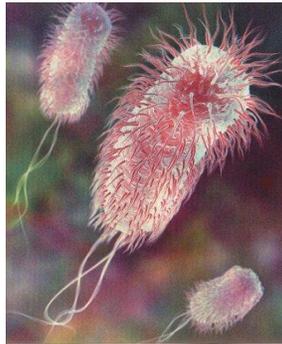




**Ministerio de Salud Pública
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"**



**TÍTULO: Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* entérica
aisladas de pacientes con procesos diarreicos agudos.**

Trabajo para optar por el título de Master en Bacteriología- Micología

Autor: Dr. Eddys Hernández Velázquez. Médico Veterinario

Tutores: Dr. Adalberto Águila Sánchez. MSc

Dra. Belkys Galindo Santana. DrC

Asesor: Ing. Claudia Hernández Morales.

La Habana Junio, 2014

***El pueblo más feliz es el que tenga mejor educado a
sus hijos, en la instrucción del pensamiento y en
la dirección de los sentimientos***

José Martí

DEDICATORIA

*“A mi familia, especialmente a mi madre, motor impulsor
en el crecimiento de valores, por lograr cada día
el resultado de quien soy”*

GLOSARIO DE TÉRMINOS

OMS: Organización Mundial de la Salud

IPK: Instituto Pedro Kourí

SNS: Sistema Nacional de Salud

EDA: Enfermedades Diarreicas Agudas

EPEC: *E. coli* enteropatogénica

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

STEC: *E. coli* productor de toxina Shiga

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EAEC. *E.coli* enteroagregativa

ADEC: *E.coli* con adherencia difusa

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

CH: Colitis Hemorrágica

IRA: Insuficiencia Renal Aguda

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

API 20 E: Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram negativos no exigentes

CSLI: Clinical and Laboratory Standards Institute

ATCC: Colección de Cepas Americanas

CIP: Ciprofloxacina

CRU: Ceftriaxona

CTX: Cefotaxima

CN: Gentamicina

C: Cloranfenicol

AK: Amikacina

F: Nitrofurantoina

SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol

TZP: Piperacilina-tazobactan

AMP: Ampicilina

TL: Termolábil

TE: Termoestable

LNR/EP/IPK: Laboratorio Nacional de Enterobacterias Patógenas del Instituto Pedro Kourí

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Escherichia coli</i> : Aspectos generales	4
2.1.1 Clasificación taxonómica:	5
2.1.4 Principales características de los patotipos de <i>E. coli</i>	7
2.1.4.1 ECET	7
2.1.4.2 ECEP.....	8
2.1.4.3 ECEI.....	8
2.1.4.4 STEC y ECEH.....	8
2.1.4.5 ECEAd: ECAD y ECAL.....	9
2.1.5 Epidemiología.....	10
2.2 Antimicrobianos	11
2.2.1 Actividad anti-infecciosa de los antimicrobianos:	12
2.2.2 Resistencia adquirida.	14
2.3 API 20 E	17
2.4 Beta-lactamasas de espectro extendido, BLEE	18
3. MATERIAL Y METODOS	21
3.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.

4.1 Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	26
4.2 Multirresistencia	33
4.3 Susceptibilidad intermedia	35
4.4 Sensibilidad	36
5. CONCLUSIONES	39
6. RECOMENDACIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas agudas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en países en vía de desarrollo. Ocurre con mayor frecuencia en edades extremas de la vida, siendo la *Escherichia coli* (*E. coli*) uno de los agentes enteropatógenos bacterianos que con mayor frecuencia provoca diarreas. Este enteropatógeno actualmente está desarrollando resistencia a diferentes familias de antimicrobianos. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el período de mayo 2009 a mayo del 2010, con el objetivo de confirmar el diagnóstico de los aislamientos de *E. coli* entéricas, determinar los fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos confirmados, así como definir los patrones de multirresistencia de *E. coli* entéricos estudiados. Se confirmó el 83.6% de los aislamientos como *E. coli*. Se mostró buena sensibilidad para la ceftriaxona (94,85%) amikacina (92,78%) piperacilina–tazobactan y nitrofurantoina, estos con (95,88%). Se obtuvieron niveles elevados de resistencia a ampicilina (39,18%), tetraciclina (32,99%), ácido nalidíxico (29,9%) y ciprofloxacina (28,87%). Se observaron 13 patrones de multirresistencia que comprometían 26 aislamientos. La mayoría de los aislamientos fueron confirmados como *E. coli*, pero todavía persisten dificultades en la identificación a nivel de laboratorio de microbiología de asistencia, por lo que es necesario perfeccionar el trabajo de la red. *E. coli* entérica muestra una alta resistencia a los betalactámicos, quinolonas y tetraciclina. Sin embargo los betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, nitrofurantoina, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos constituyen alternativas para el tratamiento de esta enterobacteria. Se observa un incremento de la multirresistencia de los aislamientos estudiados lo que constituye una alerta para el SNS.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo (1,2). Son frecuentes en las edades extremas de la vida, comprendidas entre 6 meses y 2 años de edad, debido a la inmadurez inmunológica que estos presentan (3) y en aquellos mayores de 65 años, por su estado de salud comprometido. También incluye a pacientes inmunodeprimidos como por ejemplo los casos infectados por el virus de Inmunodeficiencia humana (VIH).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que anualmente ocurren entre 750 y 1 000 millones de episodios diarreicos y cerca de 5 millones mueren por esta causa. En Cuba, la morbilidad para el año 2013 fue de 625 936 atenciones médicas (4). En los Estados Unidos se estima que se producen entre 211 y 300 millones de episodios anuales y 6 000 defunciones por EDA (5).

Escherichia coli es una de las principales bacterias causantes de EDA (6,7), aunque existe un subregistro en el reporte de casos a nivel internacional, producido por la no diferenciación entre los aislamientos de *E. coli* de la microbiota normal y aquellas patógenas. Dicho microorganismo coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y forma parte de la microbiota habitual. De acuerdo al mecanismo de patogenicidad, el cuadro clínico y la epidemiología, las cepas de *E. coli* causantes de diarreas se pueden clasificar en seis patotipos o categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* productora de la toxina Shiga (ECTS), entre la que se incluye a *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) y por último *E. coli* entero adherente (ECEAD), entre las que se encuentran las de adherencia localizada y de adherencia difusa (7).

El mal uso y el abuso de los antimicrobianos por parte del hombre han traído consigo la aparición y aumento cada vez mayor de microorganismos resistentes a los antimicrobianos (8,9). La disminución de la susceptibilidad de las bacterias a las drogas antimicrobianas es un proceso dinámico que se ha ido modificando con el transcurso del tiempo, provocando un efecto social negativo. En el caso de *E. coli* es una de las especies bacterianas que ha desarrollado más rápidamente resistencia a distintos grupos o familias de antimicrobianos, en especial las aisladas de infecciones extraintestinales (10).

A partir de los años 40, fecha en que salen al mercado los primeros antibióticos, se reporta el fenómeno de resistencia, que incluye a las drogas de reciente producción. En la actualidad toda la humanidad sufre las negativas consecuencias de este fenómeno que afecta tanto a Cuba como a otros países del mundo (10,11).

A pesar del carácter autolimitado de las diarreas provocadas por *E. coli*, resulta de importancia mantener una vigilancia estrecha de su susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos de uso clínico (12). El presente estudio brinda una herramienta a los clínicos y otros médicos de asistencia, que necesiten aplicar una terapia antimicrobiana efectiva en pacientes aquejados de estas infecciones, en particular los individuos con estado de salud comprometido.

OBJETIVOS

1. Confirmar el diagnóstico de los aislamientos de *Escherichia coli* entéricas, mediante métodos convencionales.
2. Determinar los fenotipos de resistencia antimicrobiana de los aislamientos confirmados como *Escherichia coli* entéricas.
3. Definir patrones de multirresistencia en aislamientos de *Escherichia coli* entéricas y seleccionar los de mayor relevancia.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*: Aspectos generales

Escherichia fue descrita originalmente por el pediatra y profesor alemán Theodore Escherich en 1885 y bautizada en su honor en 1919 como *Bacterium coli commune*, hoy renombrada como *Escherichia coli*. Algunas cepas de *E. coli* poseen diversos grados de patogenicidad, lo que llevó a profundizar en los mecanismos relacionados con la virulencia en los pacientes afectados (13).

Esta bacteria comenzó a estudiarse con mayor exhaustividad a partir de la primera mitad del siglo XX y es considerada la especie de vida libre más estudiada del planeta (13,14). *E. coli* está ampliamente distribuida en el tubo digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente y conjuntamente con otras bacterias aerobias y anaerobias forma parte de la microbiota intestinal (15).

Escherichia coli es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo, gramnegativo y en forma de bacilos rectos. Puede presentarse de forma aislada o en pares y tener cápsula o no. Es capaz de incorporar material genético exógeno. Coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del recién nacido y establece con el hospedero, en condiciones naturales, una relación estable de mutuo beneficio (16). Puede comportarse como un patógeno capaz de causar infección severa cuando adquiere elementos de virulencia (17,18) o cuando se desplaza de su hábitat normal, lo que provoca una enfermedad endógena en los pacientes debilitados o en aquellos que presentan una alteración de la pared intestinal. Las infecciones entéricas provocadas por *E. coli* no son causadas por las cepas que habitan

normalmente el intestino, sino por aquellas especialmente patógenas en esta localización (12, 13).

2.1.1 Clasificación taxonómica:

Reino: Procarionte

División II: Bacterias

Sección 5: Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos

Orden: Enterobacterias

Familia: Enterobacteriaceae

Tribu: *Escherichiae*

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

2.1.2 Principales características fenotípicas de *E. coli*

Tabla 1. Principales características fenotípicas de *E. coli* en diferentes sustratos bioquímicos

Morfología y tinción	Bacilos Gram (-)
Movilidad	(+) Peritricos
Relación con el O ₂	Aerobios – Anaerobios Facultativos
Requerimientos nutricionales	No exigentes
Medio OF	F
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
Nitratos a nitritos	(+)
Glucosa	(+) AG
Lactosa	(+) AG
Arabinosa	(+) AG
RM	(+)
VP	(-)
KCN	(-)
Citrato	(-)
Acetato	(+)
Ureasa	(-)
H ₂ S	(-)
Fenilalanina	(-)
Indol	(+)
Lisina decarboxilasa	(+)

(+) = amplia mayoría de cepas positivas

VP: Voges Proskauer; H₂S: sulfuro de hidrógeno RM: Rojo Metilo. KCN: Cianuro de potasio.

