

DETECCIÓN DE GENES BLA EN AISLADOS CLÍNICOS DE ESCHERICHIA COLI RELACIONADOS A INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD PROVENIENTES DEL HOSPITAL NACIONAL ZACAMIL DE EL SALVADOR

Réne Santos Herrera

Facultad de Medicina

CONTENIDO	
<p>Introducción</p> <p>Capítulo I. Planteamiento del problema</p> <p>Capítulo II. Fundamentación teórica</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Escherichia coli B. Infecciones asociadas a la atención en salud C. Producción de BLEE como factor de resistencia D. Determinación de BLEE E. Detección de genes bla F. Relevancia de BLEE en atención de infecciones <p>Capítulo III. Metodología de la investigación</p>	<p>Capítulo IV. Análisis de la información</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Resultados B. Análisis <p>Capítulo V. Conclusiones</p> <p>Recomendaciones</p> <p>Referencias bibliográficas</p>

INTRODUCCIÓN

Cada vez aparecen más frecuentemente reportes de microorganismos multiresistentes a nivel mundial, convirtiéndose un problema de salud pública de prioridad en muchos países que destinan muchos recursos para la investigación y prevención de la resistencia bacteriana. Sin embargo, a pesar que las nuevas herramientas tecnológicas permiten identificar eficazmente este problema, en El Salvador es un fenómeno poco estudiado.

El fenómeno de resistencia bacteriana es particularmente importante en infecciones intrahospitalarias asociadas a bacterias Gram negativas, donde las opciones terapéuticas cada vez son menores debido a la escasez de nuevos medicamentos para este tipo de bacterias. La producción de enzimas inactivantes es uno de los mecanismos más importantes de resistencia, siendo las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), las de mayor relevancia por el amplio perfil de resistencia que exhiben y por su amplia diseminación mundial debido a la capacidad de muchas especies bacterianas de transportar genes de BLEE a través de elementos transponibles. Por lo tanto, conocer el perfil de resistencia asociado a la producción de BLEE en la población microbiana de cada establecimiento permite a los médicos clínicos diseñar protocolos de atención adecuados que reduzcan la morbilidad y mortalidad asociadas, a la vez que disminuye el riesgo de selección de cepas multiresistentes.

Ante esto se plantea el objetivo de determinar la presencia de genes *bla* en aislados clínicos de *Escherichia coli*, de pacientes con infecciones de origen nosocomial provenientes del Hospital Nacional Zacamil, correlacionándolo con el perfil de resistencia a los antimicrobianos utilizados en la atención de estas infecciones. Para esto se estudiaron aislados consecutivos de *Escherichia coli* de muestras clínicas de pacientes del Hospital Nacional Zacamil, durante el periodo de enero a mayo del 2015. Determinando su perfil de resistencia a través de sistema automatizado y producción de BLEE por método de sinergia de doble disco. También se realizó detección de genes *bla* tipo TEM, SHV, CTX-M1/2 y AmpC mediante técnica molecular de PCR de punto final. Encontrándose cepas bacterianas con diferente grado de resistencia a los distintos antibióticos, evidenciando la producción de BLEE en el 80% de los aislados estudiados, verificando la presencia de genes *bla* tipo TEM en el 36.66% de las muestras estudiadas.

Se espera que este estudio posibilite una ruta de investigación innovadora en El Salvador en cuanto al tema de resistencia bacteriana, en donde se complemente los esfuerzos actuales en la investigación del fenómeno desde una perspectiva fenotípica, con herramientas moleculares que permitan una mejor y más amplia comprensión del problema.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

Con la explosión comercial de los antibióticos a mediados del siglo pasado, propiciado por su éxito inicial en el control de las infecciones, también aparecieron los primeros reportes de microorganismos resistentes a los antibióticos que se mostraban como la panacea del siglo en el tratamiento de las infecciones bacterianas.

En algunos casos los primeros reportes de resistencia surgieron casi inmediatamente a los reportes de éxitos en la utilización de los nuevos antibióticos. El éxito reportado derivó en algunos casos en uso injustificado para patologías que no requerían de tratamiento antibiótico. El uso indiscriminado a la par de la comercialización sin restricción en algunos países como El Salvador ha agravado el problema de resistencia bacteriana, en donde hasta hace poco, se podía adquirir cualquier medicamento de este tipo sin receta médica. Estas condiciones son favorables para el surgimiento y diseminación de la resistencia bacteriana. Un fenómeno poco estudiado en El Salvador.

Los medicamentos betalactámicos se encuentran entre los más utilizados para el tratamiento de infecciones provocadas por una gran variedad de microorganismos, debido a su amplio espectro de acción. Estos medicamentos están conformados en su estructura química por el anillo betalactámico, siendo los más abundantes y los más utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas, producidas tanto por bacterias Gram positivas como negativas.

Su amplia variedad de preparados comerciales, la disponibilidad de presentaciones de uso oral, su relativo bajo costo y su amplio espectro de acción propician su uso frecuente no solo por médicos sino por la población en general que no ve restricciones a su compra sin receta médica, cuando estos son de presentación oral.

Las bacterias exhiben diversos mecanismos de resistencia a estos medicamentos, que pueden ser: la producción de enzimas inactivantes, bombas de expulsión, mutaciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y la impermeabilidad de la bacteria al antibiótico (Barcelona 2008). Y es uno de los más frecuentes la producción de enzimas inactivantes de tipo Betalactamasa. (Blair, Weeber, Baylay et al 2014)

Estas enzimas junto con las PBP conforman una familia de enzimas que poseen un sitio activo capaz de interactuar con los antibióticos Betalactámicos, produciendo hidrólisis, lo que lleva a la inactivación del compuesto. (Barcelona 2008)

Shah y Brunn-Buisson fueron los primeros en describir Betalactamasas de transmisión plasmidial en Europa a principios de 1980, con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, apenas dos años después de la introducción de estos medicamentos (García Hernández, 2011). Estas enzimas se denominaron Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) que, desde esa fecha, se han reportado en casi todo el mundo. Actualmente se conocen más de trescientos tipos diferentes de BLEE.

