



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Caracterización fenotípica de cepas de Escherichia coli uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos.**

por **MARÍA JOSÉ GONZÁLEZ**  
tutora Dra. Gabriela Algorta



TRIBUNAL: María Inés Mota y Fernanda Azpiroz  
Licenciatura en Ciencias Biológicas: Microbiología  
Facultad de Ciencias, UdelaR  
Montevideo, Uruguay, Noviembre 2013

## **Agradecimientos**

A mi tutora Gabriela Algorta, por haber confiado en mí y haberme guiado en mi camino hacia la realización de este trabajo. Gracias por compartir tu experiencia y sabiduría conmigo.

A mis compañeras del Laboratorio de Microbiología clínica del Hospital Pereira Rossell, que hicieron mi recorrido mucho más fácil. Gracias por su apoyo constante y por las historias compartidas.

A mis amigos, los cuales brindaron sus palabras de aliento y estuvieron a mi lado cuando más los necesité.

A mí familia, porque sin ustedes no sería quien soy. Gracias

*Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden: es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas hechas con amor y con voluntad, en busca de aquello que se desea o en lo que se cree.*

*Paulo Coelho*

## Índice

Introducción.....	5
Infecciones urinarias	
<i>Escherichia coli</i>	
Antibióticos y resistencias	
Materiales y métodos.....	8
Identificación fenotípica	
Antibiograma	
Resultados.....	12
Discusión.....	19
Conclusión.....	24
Bibliografía.....	25

## Introducción

### **Infecciones urinarias**

Las infecciones urinarias constituyen la segunda infección más frecuente en el ámbito de la salud. Se estima que aproximadamente 150 millones de personas sufren esta patología en todo el mundo <sup>(1)</sup>. Por esto mismo el énfasis en el estudio de las mismas y sus agentes infecciosos.

Existen varias definiciones de las infecciones en las vías urinarias, en forma general se puede decir que es la invasión, colonización y multiplicación de gérmenes en el tracto urinario <sup>(2)</sup>.

Existe a su vez una amplia clasificación que corresponde a los signos y síntomas (asintomáticos o sintomáticos); al sitio de la infección (cistitis o pielonefritis); a la condición clínica del paciente (complicada o no complicada); a la evolución clínica (aguda o crónica); etc.

Según la localización, la infección urinaria puede clasificarse como pielonefritis aguda, a la que compromete el parénquima renal, y como cistitis o infección urinaria baja a la que se localiza en la vejiga o el tracto urinario inferior. La bacteriuria asintomática se define como la presencia de un número significativo de uropatógenos en cultivo de orina, en pacientes asintomáticos <sup>(3)</sup>.

La mayoría de los patógenos responsables de las infecciones urinarias son bacilos entéricos Gram negativos, siendo *Escherichia coli* el microorganismo más frecuente, causando entre el 70% y el 90% de las infecciones urinarias <sup>(4, 5)</sup>. En estudios realizados anteriormente en pacientes pediátricos, esta tendencia se mantiene, siendo *E. coli* el patógeno que predomina en los aislamientos en niños desde los recién nacidos hasta incluso mayores de 6 años de edad <sup>(6)</sup>.

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos. Habitante común de la flora microbiana normal del tubo digestivo, es un microorganismo comensal, pero al adquirir ciertos genes de virulencia presentes en plásmidos y en bacteriófagos pueden convertirse en patógenos importantes <sup>(7, 8)</sup>. Pueden clasificarse en diarrogénicas, uropatógenas y causantes de meningitis.

Los microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* poseen ciertos antígenos característicos. Los antígenos O (antígenos somáticos) constituyen la parte externa del lipopolisacárido (LPS) y están formado por unidades polisacáridas repetidas. Cada género está asociado a grupos antigénicos específicos y a su vez, éstos están relacionados con fenotipos virulentos. Los antígenos K (antígenos de envoltura) son aquellos que forman la cápsula. Por último, los antígenos H (antígenos flagelares) de naturaleza proteica, constituyen los flagelos <sup>(7, 9)</sup>. Diferentes combinaciones de estos antígenos dan lugar a los diferentes serotipos conocidos de *E. coli* <sup>(10)</sup>.

*E. coli* uropatógena es el virotipo que es capaz de generar una infección en el tracto urinario. Posee además de los factores de virulencia propios de la familia de Enterobacterias, factores especializados. Estos factores de virulencia le permiten proliferar en la zona de la infección. Los mismos están vinculados con mecanismos de adherencia, colonización e invasión, lo cual le permite a la bacteria competir con la flora normal y colonizar otros nichos en el organismo. Existe cierta correlación entre los factores de virulencia y el tipo de infección urinaria que se desarrolla <sup>(11, 12)</sup>. También hay una relación entre el contenido de virulencia de las diferentes cepas y su especificidad con el huésped <sup>(13)</sup>.

Para la identificación de *E. coli* se utilizan pruebas bioquímicas estándares. En la tabla siguiente se observa el porcentaje de positividad característico de las distintas pruebas (tabla 1).

**Tabla 1.** Resultados de pruebas Bioquímicas características de *E. coli*. % de positividad. Modificada de Farmer JJ III <sup>(14)</sup>.

Pruebas Bioquímicas	% positividad
Oxidasa	0
Indol	98
Glucosa	100
H <sub>2</sub> S (TSI)	1
Citrato de Simmons	1
Producción de gas	95
Lisina descarboxilasa	90
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36°C	95
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de sacarosa	50

### Antibióticos y resistencias

La resistencia a antibióticos es un factor de gran importancia en el tratamiento de las infecciones urinarias. Se entiende por resistencia bacteriana la capacidad de un microorganismo de crecer en presencia de un determinado antibiótico. Se han determinado diferentes mecanismos de resistencia utilizados por las bacterias: destrucción o inactivación enzimática, cambios en la permeabilidad de la membrana externa, alteraciones del sitio blanco (de los precursores de la pared celular, de la membrana y de los ribosomas y otros) <sup>(15)</sup>. Las bacterias han desarrollado resistencia a todas las clases de antibióticos hasta ahora descubiertas. Además, gracias a la transmisión horizontal de genes (conjugación, transformación y transducción) los genes de resistencia se dispersan rápidamente entre las poblaciones <sup>(16)</sup>.

Algunos antibióticos utilizados sobre bacterias Gram negativas son los aminoglucósidos, las quinolonas y los betalactámicos.

Las quinolonas actúan inhibiendo enzimas (topoisomerasas) indispensables en la síntesis del ADN. Tienen una actividad bactericida que depende de la concentración. Su espectro se ha ido ampliando, sobre todo desde la introducción de un átomo de flúor en la posición 6 (fluoroquinolonas). Se usan en una gran variedad de infecciones como tratamiento de elección o alternativo, tanto a nivel hospitalario como extrahospitalario. Según el compuesto se emplean en infecciones del tracto urinario, enfermedades de transmisión sexual, osteomielitis crónica, infecciones del tracto respiratorio e infecciones sistémicas graves, entre otras. Sin embargo, su uso en pediatría es limitado por su acción sobre el cartílago de crecimiento. Se clasifican en generaciones siendo de primera generación: ácido nalidíxico, cinoxacina y ácido pipemídico. De segunda generación: enoxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, pefloxacina, norfloxacina, amifloxacina, lomefloxacina y levofloxacina. De tercera generación: sparfloxacina, tosufloxacina y gatifloxacina. Por último de cuarta generación: Trovafloxacina, clinafloxacina y moxifloxacina<sup>(17, 18, 19, 20, 21)</sup>.