2.1.3 Características antigénicas de *E. coli*

Según el esquema de clasificación propuesto por Kauffman en el año 1947 y teniendo en cuenta las modificaciones aceptadas en la actualidad, las cepas de *E. coli* se clasifican en función de sus perfiles antigénicos de superficie, los cuales incluyen 3 antígenos diferentes: O (somático), H (flagelar) y K (capsular) (19).

Este esquema es actualizado constantemente y hasta el año 2002 se conocían 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K) (18). El antígeno O

grupo-específico se encuentra en la capa de lipopolisacáridos (LPS), mientras que el antígeno H tiene naturaleza proteica (18). El antígeno capsular K es un polisacárido. Existen 3 variedades del antígeno K (A), K (B) y K (L). Únicamente K (B) y K (L) se inactivan por calentamiento a 100° C durante 1 hora, mientras que para inactivar K (A), se requiere de una temperatura de 121° C durante 2 horas y media (18).

Escherichia coli productora de diarreas puede causar cuadros clínicos leves, evolucionar a la diarrea persistente o provocar complicaciones, que pueden llevar a la muerte del paciente (20). Teniendo en cuenta el mecanismo de patogenicidad y el cuadro clínico al que se encuentran asociadas, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se pueden clasificar en seis patotipos o categorías (6,21,22,23):

1. *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
2. *E. coli* enteropatógena (ECEP)
3. *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)
4. *E. coli* de adherencia (ECEAd)
5. *E. coli* enteroagregativa (ECEAg)
6. *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC siglas en Inglés), semejante a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo I.

2.1.4 Principales características de los patotipos de *E. coli*

2.1.4.1 ECET

Coloniza el intestino delgado, posee fimbrias que le permiten adherirse firmemente y suministrar la toxina al epitelio. Producen 2 enterotoxinas, una termolábil (TL) y otra

termoestable (TE), o ambas a la vez. La toxina TL está relacionada de forma funcional, inmunológica y estructural con la toxina del cólera.

2.1.4.2 ECEP

No produce enterotoxinas ni invade las células epiteliales. Su principal factor de virulencia es la adherencia y la esfacelación que provocan en el borde en cepillo del enterocito. Se adhiere al epitelio intestinal mediante una proteína denominada intimina y forma un pedestal con la consecuente pérdida de la microvellosidad. Favorece el sobrecrecimiento bacteriano, lo cual puede ser un factor condicionante para la persistencia del episodio diarreico (24). La destrucción de las microvellosidades también puede condicionar la persistencia del episodio diarreico agudo (25).

2.1.4.3 ECEI

Coloniza el colon. Las propiedades de colonizar, invadir y destruir los enterocitos del colon se codifican genéticamente en el ADN cromosomal y por plásmidos. Elabora una citotoxina que se presenta con mayor intensidad en un medio bajo en hierro. Se adhiere al epitelio intestinal y causa muerte celular y una rápida respuesta inflamatoria. Se comporta como *Shigella* en cuanto a su capacidad de invadir el epitelio intestinal, pero no produce toxina Shiga.

2.1.4.4 STEC y ECEH

Se adhiere a las células endoteliales y produce lesiones de unión estrecha y borramiento del borde en cepillo del enterocito, principalmente en el colon. En algunos estudios se reportan lesiones básicamente al nivel de las placas de Peyer y no toda la superficie de extensión de la mucosa. Produce 2 tipos principales de toxinas: una es esencialmente idéntica a la toxina Shiga de *S. dysenteriae* tipo I,

denominada antiguamente Verotoxina 1 (VT-1); la otra se denomina Verotoxina 2 (VT-2). Estas toxinas producen inhibición de la síntesis proteica y muerte celular sin invasión del enterocito. Este patotipo constituye la primera causa del síndrome hemolítico urémico (SHU) en la niñez (niños menores de 5 años de edad) y una de las principales causas de insuficiencia renal aguda (IRA), fenómeno trombocitopénico trombótico y la anemia hemolítica. Los serogrupos más comúnmente aislados son: O157, O26, O111, O145 y en combinación con los antígenos flagelares (H7, H11 y H32) conforman los serotipos más representativos de la categoría (26,27, 28).

2.1.4.5 ECEAd: ECAD y ECAL.

Coloniza el colon. Produce toxina termolábil y termoestable pero se desconoce el papel que desempeña en la patogenia. También se le denomina *E. coli* enteroaglutinante.

Es necesario destacar que las cepas de ECET, ECEP y de adherencia difusa producen diarreas acuosas, en tanto que las cepas de ECEI y STEC/ECEH producen diarrea con sangre. No obstante, algunos estudios concluyen que el cuadro clínico no resulta lo suficientemente característico como para realizar un diagnóstico específico (29).

En los últimos veinte años, STEC/ECEH ha sido reconocido por la OMS como un agente emergente y zoonótico en determinadas regiones, en donde causa enfermedad gastrointestinal grave, con riesgo de complicaciones que ponen en peligro la vida de los pacientes afectados. Las cepas STEC pertenecen a un amplio rango de serotipos y han sido asociadas a diarreas con sangre o sin ella, colitis hemorrágica (CH) y SUH (27). Superado el período de aproximadamente 10 días,

cerca del 10% de los pacientes evolucionan a SUH, que se caracteriza por producir tres entidades nosológicas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda, pero puede afectar también al sistema nervioso central, páncreas, pulmones y corazón. Los serotipos de STEC que causan enfermedad severa en el hombre pertenecen al grupo denominado ECEH (28,29). Este microorganismo es de gran interés para la OMS, razón por la que se ha establecido un programa continuo de vigilancia sanitaria, para controlar aquellos alimentos que representan riesgos para la salud (30).

2.1.5 Epidemiología

La incidencia real de EDA causada por *E. coli* en el mundo es desconocida, ya que no todos los laboratorios pueden realizar la identificación definitiva de los patotipos de este microorganismo. ECET es la causa más común de la diarrea del viajero. ECEP y ECEI infectan principalmente a los niños menores de 2 años en los países en vías de desarrollo. ECEP provoca diarreas en el recién nacido y es también causa de diarrea persistente en pacientes con antecedentes de enfermedades crónicas y debilitantes (31).

Los primeros reportes de EDA por ECEH aparecen en la década del 80, causando casos esporádicos y brotes epidémicos en países desarrollados. El serotipo más frecuente en EE.UU, Europa y Japón fue el O157:H7, que es el prototipo de la categoría ECEH, caracterizada por la producción de la toxina Shiga (22). El período de incubación oscila entre 12 y 72 h, su transmisión ocurre mientras dure la formación de colonias en las heces (32).

El hombre constituye el principal reservorio para casi todos los patotipos reconocidos de *E. coli* (33). Como la generalidad de las EDA, la transmisión es fecal - oral, a través del agua y alimentos contaminados. Resulta necesario destacar la importancia de la transmisión de persona a persona, en especial en lugares hacinados, como hogares y centros de atención de niños y ancianos, prisiones, etc. Como *E. coli* puede habitar en el intestino del ganado vacuno saludable, la carne del animal pudiera contaminarse durante el proceso de sacrificio, por contacto con restos fecales. La colitis hemorrágica producida por *E. coli* O157:H7 ha estado relacionada con la ingestión de hamburguesas contaminadas donde se han comprobado fallos en el proceso de producción, control de calidad, distribución y adecuada cocción de este producto de alta demanda en la población (32). Las bacterias presentes en las ubres de las vacas o en los equipos de ordeño pueden asimismo contaminar la leche cruda y sus derivados, principalmente los quesos (33).

2.2 Antimicrobianos

El desarrollo de la terapia antimicrobiana para la cura de las enfermedades infecciosas constituye uno de los mayores logros de la ciencia y la técnica moderna, lo que ha permitido modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y la mortalidad por estas enfermedades en muchos países del mundo (34).

La era contemporánea de la terapéutica antimicrobiana se inicia en 1934 con la descripción por Dogmak de la efectividad de la primera sulfonamida en el tratamiento de las infecciones experimentales por estreptococos (35).

Los antimicrobianos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de

laboratorio. Estos suprimen el crecimiento de microorganismos patógenos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (38,39).

2.2.1 Actividad anti-infecciosa de los antimicrobianos:

El desarrollo de la farmacoterapia anti-infecciosa tiene su origen en la obra de Pasteur, Koch y Ehrlich. Sus hitos fundamentales han sido las sulfamidas y la penicilina, quienes crearon las bases científicas para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

La actividad de un agente anti-infeccioso está definida por su espectro antibacteriano, es decir, el conjunto de microorganismos patógenos que se ven afectados por las concentraciones del antimicrobiano sin causarle toxicidad (38)

Los agentes antimicrobianos se comportan de manera diversa (Ver tabla 2):

- Como bactericidas: producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso.
- Como bacteriostáticos: inhiben el crecimiento bacteriano aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, una vez suspendido el antibiótico, puede recuperarse y volver a multiplicarse. La eliminación de las bacterias exige el concurso de las defensas del organismo infectado.

Tabla 2. Grupos de antimicrobianos con acción bactericida / bacteriostático.

BACTERICIDAS	BACTERIOSTATICOS
Penicilinas	Tetraciclinas

Cefalosporinas	Eritromicina
Aminoglucósidos	Sulfonamidas
Rifampicina	Novobiocina
Quinolonas	Cloranfenicol
Monobactámicos	
Polimixinas	

El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático, depende principalmente de su mecanismo de acción y por lo tanto, de su estructura, pero contribuyen también otros factores, tanto por parte del antimicrobiano como por parte del germen: concentración alcanzada en el sitio de infección, tipo de germen, tamaño del inóculo, tiempo de acción y fase de crecimiento de la bacteria; por ejemplo, los B-lactámicos sólo son bactericidas en la fase de crecimiento activo de la bacteria, mientras que las polimixinas son bactericidas en cualquier fase. El concepto de bactericida o bacteriostático no es, sin embargo, algo definitivo que caracterice a un determinado antibiótico, puesto que un antibiótico bacteriostático por su mecanismo de acción puede comportarse como bactericida en determinadas condiciones favorables; esto ocurre, por ejemplo, con los macrólidos.