La presencia de infecciones asociadas a microorganismos multiresistentes, representa una verdadera emergencia en salud pública, ya que la mortalidad asociada así como el alto costo de atención para los pacientes que las padecen impacta significativamente en la economía de los establecimientos que atienden estas infecciones. En el caso de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE, aproximadamente el costo de atención aumenta 1.7 veces más. (Cisneros y Cordero, 2007, Rodríguez Baño *et al*, 2010)

A este problema se suma la posibilidad de seleccionar cepas multiresistentes por la utilización fármacos tipo quinolonas, que estimulan la selección de cepas productoras de BLEE, lo que aumenta significativamente la mortalidad. (Paterson *et al*, 2000; Casellas, 2011)

En todo el mundo se generan diariamente reportes de establecimientos que identifican microorganismos productores de BLEE, lo que les permite a los clínicos de dicho establecimiento comprender mejor la ecología bacteriana y diseñar protocolos adecuados para cada establecimiento. (García, Astocondor y Banda, 2012)

Cepas de bacterias productoras de BLEE pueden presentarse como susceptibles, apareciendo la resistencia al antibiótico durante el curso del tratamiento. Además de la resistencia mostrada a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, penicilinas de amplio espectro y aztreonam, estas bacterias productoras de BLEE también presentan genes de resistencia a otros antibióticos, fenómeno conocido como reacción cruzada, (Oteo, 2002; Oteo, Pérez y Campo 2010; García Hernández *et al*, 2013; Blair, Weeber, Baylay *et al* 2014) de esta manera al ejercer presión selectiva sobre estas cepas productoras de BLEE utilizando antibióticos betalactámicos, también se seleccionan cepas resistentes a otros antibióticos, lo que disminuye aún más las opciones terapéuticas.

A pesar de estos reportes, en El Salvador no existe ningún estudio que caracterice los microorganismos resistentes de acuerdo al tipo de BLEE que producen, y menos su riesgo potencial de acuerdo a su contenido genético.

La utilización de herramientas moleculares como la reacción en cadena de las polimerasas, permitirá una mejor comprensión del fenómeno de resistencia bacteriana para cada establecimiento, lo que le proporciona al clínico mayores y mejores elementos de análisis para la decisión sobre el protocolo de antibióticos a utilizar, que le permita reducir las complicaciones asociadas a infecciones multiresistentes, reducir la mortalidad y reducir la diseminación de genes de resistencia.

Ante esto, se plantea el siguiente problema de investigación:

¿Existen cepas de *Escherichia coli* que posean genes *bla*, provenientes de infecciones de origen intrahospitalario obtenidas de pacientes del Hospital Nacional Zacamil?

B. HIPÓTESIS

En este contexto se plantea la siguiente hipótesis:

¿Existen cepas de *Escherichia coli* que poseen genes *bla*, provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud obtenidas de pacientes del hospital nacional Zacamil?

C. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de genes *bla* en aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud, obtenidas de pacientes del Hospital Nacional Zacamil de El Salvador.

Objetivos específicos

- Aislar *Escherichia coli* a partir de muestras clínicas de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud, provenientes del hospital nacional Zacamil.
- Determinar el perfil de resistencia a diferentes antibióticos en las cepas de *Escherichia coli* aislada.

- Determinar *in vitro* la producción de BLEE en las cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud.
- Verificar la presencia de genes para la producción de BLEE tipo TEM, SHV, CTX-M_{1/2} y AmpC en las cepas de *Escherichia coli*.
- Relacionar la presencia de genes *bla* en la producción de BLEE por parte de las cepas de *Escherichia coli* estudiadas.

D. JUSTIFICACIÓN

El fenómeno de resistencia bacteriana es un problema prioritario a nivel mundial, con repercusiones severas que disminuyen la esperanza de vida de quienes padecen infecciones por microorganismos resistentes. La Organización Mundial de la Salud plantea como prioridad el estudio científico en este tema que permita encontrar estrategias adecuadas para reducir la diseminación de los factores de resistencia, ya que de no controlar este problema se estima que para el 2050 morirán aproximadamente 10 millones de personas anualmente a nivel mundial, producto de infecciones por microorganismos panresistentes, según una simulación realizada por el grupo RAND Europa este año.

Caracterizar los microorganismos y el fenómeno de resistencia antimicrobiana es fundamental para una adecuada comprensión del problema. El conocimiento de las características microbiológicas asociadas a los principales microorganismos circulantes en cada establecimiento asociados a resistencia bacteriana, permitirá a los médicos tratantes, diseñar mejores estrategias de control y prevención de la resistencia, reduciendo la diseminación de genes de resistencia intra e inter especies.

En este sentido, promover la investigación científica que permita identificar las características de los microorganismos asociados a cada establecimiento, contribuye a mejorar el conocimiento acerca del fenómeno de resistencia, combinar herramientas de laboratorio para la caracterización tanto fenotípica como genotípica del fenómeno de resistencia contribuye a mejorar el conocimiento existente de la microbiota asociada a este problema. De esta manera el medico podrá diseñar y adecuar medidas de control y prevención eficaces que disminuyan el riesgo asociado a la resistencia bacteriana, ya que dispondrá de mayores elementos para un mejor análisis del problema.

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La resistencia bacteriana a los antibióticos no es un tema nuevo, desde que se inició el uso masivo de antimicrobianos, los microorganismos tratados con estos fármacos comenzaron a exhibir mecanismos de resistencia que les permitía sobrevivir a estos tratamientos. Al principio de forma aislada surgieron reportes de resistencia bacteriana, en la actualidad a nivel mundial surgen múltiples informes acerca de la resistencia y el problema de salud pública que representa.

Cada vez hay menos opciones terapéuticas para microorganismos multiresistentes, y, últimamente, panresistentes, aislados bacterianos resistentes a todos los medicamentos conocidos, incluyendo carbapenemasas y colistin, una de las últimas opciones terapéuticas para bacterias Gram negativas multiresistentes en las cuales no quedan tratamientos convencionales eficaces. (Vásquez *et al*, 2016; Humera Javed *et al*, 2016; Jayol *et al*, 2014)

Si a esto agregamos que la resistencia bacteriana se ve favorecida por el uso inadecuado de medicamentos antibióticos, no solo en terapia clínica (humana y veterinaria), sino también en la industria alimenticia y la agricultura, el problema se agrava. Esto último ha llevado a la selección de cepas multiresistentes ocasionada por el uso de fármacos antibióticos de uso indiscriminado para mejorar la producción agrícola y la conservación de alimentos perecederos. (Kebede *et al*, 2016)

Existe, entonces, la necesidad de reducir el impacto que la resistencia bacteriana pueda tener en la atención médica. Mejorando el control y disminuyendo la diseminación de cepas multiresistentes a través de la transferencia genética de factores de resistencia bacteriana.

El fenómeno de resistencia bacteriana puede estar mediada por diferentes mecanismos, las bacterias multiresistentes pueden presentar uno o todos los mecanismos asociados a resistencia. Las Enterobacterias presentan los siguientes mecanismos de resistencia: alteraciones de la permeabilidad, enzimas inactivantes, modificación del sitio blanco del antibiótico y bombas de expulsión. (Casellas, 2011)

De estos la producción de enzimas tipo Betalactamasas es el más importante en clínica, debido a la frecuencia con la que se presenta y al amplio perfil de medicamentos que pueden afectar, volviéndose un problema prioritario de investigación en salud pública. Sobre todo, para la elección de tratamientos adecuados ante las infecciones por microorganismos Gram negativos.