Los aminoglucósidos son una clase de antimicrobianos de uso habitual en la práctica clínica. A pesar de que existen diversos mecanismos de resistencia continúan siendo activos frente a gran parte de los bacilos Gram negativos aerobios. En la actualidad, aunque pueden utilizarse solos en las infecciones urinarias, se utilizan fundamentalmente en combinación con betalactámicos en infecciones graves por bacilos Gram negativos. Solo pueden usarse por vía parenteral ya que son nefrotóxicos y ototóxicos (elevación de la urea y la creatinina, y alteración de neuronas sensitivas, respectivamente). Actúan inhibiendo la síntesis proteica en la iniciación, uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma. Dentro de los aminoglucósidos se encuentran estreptomina, kanamicina, neomicina, gentamicina y tobramicina. También los hay semisintéticos, los cuales son amikacina, dibekacina, netilmicina, sisomicina e isepamina<sup>(22, 23, 24, 25)</sup>.

Los betalactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Son compuestos de acción bactericida lenta, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram negativos, pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aún así siguen siendo muy utilizados, sobre todo en combinación con inhibidores de betalactamasas. Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenems. Dentro de las penicilinas, aquéllas que en su espectro de acción incluyen *E. coli* son ampicilina y amoxicilina; también ticarcilina y piperacilina. Respecto a las cefalosporinas, se clasifican en generaciones al igual que las quinolonas. Las que son activas frente a *E. coli* son las de primera generación (cefadroxil, cefazolina, cefalexina y cefradina); de segunda generación (cefuroxime); de tercera generación (Cefotaxime, Ceftriaxona, Ceftazidime y Cefoperazona) y de cuarta generación (Cefepime y Cefpirome). Aztreonam, es el único monobactámico disponible para uso clínico. Posee una excelente actividad sobre bacterias Gram negativas aerobias y facultativas. Los carbapenems son una clase única de betalactámicos que presentan el mayor espectro de

actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Imipenem es el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. También lo son meropenem y ertapenem <sup>(7, 26, 27, 28)</sup>.

La presencia de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aislamientos clínicos es cada vez mayor. Las betalactamasas son una familia de enzimas producidas por bacilos Gram negativos, que en su mayoría derivan de las betalactamasas clásicas a partir de una serie de mutaciones puntuales que afectan a su centro activo <sup>(29, 30)</sup>.

Se ha observado un aumento significativo en la pérdida de sensibilidad de los distintos agentes etiológicos que causan infecciones urinarias. Principalmente en *E. coli* hay estudios que muestran un alto porcentaje de resistencia para ampicilina, cefradina y trimetoprim-sulfametoxazol y una alta sensibilidad para gentamicina y cefuroxime <sup>(6, 15)</sup>.

El objetivo de este trabajo fue identificar fenotípicamente diferentes cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de urocultivos y determinar de cada cepa aislada el perfil de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos.

## **Materiales y métodos**

Se estudiaron muestras de orina recibidas en el laboratorio de microbiología clínica del Hospital Pereira Rossell (CHPR), provenientes de niños internados o que consultaron en la emergencia del CHPR.

Se realizó el examen microbiológico de cada muestra de orina (urocultivo) desde un punto cuantitativo y cualitativo <sup>(31)</sup>.

Para el examen cuantitativo se utilizó el método del ansa calibrada <sup>(32)</sup>. Éstas cargan un volumen conocido de 10µl. El número de colonias obtenidas (unidades formadoras de colonias) luego fue multiplicado por 100, de esta manera se obtuvo el número de colonias por ml. Se usaron placas de Petri con agar sangre ovina (medio no selectivo, permitió apreciar características coloniales, determinar la hemólisis, etc.) en combinación con placas con agar MacConkey (selectivo y diferencial para bacilos Gram negativos no exigentes). Las placas fueron incubadas en atmósfera aerobia y examinadas a las 18 y 24 horas. Se estudiaron únicamente los cultivos con 100 000 UFC/ml o más, de un único microorganismo <sup>(7, 33)</sup> (figura 1).

Se estudiaron 30 cepas de *Escherichia coli* aisladas en un período de 4 meses entre los años 2012-2013.

## Identificación fenotípica

La identificación de los microorganismos se realizó mediante criterios fenotípicos. Estos se basaron en características físicas o metabólicas observables de las bacterias <sup>(34)</sup>.

Los criterios utilizados fueron: Morfología microscópica y tinción Gram

Morfología macroscópica de la colonia

Requerimientos ambientales para el crecimiento

Requerimientos nutricionales y propiedades metabólicas

Resistencia o sensibilidad a antibióticos

Para identificar *E. coli* se observó la morfología y la tinción Gram; el aspecto de la colonia (tamaño, forma, color, superficie, cambios en el agar); el crecimiento en agar MacConkey y el color de las colonias; la hemólisis en agar sangre (en el caso de *E. coli*, algunas cepas producen hemólisis y otras no).

## Pruebas bioquímicas realizadas

Pruebas basadas en la determinación de la presencia de enzimas:

Prueba de la catalasa

Prueba de la oxidasa

Prueba del indol

Pruebas basadas en la determinación de las vías metabólicas:

TSI (Triple azúcar hierro)

LIA (Lisina Hierro Agar)

MIO (Movilidad Indol Ornitina)

Citrato

Se siguieron los procedimientos descritos por MacFadding <sup>(34)</sup>.

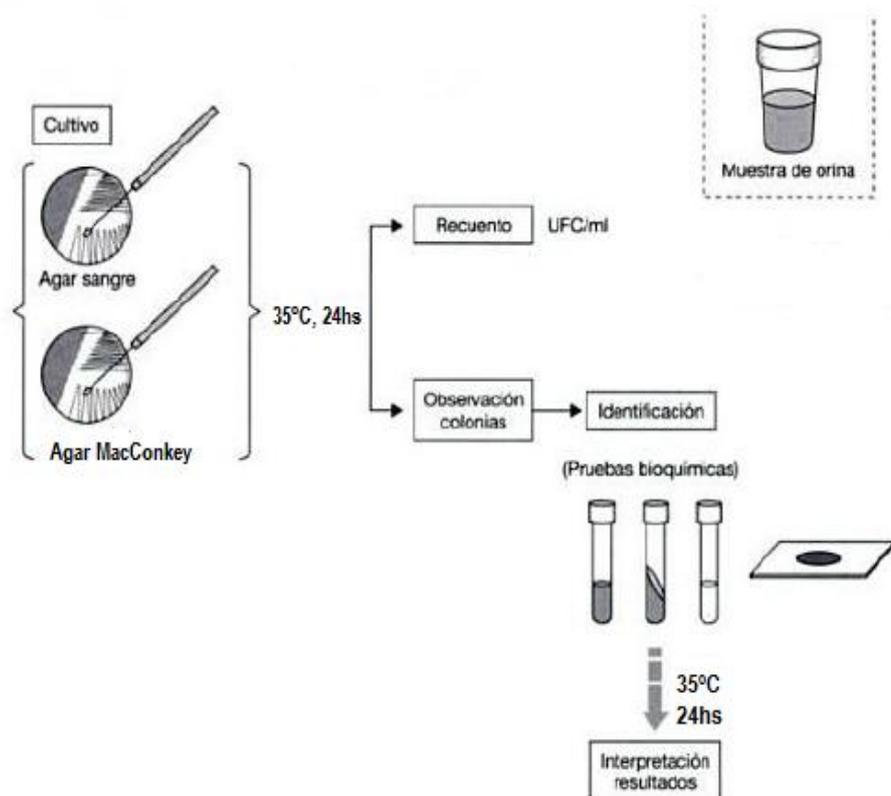
Para la realización de todas las pruebas se trabajó a partir de un cultivo puro.

En las pruebas de determinación de la presencia de enzimas el resultado se obtuvo en el momento.

En las pruebas de determinación de las vías metabólicas el resultado se obtuvo luego de 24hs de incubación a 35°C.

Como control de las pruebas bioquímicas se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 (control positivo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324 (controles negativos).

Las pruebas se realizaron por duplicado, tomando dos colonias aisladas del mismo cultivo puro.



**Figura 1.** Procedimiento de urocultivo.

## Antibiograma

Para analizar la susceptibilidad a quinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos se realizó un antibiograma manual, por el método de disco difusión, técnica de Kirby y Bauer <sup>(35)</sup>.