Desde el punto de vista clínico, se considera que una bacteria:

- Es sensible a un antimicrobiano, cuando las infecciones causadas por ella y tratadas con las dosis habituales del antimicrobiano responden satisfactoriamente.
- Es resistente cuando las infecciones que provocan no logran un resultado terapéutico favorable con las dosis máximas.

- Es moderadamente sensible cuando se necesita incrementar la dosis terapéutica habitual para conseguir su eliminación. El ejemplo de mayor interés terapéutico en la actualidad es el *Streptococcus pneumoniae* y su sensibilidad a la penicilina (40).

Hay grupos bacterianos que no son afectados por un antimicrobiano, bien porque carecen del sitio de acción del antimicrobiano o porque es inaccesible. Esta situación se define como resistencia natural o intrínseca. Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antimicrobianos. En el caso de la resistencia natural, todas las bacterias de la misma especie resultan resistentes al antimicrobiano en cuestión y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso de que se emplee esa droga (41, 42).

2.2.2 Resistencia adquirida.

Los primeros casos de resistencia adquirida se detectaron poco tiempo después de iniciarse el empleo de las sulfonamidas y los antibióticos. Su aparición es una consecuencia de la capacidad de las bacterias, como todos los seres vivos, de evolucionar y adaptarse al medio en que habitan. Desde la aparición de las primeras cepas resistentes, la introducción de nuevos antimicrobianos es correspondida con la aparición de bacterias resistentes (43, 44)

La aparición de cepas resistentes puede ocurrir localmente en una determinada especie y en una región geográfica determinada. Sin embargo, la capacidad bacteriana para compartir su información genética acaba diseminando la resistencia a otros géneros y la movilidad actual de la población humana se encarga de diseminar las cepas resistentes por el planeta (46, 47)

La resistencia cruzada ocurre cuando aparece resistencia simultánea a varios antimicrobianos de un mismo grupo que poseen estructura similar (resistencia cruzada homóloga) o antimicrobianos que tienen un mecanismo de acción parecido (resistencia cruzada heteróloga) o bien comparten el mismo sistema de transporte. La resistencia cruzada entre dos antimicrobianos puede ser recíproca, si la resistencia a uno entraña la resistencia a otro (43).

La inmensa mayoría de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica actúan sobre diferentes bacterias, y a su vez numerosas bacterias son afectadas por diferentes antimicrobianos. Sin embargo, la autoadministración de antimicrobianos,, la facilidad al acceso sin prescripción médica y su uso inapropiado y excesivo son las principales condicionantes de la resistencia bacteriana que sumadas a las condiciones sanitarias deficientes y el hacinamiento, permiten su rápida diseminación en regiones pobres de los países en desarrollo (44, 45). Según estadísticas a nivel mundial, se consumen cada año alrededor de 3 millones de libras de antimicrobianos por los humanos y 30 millones de libras por los animales. Esto ha traído como consecuencia, la creciente resistencia en microorganismos patógenos, en especial en países en vías de desarrollo, donde los antimicrobianos alternativos no están muy comercializados o resultan muy caros (47,48,49). La resistencia bacteriana es un fenómeno bastante complejo que está determinado por varios factores, implica un cambio genético en las bacterias y alcanza proporciones alarmantes que afectan drásticamente la ecología microbiana, humana y animal (43,50).

El uso irracional de los antimicrobianos y la falta de conocimiento de los mecanismos de resistencia de las bacterias, han llevado a una disminución acentuada de las opciones terapéuticas en los hospitales y en la comunidad. Debido

a la no creación de nuevos antibióticos capaces de vencer estos mecanismos de resistencia, el desarrollo de campañas educativas y protocolos encaminados a orientar su adecuado uso, es muy importante para preservar los antimicrobianos con los que contamos (44).

En el caso específico del tratamiento de las infecciones entéricas, la resistencia antimicrobiana constituye un problema creciente, en especial en los países en desarrollo, debido al mayor número de casos de EDA y el uso de antimicrobianos que no son prescritos por el médico. Entre los bacilos gramnegativos que causan diarrea, los mecanismos de resistencia bacteriana más comunes son: la inhibición enzimática, las alteraciones de la membrana de la bacteria y la alteración de sitios blanco como los ribosomas, los precursores de la pared y las enzimas. Existen varios cambios genéticos que pueden presentarse en la evolución microbiana: una mutación puntual que ocurre en un par de bases, un segundo cambio que resultaría en un re-arreglo del material genético en grandes segmentos de ADN en un solo evento, y finalmente, un tercer cambio que involucraría la adquisición de ADN extraño transportado por plásmidos, bacteriófagos o transposones (44, 45).

Estos cambios permiten a la bacteria adquirir un número ilimitado de mecanismos de resistencia. Una vez que aparece, un gen de resistencia puede diseminarse a otras bacterias por transformación, transducción, conjugación o transposición. Asimismo algunas clonas seleccionadas pueden proliferar en la flora de pacientes que reciben antimicrobianos (51, 52).

Escherichia coli presenta resistencia intrínseca a los antibióticos betalactámicos. Hasta finales de los años 70, su característica era un patrón uniforme de sensibilidad; sin embargo, la utilización masiva de antimicrobianos ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial. En los últimos años, se ha observado un

aumento de la resistencia de esta especie a las principales drogas de uso clínico para el tratamiento de las infecciones por *E. coli*, como la ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomina, tanto en cepas de origen humano y animal como en las aisladas del ambiente, agua y suelos (53).

2.3 API 20 E

El sistema comercial de identificación bioquímico API20E (BioMerieux, Francia) se emplea en la identificación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, así como de otros bacilos gram-negativos. La galería consta de 20 microtubos que contienen medios deshidratados. Las pruebas se inoculan con una suspensión bacteriana; el crecimiento de los microorganismos produce cambios de color en el medio, ya sea directamente o tras la adición de reactivos. La lectura de este sistema sigue las mismas pautas que las establecidas para el sistema comercial API 20 NE. Tras 18-24 horas de incubación a 35-37 °C debe hacerse la lectura de la galería según la tabla de lectura. Se anotan primero las reacciones espontaneas; si la glucosa resulta positiva y/o 3 o más pruebas son positivas se procede a añadir los reactivos correspondientes a las pruebas que los requieran. Si la prueba de glucosa resulta negativa y el número de pruebas positivos es menor o igual a 2, se recomienda realizar una prueba de oxidación-fermentación (OF) para comprobar el metabolismo de la glucosa del microorganismo, se siembra en agar MacConkey y se verifica la movilidad. A continuación, se incuba la galería durante 24 horas más y se revelan las pruebas que lo necesitan, realizando finalmente la lectura de la galería (Anexo 3) (54).

2.4 Beta-lactamasas de espectro extendido, BLEE

Las BLEE han sido reportadas en múltiples especies de bacterias Gram negativas, en especial *Klebsiella* spp y *E. coli*. Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefalosporinas (como las cefalosporinas de tercera generación), el aztreonam, las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido. Por otro lado, son incapaces de hidrolizar cefamicinas (cefotetán y cefoxitina) y carbapenémicos. Las BLEE son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, lo que las diferencia de las β -lactamasas tipo AmpC. Se han descrito varias familias de BLEE, siendo TEM, SHV y CTX-M las más prevalentes (58). La mayoría de las BLEE se han originado por mutaciones espontáneas de β -lactamasas de espectro reducido, por cambios en los aminoácidos en su sitio activo, lo que les ha permitido ampliar su capacidad hidrolítica. En la práctica la detección de cualquier infección provocada por una bacteria productora de BLEE debe llevar al clínico a considerarla como resistente a las cefalosporinas de amplio espectro y a los monobactámicos (55, 56).

Usualmente, las BLEE tipo TEM y SHV hidrolizan a ceftazidima con mayor eficiencia que a ceftriaxona o cefotaxima, mientras que CTX-M usualmente hidroliza cefotaxima y ceftriaxona más rápidamente que a ceftazidima; de esta manera, los laboratorios que evalúan la susceptibilidad a ceftazidima o ceftriaxona solamente, podrían no detectar estas BLEE. Esto obliga a todos los laboratorios de microbiología a estudiar simultáneamente la sensibilidad a ceftazidima y ceftriaxona (cefotaxima) para detectar cualquiera de estas BLEE. La CTX-M también hidroliza cefepima con gran eficiencia. Otras familias de BLEE son PER, VEB-1 y BES-1, las cuales son menos prevalentes en el mundo que las previamente descritas (57).

Una característica importante de las BLEE, es que son mediadas por plásmidos, lo cual les confiere una increíble capacidad de diseminación entre diferentes especies. Además, en el mismo plásmido que porta los genes de BLEE, pueden encontrarse genes que codifican resistencia para aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual puede contribuir a la resistencia a múltiples antimicrobianos. La resistencia concomitante a quinolonas es multifactorial y depende de alteraciones en la topoisomerasa, las bombas de expulsión y algunas proteínas mediadas por plásmidos (58).

Las infecciones intestinales, respiratorias y del tracto urinario causadas por bacterias resistentes y multirresistentes constituyen un problema de salud creciente en la comunidad y contribuyen al incremento de la morbilidad y la mortalidad por enfermedades infecciosas en niños y adultos. Entre los agentes que más se destacan se encuentra *E. coli*. El incremento en la actualidad de la resistencia a los antimicrobianos dentro de las categorías de *E. coli* refleja la importancia de realizar estudios de laboratorio para medir la susceptibilidad a los antimicrobianos, con la finalidad de prescribir el antimicrobiano más adecuado (58, 59).