Las Enterobacterias son agentes causales frecuentes de enfermedad, relacionados a infecciones diversas tanto de origen comunitario como nosocomial. Algunos

como *Escherichia coli*, presente en la microbiota normal de múltiples especies de animales, incluyendo el humano, puede encontrarse ocasionando infecciones tanto intestinales como extraintestinales, siendo el principal agente causal de ITU (Flores *et al*, 2008; Jafari, Aslani y Bouzari, 2012). Cuando las infecciones son de origen nosocomial, la morbilidad y mortalidad se ven aumentadas. (Flores *et al*, 2008)

Escherichia coli

Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae, grupo heterogéneo bastante amplio cuyo habitan natural es el intestino del ser humano y de los animales. Son bacilos Gram negativos, anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de carbohidratos, producen gas, reacción negativa a la oxidasa y positiva a la catalasa. Pueden ser móviles a través de flagelos y producen diversas toxinas. Tienen un contenido de DNA de G + C de 39 a 59%.

Comprenden aproximadamente 50 géneros bacterianos, sin embargo, solo unas 25 especies resultan de importancia clínica para el humano. *Escherichia coli* puede identificarse rápidamente por producir hemólisis en Agar Sangre, produce colonias iridiscentes en agar EMB. (Microbiología Médica de Jawetz 25ª edic.)

Posee frecuentemente Pili tipo 1 en su superficie como mecanismo de virulencia que facilita la fijación bacteriana a las superficies epiteliales, adhiriéndose a los residuos de D-manosa de las células endoteliales, promoviendo la adherencia a una gran variedad de células. E. coli puede producir muchos tipos de toxinas como citotoxinas formadoras de poros, toxinas inhibitoras de la síntesis de proteínas y otras. La diarrea es la manifestación universal producida por cepas patógenas de E. coli como la enterotoxigenas (ECET), enterohemorrágica (ECEH), enteroinvasiva (ECEI) y enteropatogenas (ECEP). Además, se presentan frecuentemente infecciones del tracto urinario como agentes oportunistas, siendo el principal agente bacteriano asociado a infecciones urinarias de origen comunitario. (Microbiología Medica de Sherris. 4ª edic)

En la actualidad se reconoce el importante papel de este microorganismo como agente causal de infecciones asociadas a la atención en salud, en donde se relacionan con niveles de resistencia variable pudiendo presentarse como infecciones por microorganismos multiresistentes.

Los mecanismos de resistencia por los cuales las bacterias pueden sobrevivir a los antibióticos pueden ser transmitidos de una especie a otra bacteriana a través de elementos genéticos móviles. El ambiente intestinal puede convertirse en el nicho adecuado para la transmisión de estos mecanismos. Dentro de la gran variedad de bacterias intestinales, *Escherichia coli* es la más abundante tanto para animales como humanos sanos, ejerciendo un papel importante en la patogenia sobre todo de infecciones del tracto urinario, sepsis e infección de heridas operatorias por contaminación. La presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos puede generar la diseminación de cepas multiresistentes en el intestino, favoreciendo la transmisión de genes de resistencia entre especies bacterianas. Más aun la utilización de medicamentos en la industria alimenticia y en veterinaria puede fomentar la selección de cepas resistentes que transfieran genes de resistencia con bacterias susceptibles intestinales aun sin haber sido estas últimas expuestas al medicamento. (Bryce *et al*, 2016)

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS)

Las IAAS, o infecciones nosocomiales o intrahospitalarias como se conocían anteriormente se definen como una infección localizada o sistémica que se desencadena a partir de una reacción adversa a la presencia de uno o varios agentes infecciosos o sus toxinas, sin que haya evidencia de su presencia previa a la admisión en el centro de atención en salud respectivo. Se considera una IAAS si se manifiesta la infección al menos 48 horas después de la admisión al centro de atención. (Unahalekhaha, 2013)

Existen cuatro tipos principales de IAAS asociados a procedimientos invasivos o quirúrgicos, siendo la más frecuente la infección de tracto urinario asociado al uso de catéter (ITU-CA), como principal factor de riesgo para el desarrollo de ITU. Las ITU intrahospitalarias representan aproximadamente el 35% de las IAAS. (Garay *et al*, 2010)

Las infecciones en la atención sanitaria son aquellas contraídas durante la hospitalización o en otro servicio de asistencia, y que se desarrolla en un paciente después de 72 horas de atención, dependiendo del período de incubación del agente infectante, y que no estuviese presente o incubándose al momento de la admisión del paciente o una infección adquirida durante una hospitalización anterior que aparece dentro de 72 horas que el enfermo fue dado de alta según los Lineamientos para el control de Infecciones en la Atención Sanitaria. (MINSAL 2010)

Esta normativa técnica para la vigilancia y el monitoreo de las IAAS establece que dicha vigilancia debe ser un proceso de carácter permanente, y en coordinación con el Comité Farmaco-Terapéutico de cada establecimiento, con el objetivo de mejorar el uso de antibióticos y reducir gastos. Ante esto, la identificación de cepas de *Escherichia coli*, provenientes de pacientes con IAAS, y en la cual se pueda establecer el riesgo de multirresistencias a través de la expresión de BLEE, es prioritario para mejorar el uso de los antimicrobianos en los diferentes establecimientos de salud.

Producción de BLEE como factor de resistencia antimicrobiana

La resistencia a un antimicrobiano se define como la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de ese medicamento a dosis terapéuticas. (Rubio, Gil y Gómez, 2006)

En general, se conocen tres mecanismos moleculares de resistencia bacteriana a los antibióticos: reducción de la entrada del medicamento a la bacteria, modificación del sitio blanco e inactivación del medicamento. (Cag *et al*, 2016)

Dentro de estos mecanismos, uno de los más frecuentemente estudiados es la producción de enzimas inactivantes, siendo las Betalactamasas las más importantes en cuanto al impacto negativo en la salud pública alrededor del mundo. El uso extensivo de antibióticos genera presión selectiva sobre microorganismos especialmente Gram negativos, los cuales pueden llegar a producir varios tipos de Betalactamasas simultáneamente, confiriéndole resistencia a varias categorías de antimicrobianos. En la actualidad se conocen más de 300 tipos diferentes de Betalactamasas. (Rubtsova *et al*, 2010; García *et al*, 2011; Cag *et al*, 2016)

Las Betalactamasas se clasifican a partir de su función (Bush y Jacoby, 2010) y con base en su secuencia aminoacídica o clasificación molecular, esta última las ordena en 4 grupos: A, B, C y D. (Ambler, 1980)