El antibiograma es un método de estudio in vitro del comportamiento de los antibióticos frente a los agentes infecciosos. Con los resultados obtenidos en el mismo se clasificaron las bacterias en sensibles, moderadamente sensibles (intermedio) y resistentes a un determinado antibiótico. El método de disco difusión es un método cualitativo que permite la clasificación del microorganismo en sensible o resistente <sup>(7, 36, 37)</sup>.

La interpretación está estandarizada por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) en su Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S22. Se utilizaron cepas de control de calidad que permitieron comprobar que la metodología se realizó en forma correcta. Las cepas de control de calidad de los discos de antibióticos que se usaron fueron *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 35218 <sup>(38)</sup>.

Como control de la técnica se testaron las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Esto permitió controlar la concentración de  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , pH y concentración de timidina del medio Muller-Hinton agar <sup>(31)</sup>.

Las condiciones del test que se realizó fueron:

Medio para disco difusión: Mueller-Hinton agar (Oxoid)

Inóculo: Suspensión directa de colonias aisladas, hasta obtener una turbidez equivalente a 0,5 en la escala McFarland

Incubación: 35 +/- 2°C, ambiente aerobio, 16 a 18hs <sup>(38)</sup>.

Los antibióticos testeados se muestran en la tabla 2:

**Tabla 2.** Antibióticos utilizados en pruebas de disco difusión.

QUINOLONAS	AMINOGLUCÓSIDOS	BETALACTÁMICOS		
Ácido nalidíxico (30µg)	Gentamicina (10µg)	Penicilinas	Cefalosporinas	Carbapenems
Ciprofloxacina (5µg)	Amikacina (30µg)	Amoxicilina/Ác Clavulánico (20/10µg)	Cefalotina (30µg)	Imipenem (10µg)
		Ampicilina (10µg)	Cefuroxime (30µg)	Meropenem (10µg)
		Ampicilina/Sulbactam (10/10µg)	Cefepime (30µg)	Ertapenem (10µg)
			Cefotaxime (30µg)	
			Ceftazidime (30µg)	

El criterio de interpretación utilizado es el de CLSI 2012, donde se mide el diámetro de la zona de inhibición por el antibiótico y luego se interpreta <sup>(38)</sup> (tabla 3).

**Tabla 3.** Criterio de interpretación de la zona de inhibición según CLSI 2012. Tabla modificada de Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing: M100-S22.

Antibiótico	contenido	Zona de inhibición (mm)		
		S	I	R
<b>Ampicilina</b>	10 µg	>=17	14-16	<=13
<b>Ampicilina/ác. Clavulánico</b>	20/10 µg	>=18	14-17	<=13
<b>Ampicilina/sulbactam</b>	10/10 µg	>=15	12_14	<=11
<b>Cefalotina</b>	30 µg	>=18	15-17	<=14
<b>Cefepime</b>	30 µg	>=18	15-17	<=14
<b>Cefotaxime</b>	30 µg	>=26	23-25	<=22
<b>Cefuroxime</b>	30 µg	>=18	15-17	<=14
<b>Ceftazidime</b>	30 µg	>=21	18-20	<=17
<b>Ertapenem</b>	10 µg	>=23	20-22	<=19
<b>Meropenem</b>	10 µg	>=23	20-22	<=19
<b>Imipenem</b>	10 µg	>=23	20-22	<=19
<b>Gentamicina</b>	10 µg	>=15	13-14	<=12
<b>Amikacina</b>	30 µg	>=17	15-16	<=14
<b>Ciprofloxacina</b>	5 µg	>=21	16-20	<=15
<b>Acido nalidíxico</b>	30 µg	>=19	14-18	<=13

S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Para determinar el fenotipo BLEE se utilizó la técnica de aproximación de doble disco, que utiliza amoxicilina-clavulánico con cefotaxime y ceftazidime (cefalosporinas de tercera generación). Si en

la prueba de aproximación de doble disco hay sinergia, entonces sugiere presencia de betalactamasas de espectro extendido <sup>(29, 30)</sup>.

En cuanto a las carbapenemasas, primero se realizó el antibiograma manual con todos los antibióticos testeados. Se planteó el estudio de aquellos aislamientos sobre los que disminuyera el halo de sensibilidad a los carbapenems (imipenem  $\leq 22$ mm, meropenem  $\leq 22$ mm y ertapenem  $\leq 21$ ). Para detectar la producción de carbapenemasas y la clase a la que pertenecen se planteó utilizar las técnicas de sinergia de doble disco que se basan en la potenciación de la actividad de los carbapenémicos en presencia de inhibidores de carbapenemasas <sup>(39)</sup>.

## **Resultados**

Morfología microscópica: los 30 aislamientos evidenciaron ser bacilos Gram negativos cortos sin ninguna otra característica especial a destacar.

Luego la identificación fenotípica prosiguió con la descripción morfológica de las colonias de *E. coli* aisladas. En términos generales, la morfología macroscópica de *E. coli* en agar sangre fue de colonias circulares, tamaño de mediano a grande (de 2mm a 4mm), de color blanco, superficie brillante, densidad opaca y elevación convexa. La única diferencia entre los distintos aislamientos fue la presencia/ausencia de hemólisis, que se desarrolla como una zona clara alrededor del crecimiento de la colonia en agar sangre. Por lo tanto distinguimos cepas no hemolíticas (sin halo alrededor de la colonia) de hemolíticas (con halo claro alrededor de la colonia).

En cuanto a la morfología de las colonias en agar MacConkey, el tamaño, brillo y elevación son similares que en agar sangre, la diferencia se encuentra en el color de la colonia, ya que depende de la capacidad que tengan las bacterias de fermentar la lactosa que hay en el medio. De las 30 cepas estudiadas, 28 fueron lactosa positivo (fermentan la lactosa) y sus colonias tuvieron un color rosado fuerte. Las dos cepas lactosa negativo (no fermentan la lactosa) fueron incoloras.

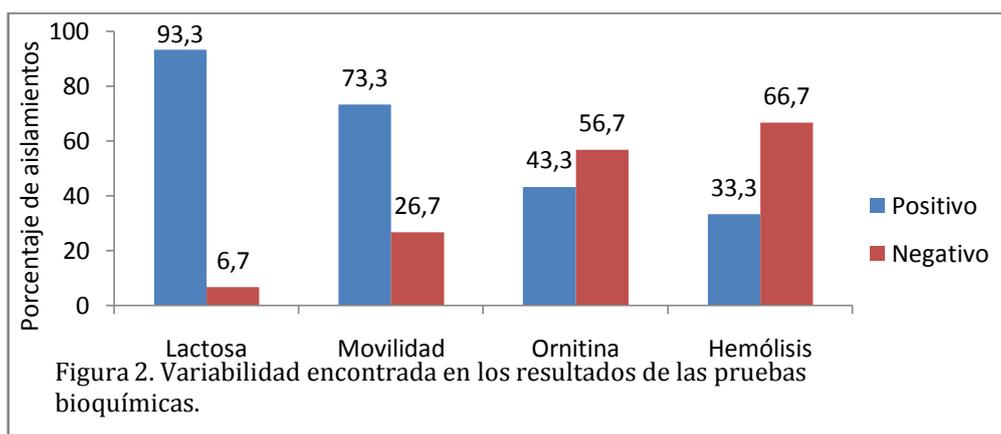
Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron variables en cuanto a movilidad, descarboxilación de ornitina y utilización de lactosa. El 93,3% de las cepas fueron lactosa positiva en MacConkey, o sea son capaces de fermentar la lactosa. 73,3% fueron móviles, o sea que eran capaces de desarrollarse más allá de la línea de inoculación. El 43,3% fueron capaces de descarboxilar la ornitina. Todas resultaron positivas en las pruebas de catalasa, lisina descarboxilasa, producción de gas e indol. Todas resultaron negativas en las pruebas de oxidasa, producción de H<sub>2</sub>S y citrato. Una sola cepa, según la prueba bioquímica TSI, fermentó glucosa pero no lactosa ni sacarosa. En la tabla 4 se agrega además el ítem hemólisis, donde se indica que el 33,3% de las cepas fueron hemolíticas (tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados de las pruebas bioquímicas de cada aislamiento.

