



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de
***Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de**
betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con
infecciones urinarias intrahospitalarias. Hospital Regional
Lambayeque. Junio - Diciembre 2015.

TESIS

Para optar el título profesional de licenciado en:

Biología – Microbiología y Parasitología

Presentado por:

Bach. Kevin Colbert Díaz Maldonado

Bach. Kelly Lelia López Ramírez

Lambayeque - Perú

2017

Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infecciones urinarias intrahospitalarias. Hospital Regional Lambayeque. Junio - Diciembre 2015.

TESIS

Para optar el título profesional de licenciado en Biología – Microbiología y Parasitología

Presentado por:

Bach. Kevin Colbert Díaz Maldonado

Bach. Kelly Lelia López Ramírez

Aprobado por:

Dra. Olga Francia Arana

Presidenta

M. Sc. Jhon Wiston García López

Secretario

M. Sc. Marco Antonio Guzmán Tello

Vocal

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

Patrocinadora

CONTENIDO

Pág.

Índice de tablas.....	<i>i</i>
Índice de figuras.....	<i>iii</i>
Resumen.....	<i>v</i>
Abstract.....	<i>vi</i>
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	4
III. Material y métodos.....	10
3.1. Población y muestra.....	10
3.2. Material.....	10
3.3. Métodos.....	11
3.4. Análisis y procesamiento de datos.....	18
IV. Resultados.....	22
V. Discusión.....	38
VI. Conclusión.....	48
VII. Recomendaciones.....	49
VIII. Referencias bibliográficas.....	50
IX. Anexos.....	54

Índice de tablas

Tabla	Pág.
1. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio - Diciembre 2015.....	23
2. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	25
3. Sinergismo de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	27
4. Agrupamientos obtenidos por ERIC-PCR y REP-PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	32
5. Agrupamientos obtenidos por ERIC-PCR y REP-PCR para las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	36
6. Concentración y zonas de diámetro de los antibióticos utilizados para mediar la susceptibilidad antimicrobiana en enterobacteriáceas según M100-S25 CLSI 2015.....	55
7. Búsqueda y confirmación del fenotipo de BLEE en cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	56
8. Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico bacteriano, según el manual de Current Protocols in Molecular Biology (2003).....	58
9. Preparación de reactivos para la corrida electroforética de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	60
10. Oligonucleótidos utilizados para el estudio molecular de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	63

11.	Concentraciones del mix de reacción para ERIC-PCR y REP-PCR para volumen final de 12.5 µL.....	63
12.	Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR en las cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	68
13.	Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR en las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	71
14.	Matriz de similitud mediante el coeficiente de Dice para <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	73
15.	Matriz de similitud mediante el coeficiente de Dice para <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.....	74
16.	Valores descriptivos calculados para el estudio molecular de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE, mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR.....	74
17.	Ficha de recolección de datos según la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud para el estudio de infecciones intrahospitalarias.....	75
18.	Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes infectados por <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE, causantes de infecciones del tracto urinario del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	77
19.	Servicios de origen y derivación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria en el Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	78
20.	Servicios de origen y derivación de las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria en el Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	79

Índice de figuras

Fig.	Pág.
1. Condiciones termodinámicas programadas en el termociclador Eppendorf.....	17
2. Susceptibilidad antimicrobiana de 20 cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio - Diciembre 2015.....	24
3. Susceptibilidad antimicrobiana de 10 cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	26
4. Porcentaje de sinergismo entre el inhibidor y las cefalosporinas en las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	28
5. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	29
6. Perfiles electroforéticos generados por REP-PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	30
7. Dendrograma derivado del agrupamiento UPGMA obtenido a partir de los perfiles electroforéticos generados por la unión de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio - Diciembre 2015	33
8. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR para las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	34
9. Perfiles electroforéticos generados por REP-PCR para las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	35
10. Dendrograma derivado del agrupamiento UPGMA obtenido a partir de los perfiles electroforéticos generados por la unión de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR para las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	

productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	37
11. Screen Test inicial para la producción de BLEE.....	57
12. Test confirmatorio para la producción de BLEE.....	57
13. Reactivación de cepas productoras de BLEE en caldo BHI, tratamiento previo para la extracción.....	59
14. Extracción de ADN genómico bacteriano según el manual de Current Protocols in Molecular Biology.....	59
15. Siembra de cepas productoras de BLEE para la corrida electroforética	61
16. Corrida electroforética de las cepas productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	61
17. Tinción del gel con bromuro de etidio de las cepas productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	62
18. Electroforesis de ADN en gel de Agarosa al 1% de extracciones de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	62
19. Preparación del mix de reacción con ERIC-PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	64
20. Preparación del mix de reacción con REP-PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.....	64
21. Diagrama esquemático de la prueba REP-PCR	65
22. Análisis de los patrones de bandas con el Software Quantity One.....	66
23. Distribución de cepas de <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE por servicio de hospitalización. Junio-Diciembre 2015.....	66
24. Distribución de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE por servicio de hospitalización. Junio-Diciembre 2015.....	67
25. Distribución de cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE por servicio de hospitalización. Junio – Diciembre 2015.....	67

RESUMEN

Caracterizar molecularmente mediante los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de pacientes con infección urinaria en los servicios del Hospital Regional Lambayeque. Junio-Diciembre 2015.

Se analizaron 30 aislados clínicos conformados por *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE, obtenidos durante los meses de junio a diciembre del 2015. Se determinó la producción de BLEE mediante el método de Jarlier, así como la susceptibilidad antimicrobiana para observar el fenotipo de resistencia. Además se evaluó la caracterización molecular por los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, registrando los geles con el software Quantity One-BIORAD. Para el agrupamiento de las cepas se usó el algoritmo UPGMA, generando los dendrogramas respectivos con la unión de los perfiles electroforéticos obtenidos por ambos marcadores.

Del análisis se obtuvieron altos valores de resistencia para cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim/ sulfametoxazol, mientras que la sensibilidad se evidenció en carbapenémicos. Así como se detectó mayor sinergismo con tres cefalosporinas. Además se discriminaron tres patrones predominantes en *E. coli* y dos en *K. pneumoniae* productoras de BLEE, procedentes en su mayoría del servicio de emergencia.

Se caracterizaron molecularmente las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, el estudio reveló la aparición de cinco patrones clonales con mayor notoriedad en emergencia, servicio que ofrece las condiciones no solo para albergar microorganismos potencialmente patógenos, sino también para facilitar su diseminación clonal. La susceptibilidad antimicrobiana mostró alta resistencia a la mayoría de familias de antibióticos.

Palabras claves: BLEE, ITU, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ERIC-PCR, REP-PCR.

ABSTRACT

Molecular characterization by ERIC-PCR and REP-PCR strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) isolated from patients with urinary tract infection in the different services of the Regional Lambayeque Hospital. June-December 2015.

We analyzed 30 clinical isolates of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* during the months of June to December, 2015. The production of ESBL was determined by the Jarlier method, and the antimicrobial susceptibility evidenced the resistance phenotype. Also, we evaluated the molecular characterization b.y ERIC-PCR and REP-PCR markers was recorded with the One-BIORAD Quantity software. For the grouping of the strains, the UPGMA algorithm was used, generating the dendrograms with the union of the electrophoretic profiles obtained by both markers.

In the analysis, high resistance values were obtained for third generation cephalosporins, fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim/sulfamethoxazole, the sensitivity was evidenced in carbapenems and was detected greater synergism with three cephalosporins. In addition, three predominant patterns in *E. coli* and two in *K. pneumoniae* producing ESBL, predominantly from the emergency department, are distinguished.

The strains producing ESBLs *E. coli* and *K. pneumoniae* were characterized molecularly, the study revealed the emergence of five clonal patterns with the main notoriety in emergency, service offers the conditions not only to harbor potentially pathogenic microorganisms, but also to facilitate their clonal dissemination. Antimicrobial susceptibility showed high resistance to most antibiotic families.

Keywords: ESBL, UTI, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ERIC-PCR, REP-PCR,

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae* son actualmente los patógenos oportunistas nosocomiales de mayor importancia, capaces de sintetizar betalactamasas de espectro extendido (BLEE), estas enzimas no solo producen resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera a cuarta generación, además del monobactam como el aztreonam, sino que usualmente transportan otros mecanismos de resistencia a antibióticos como quinolonas, aminoglucósidos y sulfamidas, limitando así las opciones terapéuticas (Curello, Pharm D, MacDougall & MAS, 2014; García, Astocondor & Banda, 2012; Morales, Reyes, Monteghirfo, Roque & Irey, 2013; Soltani, Ehsanpoor, Khorvash & Shokri, 2014).

La presencia de estos microorganismos representa una amenaza para el incremento de infecciones intrahospitalarias (IIH), las cuales intensifican la morbilidad y mortalidad de los pacientes, particularmente en afectados con compromiso de la inmunidad, con exposición a cirugías durante la hospitalización y aquellos sometidos a métodos invasivos (Bueno, 2010; Castañeda, Requelme & Poma, 2011; García, 2013; Rubio, Martín, Domingo, López & Larrañaga, 2012). Así, las infecciones del tracto urinario (ITU) son las IIH más frecuentes, presentes sobretodo en pacientes con hospitalización prolongada, producto del reemplazo de la microbiota por bacterias nosocomiales, y originadas en su mayoría por *E. coli* en el 75 – 85% de casos, seguido de *K. pneumoniae*, muchas de ellas productoras de BLEE (Cantón, González & Galán, 2012; Eftekhari, Rastegar, Golalipoor & Mansoursamaei, 2012; Yamile & Celis, 2012; Yezli, Shibl & Memish, 2014).

Debido a la alta capacidad de diseminación, patogenicidad y de expresión de genes de virulencia, estos microorganismos, suelen producir brotes hospitalarios; de modo que, un clon puede estar presente en distintos servicios y ser responsable de la mayoría de casos de IIH (Flores *et al.*, 2012; Hidalgo, Marroquín, Antigoni & Samalvides, 2011; Rao, Rama, Gurushanthappa, Manipura & Srinivasan, 2014).

Asimismo, en las infecciones del tracto urinario intrahospitalarias (ITU-IH), como en las demás IHH, no sólo basta con identificar los patógenos, sino que debe definirse con precisión la cadena epidemiológica para tomar las medidas de control adecuadas (Escalante, Síme, & Díaz, 2013; Flores *et al.*, 2012); en ello, radica la importancia de emplear métodos de caracterización y genotipificación molecular que permiten determinar las relaciones genéticas y el número de clones que circulan en un hospital (Bailón & Sacsquispe, 2013; Mantilla, García, Espinal & Valenzuela, 2004).

En la actualidad para la caracterización molecular se sigue considerando a la técnica de electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE) como el estándar de oro, pero sus altos costos y equipamiento complementario se convierten en una limitante; por otra parte, las técnicas que emplean la reacción de cadena de polimerasa (PCR) mediante marcadores altamente resolutivos basados en el análisis de regiones del cromosoma bacteriano como ERIC (Secuencias Intergénicas de Consenso Repetitivas de Enterobacterias) y REP (Secuencias de Elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos), se convierten en los métodos alternativos para una rápida caracterización, usado ampliamente en la identificación de brotes de infecciones bacterianas, por tener una buena reproducibilidad y un similar poder de discriminación, que permite discriminar grupos clonales estrechamente relacionados de la misma especie, y grupos de cepas no relacionadas clonalmente (Bailón & Sacsquispe, 2013; Castro, Alonso, Silva & Armenta, 2009; Ramazanzadeh, Zamani, Zamani, 2013; Rivas, Redondo & Alonso, 2006).

En el departamento de Lambayeque y particularmente en el Hospital Regional Lambayeque (HRL) se desconocía si las bacterias causantes de ITU pertenecían a un solo linaje clonal o a diversas cepas como un evento aleatorio; además, según registros del Laboratorio de Bacteriología – Área de investigación del HRL se sabe que *E. coli* ha sido aislada en un 50 % de los casos, seguido de *K. pneumoniae*, durante el periodo de Febrero del 2014 – Febrero del 2015. Asimismo en el departamento de Lambayeque se ha identificado como causante de ITU a *E. coli*

productora de BLEE con una incidencia que supera el 50% de aislamientos, datos que evidenciaron la alta frecuencia con que estos microorganismos multirresistentes causan ITU en nuestra localidad, lo cual genera motivo de preocupación (Arce, LLontop, Alarcón & López, 2014; Dávila & Cruz, 2014; Huayra 2008).

Por todo lo expuesto, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar molecularmente cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU procedentes de los diferentes servicios del HRL, durante el periodo de Junio a Diciembre del 2015, utilizando las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR, asimismo, las cepas se identificaron mediante susceptibilidad antimicrobiana. De esta manera se definió si un clon o patrón clonal fueron los responsables de la mayoría de casos de ITU que se suscitaron en este nosocomio. Permitiendo obtener datos actuales sobre la relación clonal existente entre cepas aisladas de ITU-IH, lo que explicaría la posible diseminación clonal entre servicios.

II. ANTECEDENTES

Con el propósito de evaluar tres variantes de la técnica de amplificación de secuencias repetitivas (rep-PCR) y compararlos con la tipificación por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), Mantilla *et al.* (2004) analizaron dos poblaciones de *K. pneumoniae*, una constituida por aislamientos causantes de infección nosocomial en un hospital de tercer nivel, y otra asociada a un brote intrahospitalario en una unidad de cuidado intensivo neonatal. Los tres iniciadores para rep-PCR correspondieron a las secuencias, BOX, ERIC y REP. Todos los aislamientos fueron tipificables por los tres sistemas de rep-PCR y se discriminaron de manera similar a lo obtenido con PFGE ($D = 0.978$). El buen poder discriminatorio ($D = 0.974$) obtenido con los procedimientos rep-PCR estandarizados, permitió sugerir el empleo de REP-PCR y ERIC-PCR para la tipificación rápida de aislamientos de *K. pneumoniae*, aplicada a estudios de epidemiología molecular de la infección nosocomial.

En un estudio realizado por Rivas *et al.* (2006), con el objetivo de genotipificar cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* de cuatro nosocomios de Caracas - Venezuela, para permitir diferenciar serotipos estrechamente relacionados y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, emplearon las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR. Se recolectaron 60 cepas de *E. coli* y 26 de *K. pneumoniae* y encontraron la diseminación de clones bacterianos dentro de los centros de salud en los diferentes servicios, siendo más frecuentes en el servicio de medicina; no se encontró diseminación de clones entre los hospitales. Asimismo, las cepas relacionadas clonalmente presentaron diferencias en los fenotipos de resistencia, lo cual sugiere que los determinantes de resistencia se adquirieron por transferencia horizontal, a diferencia de dos cepas de *K. pneumoniae* que presentaron una estrecha relación clonal, además de tener un fenotipo de resistencia idéntico, indicativo de su relación clonal.

Para validar los datos obtenidos de la tipificación molecular en aislados de *Enterobacter cloacae*, Castro *et al.* (2009) compararon dos variantes de la técnica de amplificación de rep-PCR (ERIC-PCR y REP-PCR), con los resultados de la PFGE. Se analizaron 26 cepas, a las cuales se les realizó el tamiz para confirmar la producción de BLEE. Epidemiológicamente todos los aislados fueron discriminados por ambos métodos y se agruparon de acuerdo a los criterios de Tenover. Las variantes rep-PCR agruparon a los aislados en 18 grupos clonales, considerando que seis grupos fueron genéticamente idénticos y un grupo fue estrechamente relacionado, y la PFGE determinó 20 grupos clonales, con dos grupos genéticamente idénticos, y tres grupos estrechamente relacionados. El poder de discriminación mostrado por las dos variantes de rep-PCR fue de 0.97, mientras que para la PFGE fue de 0.98. La rep-PCR puede ser una herramienta molecular alternativa útil para la investigación de brotes.

Bueno (2010) realizó un estudio para determinar los factores asociados a la infección por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en pacientes del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión de Lima. La distribución obtenida en los aislamientos según el servicio fue para medicina 44.57%, urología 23.91%, neurocirugía 10.87%, cirugía 6.52%, traumatología 5.43%, UCIN 4.35%, UCI y quemados con 2.17% cada uno. Asimismo, encontró como uno de los factores asociados a la exposición de antibioticoterapia en un 67.5%, principalmente por ceftriaxona y fluoroquinolonas. Los aislamientos productores de BLEE demostraron la notable resistencia a cefalosporinas de tercera generación y amoxicilina/ ácido clavulánico, además de la alta corresponsencia a ciprofloxacino, trimetoprim/ sulfametoxazol, no obstante se evidenciaron tasas altas de sensibilidad para carbapenémicos, cefoxitin, nitrofurantoína y amikacina, y tasas intermedias para gentamicina.

Con el objetivo de establecer la relación clonal en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, Diestra (2010), utilizó el análisis por rep-PCR. La infección por *E. coli* tuvo lugar en el 74.19% de los casos a diferencia de *K. pneumoniae* que resultó en 25.81%. Las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* procedieron de los servicios de medicina (48.7% y 44%), cirugía (25.6% y 16%), UCI (12.8% y 20%), pediatría (7.7% y 4%), consulta externa (2.6% y 4%) y otros (2.6% y 12%). Mediante rep-PCR se observaron para *E. coli*, cinco patrones clonales que agruparon dos cepas genéticamente idénticas en cada patrón, asimismo para *K. pneumoniae* se obtuvo tres patrones clonales, el primero con cuatro cepas genéticamente idénticas, el segundo con diez cepas estrechamente relacionadas, y el tercero con cuatro cepas, tres genéticamente idénticas y una posiblemente relacionada. De este modo se demostró mayor diversidad clonal en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Con la finalidad de determinar la frecuencia de ITU-IH en los servicios de medicina, además de la resistencia antibiótica, Flores *et al.* (2012), realizaron un estudio de corte transversal durante 48 horas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, se seleccionaron pacientes con ITU-IH de acuerdo con los criterios clínicos recomendados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC). De 92 pacientes hospitalizados, 11 presentaron ITU-IH. De estos pacientes en el 15.7% tuvieron urocultivo con flora polimicrobiana, y 84.2% unimicrobiana. Se aislaron 14 gérmenes, de los cuales el más frecuente fue *E. coli* 5/14, seguido de *K. pneumoniae* 4/14. De las cepas de *E. coli* se encontró alta resistencia a los antibióticos de primera línea, como ciprofloxacino 5/5, ceftriaxona 3/5, sin embargo mostraron una alta sensibilidad para aminoglucósidos como amikacina y gentamicina 1/5.