Las Betalactamasas de espectro extendido se ubican dentro de la clasificación de Bush y Jacoby en las categorías 2be, 2ber, 2de y 2der, debido a que es una de sus características más importantes desde el punto de vista epidemiológico, su capacidad de transferirse a través de bacterias de la misma o de diferente especie, por medio de elementos genéticos móviles, lo que favorece la diseminación de la resistencia bacteriana. (Bello. 2005; Paterson, 2006)

Betalactamasa tipo TEM

Fueron identificadas por primera vez en 1963, en Grecia, en un plásmido de una cepa de *E. coli* obtenida de una niña de nombre Temoniera, por lo que se les denomina como TEM. Pertenecen al grupo 2b de Betalactamasas. En la actualidad se reconocen alrededor de 200 enzimas distintas de este tipo, algunas de ellas reconocidas como de amplio espectro. Poseen una mayor afinidad por CAZ que por CTX, lo que se evidencia, claramente, por los niveles de resistencia de estos antibióticos (Queenan et al, 2004). Esta enzima se encuentra frecuentemente en cepas de *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos.

Betalactamasas tipo SHV

La primera BLEE descrita de esta familia fue aislada en 1983, a partir de una cepa de *K. pneumoniae*. A partir de esta, por mutaciones puntuales se han generado más de 140 enzimas distintas, agrupándose en los grupos 2b y 2be.

Al igual que las BLEE tipo TEM, poseen mayor afinidad por CAZ que por CTX, lo cual se puede evidenciar por los niveles de resistencia que les confieren a los microorganismos que las poseen. (Nuesch et al., 1995)

Actualmente, las enzimas SHV-5 y SHV-12, son las enzimas más detectadas en el mundo, donde las enzimas del tipo SHV se detectan en más del 80 % de las cepas productoras de Betalactamasas de espectro extendido.

Betalactamasas tipo AmpC

Las AmpC son serin-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 según la clasificación de Bush-Jacoby. Ciertas enterobacterias poseen de manera natural betalactamasas tipo AmpC, por ejemplo: *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*. Las cuales producen AmpC de naturaleza cromosomal inducible. *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Acinetobacter baumannii*, también poseen betalactamasas AmpC cromosómicas pero constitutivas (no inducibles). Por otra parte, existen AmpC de codificación plasmídica que pueden ser inducibles o no. Esta enzima se ha asociado a otros factores de resistencia como es la pérdida de porinas, lo que las vuelve un factor de importancia epidemiológica en la comprensión de la resistencia bacteriana. (Rojas, 2009)

Betalactamasas tipo CTX-M

Esta familia de enzimas fue aislada por primera vez en 1989, en Alemania. Poseen actividad intrínseca de cefotaximasas, privilegiando CTX y CRO sobre CAZ, que en general tienen una baja actividad. (Bonnet et al, 2000)

Su actividad como BLEE es intrínseca a ellas y no originada por mutaciones como es el caso de las BLEE de las familias TEM y SHV; por lo tanto, todas las enzimas de esta familia son BLEE. (Rubtsova et al. 2011)

A pesar de que los reportes de estas enzimas son recientes, respecto al tipo TEM y SHV, las BLEE del tipo CTX-M han ido cobrando gran importancia a nivel mundial por su rápida diseminación donde los distintos tipos de CTX-M han ido prevaleciendo frente a otras BLEE.

Determinación de BLEE

Dentro de los múltiples mecanismos de resistencia que las Enterobacterias pueden exhibir, la producción de enzimas inactivantes tipo betalactamasas es el más frecuente. Estas enzimas actúan sobre medicamentos de tipo betalactámicos, hidrolizando el enlace amida del anillo betalactámico inactivando estos medicamentos. En la actualidad se conocen más de 300 tipos diferentes.

La mayoría han evolucionado como resultado de mutaciones, sin embargo, existe un grupo de betalactamasas de transmisión plasmidial que poseen un mayor espectro de acción sobre diferentes medicamentos betalactámicos que incluye cefalosporinas de tercera generación y monobáctamicos como aztreonam, este grupo se denominan Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y su rápida diseminación alrededor del mundo, entre diversos agentes bacterianos Gram negativos, las convierten en un problema grave de salud pública a nivel mundial. (Paterson et al, 2003; Gaitán, Paula y Espinal, 2009)

La diseminación de estas enzimas se debe probablemente a que el gen de resistencia (blaTEM, blaSHV, entre otros) es frecuentemente transportado en plásmidos autotrasferibles dentro de bacterias de la misma especie y de especies diferentes, de tal manera que según el reporte del proyecto SENTRY, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* que presentaban fenotipo de BLEE, fueron más frecuentes en América Latina. (Gaitán, Paula y Espinal, 2009)

Existen múltiples técnicas para detectar BLEE en Gram negativos, los cuales se basan en la capacidad del ácido clavulánico para incrementar la actividad de una cefalosporina de tercera generación.

En la actualidad se utiliza la metodología recomendada por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012) que utiliza método de doble disco como estándar para detección de BLEE. Este método ha sido estandarizado para *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*. Se realiza de forma similar al método convencional de difusión en agar Mueller-Hinton, con un inóculo Mac Farland 0,5 y ensayando 4 discos: ceftazidima, ceftazidima más ácido clavulánico, cefotaxima y cefotaxima más ácido clavulánico. Se incuba normalmente en atmósfera normal durante 18 hrs a 37°C. Se miden los halos de inhibición en forma convencional. El aumento del halo en más de 5 mm con los discos conteniendo la mezcla de cefalosporina y ácido clavulánico en relación al disco de cefalosporina sola, para las dos o al menos uno de las dos cefalosporinas se considera confirmatorio para la presencia de BLEE. (Zemelman *et al*, 2002; Gaitán *et al*, 2009; García *et al*, 2011)

Detección de genes bla

Las BLEE más frecuentemente encontradas corresponden a TEM-1 y TEM-2 o SHV-1, las cuales difieren por mutaciones que alteran la configuración de aminoácidos alrededor del sitio activo de estas enzimas, (Paterson *et al*, 2003) y más recientemente también CTX-M. (Gaitán *et al*, 2009)

En bacterias productoras de BLEE la resistencia mostrada a las cefalosporinas de tercera generación es variable y pueden presentarse estas cepas como susceptibles, apareciendo la resistencia al antibiótico durante el curso del tratamiento. Además de la resistencia mostrada a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, penicilinas de amplio espectro y aztreonam, estas bacterias productoras de BLEE también presentan genes de resistencia a otros antibióticos, fenómeno conocido como reacción cruzada (Oteo, 2002; Oteo, Pérez y Campo 2010; García Hernández *et al*, 2013;) de esta manera al ejercer presión selectiva sobre estas cepas productoras de BLEE utilizando antibióticos betalactámicos, también se seleccionan cepas resistentes a otros antibióticos lo que disminuye aún más las opciones terapéuticas.