El laboratorio juega un importante papel a la hora de reportar casos de resistencia que se presenten contra los fármacos que se están aplicando en determinado momento en el hospital, ya que permite la detección precoz de cepas resistentes que pueden controlarse con oportunos cambios en los antibióticos autorizados para uso en la institución. El otro rol fundamental del laboratorio, es tipificar los gérmenes en el menor tiempo posible, dando además su perfil de susceptibilidad para pasar de la terapia empírica a la específica con el antibiótico indicado para el germen identificado. El antibiótico debe elegirse teniendo en cuenta que sea no sólo específico, también debe buscarse un fármaco económico, pasar de administración

intravenosa a vía oral en el menor tiempo posible y en los casos que sea factible pasar a un esquema con mayores dosis y menor frecuencia de administración.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias Patógenas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (LNR/EP/IPK), en el periodo comprendido entre mayo 2009 y mayo de 2010. Se estudiaron 121 aislamientos con diagnóstico presuntivo de *E. coli* recuperados de igual número de pacientes con EDA y que procedían de los 15 Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) del país y el municipio especial Isla de la Juventud.

Para la confirmación diagnóstica y la verificación de la viabilidad de los aislamientos se estableció un flujograma de trabajo representado en el anexo 1. Los aislamientos se recibieron en medio de conservación y transporte Pasteur (Anexo 2). Se realizó la siembra primaria en caldo cerebro-corazón (Biolife) durante 18-24 horas a 37°C. Una vez observado el crecimiento se procedió a la siembra en el medio selectivo y diferencial de agar MacConkey (Biolife), bajo las mismas condiciones de incubación. Confirmado en la lectura de las placas el crecimiento de colonias fermentadoras de lactosa se seleccionaron y sembraron en los medios de identificación primaria de agar Hierro de Kligler (Biolife), y agar de Hierro y Lisina (Biolife), que son utilizados para la diferenciación de microorganismos entéricos. Visualizada la imagen compatible con *E. coli* en el Kligler y el LIA se realizó la siembra en cuña agar cerebro corazón para llevar a cabo las pruebas de oxidasa por el método de Kovacs y la confirmación bioquímica por el sistema comercial Api-20E de Biomerieux, que permite la identificación de enterobacterias y otros bacilos Gramnegativos no exigentes. La incubación de la galería de pruebas se realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Tras la confirmación final de *E. coli*, se procedió a realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión con discos o Kirby-Bauer (63). Finalmente se efectuó la conservación de los aislamientos en medio caldo triptona soya con glicerol al 15%, a la temperatura de -20°C, para llevar a cabo estudios posteriores.

3.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó mediante el método de difusión con discos o Kirby-Bauer, acorde al Manual de Operaciones y Procedimientos del LNR/EP/IPK y del Comité Internacional de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI, por sus siglas en inglés) de los EUA Para comprobar la calidad de esta prueba y garantizar que los parámetros se mantuvieran dentro de los rangos establecidos (verificar estado de los discos de sensibilidad) se emplearon las siguientes cepas ATCC de referencia internacional (60):

- *Enterococcus faecalis* ATCC 33186
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Para desarrollar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se empleó el medio de agar Mueller-Hinton (Biolife) y 12 antimicrobianos que recomienda el CLSI para

el tratamiento de las infecciones por *E. coli* entéricas en pacientes con varias condiciones de salud (Tabla 3) (60).

Tabla 3. Agentes antimicrobianos utilizados, su concentración en el disco y las categorías para la interpretación de los resultados. CLSI 2013

Agentes antimicrobianos	Concentración en el disco	Diámetros en mm para definir categorías		
		R	I	S
Ampicilina (AMP)	10 µg	≤13	14-16	≥ 17
Ceftriaxona (CRO)	30 µg	≤13	14-20	≥ 21
Gentamicina (CN)	10 µg	≤12	13-14	≥ 15
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Tetraciclina (TE)	30 µg	≤ 14	15-18	≥19
Ácido Nalidíxico (NA)	30 µg	≤13	14-18	≥19
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥16
Cloranfenicol (C)	30 µg	≤12	13-17	≥18
Cefotaxima (CTX)	30 µg	≤26	23-25	≥22
Amikacina (AK)	30 µg	≤ 14	15-16	≥17
Nitrofurantoína (F)	300 µg	≤14	15-16	≥17
Piperacilina-tazobactan (TZP)	10 µg	≤17	18-20	≥21

R: resistente I: Susceptibilidad intermedia, S (sensible).

Para realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana el inóculo bacteriano se transfirió a un tubo con 5ml de caldo Mueller-Hinton (Biolife), y se ajustó la densidad

bacteriana según el patrón de turbidez 0.5 de la escala de Mac Farland (McF). Se embebió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana recientemente preparada (no más de 15 minutos). A continuación se realizó la siembra del inóculo bacteriano en la superficie del medio de agar Mueller Hinton (Biolife), con estrías en tres direcciones girando la placa alrededor de 60 grados cada vez, para garantizar una inoculación uniforme y luego se presionó el hisopo en el borde de la placa. Se dejaron secar las placas por 15 min. Se colocaron los discos antimicrobianos con pinza estéril, presionándolos sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis de 16-18 horas. En nuestro estudio se utilizaron placas de Petri de 100 x 13 mm, por lo que se colocaron no más de 6 discos de antimicrobianos por cada placa. Finalmente la lectura de las zonas de inhibición se realizó según los criterios del CLSI y los resultados se expresaron según categoría interpretativa en sensibles (S), sensibilidad intermedia (I) y resistentes (R) (63).

Definición de multirresistencia: Se consideran aislamientos multirresistentes aquellos que presentan resistencia a tres o más familias de antimicrobianos (64).

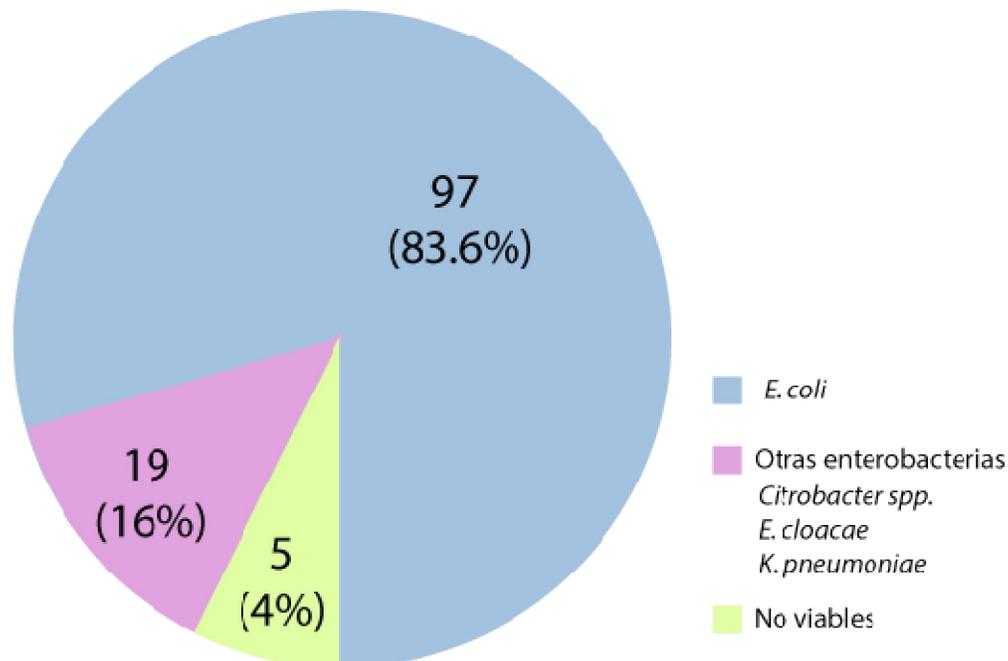


Figura1. Distribución del número y porcentaje de aislamientos confirmados como *E. coli*, otras especies de enterobacterias y no viables. Mayo 2009 - mayo 2010. IPK

El mayor porcentaje de los aislamientos confirmados perteneció a *E. coli* entérico con un 83,6%, esto favorece que el laboratorio de referencia cuente con una representación de aislamientos de todo el país, los que pueden utilizarse para generar estudios de caracterización microbiológica. Sin embargo debe señalarse que aún persisten dificultades en la identificación de *E. coli* entéricos en la red de laboratorios de microbiología y en los CPHEM del país, lo que impacta de forma negativa en el sistema Nacional de Salud (SNS). Esta dificultad en la identificación de *E. coli* entérica en la red nacional de laboratorios no es nueva, como fue reportado por Mendoza (78), 2012, aunque refieren un mayor porcentaje de dificultades diagnósticas. Las causas fundamentales que pueden influir en estos resultados radican en que los laboratorios de microbiología de asistencia no cuentan

con los reactivos para identificar presuntivamente los patotipos de *E. coli*, así como la falta de experiencia de los laboratoristas (59,61).

4.1 Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

El estudio de susceptibilidad antimicrobiana demostró que el 74.22% (72/97), de los aislamientos evaluados resultaron resistentes al menos a uno de los 12 antimicrobianos utilizados. Ningún aislamiento se mostró resistente a todos los antimicrobianos. Se obtuvieron 36 fenotipos de resistencia, 23 aislamientos fueron resistentes a un antimicrobiano y 13 a dos antimicrobianos (datos no mostrados).

Los resultados de la susceptibilidad a 12 antimicrobianos en *E. coli* entéricas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la susceptibilidad a 12 antimicrobianos de los aislamientos de *E. coli* entéricas. Mayo 2009 – Mayo 2010. IPK.

Antibióticos	Sensible		Intermedio		Resistente	
	No	%	No	%	No	%
CN	86	88,66	4	4,12	7	7,22
C	87	89,69	2	2,06	8	8,25
CRO	92	94,85	-	-	5	5,15
CTX	72	74,23	18	18,56	7	7,22
CIP	63	64,95	6	6,19	28	28,87
AK	90	92,78	7	7,22	-	-
AMP	52	53,61	7	7,22	38	39,18
SXT	75	77,32	1	1,03	21	21,65
F	93	95,88	2	2,06	2	2,06
NA	58	59,79	10	10,31	29	29,90
TZP	93	95,88	3	3,09	1	1,03
TE	64	65,98	1	1,03	32	32,99

Los porcentajes de resistencia más elevados se obtuvieron frente a: ampicilina (39,18%), tetraciclina (32,99%), ácido nalidíxico (29,90%) y ciprofloxacina (28,87%) (Figura 2 y Tabla 4).