Para determinar los patrones de resistencia de un hospital de tercer nivel ubicado en Madrid y las características más frecuentes que ocasionan infecciones por bacterias productoras de BLEE, Rubio *et al.* (2012) realizaron un estudio retrospectivo. De este modo encontraron dentro de los factores de riesgo más

relevantes a la edad avanzada, el uso de catéteres, el tiempo de hospitalización, y el tratamiento previo con antibióticos. El tracto urinario fue el sitio más común de aislamiento y *E. coli* fue el microorganismo más frecuente, además los servicios de medicina interna, unidad de cuidados intensivos y cirugía general presentaron mayor número de aislamientos. Sin embargo, no se encontró ningún brote durante el periodo de estudio. Se demostraron en todos los aislamientos altas tasas de resistencia a quinolonas, y así también manifestaron altas tasas de sensibilidad a carbapenémicos.

Con el fin de caracterizar mediante métodos microbiológicos y de biología molecular cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE sospechosos de un brote de infección intrahospitalaria, Bailón y Sacsquispe (2013), realizaron un estudio descriptivo en el servicio de neonatología de un hospital de Lima – Perú, a partir de cepas obtenidas de hemocultivos. Se aislaron 7 cepas que fueron analizadas mediante susceptibilidad antimicrobiana por el método de Difusión de Doble Disco, mostrando que todos fueron productores de BLEE. Mediante la genotipificación por ERIC-PCR, REP-PCR y PFGE, determinaron la relación clonal revelando la presencia de dos patrones, un primer patrón que agrupaba cinco aislamientos genéticamente idénticos y el segundo con dos de ellos, evidenciando la diseminación clonal de *K. pneumoniae* productora de BLEE en el servicio de neonatología.

Escalante *et al.* (2013), realizaron un estudio descriptivo para determinar las características clínicas y epidemiológicas en pacientes con IIH causadas por bacterias productoras de BLEE en el Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo, durante el año 2010. En el estudio participaron 59 muestras de pacientes que cumplieron con los criterios de IIH con hemocultivos o urocultivos positivos para bacterias productoras de BLEE, de las cuales 13.6% procedieron de hemocultivos y 86.4% de urocultivos, asimismo se confirmó la presencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en 61% y 39% respectivamente. De estas, 23.73% pertenecieron al servicio de medicina, 16.95% de emergencia, 15.25% tanto para la unidad de cuidados intensivos como para geriatría, 6.78% para cirugía y gastroenterología cada uno, 3.39 % para los servicios de ginecología, urología y oncología y 5,07% para otros servicios. Se

caracterizaron por afectar a personas en edad avanzada y con una alta frecuencia de comorbilidades.

Ramazanzadeh *et al.* (2013), realizaron un estudio para evaluar la diversidad genética en aislamientos clínicos de *E. coli* mediante la técnica de ERIC-PCR en Sanandaj-India. Los perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR permitieron tipificar 230 aislamientos en 205 patrones, agrupadas en veinte grupos principales (C01-C20), siendo el grupo C02 el más importante. De estos 187 (81.3%) presentaron un único perfil, por tanto no mostraron relación genética entre ellas; sin embargo 43 (18.7%) de ellos mostraron patrones compartidos lo cual fue indicativo de origen similar de diseminación. Las cepas en estudio también presentaron patrones de resistencia similares especialmente a la producción de BLEE.

En un estudio descriptivo prospectivo llevado a cabo por Gholipour *et al.* (2014), se determinó la prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en un hospital de Irán mediante la caracterización fenotípica y molecular. Se aislaron 245 cepas de *E. coli* y 55 cepas de *K. pneumoniae* a partir de muestras de pacientes con infecciones urinarias, obteniendo 128 aislamientos confirmados como productores de BLEE de las cuales 107 (43.67%) fueron *E. coli* y 21 (38.18%) de *K. pneumoniae*. Todos los aislamientos (100%) fueron sensibles a imipenem. Las tasas de resistencia a otros antibióticos fueron los siguientes: nitrofurantoína (16.4%), ácido nalidíxico (23.43%), cotrimoxazol (25%), cefepime (32%), ciprofloxacino (55.46%), ampicilina (69.53%), ceftazidima (100%), y cefotaxima (100%). Evidenciando la prevalencia generalizada de BLEE y la resistencia a múltiples antibióticos que se encuentran en cepas *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Se realizó un estudio multicéntrico por Rao *et al.* (2014), para determinar la prevalencia de BLEE en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* en el estado de Karnataka – India. A partir de cinco hospitales se eligieron al azar 200 cepas de cada centro de salud para *E. coli* y *K. pneumoniae* en un período de 3 años, con un total de 1000 cepas por microorganismo, se seleccionaron los aislamientos positivos

productores de BLEE en su mayoría procedentes de muestras de orina, mediante el ensayo de susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos descrito por el CLSI. Determinaron la producción de BLEE en un 84% del total de cepas, de éstas el 61.4% correspondió a cepas de *E. coli* y 46.2% a cepas de *K. pneumoniae*. Encontraron una alta prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* BLEE en todo el estado de Karnataka, con tasas de resistencia más altas a cefotaxima y ceftriaxona que a ceftazidima, lo que sugirió la posibilidad de presencia de CTX-M tipo BLEE.

En un estudio transversal-prospectivo realizado por Soltani *et al.* (2014), para identificar el patrón de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias productoras de BLEE, causantes de ITU nosocomiales en un hospital universitario de referencia Iraní. En un periodo de seis meses se detectaron 213 muestras de orina positivas para crecimiento de bacterias Gram negativas, siendo *E. coli* el microorganismo aislado más frecuente. Del total de muestras positivas para BLEE, obtuvieron el 38.5% para *E. coli*, 39.5% para *K. pneumoniae* y el resto pertenecieron a otras bacterias. El patrón de susceptibilidad antimicrobiana puso de manifiesto que más del 50% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y el 15% de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE fueron resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Bacteriología y el Laboratorio de Biología Molecular y Genética del Área de Investigación del Hospital Regional Lambayeque.

3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

a. Población

La población en estudio estuvo constituida por todas las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU-IH de los diferentes servicios del Hospital Regional Lambayeque, en el periodo de Julio – Noviembre del 2015.

b. Muestra

El número de muestra estuvo conformada por 30 cepas bacterianas; de las cuales 20 correspondieron a *E. coli* y 10 a *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con ITU-IH de los diferentes servicios del Hospital Regional Lambayeque, durante el periodo de Julio – Noviembre del 2015, que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

3.2. MATERIAL

3.2.1. Material biológico.

Cepas bacterianas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU-IH del Hospital Regional Lambayeque, obtenidas durante el periodo de Julio – Noviembre del 2015.

Criterios de inclusión

- ❖ Cepas procedentes de pacientes que desarrollan ITU a partir de 48 horas de estancia hospitalaria, siendo aislamientos positivos para *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE.
- ❖ De existir nuevos aislamientos positivos como control para pacientes con ITU causada por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, sólo se tomará en cuenta una cepa por paciente.

Criterios de exclusión

- ❖ Aislamientos positivos para bacterias diferentes a *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE de pacientes que han adquirido ITU en su estancia en el Hospital Regional Lambayeque.
- ❖ Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU procedentes de consulta externa del Hospital Regional Lambayeque.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Identificación de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Se desarrolló la prueba de susceptibilidad antimicrobiana según el documento: M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement. Se emplearon los discos de antibióticos mencionados en el anexo 01 (Clinical and Laboratory Institute Standards [CLSI], 2015).

La búsqueda del fenotipo BLEE se realizó mediante la prueba inicial o Screen Test inicial por el método de Disco Difusión en una placa conteniendo Agar Müeller Hinton, procedimiento indicado en el anexo 02. Se utilizaron los discos de antibióticos de marca EMB, los cuales fueron: Ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO) y aztreonam (ATM), en concentraciones de 30 µg. A continuación, se incubó a una temperatura de 35°C durante 16 a 18 horas, se midió el diámetro de los halos, y los resultados se evaluaron considerando el tamaño de los halos que presenten zonas menores, dependiendo de cada disco para $CAZ \leq 22\text{mm}$, $CTX \leq 27\text{mm}$, $CRO \leq 25\text{mm}$ y $ATM \leq 27\text{mm}$, lo que sugirió la producción de BLEE (CLSI, 2015) (Anexo 03).

Se corroboró la presencia del fenotipo BLEE mediante el Test confirmatorio por el método de Jarlier, donde se colocó un inhibidor de betalactamasas como el disco de amoxicilina/ ácido clavulánico (AM/C) a una concentración antimicrobiana de 20/10 µg, el cual fue ubicado en el centro de una placa de Petri con Agar Müeller Hinton, y alrededor a 25 mm de distancia se colocaron tres discos de cefalosporinas de tercera generación CAZ, CTX, CRO, y un disco de monobactam como el ATM, todos los discos estuvieron a concentraciones antimicrobianas de 30 µg. La temperatura y tiempo de incubación fue de 35°C por 16 a 18 horas. La confirmación de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico (efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano) del inhibidor AM/C ubicado en el centro de la placa, con los discos que fueron colocados alrededor (Anexo 04) (Comité de L'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie [CA-SFM], 2010).

La recolección de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* se realizó a partir del antibiograma, previa confirmación del fenotipo de resistencia a BLEE, se procedieron a sembrar en medios TSA, incubadas a 37°C por 18-24 horas. Las cepas obtenidas fueron registradas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis molecular.

3.3.2. Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

La relación clonal de las cepas productoras de BLEE aisladas de pacientes con ITU-IIH del HRL, fueron evaluadas mediante los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR. (Instituto Nacional de la Salud, 2002).

3.3.2.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN para las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, se basó en el método de Purificación de ADN genómico bacteriano según el manual de Current Protocols in Molecular Biology (2003). La preparación de los reactivos empleados se indica en el anexo 05.

Procedimiento:

a. Tratamiento previo:

- Para optimizar la extracción de ADN, se trabajó con un cultivo bacteriano joven, el cual se obtuvo mediante la inoculación de un repique de las muestras bacterianas recolectadas en 2 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion/ Infusión Cerebro Corazón) y posteriormente se incubó a 37°C por 16-18 horas.
- El cultivo joven se precipitó por centrifugación a 12000 r.p.m por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

b. Extracción y purificación:

- Se resuspendió el precipitado obtenido en 567 µL de Buffer TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) por pipeteo continuo, seguido se añadió 30 µL de SDS 10% (Dodecilsulfato de sodio) utilizado como detergente aniónico para lisar los componentes celulares como pared celular y membrana, y 3 µL de proteinasa K para desnaturalizar las proteínas. Se mezcló bien y se incubó en baño María a 37°C por 1 hora, agitando fuertemente cada 10 minutos.

- Posteriormente se agregó 100 μL de NaCl 5 M y 80 μL de CTAB/NaCl, y se llevó a incubar en baño María a 65°C por 10 minutos, con esto se consigue eliminar los restos de la pared celular, la proteína desnaturalizada, y polisacáridos adheridos a CTAB, al tiempo que se conservan los ácidos nucleicos en solución.
- Al terminar el periodo de incubación se realizó un shock térmico llevándose a una temperatura inicial de 100°C por 2 minutos y luego a -70°C por un periodo de 10 minutos, este paso se repitió dos veces.
- Con la adición de cloroformo y fenol cloroformo alcohol isoamílico (Volumen por volumen) se lograron eliminar restos celulares, compuestos fenólicos y otras moléculas que permanecieron en la solución, separando mediante una interfase blanca bajo centrifugación a 12000 r.p.m por 5 minutos la fase acuosa y la orgánica, recuperando solo la fase acuosa (sobrenadante) en un criovial estéril.

c. Precipitación:

- Para precipitar el ADN se añadieron 600 μL de isopropanol, agitando el tubo hasta hacer visible un blanco fibroso de ADN, luego se centrifugó a 12000 r.p.m por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Por último se realizó un lavado del ADN precipitado con 300 μL de etanol al 70%, para eliminar los residuos de CTAB, se centrifugó a 12000 r.p.m por 5 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y el ADN obtenido se dejó secar por un periodo de 24 horas.

d. Conservación:

- El ADN fue rehidratado agregando 50 μL de H₂O PCR y se conservó en refrigeración a una temperatura de 4°C, hasta su posterior análisis.

3.3.2.2. Determinación de la calidad de ADN

La evaluación de calidad e integridad del ADN genómico se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa, cuya concentración fue de 1% preparado con buffer TAE. Para esto se disolvió la agarosa en buffer TAE, y se calentó en un microondas hasta su ebullición, seguido se vertió en un soporte con el peine esperando hasta que gelifique. El gel listo fue colocado en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TAE 1X. Las concentraciones de los reactivos empleados en la corrida electroforética se detallan en el anexo 08. En los pocillos del gel de agarosa se cargó 1 µL de muestra previamente mezclados con 1 µL de loading buffer Dye y 8 µL de H₂O PCR, el procedimiento se observa en el anexo 09. Con la fuente de poder se aplicó corriente a 30V por 10 minutos, 70V por 30 minutos y 30V por 10 minutos, transcurrido ese tiempo el gel se tiñó en una solución con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 mg/mL, luego se visualizó y capturó la imagen del ADN con la ayuda del foto documentador Pharos Fx Plus. La visualización del ADN genómico se aprecia en el anexo 12.

3.3.2.3. Amplificación de ADN

El total de extracciones de ADN obtenidas de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, fueron analizadas mediante ERIC-PCR y REP-PCR, con la realización de tres repeticiones por marcador molecular, haciendo un total de 180 análisis. Los primers, la preparación del mix de reacción y las condiciones termodinámicas, se describen a continuación:

a. Primers

Se utilizaron como iniciadores a las secuencias de oligonucleótidos previamente reportadas por Versalovic, Koeuth y Lupski (1991), señaladas en el anexo 13.

- Para ERIC-PCR los primers constaron de un forward ERIC 1R cuya secuencia fue 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA -3' y un reverse ERIC 2 de secuencia 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGA GCG -3'.

- Para REP-PCR los primers tuvieron un forward REP 1R-I cuya secuencia fue 5'- III ICG ICG ICA TCI GGC -3' y un reverse REP2-I de secuencia 5'- ICG ICT TAT CIG GCC TAC -3'.

b. Preparación del mix de reacción:

La preparación del mix de reacción para ERIC-PCR y REP-PCR (Anexo 14) se realizó con un volumen final de 12,5 μL en cada reacción, de acuerdo a lo sugerido por Bailón y Sacsquispe (2013) y Wan *et al.* (2011), con algunas modificaciones hechas por los autores, cuyos componentes y concentraciones utilizadas por reacción fueron:

- Se utilizó 6,25 μL de Master Mix 2X (PROMEGA) a una concentración final de 1X; esto contuvo concentraciones de: 0.625 U de Taq, 200 μM de dNTPs y 1,5 mM de MgCl_2 .
- Adicionalmente para optimizar la reacción de amplificación se agregó 1 μL de MgCl_2 a una concentración final de 1 mM, y 0,75 μL de Taq Polimerasa a una concentración final de 0,375 U (GENTAQ), obteniendo una concentración total en la reacción de 2,5 mM para MgCl_2 y 1 U para Taq Polimerasa respectivamente.
- Se agregaron 1,25 μL de Primer Forward y Reverse, a una concentración final 1 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$, además de la adición de 2 μL de ADN (Anexo 15 y 16).

c. Condiciones termodinámicas de reacción

Las reacciones de amplificación para ERIC-PCR y REP-PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf ®. Las condiciones termodinámicas óptimas constaron de una temperatura de pre-desnaturalización a 94°C por siete minutos, seguido de 45 ciclos que incluyeron una desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación a 41.2°C para el marcador ERIC-PCR y 40.3°C para REP-PCR por un minuto, y extensión a una temperatura de 72°C durante cinco minutos. Finalmente se aplicó una temperatura de extensión final de 72°C por siete minutos, como se observa en la figura 1.

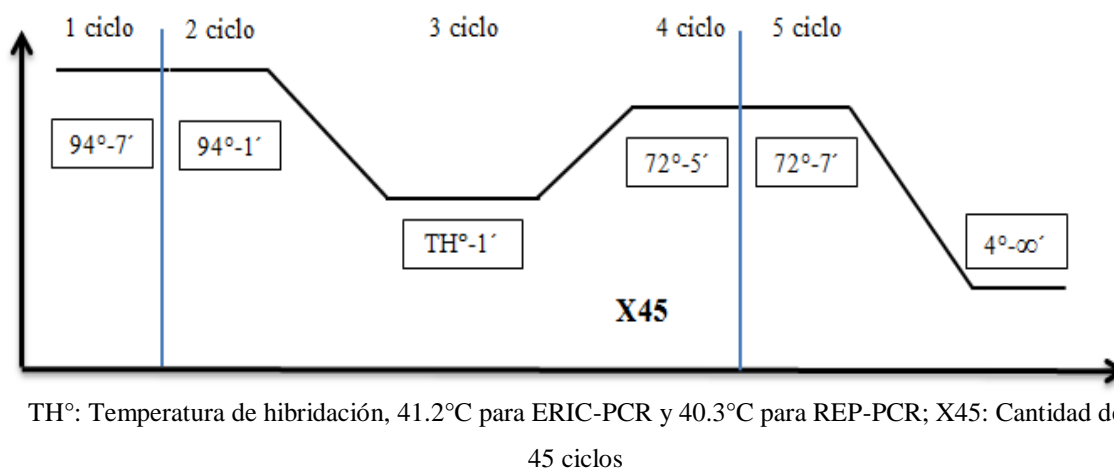


Fig. 1. Condiciones termodinámicas programadas en el termociclador Eppendorf.

