-2. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual Venezuela, 2005. <http://caibco.ucv.ve> (consulta: 7/04/09)
86. Torres, L., Gagliotta, V., Torres, O., Benítez, M., Domínguez, M., Pedrozab, M. 2006. B-lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. **26**: 80-88
87. Uberos, J. 2007. Indicaciones pediátricas de las nuevas fluoroquinolonas. www.sepeap.org (consulta: 06/04/2009)
88. Vasilaki, O., Ntokou, E., Sofianou, D., Frantzidou, F., Alexiou-Daniel, S., Maniatis, A., Pournaras, S. 2008. Emergence of the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in *Escherichia coli* isolates in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52 (8)**: 2996–2997
89. Vetting, M.W., Hegde, S.S., Fajardo, J.E., Fiser, A., Roderick, S.L., Takiff, H.E., Blanchard, J.S. 2006. Pentapeptide Repeat Proteins. *Biochemistry* **45(1)**:1-10.
90. Vignoli, R., Seija, V. 2008. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Capítulo 35. Temas de Bacteriología y Virología Médica.

91. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D. y colaboradores. 2009. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, qnrC, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53(5)**: 1892–1897
 92. Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D.C. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 2242–2248
 93. Wu, J., Ko, W., Wu, H., Yan, J. 2008. Prevalence of Qnr determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese Hospital, 1999–2005. *J Antimicrob Chemother.* **61**:1234–1239
 94. Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H. y col. 2007. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **51** (9): 3354–3360
 95. Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S. y Arakawa, Y. 2008. Plasmid-Mediated *qepA* Gene among *Escherichia coli* Clinical Isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* **52** (4): 1564–1566
 96. Zulaica, C., Molin, F., Diez, M., Castro, P. 2002. Infecciones urinarias en el adulto, *Guías Clínicas.* **2(34)**
- Consultas en línea:
97. Campaña para el uso responsable de los antibióticos. Ministerio de Sanidad y consumo. <http://www.antibioticos.msc.es/general-colaboracion.html> (consulta: 06/04/2009)