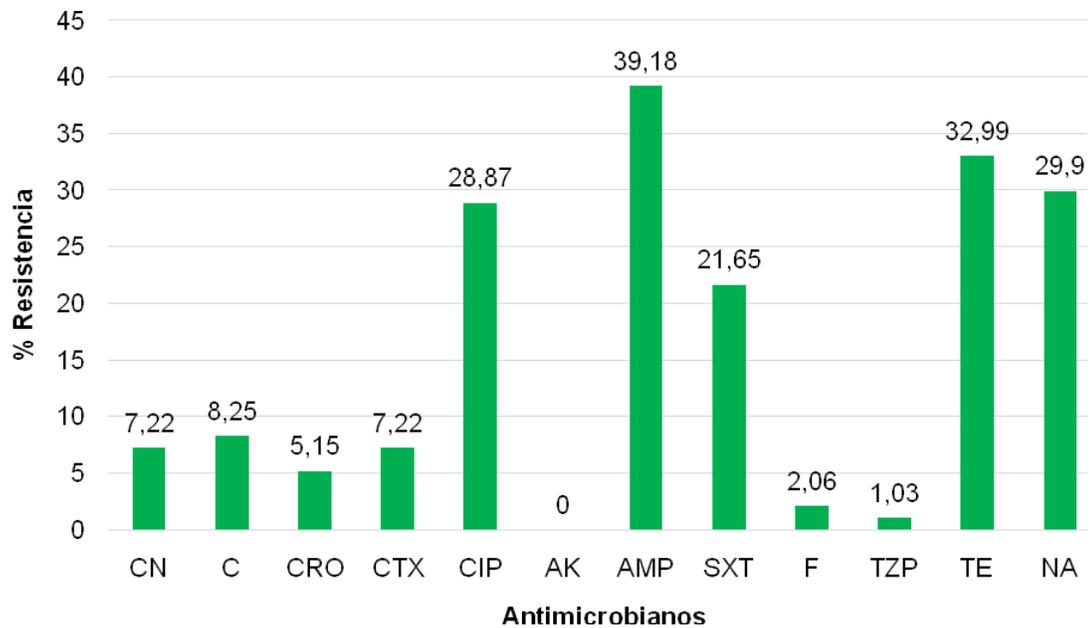


Figura 2. Porcentaje de resistencia de los aislamientos de *E. coli* entéricos, frente a 12 antimicrobianos. Mayo 2009-Mayo 2010 .IPK

Estudios de la susceptibilidad antimicrobiana en *E. coli* aisladas de pacientes con EDA, realizados anteriormente en el país, reportan porcentajes de 100% de resistencia a la ampicilina, Águila *et al*, 2007(59) y Bernedo, 2008 (61). Los elevados porcentajes obtenidos en ambos trabajos son el resultado del amplio y excesivo uso de este antimicrobiano por la población cubana, lo que provocó el aumento de la presión selectiva y la consecuente expresión de mecanismos de resistencia a este antimicrobiano.

Como resultado de los estudios anteriores, se recomendó desde hace varios años en el país el no uso de la ampicilina para el tratamiento de las infecciones por *E. coli* entéricas y otros enteropatógenos productores de EDA (59), observándose en estos momentos una disminución en los porcentajes de resistencia a esta droga. Por su parte Romeu *et al*, en 2012 (53) obtiene un 42.3 % de resistencia a la ampicilina en *E. coli* aisladas de fuentes hidroacuíferas en Cuba. Estudios realizados por autores

extranjeros también obtienen altos porcentajes de resistencia para ampicilina, como es el caso de Aibinu *et al*, 2004 en Lagos, Nigeria (62), quien reporta un 100% de resistencia en *E. coli* entéricas.

En tanto, en 2005, Nguyen *et al*, en Viet-nam (63), también reporta una elevada resistencia (86,4%) a la ampicilina en aislamientos de *E. coli* de niños con diarreas en Vietnam.

En la actualidad se ha constatado una disminución considerable del uso de la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol, primero por el vertiginoso aumento de resistencia en décadas anteriores y por el advenimiento de nuevos antimicrobianos más eficaces para la resolución de procesos infecciosos. Esto ha facilitado la disminución significativa del uso y por consiguiente de la presión selectiva que existía globalmente con estos antimicrobianos, trayendo como consecuencia un menor porcentaje de resistencia en trabajos recientes (comunicación personal Dr Adalberto Aguila. Instituto Pedro Kourí, mayo 2014)

En el estudio actual, se reportó un 32,99% de resistencia a la tetraciclina, el que supera al reportado por Bernedo (27.91%) en Cuba, en aislamientos de *E. coli* diarrogénicos (61). La diferencia entre ambos trabajos consiste en que Bernedo lo realiza con 43 aislamientos pertenecientes al patotipo de ECEH y el presente estudio se realizó con 97 aislamientos de *E. coli* entéricas, en donde no se definen los patotipos involucrados. En otro trabajo realizado por Lazo *et al* 2008 en 39 aislamientos de *E. coli* procedentes de cerdos con diarreas se reportó un 84,6% de resistencia a la tetraciclina (64).

Si comparamos nuestro resultado de resistencia a la tetraciclina con el de estos autores nacionales, resulta variable. Sin embargo, habría que tomarse en

consideración que los aislamientos de *E. coli* de ambos estudios proceden de fuentes diferentes. Es posible que estemos ante la evidencia de un fenómeno que consiste en la transferencia de mecanismos de resistencia desde las bacterias de la flora microbiana de animales, los que constituyen alimentos básicos en la dieta de los humanos, que por el mecanismo genético de conjugación transfieren dicha resistencia a los microorganismos de la flora normal del hombre sano y de los pacientes con procesos infecciosos, como lo reporta Seiffert *et al* (65), lo que genera bacterias resistentes a este y otros antimicrobianos.

En el escenario internacional, también se reporta el incremento de la resistencia de los aislamientos de *E. coli* a la tetraciclina. Kang Hy *et al*, 2005 refieren una resistencia del 82,6% y detectan determinados integrones en aislamientos realizados en humanos y animales, en Corea (66). Yang H *et al*, 2004 en China refieren un 98% de resistencia a este antimicrobiano en aislamientos recuperados de pollos y cerdos enfermos, ambos porcentajes son superiores a los obtenidos en nuestro estudio (67)

Tetraciclina no está en la lista de los principales antibióticos utilizados para el tratamiento de las enterocolitis bacterianas, sin embargo, la resistencia observada en nuestro estudio pudiera deberse a que esta droga es de elección en el tratamiento de las infecciones protozoarias intestinales y las principales infecciones de transmisión sexual. La tetraciclina asimismo representa el tratamiento de elección de importantes enfermedades emergentes como leptospirosis y cólera (Aguila, datos no publicados 2013).

Las quinolonas tienen excelente actividad *in vitro* frente a los principales enteropatógenos bacterianos, por lo que inicialmente se supuso que la resistencia a

estas drogas sería extremadamente rara. Sin embargo, se ha producido un incremento notable de bacterias Gramnegativas resistentes a las quinolonas, como consecuencia de la combinación de varios mecanismos de resistencia, entre ellos se destaca las mutaciones cromosómicas en sitios (*gyrA* y *parC*) dianas bacterianas, donde actuaría el antimicrobiano, ejerciendo su acción bactericida (68,69).

En nuestro estudio el porcentaje de resistencia para el ácido nalidíxico obtenido en aislamientos de *E. coli* fue de 29,90%, inferior al reportado por Cabrera *et al*, 2007 en Cuba y Srinivasan *et al*, 2007, en la India, con cifras de 84% y 86,1% respectivamente. (70,71)

En el caso de Bernedo, en 2008 obtuvo un 11.6% de resistencia al ácido nalidíxico en la población cubana (61). Se observa claramente que los resultados de nuestro trabajo marcan la tendencia al aumento de la resistencia del citado antimicrobiano en nuestro país, así como también se observa este hecho en otros trabajos realizados en enteropatógenos bacterianos, los que reportan el aumento de la resistencia al ácido nalidíxico.

Un estudio realizado en España en el 2008 con aislamientos de *E. coli*, mostró la tendencia global y progresiva al aumento de la resistencia a ciprofloxacina entre los años 2002-2007; el porcentaje de resistencia según año fue de: 2002 (22.9%), 2003 (21.6%), 2004 (23.7%), 2005 (24.8%), 2006 (30.2%) y 2007 (30.5%) (72). En nuestra investigación se obtuvo un porcentaje de resistencia para ciprofloxacina de 28.87%, inferior al porcentaje del estudio en España en los años 2006 y 2007.

Las quinolonas fluoradas son ampliamente usadas en el tratamiento de infecciones por gérmenes gramnegativos. En Cuba en la actualidad la ciprofloxacina es la

fluoroquinolona que con mayor frecuencia se utiliza en los procesos infecciosos agudos tanto respiratorios como intestinales. (comunicación personal Dr. Adalberto Águila. Instituto Pedro Kourí, mayo 2014)

El incremento del uso terapéutico pudiera estar influyendo en el incremento gradual de aislamientos resistentes a esta familia de medicamentos.

En un estudio realizado por Muñoz et al, 2006, en Instituciones de Salud de Cuba en aislamientos de *E. coli* procedentes de pacientes con sepsis urinaria se obtuvo un 18,5 % de resistencia a la ciprofloxacina (73). Por otra parte Espinosa *et al*, 2006 realizaron una investigación en aislamientos de *E. coli* en el Hospital Hermanos Ameijeiras, obteniendo 71 % de resistencia en los pacientes en sala y un 85% en unidades de cuidados intensivos. Suárez (75), en un estudio realizado con pacientes hospitalizados graves reporta un 39.3 % de resistencia en las cepas de *E. coli* aisladas.

El porcentaje de resistencia a este antimicrobiano en nuestro trabajo es menor a los que reportan Espinosa (74) y Suárez (75), lo que pudiera estar relacionado con el hecho que los aislamientos de *E. coli* entéricos son procedentes principalmente de la comunidad y los aislamientos estudiados por estos autores proceden de infecciones intrahospitalarias, los que siempre han reportado mayores porcentajes de resistencia antimicrobiana.