3.3.2.4. Corrida electroforética y fotodocumentación

Los productos amplificados con los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2%, utilizando TAE 1X como buffer de corrida. En los pocillos del gel se colocaron 9 µL de los productos mezclados con 1 µL de loading buffer Dye, además en los pocillos de los extremos se adicionó un marcador de peso molecular PROMEGA (ladder) de 100 pb, con el objetivo de calcular el tamaño en pares de bases de los diferentes productos amplificados.

La corrida electroforética se realizó a condiciones de: Pre-corrida de 70V por 10 minutos, corrida de 140 V por 70 minutos y post-corrida de 70V por 10 minutos. Posteriormente los geles fueron teñidos durante 15 minutos en una solución que contenía 0.5 mg/mL de bromuro de etidio (Ramazanzadeh *et al.*, 2013). Luego fueron fotodocumentados empleando un escáner molecular de marca Pharos Fx Plus, para ser visualizadas con el software Quantity One BIORAD.

3.4. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Los patrones de bandas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE generados con los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR se estudiaron aplicando el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA), utilizando el paquete estadístico del software Quantity One® BIORAD (Anexo 18); asimismo, la posición de bandas se normalizó con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

3.4.1. Construcción de la matriz binaria de datos

Se realizó una inspección visual de los perfiles electroforéticos generados producto de la amplificación mediante ERIC-PCR y REP-PCR, de esta manera se lograron identificar los patrones de bandas en cada cepa, estos caracteres se ordenaron en pares de bases de acuerdo al tamaño que presentaron, a partir de esto se armó una matriz con valores binarios de presencia (1) y ausencia (0) de bandas por cada cepa y para ambos marcadores moleculares, donde las filas correspondieron a los caracteres y las columnas a las cepas. La información se ingresó en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2013 (Serquén, 2011) (Anexo 22 y 23).

3.4.2. Construcción de la matriz de similitud

En primer lugar, se calculó la similitud entre cada par de cepas procedentes de la misma especie, basándose en las diferencias cualitativas de presencia o ausencia de bandas obtenidas de la matriz binaria. En este cálculo de comparación entre dos cepas se pueden dar las siguientes cuatro posibilidades: Coincidencia del carácter de presencia de banda en ambas cepas (1,1), presencia en la primera cepa y no en la segunda (1,0), ausencia en la primera cepa y no en la segunda (0,1) y coincidencia de ausencias en ambas cepas (0,0) (Serquén, 2011).

Para obtener la matriz de similitud se recurren a diferentes coeficientes de asociación, que expresan cuantitativamente el parecido entre distintas cepas, de esta manera se calcularon las similitudes o diferencias de las cepas estudiadas

según el coeficiente de similitud de Dice, a través de la siguiente operación matemática:

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde a fue el número de bandas presentes en ambas cepas, b fue el número de bandas presentes en la primera cepa, pero no en la segunda, y c fue el número de bandas presentes en la segunda cepa pero no en la primera. Este coeficiente puede oscilar entre un valor mínimo de cero, cuando el par de cepas no tienen bandas en común, y un valor máximo de uno, cuando todas las bandas presentes en una cepa están presentes en la otra. Así se ordenaron estas comparaciones uno a uno entre las cepas y se generó la matriz de similitud (Anexo 24 y 25).

3.4.3. Agrupamiento UPGMA y elaboración del dendrograma

Formada la matriz de similitud con el paquete estadístico del software Quantity One® BIORAD, se llevó a cabo un agrupamiento UPGMA (Unweighted pair group methodus ingarithmic averages), el cual mediante un algoritmo jerárquico reúne a las cepas en grupos similares, este procedimiento se evidenció gráficamente en un dendrograma. En este estudio se elaboró un dendrograma por especie, combinando los datos obtenidos por ambos marcadores, aumentando así la especificidad de las pruebas y mejorando el agrupamiento generado.

3.4.4. Clasificación de los agrupamientos

Para la clasificación de los agrupamientos se utilizaron los criterios según Tenover *et al.* (1995), de esta manera las cepas que tuvieron el mismo número de bandas fueron consideradas como cepas genéticamente idénticas; aquellas que difirieron en dos o tres bandas fueron clasificadas como estrechamente relacionadas, las que presentaron de cuatro a seis bandas distintas se consideraron como posiblemente relacionadas y las que difirieron en más de siete bandas fueron denominadas como cepas sin relación alguna.

3.4.5. Determinación de los valores descriptivos

Para demostrar la utilidad y confiabilidad de los marcadores moleculares, en este estudio se calculó el poder discriminatorio y el coeficiente de correlación cofenético (Anexo 26).

a. Poder discriminatorio

El poder de discriminación se define como la probabilidad de que dos cepas escogidas al azar de una población de cepas no relacionadas sean distinguidas por el marcador molecular empleado. El índice numérico del poder de discriminación se calculó con la siguiente ecuación (Castro *et al.*, 2009):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S X_j (X_j - 1)$$

Donde S fue el número de tipos, X_j fue la frecuencia del j -ésimo tipo y N fue el tamaño de la población.

b. Coeficiente de correlación cofenético o Test de Mantel

El método de agrupamiento de las cepas puede generar distorsiones en el dendrograma respecto a los datos de similitud originales. La cuantificación de dicha distorsión se realiza mediante el cálculo del coeficiente de correlación cofenético por el test Mantel, que consiste en correlacionar la matriz de similitud original con una matriz cofenética, que surge de las similitudes observadas entre los pares de cepas comparadas, dando un valor entre 0 y 1, donde 1 representa una combinación perfecta (Serquén, 2011).

Esto permitió realizar una validación interna, con la finalidad de comprobar el nivel de confianza de la matriz de similitud y la fidelidad del dendrograma. Así se determinó el coeficiente de correlación cofenético utilizando la plataforma virtual de García y Puigbo (2010).

3.4.6. Características epidemiológicas de la cepas productoras de BLEE en estudio

La información clínica brindada por el HRL, conforme con el comité de ética de investigación de la misma entidad, permitió conocer las características epidemiológicas que presentaron los pacientes con infección urinaria de donde se aislaron las cepas en estudio, desde el momento de ingreso hospitalario, los servicios de procedencia cuando se emitieron los urocultivos, hasta las ubicaciones de los traslados intrahospitalarios, otros aspectos importantes fueron el tratamiento empírico y los procedimientos invasivos; datos que fueron recopilados mediante la ficha sugerida por la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud para el estudio de infecciones intrahospitalarias (Garro & Quispe, 2014) (Anexo 27). Con esta información se fundamentaron los agrupamientos con relación generados en los dendrogramas (Anexo 28, 29y 30).

IV. RESULTADOS

Durante el periodo de junio a diciembre del 2015 fueron recolectadas y analizadas 30 cepas bacterianas productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, de las cuales 20 correspondieron a cepas de *E. coli* y 10 a cepas de *K. pneumoniae*.

4.1 Identificación de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de 20 aislamientos de *E. coli*, se obtuvo una resistencia del 100% a los antibióticos cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacino y trimetoprim/ sulfametoxazol y 60% a ceftazidima, susceptibilidad intermedia del 50% en aztreonam y amoxicilina/ ácido clavulánico, y se observó una sensibilidad del 100% con meropenem y ceftazidima, tal y como se muestra en la Tabla 1 y Figura 2.

Tabla 1. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio - Diciembre 2015.

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE	AISLAMIENTOS
	n (%)	n (%)	n (%)	
Nitrofurantoína	18 (90)	2 (10)	--	20
Trim/ Sulfam	--	--	20 (100)	20
Cefotaxima	--	--	20 (100)	20
Ceftazidima	5 (25)	3 (15)	12 (60)	20
Ceftriaxona	--	--	20(100)	20
Aztreonam	2 (10)	10 (50)	8 (40)	20
Amoxi/ Clav	2 (10)	10 (50)	8 (40)	20
Cefepime	2 (10)	--	18 (90)	20
Cefoxitin	20 (100)	--	--	20
Meropenem	20 (100)	--	--	20
Ciprofloxacino	--	--	20 (100)	20
Gentamicina	7 (35)	--	13 (65)	20
Ampicilina	--	--	20 (100)	20

Abreviaciones: *Trim/ Sulfam*, trimetoprim sulfametoxazol; *Amoxi/ Clav*, amoxicilina ácido clavulánico

Fuente: Base de datos de los autores. DÍAZ – LÓPEZ. HRL-2015

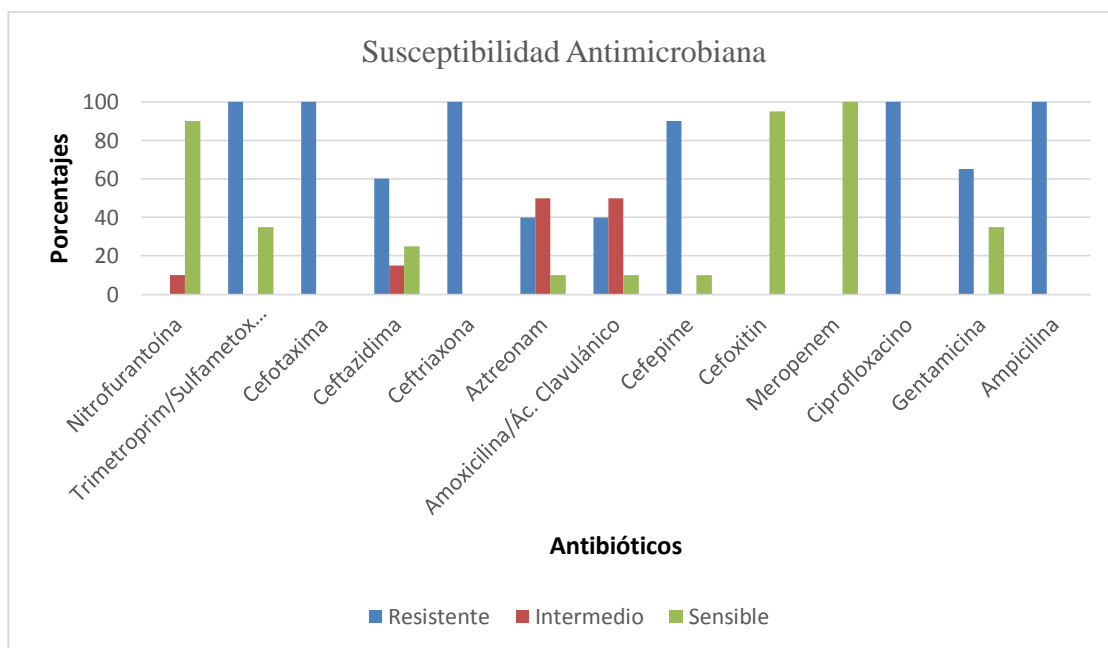


Fig. 2. Susceptibilidad antimicrobiana de 20 cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio - Diciembre 2015.

En la Tabla 2, se observan los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos de 10 aislamientos de *K. pneumoniae*, registrando 100% de resistencia a los antibióticos cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, ciprofloxacino, gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol, seguido de ceftazidima con 90% y aztreonam con 80% de resistencia, el 40% presentaron susceptibilidad intermedia a amoxicilina/ ácido clavulánico, y se evidenció mayor sensibilidad para meropenem y cefoxitin en 100% y 90% respectivamente, como se observa también en la figura 3. .

Tabla 2. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio - Diciembre 2015.

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE	AISLAMIENTOS
	n (%)	n (%)	n (%)	
Nitrofurantoína	4 (40)	1 (10)	5 (50)	10
Trim/ Sulfam	--	--	10 (100)	10
Cefotaxima	--	--	10 (100)	10
Ceftazidima	--	1 (10)	9 (90)	10
Ceftriaxona	--	--	10(100)	10
Aztreonam	--	2 (20)	8 (80)	10
Amoxi/ Clav	--	4 (40)	6 (60)	10
Cefepime	--	--	10 (100)	10
Cefoxitin	9 (90)	--	1 (10)	10
Meropenem	10 (100)	--	--	10
Ciprofloxacino	--	--	10 (100)	10
Gentamicina	--	--	10 (100)	10

Abreviaciones: *Trim/Sulfam*, trimetoprim sulfametoxazol; *Amoxi/ Clav*, amoxicilina/ ácido clavulánico

Fuente: Base de datos de los autores. DÍAZ – LÓPEZ. HRL-2015

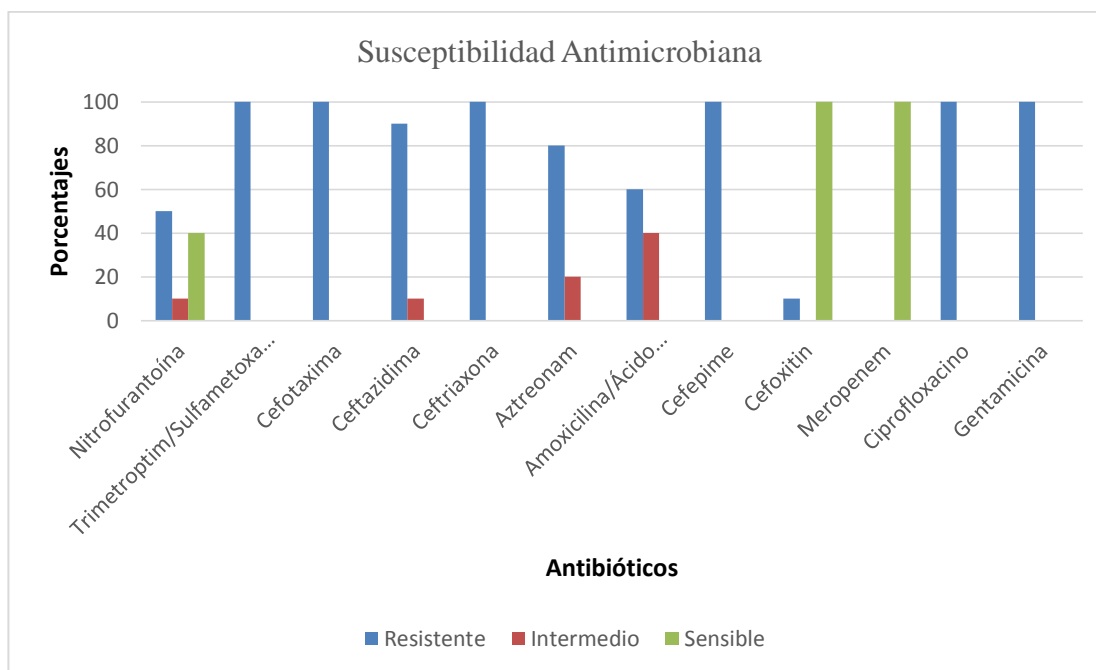


Fig. 3. Susceptibilidad antimicrobiana de 10 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio - Diciembre 2015.

4.2 Confirmación del fenotipo de BLEE

Se confirmó la producción de BLEE en las cepas recolectadas de los servicios del HRL. En la tabla 3 se muestra el sinergismo frente a cada cefalosporina de tercera generación, encontrando que el 65% de cepas de *E. coli* evidenciaron sinergismo con tres cefalosporinas, el 35% con dos (CTX y CRO), y no hubo sinergismo con solo una cefalosporina, mientras el 80% de cepas de *K. pneumoniae* presentaron sinergismo con tres cefalosporinas, un 10% con dos (CAZ y CRO) y 10% con una (CTX), como se observa en la figura 4.

Tabla 3. Sinergismo de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio - Diciembre 2015.