Para la detección de genes bla se realiza amplificación mediante Reacción en Cadena de las Polimerasa (PCR) de cada aislado resistente a alguna de las cefalosporina especificada con iniciadores específicos para los genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M del grupo 1 y blaAmpC, los cuales son genes constitutivos en *E.coli*, y existe la posibilidad de transmisión plasmidial entre enterobacterias (Gaitán *et al*, 2009).

Los partidores utilizados para la detección de estos genes *bla* son los siguientes: (Paterson *et al* 2003)

Gen bla	Secuencia	Tamaño pb	Referencia
<i>Bla</i> _{TEM}	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC 3' 5' TTATCCGCTCCATCCAGTC 3'	526	Tenover et al. (1994)
<i>Bla</i> _{SHV}	5' CTGGGGAAACGGAACTGAAATG 3' 5' GGGGTATCCCGCAGATAAAT 3'	389	Bello (2005)
<i>bla</i> _{CTX-M}	5' CGCTTTGCGATGTGCAG 3' 5'ACCGCGATATCGTTGGT 3'	551	Bonnet et al. (2000)
<i>bla</i> _{AmpC}	5'-TCAAACTGGCAGCCG-3' 5'-GAGCCCGTTTTATGCACCCA-3'	311	Paterson et al (2003)

Relevancia de BLEE en atención de infecciones

Las infecciones por bacterias productoras de BLEE tienen un impacto económico negativo porque el cuidado de los pacientes con estas infecciones es más caro, se estima que los gastos de hospitalización cuando se trata de infecciones por *E. coli* productora de BLEE son 1,7 veces superiores que en aquellos pacientes con infecciones no productoras de BLEE; además, de un aumento en los días de estancia hospitalaria que pueden llegar en promedio 9 días más en el caso de infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE comparado con cepas no productoras. (Brenner, Nercess, Pohlenz et al 2003; Cisneros y Cordero, 2007)

En un país como El Salvador, donde aproximadamente el 80% de la cobertura de salud está proporcionada por el Sistema Público, esto representa un costo importante en la economía de la nación.

Además, es importante resaltar el impacto negativo que estas infecciones tienen en el pronóstico clínico del paciente. En estudios de series de caso en infecciones por *E. coli* productora de BLEE, se reporta un aumento en la mortalidad de los pacientes de alrededor del 19% a los 30 días de infección con respecto a infecciones por cepas no productoras, así como fracaso terapéutico en el 33% de los casos.

Tomando en cuenta el volumen de casos de infecciones por bacterias productoras de BLEE en el impacto en la economía y el pronóstico clínico, el conocimiento de las características microbiológicas de las poblaciones bacterianas de cada establecimiento contribuye a diseñar protocolos de atención que reduzcan la diseminación de resistencia y por lo tanto, también los costos y la mortalidad asociada a estas infecciones.

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Ubicación del estudio

El aislamiento e identificación de los agentes bacterianos se hizo en la división de bacteriología del laboratorio clínico del Hospital Nacional Zacamil perteneciente a la red del Ministerio de Salud de El Salvador durante los meses de febrero a mayo del 2015.

El estudio de genes *bla* se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Evangélica de El Salvador durante los meses de enero a junio del 2016.

Tipo de estudio

Estudio de tipo descriptivo, de corte transversal, multicéntrico ya que se desarrolló en los laboratorios de microbiología de la Universidad Evangélica de El Salvador y en el Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Zacamil del Ministerio de Salud.

Unidades de análisis

Cepas bacterianas

Se analizaron cepas de *Escherichia coli* provenientes de muestras clínicas de diferentes sitios anatómicos de pacientes con infecciones intrahospitalarias, obtenida en los diferentes servicios de hospitalización del Hospital Nacional Zacamil.

Las muestras se recolectaron durante los meses febrero a mayo del 2015 hasta obtener un total de 30 muestras.

Se seleccionaron aislados consecutivos de *Escherichia coli* proveniente de muestras de pacientes con cuadro clínico compatible con Infección Asociada a la Atención en salud de origen intrahospitalario, definiéndola como toda infección que no haya estado presente al momento del ingreso al hospital y que se haya desarrollado después de 48 horas de estancia hospitalaria. (Flores *et al*, 2008; Horan *et al*, 2008)

Criterios de inclusión de muestra

- Pacientes mayores o iguales de 18 años de edad.
- Sexo femenino y masculino.
- Ingresados al momento de la toma de la muestra en los servicios de Medicina Interna, Cirugía, Ginecología y/o Unidad de Cuidados Intensivos, de los hospitales participantes.
- Muestras recolectadas dentro del periodo de febrero a mayo del 2015.
- Que cumplan criterios de definición de infección intrahospitalaria.
- Aislamiento de *E. coli* por metodología estándar del centro participante
- Resistencia al menos un medicamento betalactámico, según puntos de corte establecidos por CLSI 2013.

Criterios de exclusión

- Pacientes menores de 18 años.
- Si no cumple criterio de IAAS.
- Si en la muestra se aísla más de una especie de microorganismo diferente por metodología estándar para cada centro.
- Que el paciente no se encuentre ingresado al momento de la toma de su muestra.
- Cepa de *E. coli* susceptible a todos los betalactámicos ensayados.
- Muestras reportadas fuera del periodo de recolección de muestra en cada centro.

El laboratorio de bacteriología utilizó la metodología habitual para aislamiento y clasificación de género y especie, y determinación del perfil de resistencia antimicrobianos a través del sistema MicroScan®.

Se utilizó la cepa ATCC 25922 como cepa control según propone el Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI, 2013)

Instrumentos de medición

Para la identificación y aislamiento de *E. coli* en cada establecimiento se utilizó el equipo y el procedimiento estandarizado por la división de bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Zacamil.

Para la confirmación de especie y determinación de resistencia, se utilizó el equipo de la división de Bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Zacamil del Ministerio de Salud, con Prompt™* Inoculation Sistem-D para equipo MicroScan®.

Para la determinación de BLEE por método de doble disco de los diferentes aislados se utilizó el equipo de laboratorio para investigación en bacteriología del Departamento de Microbiología de la Universidad Evangélica de El Salvador siguiendo metodología propuesta por el CLSI 2013.

Para la determinación de genes *bla* en cada aislado se utilizó el equipo del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Evangélica de El Salvador.

Matriz de variables

Tema: Detección de genes *bla* en aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes de pacientes del Hospital Nacional Zacamil de El Salvador. C.A

Enunciado del problema: ¿Existen cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE que posean genes *bla* tipo TEM, CTX-M, SHV y AmpC provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud, obtenidas de pacientes del Hospital Nacional Zacamil?