La resistencia a la ciprofloxacina constituye un alerta para el área clínica y de asistencia porque se trata de un antimicrobiano de muy buen espectro de acción que además puede ser administrado tanto por vía oral como por vía parenteral, según posibilidad y estado del paciente.

El aumento de la resistencia antimicrobiana, entre otras causas puede deberse al uso indiscriminado, la automedicación, el acceso fácil a los antimicrobianos la ausencia de regulaciones nacionales para adquirirlos en los lugares de expendios (farmacias), así como la prescripción por motivos de complacencia (43, 44). También se ha implicado en esta elevada tasa de resistencias, la ingesta de pequeñas dosis de antimicrobianos dentro de la cadena alimentaria por consumo de carne procedente de animales alimentados y/o tratados con mezcla de antimicrobianos.

Teniendo en cuenta la presión selectiva que ejerce el elevado consumo de antimicrobianos en nuestro entorno, es necesario actualizar los datos relativos a los patrones de resistencia bacteriana, ya que éstos pueden variar entre distintas zonas e incluso en una misma área geográfica con el paso del tiempo (45, 46)

Resulta también necesario tomar las medidas necesarias para el control de la resistencia bacteriana, implicando a todos los que hacen uso de los antimicrobianos, incluyendo sobre todo el sector veterinario.

4. 2 Multirresistencia

Desde finales del siglo XX, asistimos a un incremento importante de la resistencia bacteriana a diferentes familias de antimicrobianos utilizados en la práctica clínica. La multirresistencia que inicialmente se observaba en los hospitales, ha traspasado las barreras de los nosocomios y en la actualidad resulta frecuente el aislamiento de estos microorganismos en el ámbito extrahospitalario. En los últimos años, se han producido cambios en la epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos. Por una parte, se produce el tránsito de patógenos hospitalarios a centros socio-sanitarios, lo que convierte a estos centros en reservorio de estos microorganismos.

Por otra parte, han aparecido algunas bacterias multirresistentes de adquisición comunitaria, como *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido. En general, la multirresistencia se debe a la adquisición de varios mecanismos de resistencia, aunque en algunas ocasiones un mismo mecanismo de resistencia puede afectar a antimicrobianos de diferentes familias (resistencia pleiotrópica)

El fenotipo salvaje de *E. coli* presenta elevada sensibilidad a la mayoría de los tratamientos antimicrobianos disponibles, aunque en las dos últimas décadas estamos asistiendo a un aumento de las infecciones producidas por *E. coli* multirresistentes. Esto ha provocado fracasos en los tratamientos empíricos de estas infecciones, por lo que resulta necesario el conocimiento de los datos de la sensibilidad antimicrobiana para poder adecuar los tratamientos.

En el actual estudio se detectaron trece patrones de multirresistencia constituidos desde tres a siete familias de antimicrobianos. Los patrones más frecuentes resultaron el 2, 4, 7, 8 y 9, los que estuvieron conformados por los siguientes antimicrobianos: patrón 2 (CIP-NA, AMP, STX), patrón 4 (AMP, STX, TE), patrón 7 (CIP-NA, AMP, STX, TE, C), patrón 8 (CIP-NA, AMP, STX, TE) y patrón 9 (CIP-NA, AMP, TE) (Tabla 5). Romeu *et al*, 2012, realizó una investigación de la susceptibilidad antimicrobiana en Cuba en 108 aislamientos de *E. coli* de ecosistemas dulceacuícolas, obtiene 9 patrones de multirresistencia con combinaciones de 3, 4, 5 y 7 antimicrobianos (53) En otro estudio también realizado en Cuba por Bernedo, 2008, en 43 aislamientos de *E. coli* en menores de 5 años, reporta 12 patrones de multirresistencia con combinaciones de 3, 4, 5, 6 y 7 antimicrobianos (61).

Tabla 5. Descripción de los patrones de multirresistencia antimicrobiana y su relación con el número de aislamientos. Mayo 2009 – Mayo 2010 .IPK.

Número de patrones de Multirresistencia	Patrones de Multirresistencia antimicrobiana	Cantidad de aislamientos multirresistentes
1	CIP-NA, CRO-CTX, CN, AMP	2
2	CIP-NA, AMP, STX	3
3	CIP-NA, CN, AMP, STX, TE,C	2
4	AMP, STX, TE	3
5	CIP-NA, CRO-CTX, CN, AMP, STX	1
6	CIP-NA, CRO-CTX, CN, AMP, STX, TE, C	1
7	CIP-NA, AMP, STX, TE, C	4
8	CIP-NA, AMP, STX, TE	3
9	CIP-NA, AMP, TE	3
10	CRO-CTX, F, C	1
11	CIP-NA, CRO-CTX, AMP, STX	1
12	CIP-NA, CN, AMP, STX	1
13	CRO-CTX, AMP, STX, TE	1

4.3 Susceptibilidad intermedia

Los porcentajes de susceptibilidad intermedia de los aislamientos de *E. coli* entéricos en el actual trabajo se encuentran por debajo del 20%. La cefotaxima, cefalosporina de tercera generación registró el mayor porcentaje, 18,56%. Esto obliga a realizar un seguimiento de la evolución de la sensibilidad a este antimicrobiano de importancia para el tratamiento de las EDA producidas por enteropatógenos entéricos, en especial las que producen disentería como *Shigella* y *Salmonella* (59,61). El resto de los antimicrobianos probados en nuestra investigación mostraron porcentajes de susceptibilidad intermedia por debajo del

10%. Aunque no se trata de porcentajes elevados, los patrones de sensibilidad a estas drogas también deberán ser objeto de vigilancia sistemática en el futuro.

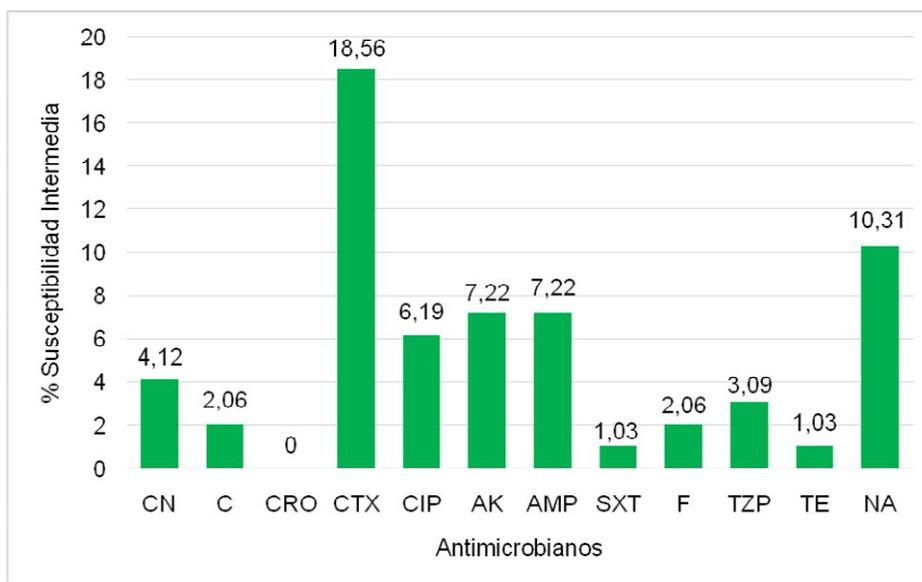


Figura 3. Porcentajes de sensibilidad intermedia en aislamientos de *E. coli* entéricas, frente a 12 antimicrobianos. Mayo 2009 – Mayo 2010. IPK.

4.4 Sensibilidad

En el presente estudio, los aislamientos de *E. coli* entéricos mostraron un 26,80% (25/97) de sensibilidad a los 12 antimicrobianos probados. En un trabajo realizado por González *et al* 2008, en aislamientos de *E. coli* de pacientes hospitalizados con infección urinaria, se obtienen mayores porcentajes de sensibilidad para la amikacina (93,49%) y para la nitrofurantoina (88,60%) (76). En nuestra investigación, los porcentajes de sensibilidad son similares a los obtenidos por González para la amikacina y superiores en el caso de la nitrofurantoina. El resto de los antimicrobianos que se probaron en ambos estudios resultaron más sensibles en la investigación actual que en el estudio realizado por González *et al* 2008. Los porcentajes de sensibilidad obtenidos por los aislamientos de *E. coli* entéricos

procedentes de la comunidad, de forma general son mayores, que aquellos que se obtienen en aislamientos intrahospitalarios, lo que ha sido demostrado en otras investigaciones (76). En un trabajo realizado por Bernedo *et al* 2008 en nuestro país, con aislamientos de niños que presentaban diarreas agudas, se obtienen altos porcentajes de sensibilidad a la gentamicina (97,67%) y a la ciprofloxacina (93,02%) (61). En el actual estudio los aislamientos mostraron porcentajes menores de sensibilidad a estos mismos antimicrobianos. En una investigación desarrollada por Gómez *et al* 2010, en aislamientos de *E. coli* procedentes de niños de la comunidad que presentaban infecciones urinarias, se reporta un 97,2% de sensibilidad a la amikacina, 80,5% a ceftriaxona y para la nitrofurantoina un 75% (76). En la presente investigación, los aislamientos mostraron porcentajes de sensibilidad inferiores a los obtenidos por Gómez *et al* 2010 (77), para la amikacina, pero fueron superiores en el caso de ceftriaxona y nitrofurantoina (Figura 4).