CEPAS	Catalasa	Oxidasa	Lactosa	TSI	LIA	Movilidad	Indol	Ornitina	Citrato	Hemólisis
30400132	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	+
30400555	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	-
30400355	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30404612	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30402949	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	-
30402531	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	-
30404069	+	-	-	Ak/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30407029	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30406759	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30407428	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	-	-	-
30407554	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	+	-	-
30407434	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	+
30409160	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	-	-	-
30407036	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	+
30418945	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	-	-	-
30418958	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	-
30435853	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	-
30439544	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30441671	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	+
30441955	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	-	-	+
30451248	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	-	-	-
30451440	+	-	-	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	+
30451388	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	+	-	+
30448664	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	-	+	+	-	-
30449527	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	+
30448676	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30442372	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	+
30441971	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	+	-	+
30449924	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-
30449518	+	-	+	A/A/+/-	Ak/Ak	+	+	-	-	-

Positivas (+). Negativas (-). En el caso del TSI, se indica superficie/fondo/gas/H<sub>2</sub>S. A: ácido, Ak: alcalino. + tardío significa que demora más de 24hs en virar. Lactosa + o – se refiere al viraje en MacConkey.

En la figura 2 se compara el porcentaje de cepas positivas y negativas en cuanto a lactosa, movilidad, descarboxilación de la ornitina y hemólisis.



El 100% de las cepas fueron sensibles a amikacina y solo una cepa (3,3%) fue resistente a gentamicina (tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados del antibiograma para aminoglucósidos.

CEPAS	CN		AK	
	Diam.(mm)	Interp.	Diam. (mm)	Interp.
30402949	9	R	20	S
30400132	18	S	18	S
30400555	19	S	21	S
30400355	18	S	18	S
30404612	18	S	20	S
30402531	15	S	20	S
30404069	19	S	20	S
30407029	20	S	21	S
30406759	19	S	20	S
30407428	19	S	20	S
30407554	18	S	20	S
30407434	19	S	20	S
30409160	19	S	19	S
30407036	18	S	20	S
30418945	19	S	20	S
30418958	18	S	19	S
30435853	18	S	18	S
30439544	17	S	18	S
30441671	18	S	19	S
30441955	18	S	18	S
30451248	17	S	18	S
30451440	19	S	19	S
30451388	16	S	17	S
30448664	18	S	19	S
30449527	19	S	21	S
30448676	18	S	18	S
30442372	18	S	19	S
30441971	18	S	20	S
30449924	18	S	19	S
30449518	18	S	18	S

CN: gentamicina, AK: amikacina, R: resistente, S: sensible. Diámetro en milímetros (mm).

Respecto a las quinolonas, para ambos antibióticos testados (ácido nalidíxico y ciprofloxacina), dos cepas (6,7%) fueron resistentes (tabla 6).

**Tabla 6.** Resultado del antibiograma para quinolonas.

CEPAS	NA		CIP	
	Diam.(mm)	Interp.	Diam. (mm)	Interp.
30409160	6	R	12	R
30402949	6	R	13	R
30400132	22	S	32	S
30400555	25	S	36	S
30400355	23	S	32	S
30404612	24	S	35	S
30402531	23	S	36	S
30404069	24	S	40	S
30407029	25	S	31	S
30406759	25	S	34	S
30407428	26	S	32	S
30407554	25	S	32	S
30407434	25	S	32	S
30407036	25	S	29	S
30418945	27	S	32	S
30418958	24	S	33	S
30435853	25	S	30	S
30439544	24	S	31	S
30441671	22	S	30	S
30441955	24	S	31	S
30451248	26	S	30	S
30451440	22	S	30	S
30451388	23	S	30	S
30448664	25	S	29	S
30449527	26	S	32	S
30448676	26	S	28	S
30442372	23	S	32	S
30441971	24	S	32	S
30449924	27	S	29	S
30449518	25	S	30	S

NA: Ácido nalidíxico, CIP: Ciprofloxacina, R: resistente, S: sensible. Diámetro en milímetros (mm).

En cuanto a los betalactámicos, un 70% de los aislamientos fueron resistentes a ampicilina, el mayor porcentaje de resistencia encontrado. El 20% de las cepas fueron resistentes a ampicilina/sulbactam y el 10% resistentes a amoxicilina/ác. clavulánico. Del grupo de las cefalosporinas se observó un alto porcentaje de resistencia a cefalotina con un 23,3% de cepas resistentes y también un 53,3% de cepas con sensibilidad disminuida (I). Se observó un 10% de

resistencia a cefuroxime. Un 10% de los aislamientos fueron resistentes a cefotaxime y un 3,3% presentaron resistencia intermedia a ceftazidime. El 10% de las cepas exhibió resistencia intermedia a cefepime (tabla 7). Para el grupo de los carbapenems (imipenem, meropenem y ertapenem) no se observó resistencias, por lo cual el 100% de las cepas fue sensible a los tres antibióticos.

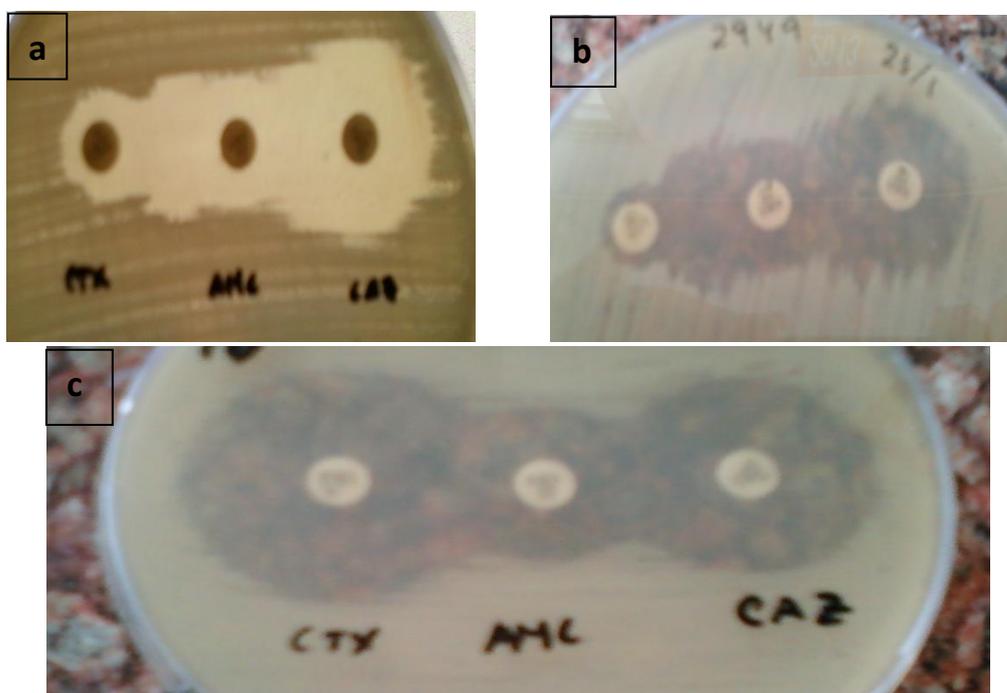
**Tabla 7.** Resultado del antibiograma para betalactámicos.