CONFIRMACIÓN DEL FENOTIPO DE BLEE				
Sinergismo Discos de Antibióticos	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Inhibidor + 1 Cefalosporina	N	%	n	%
AMC / CAZ	-	-	-	-
AMC / CRO	-	-	1	10.0
AMC / CTX	-	-	-	-
Total	-	-	1	10.0
Inhibidor + 2 Cefalosporinas	N	%	n	%
AMC / CAZ-CRO	-	-	1	10.0
AMC / CRO-CTX	7	35	-	-
AMC / CTX-CAZ	-	-	-	-
Total	7	35	-	-
Inhibidor + 3 Cefalosporinas	N	%	n	%
AMC / CAZ-CRO-CTX	13	65.0	8	80.0
Total	13	65.0	8	80.0
Total de aislamientos	20	100.0	10	100.0

*AMC: Amoxicilina/ ácido clavulánico,; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CTX: Cefotaxima

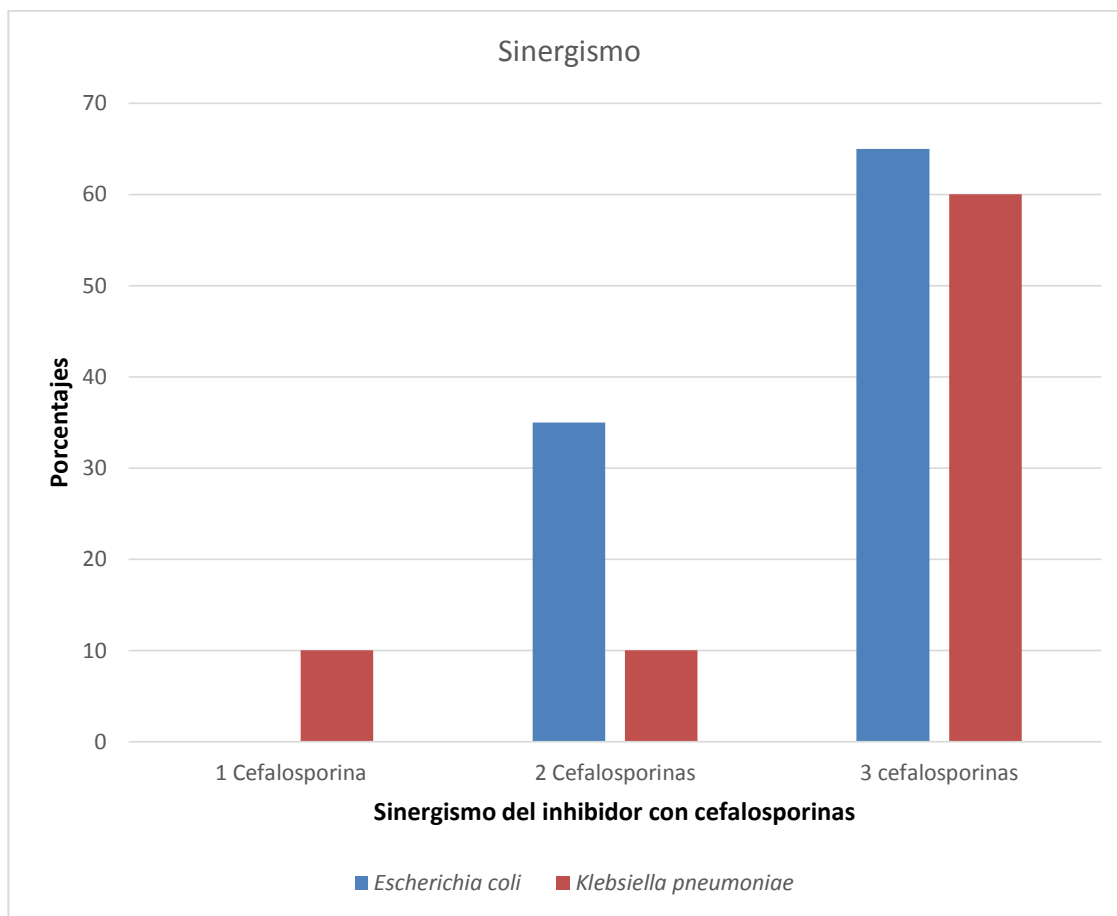
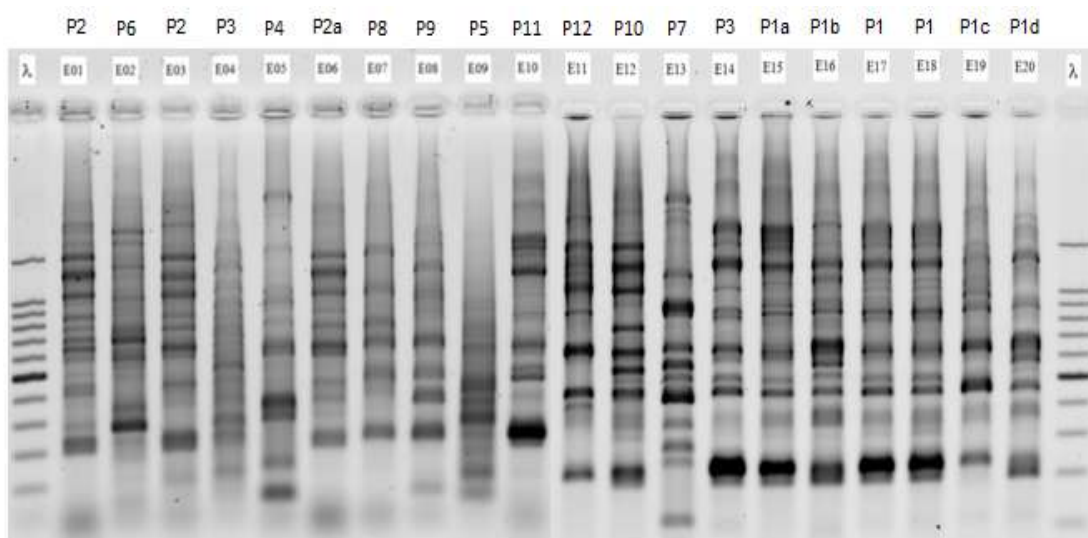


Fig. 4. Porcentaje de sinergismo entre el inhibidor y las cefalosporinas en las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio - Diciembre 2015.

4.3 Caracterización molecular

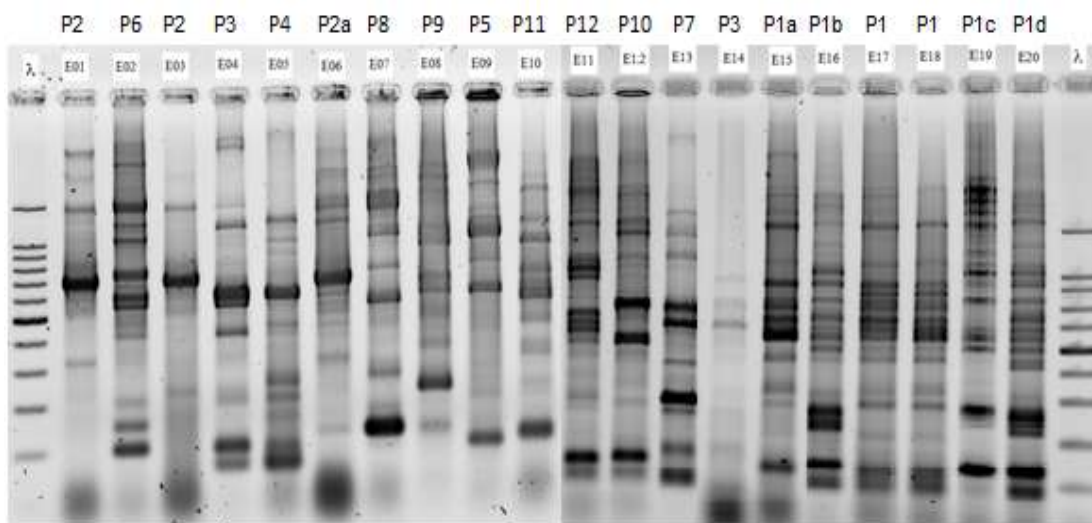
Las amplificaciones del ADN realizadas con 20 cepas de *E. coli* productoras de BLEE utilizando el marcador molecular ERIC-PCR mostraron mediante electroforesis en gel de agarosa los respectivos perfiles electroforéticos en cada aislamiento, el número de bandas registradas en cada perfil osciló entre 38 y 40.



Corrida electroforética con buffer TAE 1X en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción en solución de bromuro de etidio, fotografiado con el escáner molecular PHAROX FX Plus. λ: Marcador de peso molecular, P1 a P12: Patrones clonales,

Fig. 5. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR para las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria. Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Asimismo, usando el marcador molecular REP-PCR se obtuvieron los perfiles electroforéticos para las 20 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, el número de bandas registradas en cada perfil osciló entre 45 – 50.



Corrida electroforética con buffer TAE 1X en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción en solución de bromuro de etidio, fotografiado con el escáner molecular PHAROX FX Plus. λ: Marcador de peso molecular, P1 a P12: Patrones clonales,

Fig. 6. Perfiles electroforéticos generados por REP-PCR para las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria. Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Los perfiles electroforéticos obtenidos con los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR se combinaron, revelando en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE la formación de doce patrones clonales (P1 – P12). El patrón P1 agrupó seis cepas, de ellas E17 y E18 mostraron semejanzas en el 100% de las bandas y se discriminaron como cepas genéticamente idénticas con un coeficiente de similitud de 1.00, las cuatro cepas restantes (E15, E16, E19 y E20) correspondieron a subpatrones clonales (P1a, P1b, P1c y P1d) y fueron discriminadas como cepas posiblemente relacionadas, cuyos coeficientes de similitud dieron 0.76, 0.70, 0.68 y 0.64 respectivamente.

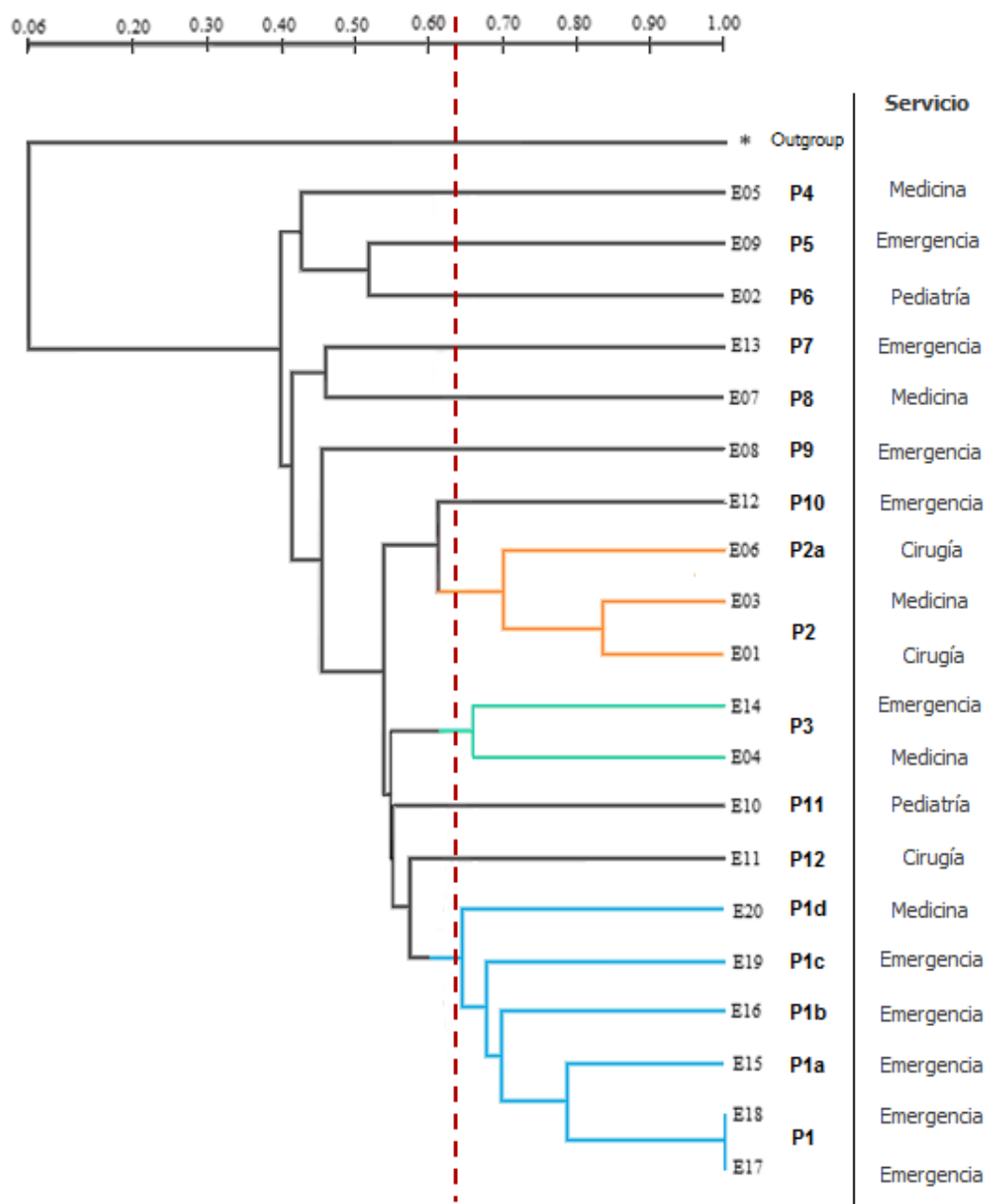
El patrón P2 agrupó tres cepas, de ellas E01 y E03 difirieron en dos de sus bandas, y se discriminaron como cepas estrechamente relacionadas con un coeficiente de similitud de 0.84, la cepa restante E06 se consideró un subpatrón clonal P2a al diferir en cinco de sus bandas, además fue discriminada como una cepa posiblemente relacionada con un coeficiente de similitud de 0.70.

El patrón P3 lo conformaron las cepas E04 y E14, los cuales difirieron en seis bandas y se discriminaron como cepas posiblemente relacionadas con un coeficiente de similitud de 0.66. Asimismo, los patrones P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11 y P12 mostraron mayores diferencias entre sus bandas, y se consideraron como cepas no relacionadas, conteniendo solo una cepa en cada patrón. Los agrupamientos generados y el dendrograma se detallan en la Tabla 4 y Figura 7, respectivamente.

Tabla 4. Agrupamientos obtenidos por ERIC y REP-PCR para las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio - Diciembre 2015.

Patrón clonal	Subpatrón clonal	N° de cepas	Aislamiento	Categoría	Valor de similitud
P1	P1	6	E17	Genéticamente idénticos	1.00
			E18		
	P1a		E15	Posiblemente relacionados	0.76
	P1b		E16	Posiblemente relacionados	0.70
	P1c		E19	Posiblemente relacionados	0.68
	P1d		E20	Posiblemente relacionado	0.64
P2	P2	3	E01	Estrechamente relacionado	0.84
			E03		
	P2a		E06	Posiblemente relacionados	0.70
P3	P3	2	E04 E14	Posiblemente relacionados	0.66
P4	-	1	E05	No relacionado	0.43
P5	-	1	E09	No relacionado	0.52
P6	-	1	E02	No relacionado	0.52
P7	-	1	E13	No relacionado	0.46
P8	-	1	E07	No relacionado	0.46
P9	-	1	E08	No relacionado	0.45
P10	-	1	E12	No relacionado	0.61
P11	-	1	E10	No relacionado	0.55
P12	-	1	E11	No relacionado	0.57

Las cepas genéticamente idénticas se agruparon con un valor de similitud de 1.00, estrechamente relacionados con 0.84 y posiblemente relacionados con un valor de similitud superior a 0.64.



Genéticamente idénticos: P1. Estrechamente relacionados: P2. Posiblemente relacionados: P1a, P1b, P1c, P1d, P2a y P3. *Cepa out-group.

Fig. 7. Dendrograma derivado del agrupamiento UPGMA, obtenido a partir de los perfiles electroforéticos generados por la unión de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR para las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria. Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Las amplificaciones del ADN utilizando el marcador molecular ERIC-PCR realizadas con 10 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE mostraron mediante electroforesis en gel de agarosa los perfiles electroforéticos en cada aislamiento y el número de bandas en cada perfil osciló entre 15 – 20.

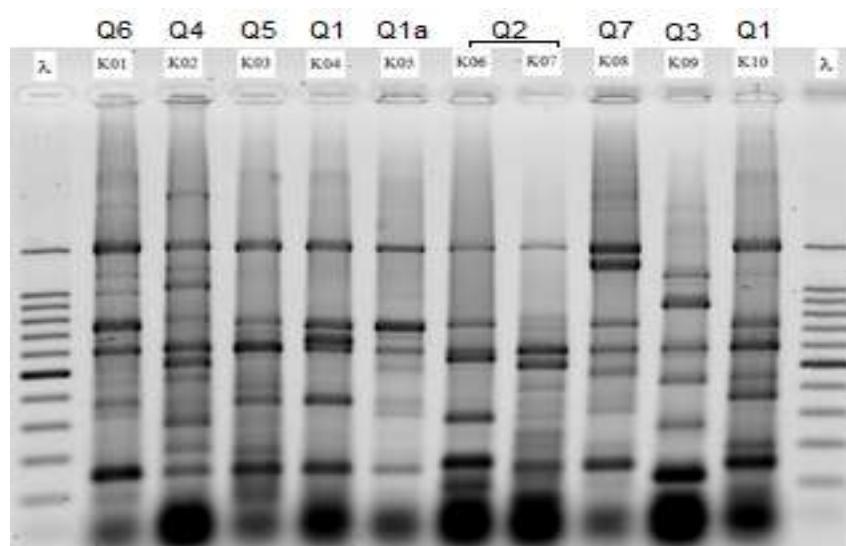


Corrida electroforética con buffer TAE 1X en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción en solución de bromuro de etidio, fotografiado con el escáner molecular PHAROX FX Plus. λ: Marcador de peso molecular, Q1 a Q7: Patrones clonales,

Fig. 8. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR para las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria.

Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Asimismo, se obtuvieron los perfiles electroforéticos de 10 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE usando el marcador molecular REP-PCR, el número de bandas registradas en cada perfil osciló entre 25 – 30.



Corrida electroforética con buffer TAE 1X en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción en solución de bromuro de etidio, fotografiado con el escáner molecular PHAROX FX Plus. λ: Marcador de peso molecular, Q1 a Q7: Patrones clonales,

Fig. 9. Perfiles electroforéticos generados por REP-PCR para las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria.

Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Se combinaron los perfiles electroforéticos obtenidos con los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, revelando en las 10 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE la formación de siete patrones clonales (Q1 – Q7). El patrón Q1 agrupó tres cepas, de ellas K04 y K10 difirieron en cinco de sus bandas, y se discriminaron como cepas posiblemente relacionadas con un coeficiente de similitud de 0.66, la cepa restante K5 difirió en seis de sus bandas, se consideró un subpatrón clonal Q1a, y fue discriminada como una cepa posiblemente relacionada con un coeficiente de similitud de 0.64.