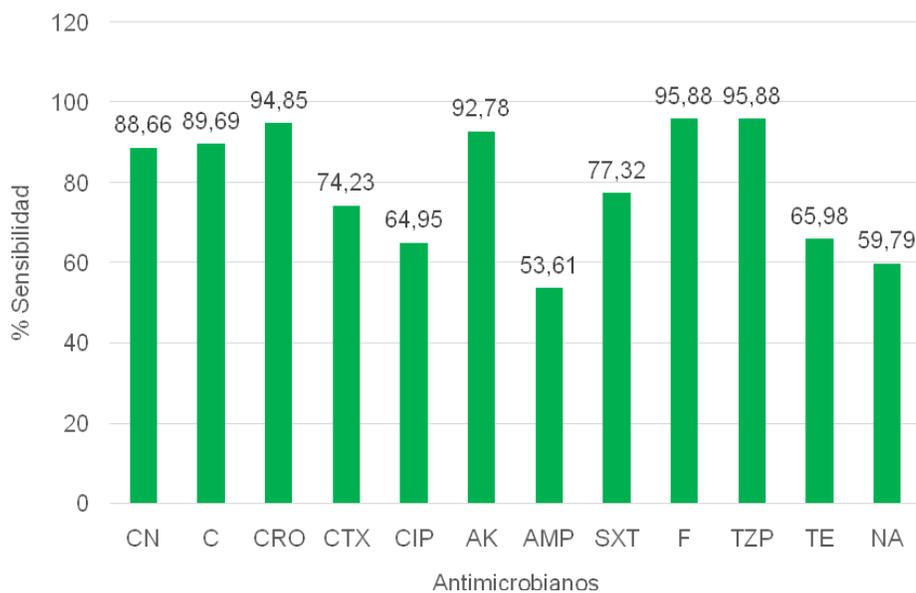


Figura 4. Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli* entéricas frente a los 12 antimicrobianos. Mayo 2009 – Mayo 2010. IPK.

En el actual estudio los aislamientos obtuvieron altos porcentajes de sensibilidad para la piperacilina con tazobactan (TZP) (95,88%) siendo uno de los antimicrobianos que mejores resultados registraron. Esta droga es de amplio espectro y aunque no es utilizada comúnmente para el tratamiento de las enteritis bacterianas, se considera importante conocer el comportamiento de los aislamientos de *E. coli* entéricos, como una alternativa en el tratamiento de los pacientes con estado de salud comprometido, que no resuelvan con los tratamientos convencionales.

5. CONCLUSIONES

1. A pesar de que la mayoría de los aislamientos fueron confirmados como *E. coli*, todavía persisten dificultades en la identificación a nivel de los laboratorios de microbiología de las provincias, siendo necesario perfeccionar el trabajo en estos.
2. *Escherichia coli* entérica mostró una elevada resistencia a los betalactámicos, quinolonas y tetraciclina y una alta sensibilidad a los betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, nitrofurantoina, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos, por lo que constituyen alternativas para el tratamiento de las infecciones por esta enterobacteria.
3. Se observó un incremento de la multirresistencia de los aislamientos de *E. coli* entéricos estudiados, lo que representa una alerta para el sistema nacional de salud.

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* entérica para mantener actualizado al sistema nacional de salud sobre las terapias antimicrobianas más recomendadas en el tratamiento de las infecciones causadas por este enteropatógeno.
2. Realizar estudios moleculares para relacionar los fenotipos resistentes y multirresistentes con los patotipos de *E. coli* entéricas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Corteguera R. Manual de procedimientos para el manejo de las enfermedades diarreicas y el cólera. La Habana: MINSAP; 1994.
2. Corteguera R. Etiología bacteriana y parasitaria de la EDA. Rev. Cubana Pediatría 1992; 51(14-9).
3. Vizcaya DL, Flores CA, Hernández JG, Nieves BB, Pérez SI. Origen bacteriano de la enfermedad diarreica aguda en Mérida, Venezuela. Rev Cubana Med Trop. 1999; 51: 9-14.
4. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico. 2013. MINSAP. 300 pp.
5. Thielman N, Guerrant R. Acute Infectious Diarrhea. New Engl J Med. 2004; 350: 38-47.
6. Fewtrell L, Colford JM. Water, sanitation and hygiene: interventions and diarrhea. A systematic review and meta-analysis. Washington DC: The World Bank; 2004.
7. Medina M, Esquivel P, Lifschitz V, Lösch L, Merino LA. Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. Rev Cubana Med Trop. 2010; 42(7): 121-4.
8. Acar JF. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. Clin. Infect. Dis. 1997; 24: S17-8.
9. Hart CA, Kariuki S. Antimicrobial resistance in developing countries. 1998. WHO Report, 1999. 100 pp.
10. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Vaca-Pacheco S. Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas detectadas en

infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex. Rev Med Hosp Gen Mex. 2007. 70 (4) 158-67.

11. Nodarse HR. Monitoreo de la resistencia bacteriana "In vitro" a los antimicrobianos durante cinco años. Rev. Cub. Med.Milit. 1998. 1998(27) 1, 34-38.

12. Ali MM. Enteraggregative in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. J Infect Dev Ctrs. 2014; 8(5): 589-596.

13. Lederberg J. E coli K-12. Microbiology Today. 2004. 31:116.

14. Neidhardt FC. *Escherichia coli* and Salmonella: cellular and molecular Biology Washington D.C: ASM Press. 1999.

15. Momtaz H, Rahimi E, Moshkelani S. Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. Veterinarian Medicine. 2012; 57(4): 193-197.

16. Drassar BS, Hill MJ. Human intestinal flora Londres: Academic Press Ltd; 1974.

17. Costa AR, Sousa CO, Lima KV, Loureiro EC. Desarrollo de una PCR multiplex para la detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos. Rev. Pan-Amaz Saude. 2010; 1(2): 77-84.

18. Rodriguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica de México. 2002. 2002.44:464-475.

19. Koper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2004 123(40): 199-202.

20. Valdes-Dapena M. Enterobacterias. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo I ed.: Editorial de Ciencias Médicas; 2001.

21. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Review. 1998; 142: 201-210.
22. Kaper JB. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Current Opinion Microbiol. 1998; 103(8): 603-7.
23. Sánchez S, Ropmecin P, Guachilla LM, Iñiguez V. Caracterización genotípica de aislados de *Escherichia coli* de pacientes pediátricos en procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de la Paz. Implicaciones para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas. Rev.Chil Pediatr. 2006. (6) 815-830.
24. Cruz ASD, Neto VF. Influence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* on small bowel bacterial proliferation in infants acute and persistent diarrhea. Rev Assoc Med Bras. 1996. 41 (1) 67-76.
25. Fagundes NM, Scaletsky I, Schmitz LG, Freymuller E. Serotypes of classical enteropathogenic *Escherichia coli* that produce changes in the small bowel ultrastructure and invasion of Hela cells. Rev. Assoc. Med. Bras. 1995; 41(5): 65-8.
26. Natarro JP, Kaper JB, Robins-Brown R, Prado V, Vial P y Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* Hep-2 cells. Pediatr Infect Dis. 1987. 6:829-831.
27. Rodríguez- Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 2002.44:464-475.
28. Tarr PI, Gordon CA y Chandler WI. Shiga –toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome. Lancet. 2005.365: 1073.86

29. Caprioli A, Pezera C, Morelli R, Giammarco A, Arista S, Crotti D, *et al.* Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy study group on gastrointestinal infections. *Pediatric Infect Dis J.* 1996. 15 (4) : 351
30. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 1991. 10: 31-46
31. Dorn RC. *Escherichia coli* O157:H7. *JAMA.* 1995. 273 : 1093-1098.
32. Roldan ML, Chinen I, Otero JI, Miliwebsky ES, Alfaro N, Burns P, *et al.* Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O 157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Rev Argentina Microbiol.* 2007. vol 39 (2): 113-119
33. Treviño A, Mata V, Espinoza A, Martínez I, Morales A, Alvarez G, *et al.* Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne fresca de res mediante PCR múltiple. *Revista de Salud Pública y Nutrición.* 2009; 10(2). 78-80.
34. Beneson A. El Control de enfermedades transmisibles en el hombre Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1992. 200 pp.
35. Sande M, Mandell GL. Quimioterapia de las enfermedades: agentes antimicrobianos. Las bases farmacológicas de la terapéutica. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1982. p1062-1165.
36. Jawetz E. Quimioterapia antimicrobiana. In *Manual de microbiología médica.* 9ed. Mexico DF: El Manual Moderno. 145 pp.

37. Calderwood S, D. JM. Principios de tratamiento antiinfeccioso: Editorial Científico-Técnica; 1988. 200 pp.
38. Hart CA. La resistencia a los antibióticos. ¿un problema creciente? In.: Ed Latinoam; 1998. 48 pp.
39. Courvalin AJ. El final de la edad de oro de los antibiótico. Ther Nat. 1988; 314(3): 6-10.
40. Ashkenzi S. Antibiotic treatment of bacterial gastroenteritis. J. Pediatr Infect Dis. 1991. 10 : 140-148.
41. Furuya Y, Lowi DF. Antimicrobial –resistant bacteria in the community setting. Nature. 2006; 37: 45-48.
42. Vila J, Vargas M. Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. 1999: 4: 3022-3024.
43. Llop A. Enterobacterias. Microbiología y Parasitología Médicas: Editorial de Ciencias Médicas; 2001.
44. Martinez RE, Villalobos LB. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de alimentos y aguas residuales en Cumaná, Venezuela. In.: Universidad de Oriente 2008; 6: 172-176.
45. Rodas C, Halversen K, Iñiguez V. Multirresistencia antimicrobiana asociada a integrones en enteropatógenos de la diarrea infantil y *Escherichia coli* de la flora normal en niños menores de 5 años en la ciudad de La Paz. Cuaderno del Hospital de Clínicas. 2005; 50(2): 58-9.

46. Merino L, Hreňuk G. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella spp* en el nordeste argentino. Rev Panam Salud Pública. 2004; 15(4): 44-48.
47. Cabrera L, Díaz L, Fernández T, Bravo L. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos bacterianos causantes de infecciones comunitarias. Rev Cubana Med Gen Integr. 2007; 23(1): 29-32.
48. Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. Health and economic impacts of. Rev Infect Dis. 1987;(9): 19-22.
49. Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance. In GL M, JE B, R D, eds. Principles and practice of infectious. Nueva York: Churchill Livingstone; 1995. p. 212-224.
50. Lupski JR. Molecular mechanisms for transposition of drug-resistance genes. Rev Infect Dis. 1987. Mar-Apr ;9(2):357-68
51. Alzahrani AM, Gherbawy YA, Sawant A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli*. African J Microbiol. 2011; 5(2): 77-9.
52. Turner R, Solberg O, Lee B, Raphael E, DebRoy C, Riley L. Global Spread of Mobile Antimicrobial Drug Resistance Determinants in Human and Animal. Clin Infect Dis. 2006; 49(7): 178-180.
53. Romeu BÁ. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas Aspirante. Universidad de La Habana, 2012.