Cepas	AMP		SAM		AMC		KF		CXM		CTX		CAZ		FEP	
	(mm)	Inter.														
30409160	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	8	R	21	S	15	I
30402949	6	R	9	R	15	I	6	R	6	R	6	R	19	I	15	I
30402531	6	R	9	R	15	I	6	R	6	R	10	R	21	S	16	I
30407036	6	R	6	R	12	R	12	R	21	S	31	S	27	S	29	S
30442372	6	R	8	R	13	R	12	R	22	S	32	S	27	S	31	S
30435853	6	R	11	R	15	I	12	R	20	S	28	S	27	S	29	S
30449518	6	R	13	I	15	I	14	R	22	S	32	S	29	S	32	S
30441955	6	R	12	I	16	I	17	I	21	S	30	S	26	S	28	S
30407428	6	R	14	I	17	I	17	I	23	S	32	S	28	S	34	S
30407554	6	R	13	I	17	I	17	I	23	S	35	S	28	S	33	S
30439544	6	R	12	I	17	I	15	I	22	S	31	S	26	S	31	S
30451248	6	R	15	S	17	I	15	I	23	S	31	S	27	S	33	S
30400555	6	R	14	I	19	S	16	I	23	S	32	S	29	S	33	S
30448664	6	R	13	I	18	S	16	I	22	S	32	S	28	S	29	S
30448676	6	R	13	I	17	S	16	I	22	S	32	S	29	S	32	S
30407434	6	R	14	I	18	S	17	I	22	S	30	S	28	S	30	S
30418945	6	R	16	S	19	S	15	I	23	S	31	S	28	S	32	S
30449924	6	R	15	S	18	S	15	I	22	S	31	S	27	S	31	S
30400132	12	R	21	S	21	S	16	I	21	S	32	S	30	S	35	S
30407029	6	R	16	S	20	S	19	S	22	S	32	S	29	S	33	S
30406759	6	R	15	S	19	S	20	S	22	S	32	S	28	S	33	S
30451440	15	I	20	S	21	S	15	I	23	S	32	S	28	S	33	S
30451388	16	I	20	S	20	S	16	I	22	S	29	S	26	S	31	S
30441671	15	I	20	S	20	S	17	I	20	S	28	S	26	S	30	S
30404069	18	S	22	S	21	S	17	I	22	S	32	S	30	S	34	S
30400355	19	S	22	S	22	S	18	S	22	S	32	S	27	S	33	S
30404612	20	S	21	S	22	S	19	S	22	S	32	S	28	S	33	S
30418958	19	S	20	S	19	S	19	S	24	S	33	S	29	S	32	S
30441971	19	S	22	S	21	S	18	S	24	S	31	S	27	S	31	S
30449527	20	S	24	S	24	S	20	S	26	S	34	S	31	S	32	S

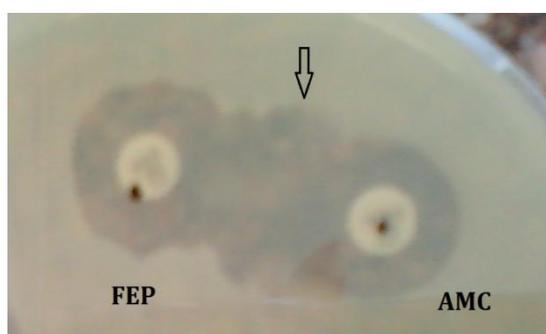
AMP: Ampicilica, SAM: Ampicilina/sulbactam, AMC:Amoxicilina/clavulánico , KF: Cefalotina, CXM: Cefuroxime, CTX: Cefotaxime, CAZ: Ceftazidime y FEP: Cefepime . R: resistente, I: intermedio, S: sensible. Diámetro en milímetros (mm).

Se observó que la cepa 30404069 presentó sensibilidad a ampicilina y una resistencia intermedia a cefalotina.

Además de estos datos se encontró que de las 30 cepas, tres (10%) presentaron producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Esto se evidenció por el test de sinergia entre amoxicilina/clavulánico y cefalosporinas de tercera generación (figuras 3 y 4). Vemos en la tabla 7 que estas cepas son las que poseen un mayor número de resistencias (las cepas 30409160, 30402949 y 30402531 con fenotipo BLEE se encuentran en la parte superior de la tabla). Estas también tienen sensibilidad disminuida a cefepime.

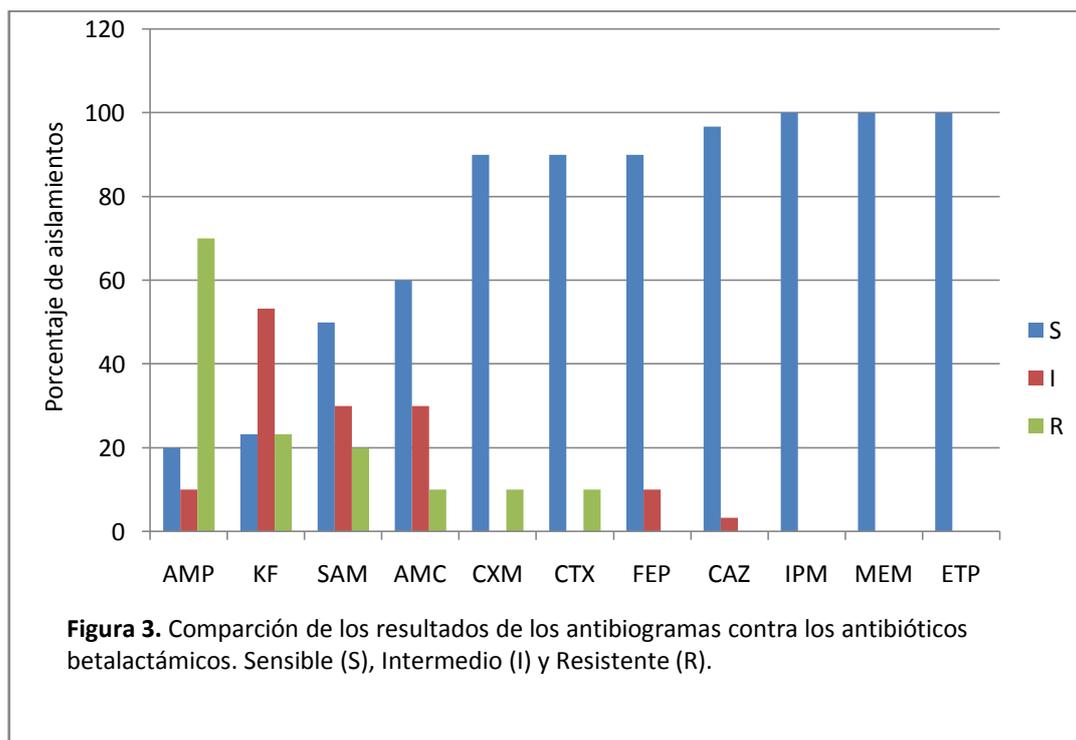


**Figura 3.** En imágenes **a** y **b** se observa sinergia positiva entre CTX, AMC y CAZ (en ese orden). Evidencia posible presencia de BLEE. En **c** se observa sinergia negativa.



**Figura 4.** Se observa la sinergia entre los discos de FEP y AMC.

En la figura 5 se compara los resultados de sensibilidad a los antibióticos betalactámicos, donde se observó con claridad la alta resistencia existente a ampicilina.



Por último se muestra en la tabla 8 el perfil de resistencia de las cepas que presentaron producción de BLEE. Se observó que estas cepas presentaron multirresistencias: además de resistencia a los betalactámicos, poseen también resistencia a los otros grupos de antibióticos. De esta manera se distinguieron tres perfiles diferentes. Un perfil presentó resistencia a cefotaxime, ciprofloxacina y resistencia intermedia a cefepime. Otro perfil presentó resistencia a cefotaxime, ciprofloxacina y gentamicina, y resistencia intermedia a ceftazidime y cefepime. El último perfil presentó resistencia solo a cefotaxime y resistencia intermedia a cefepime.

**Tabla 8.** Cepas con fenotipo BLEE, perfil de resistencia.

Cepas	Betalactámicos			Quinolonas	Aminoglucósidos
	CTX	CAZ	FEP	CIP	CN
30409160	R	S	I	R	S
30402949	R	I	I	R	R
30402531	R	S	I	S	S

CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, FEP: cefepime, CIP: ciprofoloxacina, CN: gentamicina, S: sensible, I: intermedio, R: resistente.