Objetivo general: Investigar la presencia de genes *bla* en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE provenientes de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud del Hospital Nacional Zacamil

Hipótesis general: “Existen cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud obtenidas del Hospital Nacional Zacamil que posean genes *bla* tipo TEM, SHV, CTX-M y AmpC.”

Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas	Unidades de Análisis	VARIABLES	Operacionalización de variables	Indicadores	Ítemes	Técnicas a utilizar	Tipos de instrumentos
Aislar Escherichia coli a partir de muestras de pacientes con infecciones intrahospitalarias, provenientes del Hospital Nacional Zacamil.		Cepas bacterianas	Infección por E. coli	Infección de origen hospitalario por E. coli según criterios CDC	Cumplimiento con los criterios infección intrahospitalaria propuestos por el CDC		Aislamiento proveniente de muestras clínicas	Medios de cultivo selectivo para E. coli
Determinar el perfil de resistencia a diferentes antibióticos en las cepas de Escherichia coli aislada de las muestras de orina.		Diferentes antibióticos	Perfil de resistencia	Susceptibilidad o resistencia a los diferentes antibióticos estudiados por microScan	Puntos de corte establecidos por el CLSI 2013		MicroScan	MicroScan
Determinar in vitro la producción de BLEE en las cepas de Escherichia coli.		Cepas bacterianas	Producción BLEE	Test de Betalactamas a por difusión de dobles disco	Aumento de más de 5 mm en diámetro de inhibición en presencia de antibiótico combinado con inhibidor de BLEE		Difusión en agar con doble disco de C3G con y sin inhibidor	Placas de Agar MullerHinton con discos de difusión de ceftazidima cefotaxima solos y con inhibidores de BLEE
Verificar la presencia de genes para la producción de BLEE en las cepas de Escherichia coli.		ADN bacteriano	Genes <i>Bla</i>	Presencia o ausencia de genes bla	Amplificación de genes bla a partir de genoma muestras de aislados clínicos		PCR Convencional	Termociclador y cámara de electroforesis

Técnicas y procedimientos a emplearse en la recopilación de información

Estudio de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de los siguientes antibióticos: amikacina, amoxicilina/ac. clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefazolina, cefepima, cefotaxima, cefotaxima/a clavulánico, cefotetan, cefoxitina, ceftazidima, ceftazidima/a clavulánico, ceftriaxona, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, moxifloxacina, nitrofurantoina, piperacilina/tazobactam, tetraciclina, ticarcilina/a clavulánico, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol. A partir del Sistema de Inoculación Prompt™*-D analizado con sistema MicroScan®.

Se utilizaron puntos de corte de acuerdo a recomendaciones de CLSI. (2013)

A partir de un cultivo puro de *Escherichia coli* proveniente de la muestra clínica se extrajo el equivalente a tres colonias aisladas con la varilla de inoculación y se colocan junto con la varilla en la botella de inoculación del sistema Prompt™.

Una vez realizado esta suspensión se vierte en el inoculador.

La inoculación se llevó a cabo con el sistema RENOK® con inoculadores D. La concentración final en cada pocillo fue de 3-7x10⁵ UFC/ml según especificaciones del fabricante.

Los paneles fueron incubados con el sistema WalkAway® y leídos a través del instrumento MicroScan® después de 18 a 20 horas de incubación, según especificaciones del fabricante.

La CIM se registró como la concentración antimicrobiana más baja que muestra inhibición del crecimiento.

Cuando hay crecimiento en todas las concentraciones de un antimicrobiano, la CIM se registra como “superior a” (>) la concentración más alta.

Cuando no hay crecimiento en ninguna de las concentraciones de los antimicrobianos, la CIM se registra como “menor o igual a” (≤) la concentración más baja. Según protocolo de trabajo de la división de bacteriología del laboratorio clínico del Hospital Nacional Zacamil.

Determinación de BLEE

A partir de la resistencia y la producción de Betalactamasa de Espectro extendido para cada cepa obtenido por el del sistema automatizado de estudio se confirmó la producción de BLEE utilizando los criterios del CLSI, utilizando la técnica de difusión en agar con discos de antibióticos conteniendo cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima), sola y en combinación con ácido clavulánico como inhibidor de betalactamasa. (CLSI, 2013)

Se realizó de forma similar al método convencional de difusión en agar Mueller-Hinton, con un inóculo Mac Farland 0,5 y ensayando 4 discos: ceftazidima, ceftazidima más ácido clavulánico, cefotaxima y cefotaxima más ácido clavulánico. Se incubó normalmente en atmósfera normal durante 18 horas a 37°C. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición en forma convencional. El aumento del halo en más de 5 mm con los discos conteniendo la mezcla de cefalosporina y ácido clavulánico en relación al disco de cefalosporina sola, para las dos o al menos uno de las dos cefalosporinas se considera confirmatorio para la presencia de BLEE. (Zemelman et al, 2002; Gaitán et al, 2009; García et al, 2011)

Reacción de polimerasa en cadena (PCR) para detección de genes *bla*

Para la detección de genes *bla*, todos los aislados clínicos fueron conservados en congelador a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento para la extracción de ADN bacteriano.

Para la extracción de ADN se procedió a resucitar cada muestra sembrándola en caldo TSC e incubándolo a 37°C por 18 a 24 horas. Obteniendo cultivos recientes para la extracción del material genético.

Para esto se utilizó KIT de extracción NucleoSpin® Tissue. Marca Macherey-Nagel. Realizando extracción según especificaciones del fabricante. El material obtenido, se distribuyó en alícuotas que fueron almacenadas a temperatura de -20°C hasta su utilización para amplificación de genes *bla*.

A todos los aislados se les realizó detección de genes *bla*CTX-M 1/2, *bla*TEM; *bla*SHV y *bla*AmpC mediante técnica molecular de PCR de punto final (Gaitán et al, 2009). Los productos de PCR fueron observados a través de geles de agarosa, teñidos con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain de la marca Biotium. Y observados con equipo de fotocaptura DigiDoc-It®.