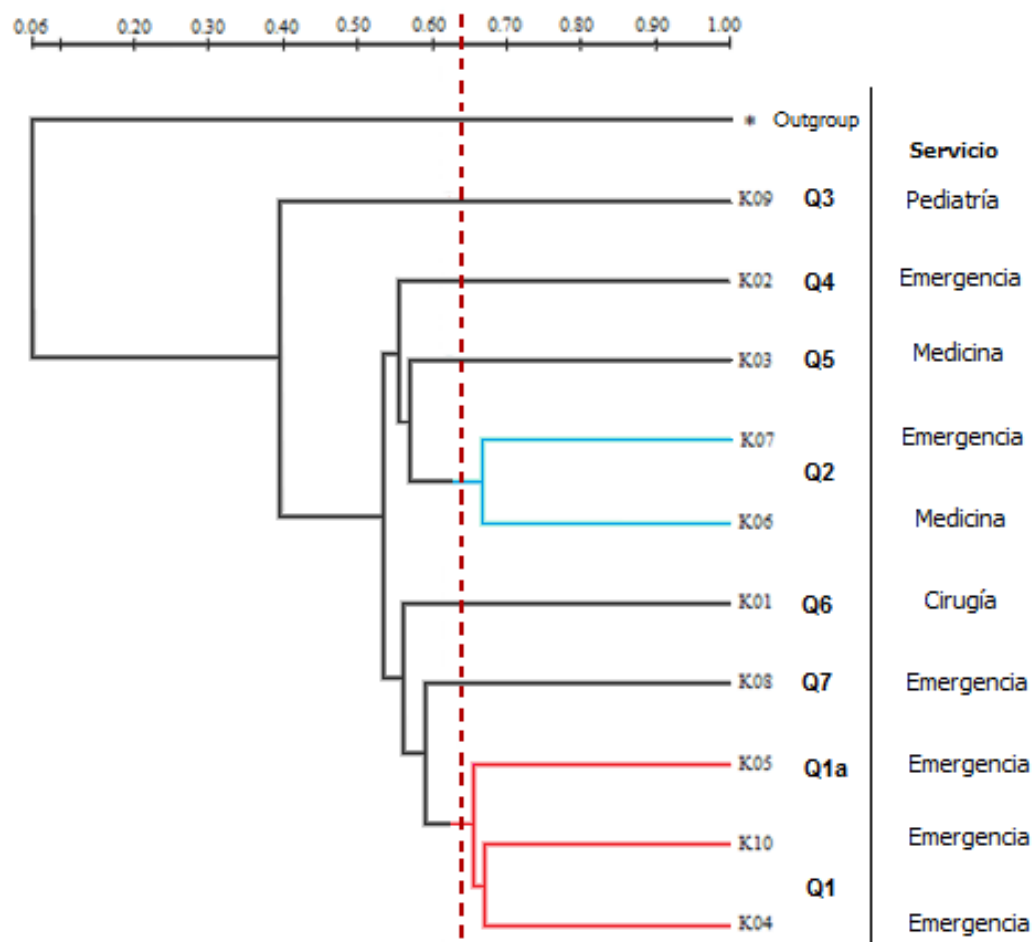
Las cepas K06 y K07 conformaron el patrón Q2, los cuales difirieron en seis bandas, y se discriminaron como cepas posiblemente relacionadas con un coeficiente de similitud de 0.66. Asimismo, los patrones Q3, Q4, Q5, Q6 y Q7 mostraron mayores diferencias entre sus bandas, y se consideraron como cepas no relacionadas,

conteniendo solo una cepa en cada patrón. Los agrupamientos y el dendrograma se detallan en la Tabla 5 y Figura 10, respectivamente.

Tabla 5. Agrupamientos obtenidos por ERIC y REP-PCR para *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio - Diciembre 2015.

Patrón clonal	Subpatrón clonal	N° de cepas	Aislamiento	Categoría	Valor de similitud
Q1	Q1	3	K04	Posiblemente relacionadas	0.66
			K10		
	Q1a		K05	Posiblemente relacionadas	0.64
Q2	Q2	2	K06	Posiblemente relacionadas	0.66
			K07		
Q3	-	1	K01	No relacionado	0.55
Q4	-	1	K02	No relacionado	0.50
Q5	-	1	K03	No relacionado	0.57
Q6	-	1	K08	No relacionado	0.59
Q7	-	1	K09	No relacionado	0.40

Las cepas posiblemente relacionadas se agruparon con un valor de similitud superior a 0.64



Posiblemente relacionadas: Q1, Q1a y Q2. *Cepa out-group.

Fig. 10. Dendrograma derivado del agrupamiento UPGMA, obtenido a partir de los perfiles electroforéticos generados por la unión de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR para las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria. Junio – Diciembre 2015.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, frente a la sospecha de una posible diseminación bacteriana en los servicios del HRL por aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE, con un fenotipo de multirresistencia muy similar entre ellos, se realizó la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas en estudio. Dentro de los resultados se obtuvieron altas tasas de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (100% a cefotaxima y ceftriaxona), tasas que coincidieron con la investigación realizada por Bailón y Sacsquispe (2013) para *K. pneumoniae* y por Bueno (2010) para ambas especies. Por lo general, las BLEE hacen referencia a enzimas de codificación plasmídica capaces de hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico, lo que apunta a un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de propagación.

Además, se mostró un 100% y 90% de resistencia a cefepime para los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* respectivamente, cuya capacidad hidrolítica en enterobacteriáceas puede atribuirse a la alta prevalencia de genes BLEE de tipo CTX-M en los aislados, resultados que discrepan con el trabajo realizado en Irán por Gholipour *et al.* (2014), quienes reportaron una resistencia del 32% para cefepime, esto quizá debido a otros genes BLEE sobre todo del tipo SHV, donde se ha visto que las cefalosporinas de cuarta generación mantienen buena actividad, aunque no se recomienda su uso como primera línea ante infecciones complicadas. También se presentó en los aislamientos alta resistencia a ceftazidima y aztreonam, esto sugiere el inadecuado y creciente uso de cefalosporinas de espectro extendido como terapia empírica, frecuentemente aplicada frente a estos uropatógenos, que explica la elevada resistencia mostrada en los servicios del HRL, información que a su vez es sostenida por un estudio elaborado por Flores *et al.* (2012) en un hospital de Lima.

A esto se suma, que en los aislamientos se observó un 100% de resistencia a ciprofloxacino, la cual usualmente se da por mutaciones puntuales a nivel cromosómico que generan el cambio de aminoácido en la enzima blanco del antibiótico, y a trimetoprim/ sulfametoxazol, relacionados mayormente con la adquisición de genes mutantes mediante elementos móviles como integrones (Ramazanzadeh *et al.*, 2013). La resistencia a gentamicina se dio en un 65% y 100% para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, esta resistencia puede cotransferirse con BLEE a través de plásmidos, de esta manera la inactivación enzimática es el principal mecanismo de resistencia en aminoglucósidos. Esto revela la preocupación ante mecanismos de resistencia como las BLEE, que no solo confieren la resistencia ya conocida, sino que desarrollan un amplio espectro de inactivación a la mayoría de antibióticos, originando incrementos en las tasas de resistencia y provocando una notable disminución de las opciones terapéuticas para contrarrestar las IHH.

Asimismo, se halló sensibilidad a ceftazidima en un 100% y 90% para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, y a meropenem en un 100% para ambas especies. Las cefamicinas y los carbapenémicos son estructuralmente más estables y resistentes a la hidrólisis por BLEE, los últimos llegan a ser la terapia de elección en bacterias productoras de BLEE con excelente actividad *in vitro* (Bueno, 2010). Dichos resultados difirieron con Soltani *et al.* (2014), quienes revelaron en un estudio realizado en Irán, susceptibilidad intermedia para carbapenémicos en un 100%. A su vez para los aislamientos de *E. coli* se manifestó un 90% de sensibilidad a nitrofurantoína, datos similares al obtenido por Gholipour *et al.* (2014), fármaco alternativo para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas, cuya acción permite interferir en varias rutas enzimáticas; no obstante en *K. pneumoniae* se presentó en un 50%. Estos resultados permiten dilucidar que en los servicios del HRL aún no se han alcanzado tasas importantes de resistencia para este grupo de antibióticos, sugiriendo que estos fármacos deben utilizarse cuidadosamente, de lo contrario su eficacia podría verse disminuida por los mecanismos de resistencia.

Ante aislamientos con halos de inhibición inferiores para cefalosporinas de tercera generación o ante hallazgos de multirresistencia en las pruebas de susceptibilidad, se hace prioritario descartar la presencia de BLEE. Para este caso se evaluó el sinergismo de los discos de ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona, con el inhibidor amoxicilina/ ácido clavulánico, detectando el 100% de cepas en estudio como productoras de BLEE, según el método de Jarlier sugerido por García *et al.* (2012), el cual demostró ser buena opción como prueba confirmatoria. Asimismo, el mayor sinergismo se obtuvo entre el inhibidor con tres cefalosporinas en un 65% y 80% para las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente. El mayor sinergismo observado responde principalmente a la producción de la betalactamasa tipo CTX-M, quien tiene especial actividad sobre la cefotaxima, pero también contra otros sustratos betalactámicos como ceftazidima y ceftriaxona, esto ha sido señalado por investigaciones realizadas por Rao *et al.* (2014).

Las cepas en estudio presentaron mayor inducción a más de una cefalosporina, resultados que se diferenciaron con la investigación realizada en el hospital docente Belén por Galindo y Gutiérrez (2015), quienes obtuvieron un 50% de sinergismo para una cefalosporina, además de un 4,6% de cepas sin sinergismo. Esto evidencia que la intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, llegando incluso a no tener efecto fenotípicamente detectable, permaneciendo en un intervalo de sensibilidad, lo que lleva a considerar la resistencia a todas las cefalosporinas y monobactámicos frente una infección por una bacteria productora de BLEE (Soltani *et al.*, 2014). Probablemente el uso prioritario de estos antibióticos como tratamiento por su baja toxicidad y espectro extendido, explique tal diferencia, además la generación de distintas betalactamasas repartidas entre genes de estos patógenos nosocomiales, sugiere que el tipo de betalactamasa causante de la producción de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* varía entre hospitales.

Es de conocimiento público que los ambientes hospitalarios suelen mantener reservorios de patógenos, originados por diversas vías de transmisión que facilitan la

diseminación de cepas con resistencia a BLEE. En este sentido, las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infecciones urinarias en el HRL durante el periodo de estudio, procedieron principalmente de pacientes del servicio de emergencia en un 53.4%, los cuales se mantenían internados por periodos superiores a siete días, seguido de medicina que ocupó el 23.3%, cirugía el 13.3% y pediatría el 10%. Esto apunta a que mientras mayor sea el número de casos producidos por una especie en un determinado servicio, existirá mayor oportunidad de encontrar relación entre ellas. Datos que difirieron con los obtenidos por Escalante *et al.* (2013), quienes encontraron en el servicio de medicina al mayor número de cepas productoras de BLEE en el hospital Almanzor Aguinaga Asenjo, esclareciendo que la mayor frecuencia del HRL, viene dada por la numerosa acogida presente en el servicio.

Para investigar la posible diseminación de bacterias productoras de BLEE en los servicios del HRL, se realizó además la caracterización molecular de las cepas en estudio buscando su relación genética. De acuerdo a los perfiles electroforéticos, los aislamientos fueron agrupados en patrones clonales, donde destacaron tres patrones en las cepas de *E. coli* y dos en las cepas de *K. pneumoniae*, los cuales mostraron una agrupación genética muy similar por los análisis ERIC-PCR y REP-PCR. Estos análisis resaltan la necesidad de utilizar por lo menos dos marcadores de genotipificación diferentes, para lograr establecer con mayor eficacia las posibles relaciones entre cepas, esto se ha visto reflejado en la investigación realizada por Castro *et al.* (2009), quienes a partir de la complementariedad de las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR les han permitido genotipificar varios géneros de bacterias, siendo aplicados con éxito en enterobacteriáceas como *E. coli* y *K. pneumoniae*.

La asignación de bandas con valores binarios se realizó minuciosamente, y el análisis estadístico de datos definió las relaciones de similitud de las 20 cepas de *E. coli* y las 10 de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Se utilizó el algoritmo UPGMA, tal y como lo reportó Serquén (2011), con la finalidad de lograr agrupaciones que expliquen de manera más acertada las relaciones entre cepas

representadas en un dendrograma y las razones de sus vinculaciones al correspondiente patrón. De este modo, los patrones de las cepas en estudio se obtuvieron combinando los datos generados por ambos marcadores moleculares, así como lo indicaron Mantilla *et al.* (2004), lo que incrementó la especificidad de las pruebas mejorando las agrupaciones entre cepas.

Según criterio de los investigadores se trabajó con un coeficiente de similitud de 0.64 para los dendrogramas, el cual es variable para cada estudio, dado que este infiere directamente en los agrupamientos, tomando en cuenta el nivel de polimorfismo generado. De esta manera, se formaron doce patrones clonales en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, siendo P1, P2 y P3, los tres patrones que predominaron, y en las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, se discriminaron siete patrones clonales, de los cuales sobresalieron dos, los patrones Q1 y Q2. Por otra parte, estos agrupamientos sugirieron la transmisión de cinco diferentes cepas en los servicios del HRL, durante el periodo de estudio, los cuales fueron caracterizados como patrones clonales entre *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

Cuando se obtienen cepas clasificadas como genéticamente idénticas, se puede asumir que estas derivaron recientemente de un ancestro común, y que además poseen un nivel de similitud significativo. Los métodos ERIC-PCR y REP-PCR fueron capaces de discriminar como genéticamente idénticas a dos cepas de *E. coli* productoras de BLEE (E17 y E18), ubicadas dentro del patrón P1, mostrando la completa semejanza entre sus bandas. Del mismo modo se discriminaron los demás aislamientos, donde se obtuvieron subclones de los patrones formados, encontrando a su vez cepas clasificadas como estrechamente y posiblemente relacionadas. Resultados que se asemejan al obtenido por Rivas *et al.* (2006), quienes encontraron un grupo de clones de *E. coli* estrechamente relacionados en un centro de salud de Venezuela, de donde destacaron 4 cepas clasificadas como genéticamente idénticas,

utilizando las dos variantes de la técnica rep-PCR, dejando evidencia de la propagación clonal a nivel de nosocomio.

Asimismo, el patrón P1 tuvo el mayor número de aislamientos agrupados, los cuales procedieron del servicio de emergencia obtenidos durante el mes de octubre, esto reveló que una cepa de *E. coli* productora de BLEE se transmitía entre los pacientes internados en el servicio de emergencia, quizá principalmente por transmisión indirecta de un paciente a otro por manos del personal sanitario, observando el mayor impacto de diseminación clonal intrahospitalaria. Por otro lado, los patrones clonales P2 y P3 con una menor cantidad aislamientos y valores de similitud, fueron clasificados como estrechamente y posiblemente relacionados respectivamente, cuya diseminación se observó entre los servicios de medicina y cirugía para el patrón P2, y en los servicios de emergencia y medicina para el patrón P3. Los datos de fecha y lugar de los aislamientos, sin duda incrementan la probabilidad de considerarlos como epidemiológicamente relacionados.

En las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE se discriminaron dos patrones clonales predominantes como posiblemente relacionados, los cuales aparecieron en un lapso de tiempo no mayor de 30 días, en este caso el patrón Q1 evidenció diseminación dentro del servicio de emergencia, mientras el patrón Q2 lo hizo entre el servicio de emergencia y medicina. Estos resultados se diferenciaron con el estudio realizado por Bailón y Sacsquispe (2013), quienes revelaron la propagación clonal de *K. pneumoniae* productora de BLEE en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, determinando la existencia de dos grupos clonales, al caracterizar siete aislamientos mediante los métodos ERIC-PCR, REP-PCR y PFGE. Si bien las cepas del estudio tuvieron una categoría menor de relación, esto se ve fundamentado por posibles eventos genéticos como mutaciones puntuales, inserciones o deleciones que ocurren de manera espontánea y al azar, y que pueden alterar el patrón de bandas.

Los resultados demostraron que en los servicios del HRL y especialmente en emergencia, se dan las condiciones apropiadas no sólo para albergar microorganismos potencialmente infecciosos, sino también para facilitar su diseminación. Esto se explica por las características propias de los servicios del HRL, entre ellas la estancia hospitalaria prolongada, así los datos evidenciaron que 17 pacientes tuvieron una hospitalización mayor de 30 días, el tratamiento con drogas de amplio espectro, dado con cefalosporinas de tercera generación y quinolonas, y el hacinamiento, este último frecuente en el servicio de emergencia, generado por la gran cantidad de pacientes que a diario recurren por múltiples enfermedades y/o accidentes, en ocasiones la infraestructura queda corta y el servicio llega a colapsar. Este hallazgo es comparado con los estudios reportados por Bailón y Sacsquispe (2013) y Rubio *et al.* (2012), quienes detectaron como los principales puntos de diseminación a los servicios de neonatología y medicina respectivamente.