## Discusión

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos. Es una especie que causa diferentes infecciones, dependiendo de los factores de virulencia que exprese, lo que le permite tener una amplia diversidad.

Se observó que las cepas aisladas de infecciones urinarias presentaron ciertas variantes fenotípicas. Respecto a ornitina, el 43,3% fue capaz de descarboxilar la ornitina para formar un grupo amino y el 56,7% restante no. Esto coincide con lo descrito en la bibliografía donde la descarboxilación de la ornitina tiene un 65% de positividad en *Escherichia coli* (tabla 1). También pueden ser móviles (frecuentemente) o inmóviles, en este caso el 73,3% de las cepas fueron móviles a 35°C. Los bacilos móviles, en el caso de *E. coli* poseen flagelos peritricos, que son los que permiten la movilidad de la bacteria. El hecho de que algunas cepas no sean móviles se puede explicar por la no expresión de los flagelos o por la presencia de los mismos y ausencia de movilidad. Esto sería debido a cambios en los genes que codifican para los mismos, ya sean mutaciones puntuales, deleciones, etc. En cuanto a la fermentación de lactosa interpretada en el agar MacConkey, el 93,3% fermentaron la misma y solo el 6,7% no lo hicieron. Estos datos no son muy lejanos de los presentados en otros artículos, donde el porcentaje de positividad es el 95%.<sup>(14 y 40)</sup>

Algunas cepas uropatogénicas de *E. coli* producen una toxina extracelular llamada hemolisina (HlyA), que es capaz de lisar otras células como los eritrocitos. Esto se evidencia en placas de agar sangre, donde se genera alrededor de las colonias un halo claro. En este trabajo se encontró que el 33.3% de las cepas fueron hemolíticas. Esta toxina sería la causante de daño renal e incrementaría el riesgo de septicemia<sup>(12)</sup>. La HlyA forma parte de la familia de las toxinas RTX, que se activan mediante la acilación post traduccional de dos residuos internos de lisina. Luego de secretada la toxina al medio extracelular genera poros en la membrana de las células del huésped y de esta manera libera nutrientes y otros factores necesarios para el crecimiento de la bacteria.<sup>(7, 41, 42, 43)</sup>

Con respecto a la búsqueda de resistencias a los antimicrobianos, se encontró la mayor frecuencia de resistencias en el grupo de los antibióticos betalactámicos. Se encontró una cepa con resistencia a la gentamicina, representante del grupo de los aminoglucósidos. Para las quinolonas, dos cepas presentaron resistencias tanto a ácido nalidixico como a ciprofloxacina. Cabe mencionar, las cepas que presentaron resistencias a quinolonas y/o aminoglucósidos, serían las que también presentaron producción de BLEE. Esto podría indicar una posible relación entre resistencias a diferentes grupos de antibióticos, lo cual se discute más adelante.

Los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos consisten en la modificación enzimática del antibiótico, lo cual produce su inactivación; la alteración en la permeabilidad y la mutación ribosómica que disminuye la afinidad por la subunidad 30S del ribosoma. Este último mecanismo está demostrado para estreptomicina<sup>(48)</sup>. De todos, la modificación enzimática es el mecanismo

más frecuente. Existen tres tipos de enzimas inactivantes: acetiltransferasas (AAC), fosfotransferasas (APH) y nucleotidiltransferasas (ANT), y dentro de cada grupo existen diferentes variantes<sup>(7, 23)</sup>.

En un trabajo realizado en Uruguay<sup>(6)</sup> se encontró, para las tres especies más frecuentemente aisladas en infecciones urinarias procedentes de pediatría (*E. coli*, *Proteus* y *Klebsiella*), una resistencia a gentamicina del 18,4%. En comparación con el resultado obtenido en este trabajo (3,3%) hay una diferencia, ya que fue inferior. Esta diferencia se observa también en resultados de otros trabajos y puede deberse a la diferencia entre las poblaciones del estudio<sup>(44, 45)</sup>. Por otra parte, resulta difícil de comparar cuando se estudian diferentes especies bacterianas, con diferentes mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos. Si solo se observa las cepas productoras de BLEE como hacen otros trabajos<sup>(46, 47)</sup> vemos que el porcentaje de resistencia a aminoglucósidos aumenta al 33,3%. Esto puede indicar una relación entre la producción de BLEE y la resistencia a otros grupos de antibióticos<sup>(47)</sup>. En relación a amikacina, no existieron cepas resistentes, comparándolo con los trabajos mencionados anteriormente, estos resultados son similares.

Los mecanismos de resistencia a quinolonas son básicamente de dos tipos. Por alteración del sitio blanco y por alteración de permeabilidad. Las alteraciones del sitio blanco se producen por mutaciones a nivel cromosómico, las cuales producen una alteración en la ADN girasa, principalmente en la subunidad A de la misma. Estas alteraciones generan cambios en la estructura de la enzima y disminuyen la afinidad por el fármaco. Un cambio en la permeabilidad de la membrana no solo confiere resistencia a quinolonas, sino también a otros grupos de antibióticos<sup>(17)</sup>.

En los últimos años se ha descrito un mecanismo de resistencia plasmídico y transmisible, que consiste en la acción de una proteína que actuaría bloqueando el sitio blanco de acción. Esta proteína estaría codificada por el gen *qnr*<sup>(49)</sup>. Otro mecanismo plasmídico descrito es la modificación de las quinolonas por la acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr<sup>(50)</sup>, una enzima capaz de modificar aminoglucósidos y quinolonas, la cual ya ha sido reportada en Uruguay<sup>(51)</sup>.

En este trabajo se observó que los dos aislamientos de UPEC que presentaron resistencia a quinolonas, fueron resistentes a ácido nalidíxico y ciprofloxacina. Teniendo en cuenta que una mutación a nivel cromosómico del gen que codifica para la ADN girasa (que afecta la región QRDR de la enzima) le confiere a *E. coli* resistencia a ácido nalidíxico, solo basta con una segunda mutación para disminuir la sensibilidad o generar resistencia a ciprofloxacina<sup>(39 y 52)</sup>. Esta es una explicación posible en cuanto a la resistencia a ambos antimicrobianos, pero además se observó que ambas cepas presentan también BLEE. En este caso, ambos mecanismos podrían estar ligados en un plásmido que confiera resistencia a múltiples grupos de antimicrobianos. Esto podría probarse mediante la conjugación del plásmido (en caso de que fuera conjugativo) a una cepa de *E. coli* sensible a quinolonas y betalactámicos. Luego habría que probar si estos conjugantes al recibir la información genética, ésta les proporcionó resistencia a quinolonas y betalactámicos (produce BLEE) o solo a uno de los dos grupos de antibióticos.

En otros trabajos se plantea un aumento de la resistencia a quinolonas con el correr de los años, llegando a un 23% para ciprofloxacina<sup>(53)</sup>. También ocurre algo similar que con los aminoglucósidos, donde el porcentaje de resistencia a quinolonas es mayor en cepas con BLEE, donde llega al 73%<sup>(45)</sup>. En este trabajo, de las 30 cepas aisladas de UPEC, el 6,7% son resistentes tanto a ácido nalidixico como a ciprofloxacina. Si tomamos en cuenta solo las cepas con BLEE, el porcentaje de resistencia es del 66,7%, valor similar al encontrado en la bibliografía. Este grupo de antibióticos tiene un uso limitado en infecciones urinarias en niños, debido a que podrían actuar a nivel de los cartílagos de crecimiento<sup>(59)</sup>. Por lo tanto no se explica el alto porcentaje de resistencia a quinolonas por presión selectiva.