54. Aulavirtual.usal.es. [Online]. Available from: HYPERLINK "http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/LabV/API/ap" <http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/LabV/API/ap> . Acceso 17 mayo 2014.
55. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 29-37.
56. Peterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2005; 18: 709-712.
57. Paterson DL, Huger KM, Huger AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHE- and CTX- Mtype beta-lactamases. Antimicrob Ag Chemother. 2003; 47: 3554-60.
58. Martínez-Martínez L. Association of ESBL with other resistance mechanisms. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 15(2): 901-906.
59. Águila A, Bernedo R, Llop A, Ramírez M, Bravo L, Fernández A, *et al.* Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas. Rev Cubana Med Trop. 2007; 59(2)
60. Clinical and Laboratory Standard International. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance for Antimicrobial Testing. CLSI: 2013.
61. Bernedo R. Patrones de resistencia antimicrobiana y confirmación molecular de cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica de interés clínico en Cuba. Trabajo para optar por el título de Master en Bacteriología-Micología. La Habana: Instituto Pedro Kourí; 2008.

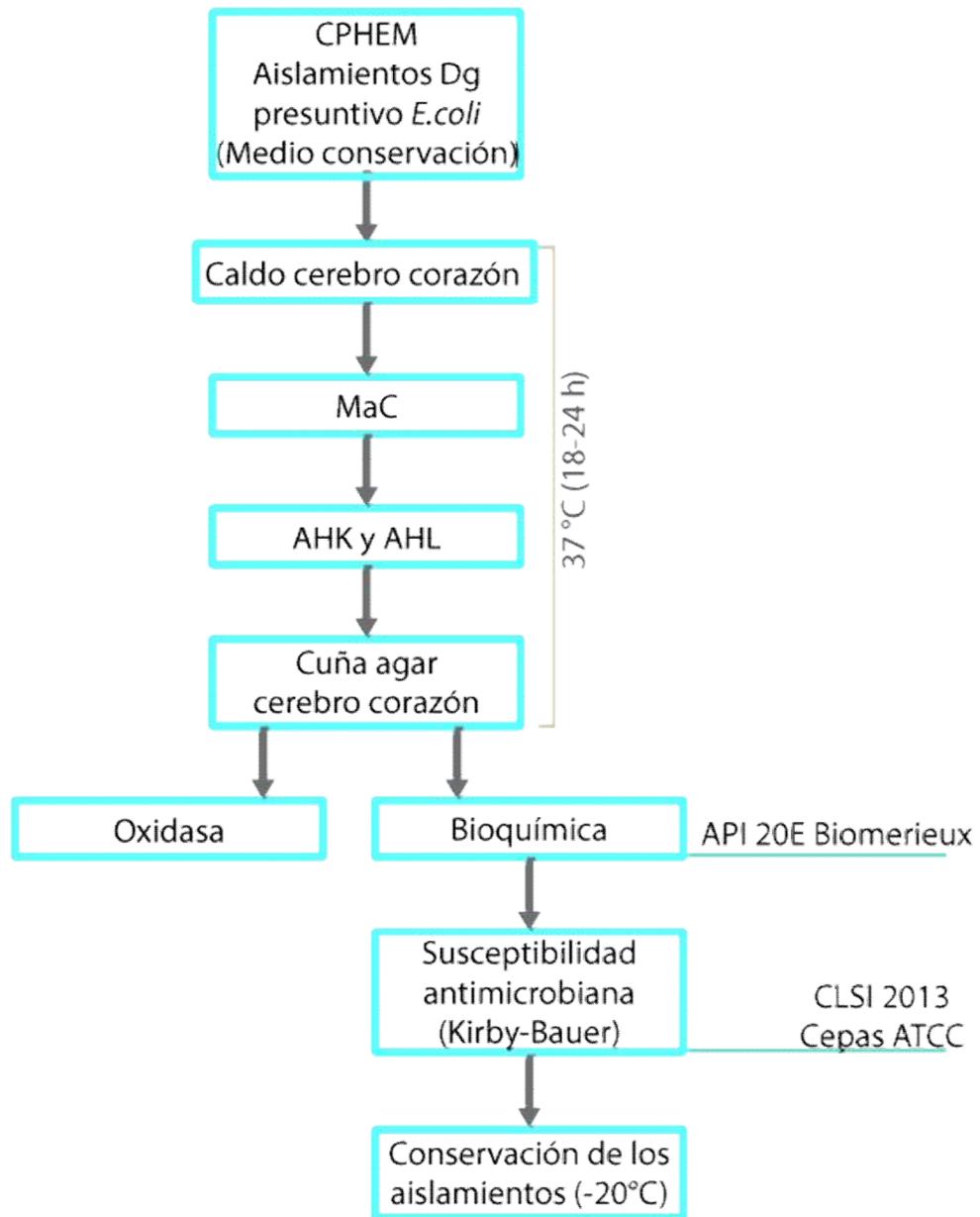
62. Aibinu I, Adenipekun E, Odugbemi O. Emergence of quinolone resistance amongst *Escherichia coli* strains isolated from clinical infections in some Lagos state hospitals, Nigeria. *Nig J Health Biomed Sc.* 2004.
63. Nguyen TV, Le PV, Le CH, Weintraub A. Antibiotic Resistance in Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella Strains* Isolated from children in Hanoi, Viet-nam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49 (2): 816-9.
64. Lazo L. Comportamiento epidemiológico de la colibacilosis entérica porcina en la provincia de Villa Clara, patotipos, genes de virulencia y resistencia a antibióticos en los aislados de *Escherichia coli*. *Rev. Salud Anim. Vol. 30 No. 3 (2008): 195*
65. Seiffert SN, Hilty M, Perretenb V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates.* 2013; 16
66. Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. (2005): Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Jornal Antimicrob Chemother* Vol. 55 (5):639-44.
67. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDenmolt P, Walter R, Meng J. (2004): Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* isolates from Diseased Chickens and Swine in China. *J Clin Microbiol.* Vol. 42 (8):3483-3489.
68. Prats G, Mirelis B, Llovet T, Munoz C, Miro E, Navarro F. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44. 198-203.

69. Phavichitr N, Catto-Smith A. Acute gastroenteritis in children: what role for antibacterials? *Paediatric Drugs*. 2003; 5 (5) 279-290.
70. Cabrera L, Díaz L, Fernández L, González O, Carrasco M, Bravo L. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos bacterianos causantes de infecciones comunitarias. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2007 (23) 1.
71. Srinivasan V, Nguyen LT, Headrick SI, Murinda SE, Oliver SP. Antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin –producing *Escherichia coli* O157: H7 and O157: H7- from different origins. *Microb Drug Resist* Spring. 2007. 13 (1): 44-51
72. Sánchez Jm, Maquieira C, Foz C, Mecahno RL, Pérez M, Raya C, García. Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Urología General*. Arch. Esp. Urol. 2008 (61), 7 (776:80)
73. Muiños JC, Torres E, Caravia E, Pubillones I, Brito I. Resistencia a antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario inferior adquiridas en la comunidad: diferencias en relación con la edad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2008, Vol. 39, No. 3.
74. Espinosa F, Hart H, Martínez ML, Halley MC, Martínez A. Utilización del recurso microbiológico en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Hermanos Ameijeiras. Agosto 2001/ agosto 2002. *Rev Latinoam de Microb*. 2002, 44 (4) : 3-4.
75. Suarez B. Detección de fenotipos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* multidrogaresistente. Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología. IPK, La Habana, 2011

76. Gonzáles D, Solórzano J, Fortunato J, Tapia E, Samalvides. Sensibilidad antibiótica de bacterias causantes de infecciones del tracto urinario en un hospital general. Enero – junio 2008. *Rev Med Hered* 20 (1), 2009 11
77. Gómez U, Reyes U, Reyes D, Hernández P, López-Cruz, G, Castell-Roldán E, Reyes K, Cruz L, Vásquez I. Sensibilidad Antimicrobiana de *E. coli* en Niños con Infección de Vías Urinarias en una Clínica Privada. Primer Período 2010. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son* 2012; 29(1): 24-28
78. Mendoza G. J. L. Implementación de dos PCR multiplex para la confirmación de patotipos de *E. coli* entéricas. Trabajo para optar por el título de Licenciado en Microbiología. La Habana: Instituto Pedro Kourí. 2012

ANEXOS

Anexo 1. Flujograma de Trabajo.



Anexo 2. Medio de conservación (Milieux et Reactifs de Laboratoire Pasteur, 1978).

Composición	g/l
Extracto de carne	5
Peptona	10
NaCl	5
Agar	10
pH	7,4 – 7,5

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada, ajustar pH, calentar hasta su total disolución, distribuir 4ml en tubos de 13x100, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de AHK de 24 horas inocular con el asa puncionando varias veces hasta el fondo.

Anexo 3. Pruebas API-20E

Procedimiento: A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 mL de agua estéril. Llenar la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias. Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H₂S para obtener anaerobiosis.

Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente poner agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.

Incubar a 37 °C durante 18-24 h.

Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados.

Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

Si la glucosa da negativo y los tests positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos. Cuando esto ocurre se hacen otros tipos de API como el API 20NE, API OF, el API M o el API 10S para ver determinados metabolismos especiales.

- Si la glucosa es positiva y/o tres o más tests son positivos se revelan los test que requieren reactivos:

TDA: Añadir una gota de FeCl₃ 10 %.

V: Añadir una gota del reactivo 1 (KOH al 40%) y una gota del reactivo 2 (C₂ H₅ OH).

IND: Añadir una gota de reactivo de Kovacs o de Dimetilamino-cinamaldehido.

Oxidasa: Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

La identificación se realiza a partir de la base (V 4.1)

- **Con la ayuda del Catálogo Analítico:**
 - **Localizar el perfil numérico en la lista de los perfiles.**
- **Con la ayuda del software de identificación apiweb™:**
 - **Introducir manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras.**