Como se ha mencionado, el estándar de oro para la caracterización molecular es la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE); sin embargo, técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando secuencias repetitivas de ADN no codificante, como ERIC-PCR y REP-PCR, han sido reportadas como una buena alternativa, debido a su alto poder de discriminación, buena reproducibilidad, bajo costo, rapidez y fácil uso, lo cual ha sido descrito por diversos autores como Bailón y Sacsquispe (2013) y Ramazanzadeh *et al.* (2013), quienes han demostrado la eficacia y eficiencia de estos marcadores moleculares para caracterizar cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

Durante la obtención de los resultados el proceso de extracción de ADN fue fundamental, al considerarse como uno de los factores que influyen en la reproducibilidad de los ensayos moleculares, siendo imprescindible un protocolo a seguir; con este fin se llevó a cabo el procedimiento indicado en el manual de Current Protocols in Molecular Biology (2003). Con respecto a las condiciones del PCR, fue necesario hacer modificaciones al protocolo propuesto por Wan *et al.* (2011), se

estandarizaron las concentraciones de reactivos para el mix de reacción, además se probaron los marcadores en base a temperaturas de amplificación trabajadas por el mismo autor. Estos datos fueron evaluados mediante gradiente de temperatura, ya que temperaturas de ciclaje relativamente bajas pueden generar fragmentos inespecíficos, de esta manera se lograron obtener las temperaturas óptimas para ERIC-PCR y REP-PCR presentados en este estudio. Finalmente se demostró la alta resolución entre las bandas generadas, después de la electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Por otra parte, la confiabilidad de los datos y la reproducibilidad de las observaciones son cruciales para un sólido estudio de caracterización molecular, la información que cada marcador molecular imparte al estudio, es considerada una medida útil para distinguir una cepa de otra. En los ensayos se obtuvo un poder de discriminación de 0.91 para las cepas de *E. coli* y 0.93 para las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, considerando que el número máximo de discriminación es 1.0, y cuyos valores comparados con el poder de discriminación de 0.98 de la PFGE presentado por Castro *et al.* (2009), demostraron la aceptabilidad de los datos generados mediante ERIC-PCR y REP-PCR, lo cual reveló que los marcadores moleculares fueron muy discriminativos permitiendo reconocer a los aislamientos no relacionados como distintos.

Con el fin de demostrar la seguridad de los agrupamientos generados en el dendrograma, se utilizó la prueba conocida como índice de correlación cofenético o Test de Mantel, desarrollada en la plataforma virtual de García y Puigbo (2010). Con ello, los coeficientes de correlación cofenético resultaron ser 0.95 para las cepas de *E. coli* y 0.97 para *K. pneumoniae* productoras de BLEE, esto se evidenció al compararse la matriz de similitud con la matriz cofenética, definiendo que hubo una adecuada representación de las similitudes genéticas por parte de los dendrogramas, es decir no se generaron distorsiones en la gráfica, indicando que el algoritmo de agrupamiento UPGMA fue el correcto. Cabe resaltar que los marcadores moleculares fueron altamente resolutivos generando gran cantidad de bandas y mediante el

agrupamiento UPGMA los coeficientes de similitud obtenidos fueron en su mayoría relativamente bajos.

Los aislamientos productores de BLEE encontrados son de suma importancia, ya que en comparación con otros microorganismos están frecuentemente asociados con la multirresistencia, hecho demostrado en este estudio y por otros autores como Ramazanzadeh *et al.* (2013). Además pueden mantenerse por periodos prolongados, incluso durante tiempo indefinido, donde interfieren las principales fuentes de infección animadas e inanimadas que permiten la supervivencia de estos gérmenes, asimismo su facilidad de propagación las convierte en una amenaza frente a la producción de brotes en hospitales.

La mayoría de las cepas presentaron algunas variaciones en sus perfiles de resistencia, estos resultados sugieren que la propagación de los determinantes de resistencia se dio principalmente por una transmisión horizontal y no solamente por la diseminación de clones bacterianos. También se presentó variabilidad genética entre algunas cepas, esto posiblemente producto de la aleatoriedad generada en algunas infecciones del tracto urinario, dado por el cambio de la microbiota normal en el periodo de hospitalización, lo cual fue visto en parte de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE. Si bien estas especies forman parte de la microbiota del tracto intestinal y poseen diversos factores de virulencia como fimbrias, adhesinas, toxinas, entre otros, requieren además otros factores predisponentes para dar lugar a infecciones oportunistas, como lo refiere Diestra (2010).

Además los resultados apoyaron la complementariedad de las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR como métodos útiles para caracterizar aislamientos procedentes de infecciones sospechosas de causar una diseminación y generar brotes hospitalarios, permitiendo determinar el número de clones circulantes en diferentes servicios, esto demuestra la buena tipabilidad y alta capacidad de repetición de los marcadores moleculares utilizados. De este modo, la relación genética entre cepas, así como la

variabilidad genética deben ser tomadas en cuenta para futuros estudios epidemiológicos y clínicos en la región Lambayeque. Cabe mencionar que las infecciones nosocomiales aumentan los gastos y reducen la calidad de la asistencia sanitaria, por lo que persiste el reto a nivel hospitalario, de vigilar la presencia y propagación de las infecciones causadas por BLEE.

VI. CONCLUSIÓN

1. Las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del HRL se caracterizaron molecularmente mediante los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, revelando la formación de 3 patrones clonales predominantes en las cepas de *E. coli*, evidenciando mayor diseminación clonal en el servicio de emergencia durante el mes de octubre del 2015, y las cepas de *K. pneumoniae* revelaron dos patrones clonales predominantes, procedentes de los servicios de emergencia y medicina.
2. Las cepas *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE demostraron alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y a trimetoprim/ sulfametoxazol, susceptibilidad intermedia a amoxicilina/ ácido clavulánico y sensibilidad a los carbapenémicos y cefamicinas, y se detectó mayor sinergismo con tres cefalosporinas y un inhibidor en 65% para *E. coli* y en 80% para *K. pneumoniae*.
3. Los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR mostraron ser eficientes en la caracterización de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, obteniendo valores altos de discriminación en los análisis y altos coeficientes de correlación cofenético.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar posteriores estudios que abarquen mayor población con el fin de vigilar la presencia y propagación de las infecciones intrahospitalarias producidas por BLEE, además de enriquecer la información epidemiológica de las cepas causantes de infecciones en los servicios del HRL, información que debe ser impartida al personal que labora en el nosocomio para establecer una buena prevención.
2. Se debe establecer guías de manejo que implementen reportes obligatorios y de seguimiento para las infecciones nosocomiales, de manera que se puedan aplicar terapias empíricas adecuadas a la realidad local, lo cual permitirá reducir las tasas de infecciones.
3. Implementar el uso de técnicas moleculares frente a la presencia de antibiótipos similares diagnosticados fenotípicamente, ya que estas se adquieren en su mayoría por una transmisión horizontal y no vertical; por tanto, para estos casos se requieren de análisis más precisos que busquen la relación clonal en ambientes hospitalarios.
4. Ensayar con PFGE, a fin de comparar los resultados obtenidos en esta investigación, ya que al ser considerada el estándar de oro, podría precisar más detalladamente las agrupaciones formadas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arce, Z., Llontop, J., Alarcón, E., & López, E. (2014). Detección de los genes SHV, TEM y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo – Perú. *Revista de Cuerpo Médico*, 7(3), 27–30.
- Bailón, H., & Sacsquispe, R. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 24, 101–108.
- Bueno, G. (2010). *Factores asociados a la infección por Escherichia coli y Klebsiella sp productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión – Callao: Setiembre 2008 - Diciembre 2009*. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperada de: http://200.62.146.31/sisbib/2010/bueno_bg/pdf/bueno_bg.pdf
- Cantón, R., González, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(110), 1-19. Recuperado de: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Castañeda, M., Requelme, F., & Poma, J. (2011). Infecciones intrahospitalarias: un círculo vicioso. *Revista Médica Herediana*, 22(4), 202-203.
- Castro, N., Alonso, A., Silva, J., & Armenta, A. (2009). Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de β – lactamasas de espectro extendido. *Bioquímica*, 33(4), 165-174.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty - Fifth Informational Supplement*.
- Comité de L'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie. (2010). Les recommandations 2010. CA-SFM. *Société Française de Microbiologie*. Recuperado de: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm_2010.pdf
- Curello, J., PharmD, MacDougall, C., & MAS. (2014). Beyond susceptible and resistant, Part II: Treatment of infections due to gram negative organisms producing extended spectrum β – lactamase. *Journal Pediatr Pharmacol Ther*, 19(3), 156-164. Recuperado de: <http://doi.org/10.1056/NEJMra1313875>
- Current Protocols in Molecular Biology. (2003). Recuperado de: http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Proceeding_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf

- Dávila, K. F., & Cruz, R. A. (2014). *Etiología, susceptibilidad antibiótica y detección de betalactamasas en bacterias aisladas de ITU en pacientes atendidos en el Centro Médico Salud y Vida – Chiclayo: Junio 2013 – Enero 2014*. (Tesis). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Diestra, K. (2010). *Caracterización del entorno genético de genes bla_{BLEE} y plásmidos asociados en cepas circulantes de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae en España*. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Eftekhari, F., Rastegar, M., Golalipoor, M., & Mansoursamaei, N. (2012). Detection of extended spectrum β -lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to Bla SHV, Bla TEM and BLA CTX-M gene carriage. *Iranian J Publ Health*, 41(3), 127-132.
- Escalante, J. C., Síme, A., & Díaz, C. (2013). Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Epidemiología*, 17(1), 1-6.
- Flores, M. K., Pérez, L. M., Trelles, M. G., Málaga, G., Loza, C., & Tapia, E. (2012). Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un hospital general. *Revista Medica Herediana*, 19(2), 46-52.
- Galindo, A., & Gutiérrez, L. R. (2015). *Prevalencia de Enterobacterias productoras de betalactamasas tipo BLEE y AmpC aisladas de pacientes con Infecciones del Tracto Urinario (ITUs). Hospital Provincial Docente Belén, Lambayeque Agosto 2014 – Febrero 2015*. (Tesis). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- García, C. (2013). Infecciones por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Revista Medica Herediana*, 24, 99-100.
- García, C., Astocondor, L., & Banda, C. (2012). Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Médica Perú*, 29(3), 163-169.
- García, S., & Puigbo, P. (2010). DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. Recuperado de: <http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php?entrada=Example3>
- Garro, G. M., & Quispe, Z. E. (2014). Protocolo: Estudio de prevalencia de infecciones intrahospitalarias. *Dirección General de Epidemiología/ Ministerio de Salud*. Lima, Perú. Recuperado de: http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/protocolo_iih.pdf
- Gholipour, A., Soleimani, N., Shokri, D., Mobasherizadeh, S., Kardi, M., & Baradaran, A. (2014). Phenotypic and molecular characterization of extended spectrum β - lactamase produced by *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates in an Educational Hospital. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(10), 1-6. Recuperado de: <http://doi.org/10.5812/jjm.11758>

- Hidalgo, L. F., Marroquín, J. E., Antigoni, J., & Samalvides, F. (2011). Prevalencia de infecciones hospitalarias en un hospital peruano de nivel IV, en el año 2008. *Revista Medica Herediana*, 22(2), 76-81. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2011000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Huayra, J. M. (2008). *Incidencia de Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU). Hospital Provincial Docente "Belén" de Lambayeque: Septiembre 2007 – Marzo 2008*. (Tesis). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Instituto Nacional de Salud. (2002). *Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular*. Serie de Normas Técnicas N°35, Lima, Perú.
- Mantilla, J. R., García, I., Espinal, P. A., & Valenzuela, E. M. (2004). Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Col Cienc Quím Farm*, 33(1), 48-58
- Morales, J. L., Reyes, K., Monteghirfo, M., Roque, M., & Irey, J. (2013). Presencia de β - lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*, 66(1), 24–32.
- Ramazan-zadeh, R., Zamani, S., & Zamani, S. (2013). Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), 126–131.
- Rao, S. P., Rama, P. S., Gurushanthappa, V., Manipura, R., & Srinivasan, K. (2014). Extended spectrum betalactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentric study across Karnataka. *Journal of Laboratory Physicians*, 6(1), 7–13. Recuperado de: <http://doi.org/10.4103/0974-2727.129083>
- Rivas, J., Redondo, C., & Alonso, G. (2006). Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*, 9(2), 3-7.
- Rubio, I., Martín, E., Domingo, D., López, M., & Larrañaga, E. (2012). Extended spectrum betalactamase producing bacteria in a tertiary care hospital in Madrid: epidemiology, risk factors and antimicrobial susceptibility patterns. *Emerg Health Threatsm*, 5, 1-6. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.3402/ehj.v5i0.11589>
- Serquén, L. M. (2011). *Caracterización de la variabilidad genética e identificación de marcadores genéticos en accesiones silvestres del Jatropha curcas de la costa norte del Perú*. (Tesis). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Soltani, R., Ehsanpoor, M., Khorvash, F., & Shokri, D. (2014). Antimicrobial susceptibility pattern of extended spectrum β -lactamase producing bacteria causing nosocomial urinary tract infections in an Iranian referral teaching hospital. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 3(1), 6-11. Recuperado de: <http://doi.org/10.4103/2279-042X.132703>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831. <http://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Vílchez, G., & Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 6-12.
- Wan, L., Wang, Z., Yan, Q., Wang, X., Lei, Y., Zuo, L., ... Guo, W. (2011). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms revealed by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) and repetitive extragenic palindrome PCR (REP-PCR), 10(51), 10543-10550. Recuperado de: <http://doi.org/10.5897/AJB11.1388>
- Yamile A., & Celis, B. (2012). *Escherichia coli* uropatogénica resistente a múltiples antibióticos: un problema de salud pública. *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 74-77.
- Yezli, S., Shibl, A. M., & Memish, Z. A. (2014). The molecular basis of β -lactamase production in Gram negative bacteria from Saudi Arabia. *Journal of Medical Microbiology*, 64(2), 127-136. Recuperado de: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.077834-0>

IX. ANEXOS

ANEXO N° 01

Tabla 6. Concentración y zonas de diámetro de los antibióticos utilizados para medir la susceptibilidad antimicrobiana en enterobacteriáceas según M100-S25 CLSI 2015.

Grupo	Agente antimicrobiano	Concentración del disco	Zona de Diámetro		
			S	I	R
Penicilinas	Ampicilina	10 µg	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Inhibidores de betalactámicos	Amoxicilina	20 / 10 µg	≥ 18	14 - 17	≤ 13
	ácido clavulánico				
	Cefepime	30 µg	≥ 25	-	≤ 18
Cefalosporinas parentales	Cefotaxima	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
	Ceftriaxona	30 µg	≥ 23	20 - 22	≤ 19
	Cefoxitin	30 µg	≥ 18	15 - 17	≤ 14
	Ceftazidima	30 µg	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Monobactámicos	Aztreonam	30 µg	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Carbapenémicos	Meropenem	10 µg	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Aminoglucósidos	Gentamicina	10 µg	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	5 µg	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Inhibidores de la vía folato	Trimetoprim	1.25 / 23.75 µg	≥ 16	11 - 15	≤ 10
	sulfametoxazol				
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	300 µg	≥ 17	15 - 16	≤ 14

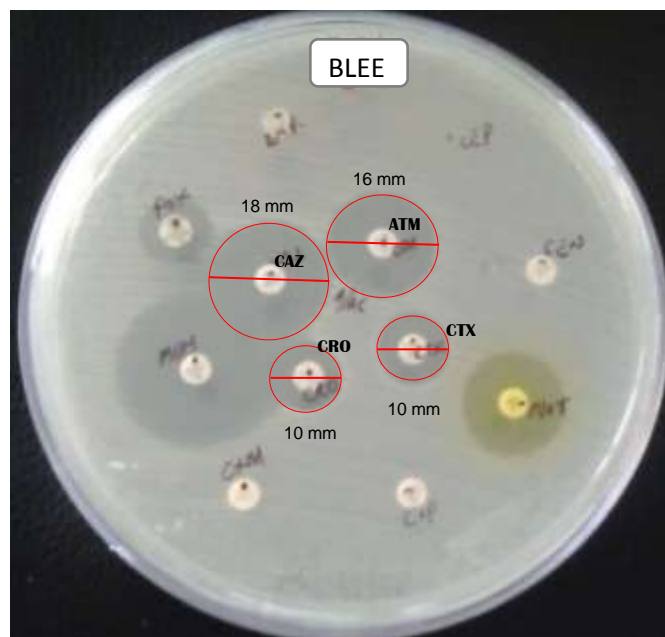
* *K. pneumoniae* presenta resistencia natural a ampicilina

ANEXO N° 02

Tabla 7. Búsqueda y confirmación del fenotipo de BLEE en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

TEST	SCREEN TEST INICIAL	TEST CONFIRMATORIO
Fuente	M100-S25 CLSI 2015	Sociedad Francesa de Microbiología
Método	Disco de Difusión	Jarlier
Medio	MHA	MHA
Concentración del agente antimicrobiano	Aztreonam (ATM) 30 µg Cefotaxima (CTX) 30 µg Ceftazidima (CAZ) 30 µg Ceftriaxona (CRO) 30 µg (El uso de más de un agente antimicrobiano para el screening aumenta la sensibilidad de detección de BLEE)	Se colocará un disco de Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/ 10 µg) en el centro de una placa de Petri con MHA, y alrededor, a 25 mm de distancia, discos de CAZ, CTX, CRO y ATM.
Temperatura y tiempo de inoculación	35°C/ 16-18 horas	35°C/ 16-18 horas
Resultados	Halo de Aztreonam ≤ 27 mm Halo de Cefotaxima ≤ 27 mm Halo de Ceftazidima ≤ 22 mm Halo de Ceftriaxona ≤ 25 mm Zonas menores podrían indicar producción de BLEE	La presencia de BLEE será manifestada por el efecto sinérgico del inhibidor AMC con cualquiera de los discos de CAZ, CTX, CRO y ATM, ubicados alrededor, mostrando las características de efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano.