Los mecanismos de resistencia a los betalactámicos comprenden la producción de enzimas hidrolíticas, alteraciones de la permeabilidad, alteración de la diana, y bombas de expulsión activa. *E. coli* no presenta resistencias naturales a los betalactámicos; si bien posee una betalactamasa cromosómica de clase C de Ambler (AmpC) esta se expresa constitutivamente a muy bajo nivel por carecer de los genes reguladores, por lo que no confiere en general resistencia alguna a los betalactámicos. El principal mecanismo de resistencia adquirida en enterobacterias es la modificación enzimática del antimicrobiano. Esta se produce por la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico y que, por lo tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión a las PBP (penicillin binding proteins). La resistencia puede deberse a la adquisición de material genético móvil, como plásmidos, islas genómicas, que a su vez porten transposones y/o integrones; mediante conjugación, transformación o transducción. Otros cambios pueden darse por mutaciones en los genes cromosómicos del microorganismo, en la región del promotor o en los genes reguladores<sup>(52)</sup>.

En este trabajo se estudió la resistencia a penicilinas, penicilinas en combinación de inhibidores, cefalosporinas y carbapenems, encontrándose una gran variabilidad en cuanto a la resistencia a dichos antibióticos. Las penicilinas presentaron en el caso de ampicilina un 70% de resistencia, siendo de todos los antimicrobianos el que presenta el mayor porcentaje de resistencia. En cambio, si combinamos una penicilina con un inhibidor, el porcentaje disminuye bruscamente. En el caso de ampicilina/sulbactam, el porcentaje de resistencia es del 20% y de 10% para amoxicilina/clavulánico. Esto indicaría que los inhibidores tienen un buen efecto sobre estas betalactamasas.

En cuanto a las cefalosporinas, cefalotina una cefalosporina de primera generación, dentro de las cepas ensayadas se encontró una resistencia del 23,3% además de un 53,3% con una disminución de la sensibilidad (intermedio). Si tomamos en cuenta las cepas resistentes y las que tienen sensibilidad intermedia, el porcentaje es del 76,5%. Tres cepas fueron resistentes a cefuroxime (10%). El 10% de las cepas fueron resistentes a cefotaxime, mientras que para ceftazidime solo un aislamiento presentó sensibilidad disminuida. Para cefepime se encontró una sensibilidad intermedia del 10%.

De las treinta cepas, tres (10%) presentaron un test de sinergia positivo, lo cual evidenció la posible presencia de BLEE. Son estas las cepas que presentan resistencia a cefuroxime, cefotaxime y sensibilidad disminuida a ceftazidime y cefepime. Este porcentaje es alto considerando los pocos aislamientos estudiados y al azar, lo que implica una incidencia importante de las BLEE en UPEC. Se observan porcentajes mucho mayores de cepas productoras de BLEE, como en el trabajo de Xuan Quin et al, donde el porcentaje de UPEC productor de BLEE es del 63,6%. También señalan en este trabajo que existió un aumento en las cepas de *E. coli* con hiperproducción de AmpC, lo cual genera un perfil de resistencia similar al de las BLEE, pero que también confiere resistencia a las asociaciones con inhibidores, mientras que las cefalosporinas de cuarta generación y los carbapenems se mantienen activos y el test de sinergia con clavulánico es negativo <sup>(54)</sup>. En nuestro caso no encontramos hiperproducción de AmpC puesto que los 3 aislamientos resistentes a cefalosporinas de 2º y 3º generación dieron test de sinergia positivo (y por tanto corresponden a BLEE).

Para la interpretación del antibiograma, se observó el perfil de resistencia a todos los antibióticos. De esta manera se pueden inferir los posibles mecanismos de resistencia que estarían actuando. Comenzando por las cepas que solo poseen resistencias a ampicilina y cefalotina, podemos inferir que estaría actuando una betalactamasa clásica, o sea una betalactamasa plasmídica de clase A (TEM-1, TEM-2 o SHV-1). Estas betalactamasas confieren resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas, pero son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y el sulbactam. En el caso de que exista una hiperproducción de esta enzima, podría originar resistencias a cefalosporinas de 1º y 2º generación. Esto puede explicar porque las cepas resistentes a AMP, son resistentes o con sensibilidad disminuida a KF.

Podemos observar diferencias entre los inhibidores de betalactámicos, viendo que AMC es más efectivo que SAM, ya que el porcentaje de resistencia es menor para AMC (AMC: 10% y SAM: 20%). Estos valores son similares a los encontrados en otros trabajos <sup>(55)</sup>. Su mecanismo de acción se da mediante la unión en forma irreversible a la betalactamasa formando un complejo acil-enzima y actuando como inhibidores "suicidas", ya que en el proceso de unión a la enzima se autodestruyen. Como actúan en forma sinérgica con los betalactámicos, permiten que estos actúen libremente, mientras se unen a las betalactamasas. Actúan con distinto grado de afinidad y se utiliza AMC como un mejor predictor de sensibilidad <sup>(56)</sup>.

Las cepas que producen betalactamasas resistentes a inhibidores, presentan resistencias a AMC y/o a SAM. Estas betalactamasas derivan de las clásicas, confieren resistencia a penicilinas y no son sensibles a inhibidores. Se denominan IRT (inhibitor-resistant TEM mutant) ya que derivan de las TEM <sup>(57)</sup>. La presencia de una de estas enzimas podría explicar la resistencia a los inhibidores de betalactamasas. Algunas oxacilinasas como OXA-1, también confieren un fenotipo similar al de las IRT, que se caracteriza por resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas siendo insensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa de clase A como el ácido clavulánico.

Por último, las cepas que presentaron un test de sinergia positivo entre el AMC, CXM y CAZ, se infirieron como cepas productoras de BLEE. Además de presentar resistencias a AMP, SAM y AMC, presentaron resistencia a los antibióticos betalactámicos de primera generación (KF), de segunda (CXM) y de tercera (CTX y CAZ). En este último caso, se encontró mayor resistencia a CTX que a CAZ, donde solo una cepa presentó sensibilidad intermedia. También presentaron una disminución en la sensibilidad a los betalactámicos de cuarta generación (FEP), con el cual también se observó sinergia entre los discos de FEP y AMC. El hecho de todas que presentaran mayor resistencia a CTX que a CAZ demuestra que en este grupo de aislamientos predominan las cefotaximasas (probablemente CTX-M), ya que se ha encontrado en otros trabajos el aumento en la incidencia de las mismas <sup>(46)</sup> y particularmente en trabajos realizados con anterioridad en CHPR también son el tipo de BLEE más frecuente <sup>(60)</sup>. No se puede dejar de lado la probabilidad de que pueda existir otro tipo de BLEE, como TEM o SHV. Para comprobar la presencia de las BLEE y determinar a cual corresponde, se tendría que acudir a técnicas moleculares, como la técnica de PCR y la secuenciación.

Las BLEE se caracterizan por ser capaces de inactivar todas las cefalosporinas, a excepción de las cefamicinas. Mantienen la sensibilidad a inhibidores y a carbapenems. Para su interpretación se debe tener en cuenta disminuciones de sensibilidad, presencia de sinergia entre cefalosporinas de 3º o 4º generación con ác. clavulánico, los bordes irregulares de los halos de inhibición y las resistencias asociadas a quinolonas y aminoglucósidos. En este caso, vemos que las cepas con BLEE presentan una asociación con la resistencia a quinolonas y aminoglucósidos, donde se podría inferir que existe algún elemento genético móvil que aporta mecanismos de resistencia para diferentes grupos de antibióticos. Existen otros trabajos que sustentan esta hipótesis <sup>(47 y 58)</sup>.

Los tres aislamientos que evidenciaron ser productores de BLEE provenían de pacientes internados, esto coincide con lo observado en otro trabajo, en el cual se encontró que las cepas con BLEE son más frecuentes en pacientes internados, que en pacientes ambulatorios <sup>(60)</sup>. Esto podría estar relacionado con los factores de riesgo para la adquisición de *E. coli* productora de BLEE en pacientes hospitalizados. En un trabajo realizado en el CHPR se encontró que la adquisición de cepas productoras de BLEE se asocia a la hospitalización, la presencia de enfermedades graves y exposición previa a antibióticos (especialmente cefalosporinas de 3º generación) <sup>(47)</sup>. Estos factores pueden ejercer presión selectiva, seleccionando cepas más resistentes y con producción de BLEE. Si bien no se tiene la información de la historia clínica de los pacientes, debemos tener en cuenta los factores de riesgo mencionados anteriormente.