Para la detección de genes bla se realiza amplificación mediante Reacción en Cadena de las Polimerasa (PCR), utilizando partidores específicos para los genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M1/2 y blaAmpC, los cuales son genes constitutivos en E.coli, y existe la posibilidad de transmisión plasmidial entre enterobacterias. (Gaitán et al, 2009)

Los partidores utilizados para la detección de estos genes bla fueron los siguientes:

Gen bla	Secuencia	Tamaño pb	Referencia
BlaTEM	5' TGGGTGCACGAGTGGGTTAC 3' 5' TTATCCGCCTCCATCCAGTC 3'	526	Tenover et al. (1994)
BlaSHV	5' CTGGGGAAACGGAAGTCAAATG 3' 5' GGGGTATCCCGCAGATAAAT 3'	389	Bello (2005)
blaCTX-M	5' CGCTTTGCGATGTGCAG 3' 5'ACCGGATATCGTTGGT 3'	551	Bonnet et al (2000)
blaAmpC	5'-TCAAAACTGGCAGCCG-3' 5'-GAGCCCGTTTTATGCACCCA-3'	311	Paterson et al (2003)

Para la amplificación de estos genes se siguieron las siguientes condiciones de temperaturas realizando 35 ciclos de amplificación en Termociclador:

Temperatura de denaturalización de 94°C por 30 segundos.

Temperatura de alineamiento de 60°C por 1 minuto (70°C para CTX-M1/2 y 45°C para TEM).

Temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto. Seguido de una Extensión final de 72°C por 10 min. (Paterson *et al* 2003)

E. Procesamiento y análisis

Los resultados obtenidos se tabularon utilizando una matriz en hoja electrónica Excel 2010. Registrando las diferentes variables para cada cepa estudiada.

La presencia de genes bla y su manifestación fenotípica en el test de BLEE se registró a través de fotografías digitales y tablas electrónicas.

Validación estadística: los ensayos de susceptibilidad a los diferentes antibióticos se realizarán en duplicado. Estos resultados se correlacionaron con las diferentes variables y se realizaron pruebas de contingencia estadística.

IV. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

A. Resultados

Se recolectaron 30 muestras provenientes de pacientes ingresados en los diferentes servicios de encamados del Hospital Nacional Zacamil, provenientes de diferentes sitios anatómicos, siendo la muestra más frecuente de orina. Estas muestras corresponden a infecciones asociadas a la atención en salud y fueron recolectadas en el periodo de febrero a mayo de 2015.

Se procesaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad Evangélica de El Salvador, en el periodo de marzo a junio de 2015, para la determinación de BLEE por método de doble disco, posteriormente almacenadas en congelador a temperatura de -20°C hasta su procesamiento para extracción de ADN y posterior amplificación de genes para BLEE.

Todas las muestras recolectadas reflejan valores de CIM, correspondientes a resistencia a por lo menos un antibiótico betalactámico, esto puede observarse en la Tabla N° 1 y 2 correspondientes a los valores de CIM de los antibióticos analizados, observándose que la mayoría de muestras presenta disminución de la susceptibilidad a cefalosporinas de tercera generación como ceftriazona y cefotaxima.

La susceptibilidad a betalactámicos esta disminuida en todos los aislados clínicos a por lo menos un medicamento perteneciente a este grupo.

La susceptibilidad se encuentra disminuida para la combinación trimetoprim/sulfametoxazol en la mayoría de los aislados estudiados.

Tabla 1. Valores de CIM de los diferentes aislados clínicos de *Escherichia coli* para los antibióticos estudiados

Cepa	AMC	SAM	AMP	ATM	CEP	CZO	FEP	CTX	CTT	FOX	CAZ	CRO	CXM
EC-04	≤8/4	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-05	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-08	≤8/4	16/8	>16	≤8	>16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	8
EC-09	≤8/4	≤8/4	≤8	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	≤4
EC-11	16/8	>16/8	>16	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	≤4
EC-12	>16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-14	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-17	>16/8	16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-20	≤8/4	>16/8	>16	>16	>16	>16	<16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-23	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-26	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-27	>16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-30	16/8	>16/8	>16	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	≤4
EC-31	≤8/4	>16/8	>16	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	≤4
EC-32	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	16	>16	>32	>16
EC-33	≤8/4	>16/8	>16	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤	≤1	≤8	≤
EC-34	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-35	≤8/4	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-36	>16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	16	>16	>32	>16
EC-37	≤8/4	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-39	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-40	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-41	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	≤8	>16	>32	>16
EC-42	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	16	>16	>32	>16
EC-43	16/8	>16/8	>16	>16	>16	>16	>16	>32	≤16	16	>16	>32	>16
EC-44	16/8	>16/8	>16	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	8
EC-46	≤8/4	16/8	>16	≤8	>16	≤8	≤8	≤25	≤16	≤8	≤1	≤8	≤4
EC-48	≤8/4	16/8	>16	≤8	>16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	8
EC-49	≤8/4	16/8	>16	≤8	16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	4	≤8	≤4
EC-51	≤8/4	>16/8	<16	≤8	>16	≤8	≤8	≤2	≤16	≤8	≤1	≤8	≤4

AMC: amoxicilina/ac.clav; SAM: ampicilina/sulbactam; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CEP: cefalotina; CZO: cefazolina; FEP: cefepime; CTX: cefotaxima; CTX: cefotaxima; CTT: cefotetan; FOX: ceftioxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CXM: cefuroxima.

Es importante mencionar que la mayoría de aislados estudiados presentaban niveles de susceptibilidad a nitrofurantoina, ya que la mayoría de resultados obtenidos reflejan valores de CMI a este fármaco por debajo de los puntos de corte establecidos como susceptibles. Además, los resultados en cuanto a la sensibilidad a ciprofloxacina y ceftriaxona muestran que la mayoría de aislados clínicos son resistentes a estos dos fármacos como puede observarse en la tabla

Tabla 2. Resultado valores de CIM 50 y 90 de los antibióticos estudiados para los diferentes aislados clínicos de *Escherichia coli*

Antibiótico	Rango	CIM ($\mu\text{gr/ml}$)		Puntos de corte		
		50%	90%	S	I	R
AMK	≤ 16 a > 32	≤ 16	32	≤ 16	32	≥ 64
AMC	$\leq 8/4$ a $> 16/8$	$\leq 8/4$	$> 16/8$	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
SAM	$\leq 8/4$ a $> 16/8$	$> 16/8$	$> 16/8$	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
AMP	≤ 8 a > 16	> 16	> 16	≤ 8	16	≥ 32
ATM	≤ 8 a > 16	> 16	> 16	≤ 4	8	≥ 16
CEP	≤ 8 a > 16	> 16	> 16	≤ 8	16	≥ 32
CZO	≤ 8 a > 16	> 16	> 16	≤ 1	2	≥ 4
FEP	≤ 8 a > 16	> 16	> 16	≤ 8	13	≥ 32
CTX	≤ 2 a > 32	> 32	> 32	≤ 1	2	≥ 4
CAC	≤ 0.5 a > 4	≤ 0.5	≤ 0.5	Test de	BLEE	
CTT	≤ 16 a > 32	≤ 16	≤ 16	≤ 16	32	≥ 64
FOX	≤ 8 a > 16	≤ 8	16	≤ 8	16	≥ 32
CAZ	≤ 1 a > 16	> 16	≤ 16	≤ 4	8	≥ 16
CAC	≤ 0.25 a > 2	≤ 0.25	> 2	Test de	BLEE	
CRO	≤ 8 a > 32	> 32	> 32	≤ 1	2	≥ 4
CXM	≤ 4 a > 16	> 16	> 16	≤ 8	16	≥ 32
CIP	≤ 1 a > 2	> 2	> 2	≤ 1	2	≥ 4
EPM	≤ 2 a > 4	≤ 2	≤ 2	≤ 0.25	0.5	≥ 1
GEN	≤ 4 a > 8	> 8	> 8	≤ 4	8	≥ 16