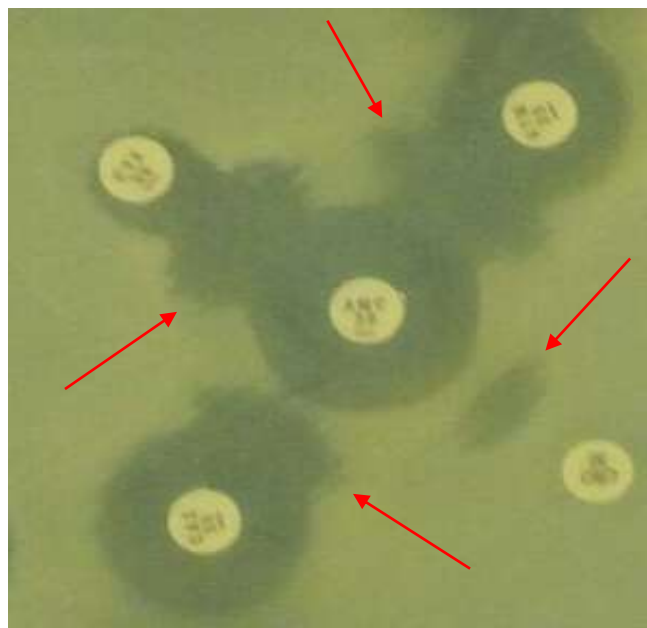
ANEXO N° 03



CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona y ATM: Aztreonam

Fig. 11. Screen Test inicial para la producción de BLEE.

ANEXO N° 04



Sinergismo entre AMC con ATM, CAZ, CRO, CTX.

Fig. 12. Test confirmatorio para la producción de BLEE.

ANEXO N° 05

Tabla 8. Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico bacteriano, según el manual de Current Protocols in Molecular Biology (2003).

Reactivo	Concentración final	Volumen final	Cantidades
Buffer TE pH 8.0	Tris 10 mM EDTA 1 Mm	50 mL	Tris 0.06 g
			EDTA 0.01861 g
			H ₂ O estéril 50 mL
SDS	10 %	50 mL	SDS 5 g
			H ₂ O estéril 50 mL
NaCl	5 M	100 mL	NaCl 29.22 g
			H ₂ O estéril 100 mL
CTAB / NaCl	CTAB 10 % NaCl 0.7 M	100 mL	NaCl 4.1 g
			CTAB 10 g
			H ₂ O estéril 100 mL
Cloroformo - OH isoamílico	C: I 24: 1	50 mL	Cloroformo 48 mL
			OH isoamílico 2 mL
Fenol - Cloroformo - OH isoamílico	P: C : I 25: 24: 1	100 mL	Fenol 50 mL
			Cloroformo 48 mL
			OH isoamílico 2 mL

*Buffer TE: El pH 8.0 se regula con NaOH en caso de acidez, y con HCl en caso de alcalinidad.

*Preparación del fenol: El envase de fábrica contiene 100 g de fenol cristalizado, al cual se agregaron 250 mL de Tris base 0.5 M, y se llevó a un agitador magnético por 30' (pudiendo mantenerlo por tiempos de 60' o 90') a una temperatura de 70°C, seguido se dejó reposar observándose la formación de dos capas, se extrajo entonces el tris residual de la capa superficial, ya que el fenol formado se ubicará en el fondo; para seguir neutralizando se hicieron dos lavados más con 250 mL de Tris Base 0.1 M con 30' de agitación.

*Tris Base 0.5 M: 30.285g de Tris base y 400 mL de H₂O estéril

*Tris Base 0.1 M: 100 mL Tris Base 0.5 M y 400 mL de H₂O estéril

ANEXO N° 06



Fig. 13. Reactivación de cepas productoras de BLEE en caldo BHI, tratamiento previo para la extracción.

ANEXO N° 07



Fig. 14. Extracción de ADN genómico bacteriano, según el manual de Current Protocols in Molecular Biology

ANEXO N° 08

Tabla 9. Preparación de reactivos para la corrida electroforética de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

Medio	Concentración final	Volumen final	Cantidades
Gel de Agarosa 1%	1%	35 mL	Agarosa 0.3 g Buffer TAE 1X 30 mL Agua destilada 5 mL
Gel de Agarosa 2%	2%	85 mL	Agarosa 1.6 g Buffer TAE 1X 80 mL Agua destilada 5 mL
BUFFER TAE 1X	1X	100 mL	Buffer TAE 10X 10 mL Agua bidestilada 90 mL

* Buffer TAE 10X: El buffer se almacena a una concentración 10X, en la cual no precipitan los solutos. Las cantidades para preparar 1 litro de Buffer TAE 10X fueron: 48.4 g de tris base (hidroximetilaminometano), 11.4 mL de ácido acético glacial, 3.7 g ó 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y agua bidestilada.

ANEXO N° 09

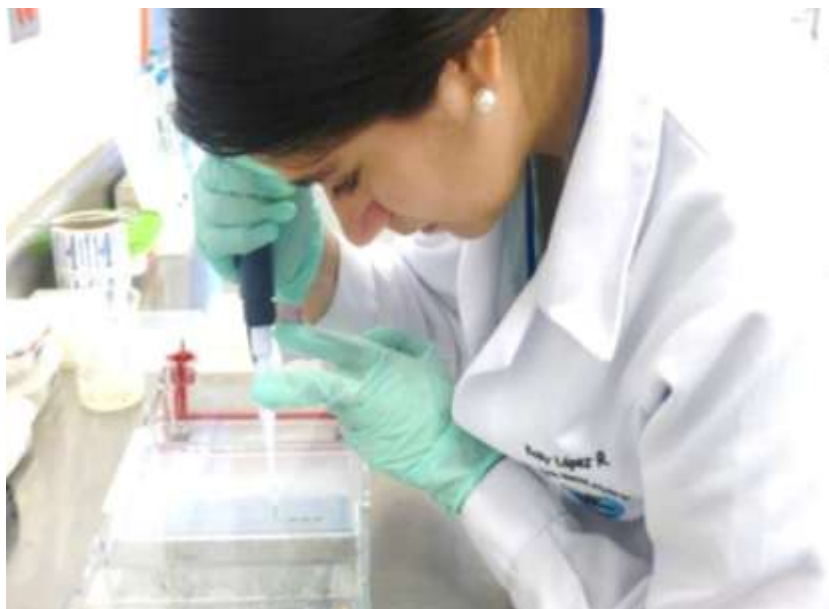


Fig. 15. Siembra de cepas productoras de BLEE para la corrida electroforética.

ANEXO N° 10

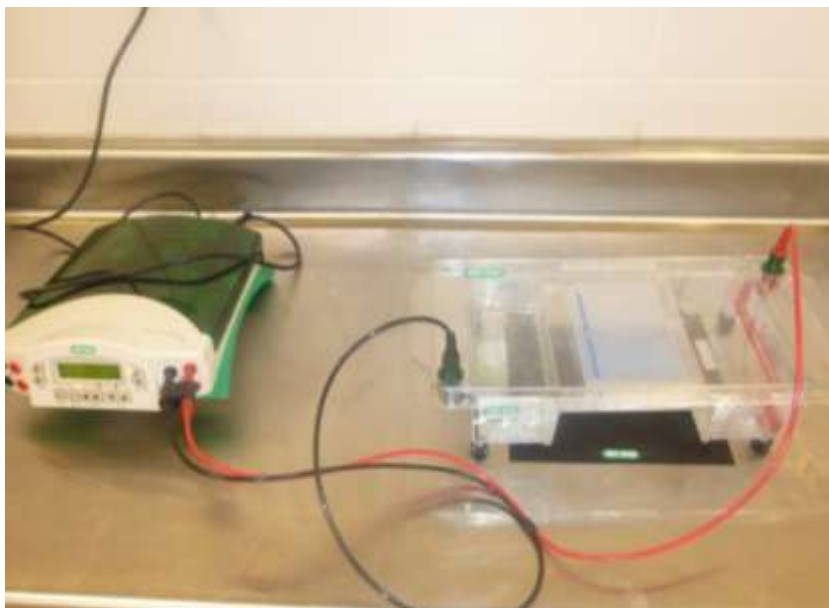


Fig.16. Corrida electroforética de las cepas productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

ANEXO N° 11



Fig. 17. Tinción del gel con bromuro de etidio de las cepas productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

ANEXO N° 12

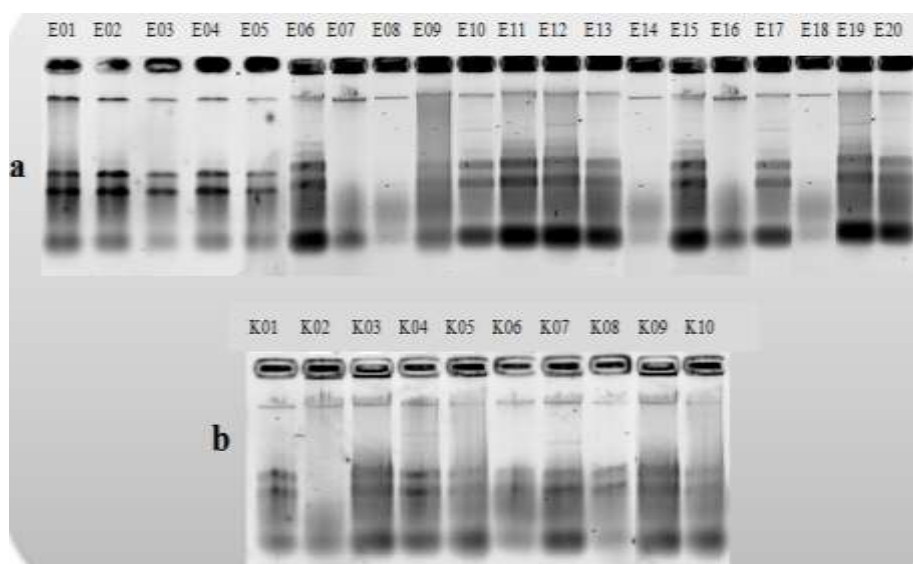


Fig. 18. Electroforesis de ADN genómico en gel de Agarosa al 1%, (a) extracciones de cepas de *Escherichia coli* (b) extracciones de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

ANEXO N° 13

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para el estudio molecular de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

Oligonucleótido	Secuencia	Bases del DNA
ERIC 1R	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA - 3'	21 bases
ERIC 2	5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGAGCG - 3'	24 bases
REP 1R-I	5'- IIIICGICGICATCIGGC - 3'	11 bases
REP 2-I	5'- ICGICTTATCIGGCCTAC - 3'	15 bases

* Fuente: Hoja de especificaciones según Integrated DNA Technologies ®; I: representa al nucleósido inosina.

ANEXO N° 14

Tabla 11. Concentraciones del mix de reacción para ERIC-PCR y REP-PCR para volumen final de 12.5 µL.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final
PCR Master Mix 2x	2 X	1 X	6.25 µL
Taq	50 U/ mL	0.625 U	
Dntps	400 µM	200 µM	
MgCl₂	3 mM	1.5 mM	
Primer F	10 µM	1 µM	1.25 µL
Primer R	10 µM	1 µM	1.25 µL
DNA	-	-	2 µL
Taq Pol	5 U/ mL	0.375 U	0.75 µL
MgCl₂	25 mM	1 mM	1 µL
Volumen final	-	-	12.5 µL

ANEXO N° 15



Fig. 19. Preparación del mix de reacción con ERIC-PCR para cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

ANEXO N° 16



Fig. 20. Preparación del mix de reacción con REP-PCR para cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

ANEXO N° 17

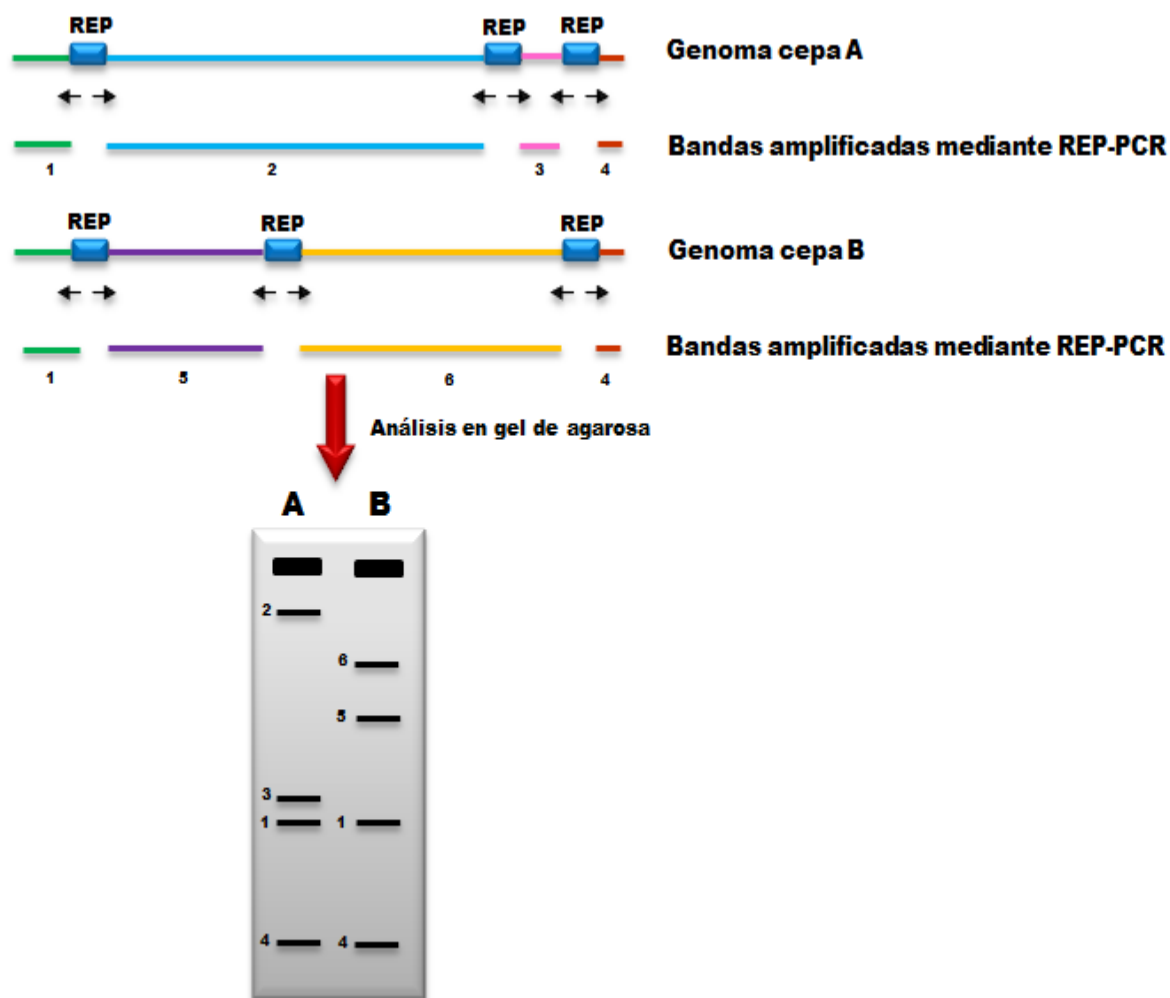


Fig. 21. Diagrama esquemático de la prueba REP-PCR mostrado según Vilchez y Alonso (2009). Se representa la distribución hipotética de las secuencias repetitivas REP en una región de los genomas de dos cepas A y B. Utilizando marcadores moleculares que reconocen estas secuencias repetitivas, se amplifican las regiones espaciadoras extragénicas, y los fragmentos de DNA generados, se separan en un gel de agarosa mediante el cual se comparan los patrones de bandas entre las cepas. Similar esquema se presenta para la prueba ERIC-PCR.

ANEXO N° 18



Fig. 22. Análisis de los patrones de bandas con el software Quantity One.