Por último, en cuanto a las carbapenemasas, se clasifican según Ambler en cuatro clases de acuerdo a su estructura molecular (A, B, C y D). A, C y D son serinproteasas, enzimas cuyo centro activo es una serina. Las B son metaloenzimas, donde los átomos de Zn<sup>2+</sup> interactúan con un residuo de cisteína y tres residuos de histidina en el sitio activo. Si bien no es en cepas de *E. coli* (ni en pediatría) donde se encuentran con mayor frecuencia las carbapenemasas, tienen una gran importancia en la microbiología por su rápida transmisión y la capacidad de generar multirresistencias. En este trabajo no se observaron cepas con este tipo de betalactamasas.

## Conclusión

En este estudio, si bien el número de cepas estudiadas es pequeño, al ser muestras tomadas al azar en un corto período de tiempo, sería representativo de las UPEC que se encuentran en pediatría. Dentro de este grupo se encontró una alta incidencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE y con multirresistencia, donde una misma cepa es resistente a más de un grupo de antimicrobianos. Esto genera una gran preocupación en el ámbito de la pediatría al reducir el espectro de antibióticos a utilizar y plantea un desafío, en cuanto a la creación de posibles estrategias de tratamiento. Para determinar qué tipo de BLEE hay en este grupo de cepas, el paso siguiente sería la búsqueda de genes mediante biología molecular, en este caso por PCR.

## **Bibliografía**

1. González C. M, Schaeffer A. J. Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new and what works. *World J Urol* 1999; 17(6):372-82.
2. Meneghello R. y col. *Pediatría*. 5ta Ed. Buenos Aires: Panamericana, 1997.
3. Rueda E, Murcia I. Trastornos de las vías urinarias. En: Quevedo F. *El pediatra eficiente*. 6ta Ed. Bogotá: Panamericana, 2002.
4. Gupta K, Hooton T. M, Stamm W. E. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *Ann Intern Med* 2001; 135(1):41-50.
5. Infección urinaria. *El Manual Merck*. <http://manualmerck.tripod.com> visitado el día 5/11/2012.
6. Alonso B, et al. Infección urinaria en niños: agentes patógenos y sensibilidad antibiótica. *Arch Pediatric Urug* 2001; 72:268-273.
7. *Temas de bacteriología y virología médica*. 2ª Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR, 2006.
8. Murray P. *Microbiología médica*. 5ta Ed. Madrid: Elsevier España, 2006.
9. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Microbiología médica*. 14ta Ed. México D.F: El manual moderno, 1992.
10. Romero R. *Microbiología y Parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ra Ed. México D.F: Editorial médica panamericana, 2007.
11. Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:80–128.
12. Nielubowicz, G. R. & Mobley H. L. T. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 2010; 7:430–441.
13. Poey M. E, et al. Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. *Microbial Pathogenesis* 2012; 52:292-301.
14. Farmer JJ III. *Enterobacteriaceae; Introduction and identification*. En: Murray P. *Manual of clinical microbiology*. 6ta Ed. Washington: D.C. ASM Press 1995: 440.
15. Gómez J, García E, Ruiz J. Significación clínica de las resistencias bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). *Rev Esp Quimioter* 2008; 21(2):115-122.
16. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 2005; 36:697-705.
17. Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol Soc Quím Méx* 2008; 2(1):1-13.
18. Alós J.I. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(5):261-8.

19. Cordiés Jackson L, et al. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Medica* 1998; 8(1):58-65.
20. Mella S, et al. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infect* 2000; 17(1):53-66.
21. Oliaphant C. M, Green G. M. Quinolones: A Comprehensive Review. *Am Fam Physician* 2002; 65:455-64.
22. Cordiés Jackson L, et al. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica* 1998; 8(1):13-27.
23. Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(2):105-15.
24. Barranco E. Aminoglucósidos. *Acta Medica* 1998; 8(1):48-53.
25. Rodríguez M. Aminoglucósidos. *Enf Infecc y Micro* 2002; 22(1): 20-30.
26. Marín M, Francesc G. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(1):42-55.
27. Suárez C, Francesc G. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27(2):116–129.
28. Bush K. Characterization of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 1989; 33(3):259-263.
29. García E, et al. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter* 2011; 24(2):57-66.
30. Paterson D, Bonomo R. Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4):657–686.
31. Isenberg H. *Clinical Microbiology Procedures Handbook Vol 1*. 1er ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1992.
32. Albers, A. y Fletcher R. Accuracy of calibrated-loop transfer. *J Clin Microbiol* 1983; 18(1): 40-42.
33. Forbes, Sham, Weissfeld. *Diagnóstico microbiológico*. 12ª Ed. Buenos Aires: Editorial médica panamericana, 2009.
34. MacFadding. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3er ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 2003.
35. Danés I. y Arnau J. M. ¿Es segura la administración de quinolonas en edad pediátrica? *Med Clin (Barc)* 2001; 117:676-677.
36. Cantón R. Interpretación del antibiograma en la elección del antibiótico y vía de administración. *Rev Clin Esp* 2003; 203(12):608-11.
37. Sánchez J, Feris J. Antibiogramas: utilidad y limitaciones. *Arch Dom Ped* 1998; 34(3):83-87.
38. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S22 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012

39. Procedimientos en microbiología clínica.  
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap38.asp> visitado el día 17/12/2012.
40. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx* 2002; 44(5): 464-475.
41. Zaitseva J, et al. A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(5):990-5.
42. Jumpertz T, et al. Mutations affecting the extreme C terminus of *Escherichia coli* haemolysin A reduce haemolytic activity by altering the folding of the toxin. *Microbiology* 2010; 156(8):2495-505.
43. Stanley P, Koronakis V, Hughes C. Acylation of *Escherichia coli* Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(2):309–333.
44. Cifuentes Y, et al. Perfil Microbiológico de Aislamientos en Unidades Neonatales en un Hospital de Tercer Nivel de Bogotá, Colombia. *Rev Salud pública* 2005; 7(2):191-200.
45. Phongpaichit S, et al. Antimicrobial resistance, class 1 integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* clinical isolates from patients in South Thailand. *Journal of Health Science* 2011; 57(3):281-288.
46. Rodríguez-Baño J, et al. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(3):1089-1094.
47. Robino L, et al. Risk factors of the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized children. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(4):361-364.
48. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4):727-737.
49. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone. *Lancet Infect Dis* 2006; (6):629–640.
50. Robicsek A, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine* 2006; 12(1):83-88.
51. Seija V, et al. Ciprofloxacin-Resistant Enterobacteria Harboring the *aac(6)-Ib-cr* Variant Isolated from Feces of Inpatients in an Intensive Care Unit in Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52(2):806–807.
52. Navarro F, et al. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28(9):638-645.

53. Queipo Zaragoza J. A, et al. Evolución de la Resistencia Microbiana a Fluoroquinolonas en in Hospital Terciario. *Actas Urol Esp* 2000; 24(5):381-387.
54. Quin X, et al. Prevalence and Mechanisms of Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*: a Children`s Hospital Experience. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52(11):3909-3914.
55. Martín N, et al. Efecto de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas sobre la evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en bacilos Gram-negativos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2002; 22(1):37-43.
56. Barcelona L, et al. Betalactamicos con inhibidores de betalactamasas. Amoxicilina Sulbactam. *Medicina* 2008; 68(1):65-74.
57. Miró E, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant betalactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12):3991-3994.
58. Kim Y, et al. Bloodstream Infections by Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Children: Epidemiology and clinical Outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(5): 1481-1491.
59. Bauer A, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disck method. *Am J Clin Pathol* 1996; 45(4):493-496.
60. García-Fulgueiras V, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(8): 1725-1729.