ANEXO N° 19

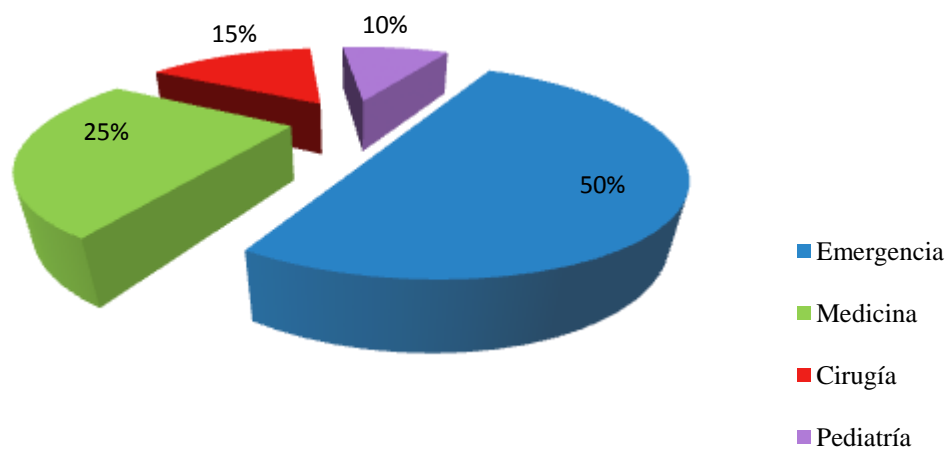


Fig. 23. Distribución de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE por servicio de hospitalización. Junio – Diciembre 2015

ANEXO N° 20

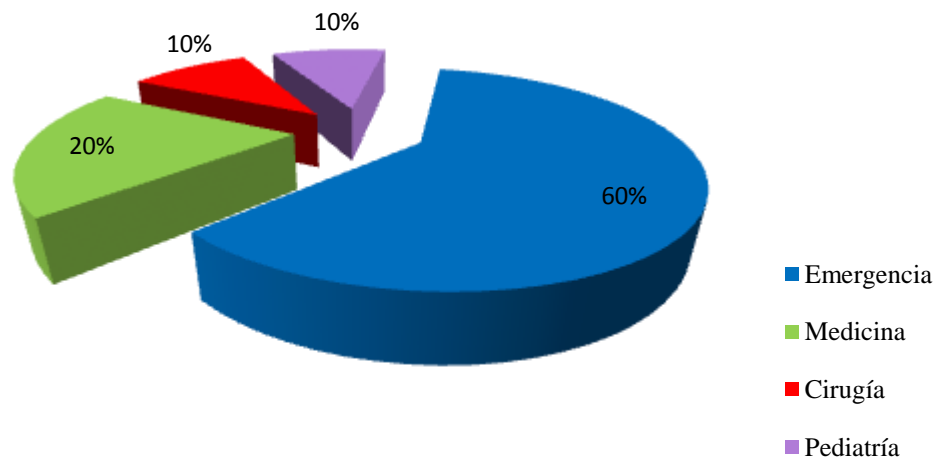


Fig. 24. Distribución de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE por servicio de hospitalización. Junio – Diciembre 2015

ANEXO N°21

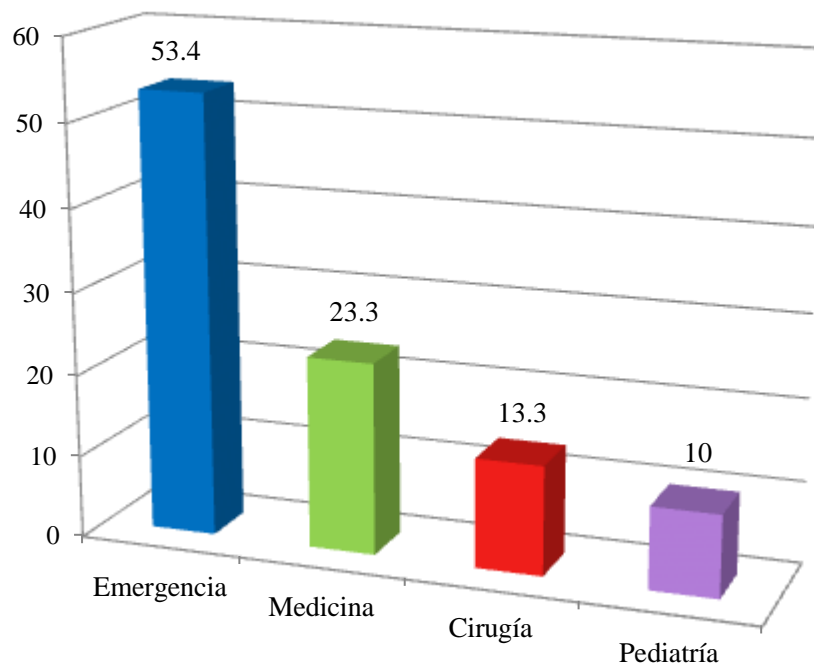


Fig. 25. Distribución de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE por servicio de hospitalización. Junio – Diciembre 2015

ANEXO N° 22

Tabla 12. Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, en las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	*
1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0

1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1
0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0

*Presencia: 1; Ausencia: 0

(*): Cepa outgroup.

ANEXO N° 23

Tabla 13. Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

K01	K02	K03	K04	K05	K06	K07	K08	K09	K10	*
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0

*Presencia: 1; Ausencia: 0

(*): Cepa outgroup.

ANEXO N° 24

Tabla 14. Matriz de similitud mediante el coeficiente de Dice para *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

Carril	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	*
E01	100																				
E02	52.0	100																			
E03	83.7	46.6	100																		
E04	44.4	48.3	46.1	100																	
E05	36.7	47.3	36.7	39.2	100																
E06	71.2	45.9	68.5	49.8	44.1	100															
E07	30.7	35.1	30.0	39.7	27.3	37.9	100														
E08	28.2	34.7	36.6	52.3	23.3	34.2	44.4	100													
E09	19.8	51.7	20.9	29.9	38.2	30.0	25.3	31.6	100												
E10	56.2	50.8	50.6	49.8	38.7	54.9	35.3	45.4	27.9	100											
E11	52.1	52.7	46.4	51.5	41.6	52.7	39.0	37.9	40.5	55.7	100										
E12	62.7	55.0	64.4	61.0	45.1	56.6	47.8	49.7	31.6	54.2	56.5	100									
E13	43.4	48.5	39.2	41.3	33.0	36.4	46.0	39.1	30.1	40.9	36.8	49.6	100								
E14	56.7	50.5	51.9	66.0	34.6	55.8	36.1	51.9	34.7	53.3	54.1	57.2	45.6	100							
E15	43.8	46.8	54.0	57.2	45.7	52.7	44.2	53.1	39.1	59.9	52.4	64.3	40.2	59.5	100						
E16	57.5	57.5	55.3	54.7	41.8	56.9	47.2	44.0	32.3	56.6	60.9	60.3	47.6	57.4	69.6	100					
E17	58.4	50.8	60.0	54.1	53.4	61.4	41.4	47.8	31.7	59.0	59.3	63.4	43.0	62.0	80.9	71.6	100				
E18	57.6	50.0	58.6	57.4	50.2	57.8	35.2	54.3	31.3	57.4	56.5	62.9	45.7	60.2	76.2	67.8	88.7	100			
E19	51.1	57.3	53.1	48.4	39.3	51.6	37.7	49.6	40.8	52.8	67.5	55.9	44.7	57.5	63.2	67.7	71.2	68.8	100		
E20	37.3	50.7	39.4	55.1	43.9	36.6	52.0	48.0	30.6	45.9	47.5	55.1	52.5	45.4	57.4	69.4	63.7	59.4	64.3	100	
*	8.0	4.7	5.2	7.6	5.3	8.0	2.6	0.0	3.5	4.1	8.1	4.5	8.1	4.0	1.5	8.8	5.3	5.8	9.2	10.7	100

ANEXO N° 25

Tabla 15. Matriz de similitud mediante el coeficiente de Dice para *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección urinaria del Hospital Regional Lambayeque, Junio – Diciembre 2015.

Carril	K01	K02	K03	K04	K05	K06	K07	K08	K09	K10	*
K01	100.0										
K02	53.3	100.0									
K03	56.1	53.7	100.0								
K04	56.2	53.8	54.1	100.0							
K05	58.8	55.7	50.2	65.8	100.0						
K06	49.0	53.0	55.1	60.9	54.7	100.0					
K07	47.6	59.4	58.3	62.7	55.9	65.9	100.0				
K08	54.8	54.4	48.9	65.1	51.3	54.2	47.9	100.0			
K09	38.9	43.8	33.5	39.4	39.4	21.0	30.2	52.8	100.0		
K10	55.3	57.4	58.7	66.0	63.4	46.0	48.4	60.2	58.4	100.0	
*	3.6	3.1	12.1	7.0	6.9	9.5	11.0	3.2	3.7	3.2	100.0

ANEXO N° 26

Tabla 16. Valores descriptivos calculados para el estudio molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, mediante la combinación de los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR.

Valores descriptivos	Agrupamiento o Dendrograma	Valor
Cr	<i>Escherichia coli</i>	0.95
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.97
D	<i>Escherichia coli</i>	0.91
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.93

*Cr: Coeficiente de correlación cofenético o Test de Mantel; D: Poder discriminatorio

ANEXO N° 27

Tabla 17. Ficha de recolección de datos según la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud para el estudio de infecciones intrahospitalarias.

PERÚ
Ministerio de Salud
 Dirección General de Epidemiología

ESTUDIO DE PREVALENCIA DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

FICHA DE REGISTRO DE DATOS DEL PACIENTE

N° FICHA:

I.- DATOS GENERALES

1.1. Nombre del Establecimiento de Salud: 1.2. Fecha del estudio: / /

1.3. Servicio de hospitalización: 1.4. N° cama:

1.3.a Denominación del servicio:

Llenado obligatorio del siguiente campo según códigos que se encuentran en la parte posterior

II.- DATOS DEL PACIENTE

2.1. Número de historia clínica: 2.3. Hora de ingreso al hospital:

2.2. Fecha de ingreso del paciente al hospital: / / 2.5 Tipo de edad:

2.4. Edad del paciente al momento del estudio: 2.7. Peso al nacer (Neonatos): kg

2.6. Sexo:

III.- PROCEDIMIENTOS INVASIVOS E INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

3.1. Procedimiento invasivo empleado en las últimas 72 horas: 3.3. Fecha de inicio del procedimiento N°1: / /

3.2. Procedimiento invasivo N°1: 3.5. Fecha de inicio del procedimiento N°2: / /

3.4. Procedimiento invasivo N°2: 3.7. Fecha de inicio del procedimiento N°3: / /

3.6. Procedimiento invasivo N°3: 3.9. Fecha de inicio del procedimiento N°4: / /

3.8. Procedimiento invasivo N°4: 3.11. Fecha de inicio del procedimiento N°5: / /

3.10. Procedimiento invasivo N°5: 3.13. Fecha de inicio del procedimiento: / /

3.12. Otro procedimiento invasivo sin código: 3.15. Fecha de la intervención quirúrgica: / /

3.14. Intervención quirúrgica: 3.18. Fecha de la intervención quirúrgica: / /

3.15. Tipo de intervención quirúrgica: 3.20. Grado de contaminación de la cirugía:

3.17. Otro intervención quirúrgica sin código:

3.19. Clasificación de ASA:

3.21. Tiempo de duración de la cirugía: min.

IV. DIAGNÓSTICO MÉDICO PRINCIPAL (SEGÚN CIE 10):

4.1. OTROS DIAGNÓSTICOS MÉDICOS (SEGÚN CIE 10):

4.2 4.3

V.- ANTIMICROBIANOS

5.1. El paciente tiene prescripción de antimicrobianos:

5.2

Antimicrobiano (Nombre genérico)	Vía de adm.	Fecha de inicio	Motivo de uso (colocar códigos)

VI.- INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA (IH):

6.1. Al momento del estudio, el paciente presenta alguna IH: Si No

*Si tiene IH *, llenado obligatorio de los siguientes campos con códigos*

ITEMS	IH N° 1		IH N° 2		IH N° 3																																																																																																			
6.2. Tipo de IH:																																																																																																								
6.3. Dispositivo o procedimiento asociado a la IH:																																																																																																								
6.4. Fecha de inicio de la IH:																																																																																																								
6.5. Cultivo solicitado:																																																																																																								
6.6. Tipo de cultivos:																																																																																																								
6.7. Germen aislado para IH:	Germen N°1	Germen N°2	Germen N°1	Germen N°2	Germen N°1	Germen N°2																																																																																																		
6.8 Marcadores de resistencia antimicrobiana: marcar con "X" si el paciente tiene alguno de los de los gérmenes que se muestran	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 0.8em;"> <thead> <tr> <th></th> <th>C3a-S / Ce-S</th> <th>C3a-R / Ce-S</th> <th>C3a-S / Ce-R</th> <th>C3a-R / Ce-R</th> <th>C3a-S / Ce-S</th> <th>C3a-S / Ce-S</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Enterobacteriaceae: Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Citrobacter spp., Morganella spp.,</td> <td>C3a-R / Ce-S</td> <td>C3a-R / Ce-S</td> <td>C3a-R / Ce-S</td> <td>C3a-R / Ce-S</td> <td>C3a-R / Ce-S</td> <td>C3a-R / Ce-S</td> </tr> <tr> <td></td> <td>C3a-R / Ce-R</td> <td>C3a-R / Ce-R</td> <td>C3a-R / Ce-R</td> <td>C3a-R / Ce-R</td> <td>C3a-R / Ce-R</td> <td>C3a-R / Ce-R</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Ce-S</td> <td>Ce-S</td> <td>Ce-S</td> <td>Ce-S</td> <td>Ce-S</td> <td>Ce-S</td> </tr> <tr> <td>Pseudomonas spp., Acinetobacter spp.,</td> <td>Ce-R</td> <td>Ce-R</td> <td>Ce-R</td> <td>Ce-R</td> <td>Ce-R</td> <td>Ce-R</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> </tr> <tr> <td>Staphylococcus aureus</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> <td>Oxa-S o MSSA</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> <td>Oxa-R o MSSA</td> </tr> <tr> <td>Enterococcus spp.</td> <td>Op-S</td> <td>Op-S</td> <td>Op-S</td> <td>Op-S</td> <td>Op-S</td> <td>Op-S</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> <td>Op-R o VRE</td> </tr> <tr> <td>Si se desconocen los marcadores de resistencia marcar</td> <td>Desconocido</td> <td>Desconocido</td> <td>Desconocido</td> <td>Desconocido</td> <td>Desconocido</td> <td>Desconocido</td> </tr> </tbody> </table>							C3a-S / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-S / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-S / Ce-S	C3a-S / Ce-S	Enterobacteriaceae: Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Citrobacter spp., Morganella spp.,	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S		C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R		Ce-S	Ce-S	Ce-S	Ce-S	Ce-S	Ce-S	Pseudomonas spp., Acinetobacter spp.,	Ce-R	Ce-R	Ce-R	Ce-R	Ce-R	Ce-R		Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA		Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Staphylococcus aureus								Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA		Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Enterococcus spp.	Op-S	Op-S	Op-S	Op-S	Op-S	Op-S		Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE		Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Si se desconocen los marcadores de resistencia marcar	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido
	C3a-S / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-S / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-S / Ce-S	C3a-S / Ce-S																																																																																																		
Enterobacteriaceae: Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Citrobacter spp., Morganella spp.,	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S	C3a-R / Ce-S																																																																																																		
	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R	C3a-R / Ce-R																																																																																																		
	Ce-S	Ce-S	Ce-S	Ce-S	Ce-S	Ce-S																																																																																																		
Pseudomonas spp., Acinetobacter spp.,	Ce-R	Ce-R	Ce-R	Ce-R	Ce-R	Ce-R																																																																																																		
	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA																																																																																																		
	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA																																																																																																		
Staphylococcus aureus																																																																																																								
	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA	Oxa-S o MSSA																																																																																																		
	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA	Oxa-R o MSSA																																																																																																		
Enterococcus spp.	Op-S	Op-S	Op-S	Op-S	Op-S	Op-S																																																																																																		
	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE																																																																																																		
	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE	Op-R o VRE																																																																																																		
Si se desconocen los marcadores de resistencia marcar	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido																																																																																																		

ANEXO N°28

Tabla 18. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes infectados por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, causantes de infecciones del tracto urinario del Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Características Epidemiológicas		n	%
Edades (años)	Menores de 60 años	9	30
	Mayores de 60 años	21	70
Sexo	Masculino	12	40
	Femenino	18	60
Características Clínicas		n	%
Tipos de bacterias	<i>E. coli</i>	20	66.7
	<i>K. pneumoniae</i>	10	33.3
	Cefalosporinas de tercera generación	17	56.67
Antibioticoterapia previa	Fluoroquinolonas	6	20
	Lincosaminas	4	13.33
	Penicilinas	4	13.33
	Cefalosporinas de primera generación	2	6.67
	Glicopéptidos	1	3.33
	Nitrofuranos	1	3.33
Estancia hospitalaria	Menor de 30 días	13	43.33
	Mayor de 30 días	17	56.67

*Cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona; Fluoroquinolonas, ciprofloxacino y levofloxacino; Penicilinas, amoxicilina ácido clavulánico y oxacilina; Cefalosporinas de primera generación, cefalexina y cefalotina; Glicopéptidos, vancomicina; Nitrofuranos, nitrofurantoína.

ANEXO N°29

Tabla 19. Servicios de origen y derivación de las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria en el Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Aislamiento	Servicio y fecha de ingreso	Servicio y fecha de urocultivo	Servicios de derivación
E01	E – 26/06/2015	C – 08/07/2015	–
E02	P – 08/07/2015	P – 12/07/2015	–
E03	M – 06/09/2015	M – 09/09/2015	–
E04	M – 01/09/2015	M – 12/09/2015	E*
E05	M – 11/09/2015	M – 16/09/2015	M
E06	E – 02/09/2015	C – 16/09/2015	M
E07	E – 01/08/2015	M – 19/09/2015	–
E08	E – 15/09/2015	E – 21/09/2015	C, M
E09	E – 25/09/2015	E – 29/09/2015	–
E10	E – 03/09/2015	P – 04/10/2015	–
E11	E – 06/10/2015	C – 10/10/2015	M
E12	E – 06/10/2015	E – 11/10/2015	M
E13	E – 02/10/2015	E – 11/10/2015	–
E14	E – 08/10/2015	E – 12/10/2015	M
E15	E – 06/10/2015	E – 13/10/2015	M
E16	E – 09/10/2015	E – 13/10/2015	–
E17	E – 15/10/2015	E – 20/10/2015	C, M
E18	E – 05/10/2015	E – 20/10/2015	M
E19	E – 17/10/2015	E – 25/10/2015	U
E20	E – 28/09/2015	M – 30/10/2015	M

C, Cirugía; E, Emergencia; M, Medicina; P, Pediatría; U, Unidad de cuidados intensivos

ANEXO N°30

Tabla 20. Servicios de origen y derivación de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección urinaria en el Hospital Regional Lambayeque. Junio – Diciembre 2015.

Aislamiento	Servicio y fecha de ingreso	Servicio y fecha de urocultivo	Servicios de derivación
K01	E – 30/06/2015	C – 04/07/2015	U
K02	E – 16/09/2015	E – 21/09/2015	M
K03	E – 20/09/2015	M – 26/09/2015	–
K04	E – 01/10/2015	E – 05/10/2015	M
K05	E – 05/10/2015	E – 16/10/2015	M
K06	M – 18/10/2015	M – 22/10/2015	–
K07	E – 24/10/2015	E – 27/10/2015	M, C, M
K08	E – 25/10/2015	E – 28/10/2015	M
K09	E – 12/10/2015	P – 01/11/2015	–
K10	E – 10/10/2015	E – 01/11/2015	M

C, Cirugía; E, Emergencia; M, Medicina; P, Pediatría; U, Unidad de cuidados intensivos