IMP	≤4	≤4	≤4	≤1	2	≥4
LEV	≤2 a >4	>4	>4	≤2	4	≥8
MER	≤4	≤4	≤4	≤1	2	≥4
MOX	≤2 a >4	>4	>4	ND	ND	ND
NIT	≤32 a >64	≤32	≤32	≤32	64	≥128
PIC	≤16 a >64	≤16	64	≤16/4	32/4 - 64/4	≥128/4
TET	≤4 a >8	>8	>8	≤4	8	≥16
TAC	≤16 a >64	64	64	≤16/2	32/2 - 64/2	≥128/2
TOB	≤8 a >8	>8	>8	≤4	8	≥16
COX	≤2/38 a >2/38	>2/38	>2/38	≤2/38	ND	≥4/76
AMK: amikacina; AMC: amoxicilina/ac.clav; SAM: ampicilina/sulbactam; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CEP: cefalotina; CZO: cefazolina						
FEP: cefepime; CTX: cefotaxima; CTC: cefotaxima/ac.clav; CTT: cefotetan; FOX:cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CAC: ceftazidima/ac.clav; CRO: ceftriazona						
CRO:ceftriazona; CXM:cefuroxima; CIP:ciprofloxacina; EPM:ertapenem; GEN:gentamicina; IMP:imipenem; LEV: levofloxacina; MER: meropenem						
MOX:moxifloxacina; NIT:nitrofurantoina; PIC:piperacilina/tazobactam; TET:tetraciclina; TAC: ticarcilina/ac.clav; TOB: tobramicina; COX: Trim/sulfam.						

Se relacionó estadísticamente el resultado de producción de BLEE determinado por el método automatizado del hospital y por el método de doble disco realizado en el laboratorio de la Universidad Evangélica de El Salvador, en muestras de pacientes con y sin IAAS. Para esto se calculó CHI cuadrada a través del paquete estadístico de EXCEL 2010, utilizándose un valor de $p < 0.05$. Al realizar la prueba de χ^2 el valor de p fue 0.00000293 para el test de doble disco. Este valor confirma la significancia de los resultados de la prueba.

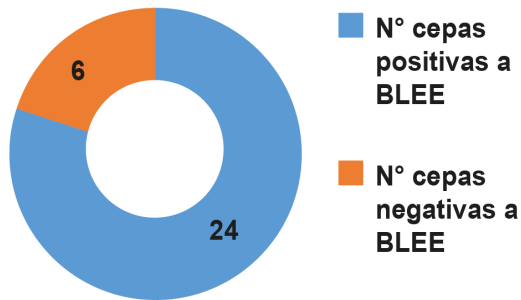


Gráfico 1. Distribución de cepas.

Se procedió a verificar la producción de BLEE por método fenotípico de difusión en agar con doble disco, obteniéndose confirmación de producción de enzimas en el 80% de las muestras analizadas por este método. Cabe mencionar que al revisar el reporte de producción de BLEE por método automatizado, este solamente detectó la producción de la enzima en el 66% de las muestras analizadas.

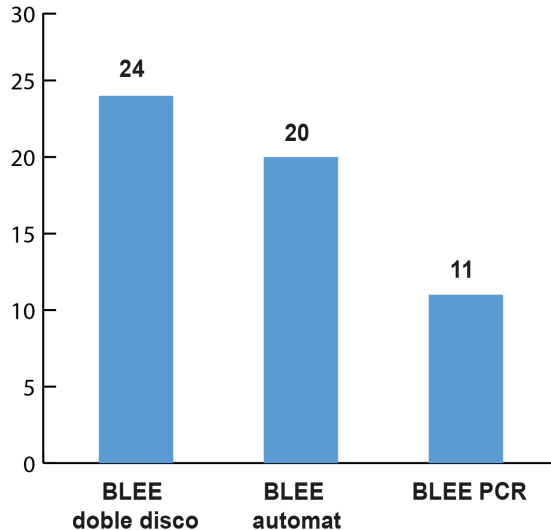


Gráfico 2. Muestras que resultaron positivas a identificación de BLEE por los diferentes métodos utilizados.

Es importante mencionar que la determinación de BLEE resultó positiva únicamente a la enzima tipo TEM. No encontrándose positividad a los genes de las otras tres enzimas estudiadas.

Al revisar los 30 expedientes clínicos de pacientes de los cuales se obtuvo las muestras analizadas, se verificó que la mayoría recibieron tratamiento con al menos un antibiótico reportado como resistente por el laboratorio de bacteriología del hospital, y en varios casos se continuó con la terapia después de conocido el resultado del cultivo.

El antibiótico que se utilizó con mayor frecuencia para el tratamiento de infecciones resistentes fue ciprofloxacina, seguido de ceftriazona. Algunos de los pacientes incluso recibieron terapia combinada de antibióticos, utilizando dos o hasta tres medicamentos simultáneamente a los cuales el cultivo reportaba al microorganismo aislado como resistente.

Tabla 3. Antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones relacionadas a *Escherichia coli* productora de BLEE

Antibiótico	Pacientes
AMP	2
PEN	1
AMX	1
AMK	2
DIC	1
FOS	1
CRO	8
CZO	1
CIP	12
MTZ	4
CLI	4
DOR	1
NIT	2
COX	2
CHL	1
AMP= ampicilina; PEN: penicilina; AMX: amoxicilina; AMK: amikacina; DIC: dicloxacilina FOS: fosfomicina; CRO: ceftriazona; CZO: cefazolina;	
CIP: ciprofloxacina; MTZ: metronidazol CLI: clindamicina; DOR: doripenem; NIT: nitrofurantoina; COX: trimetoprim/sulfametoxazol; CHL: cloranfenicol	

Del total de pacientes con IAAS de los cuales se obtuvieron las muestras solamente dos fueron tratados con Nitrofurantoina durante el curso de su enfermedad, a pesar que en la mayoría de aislados se reportaban niveles de susceptibilidad a este fármaco.

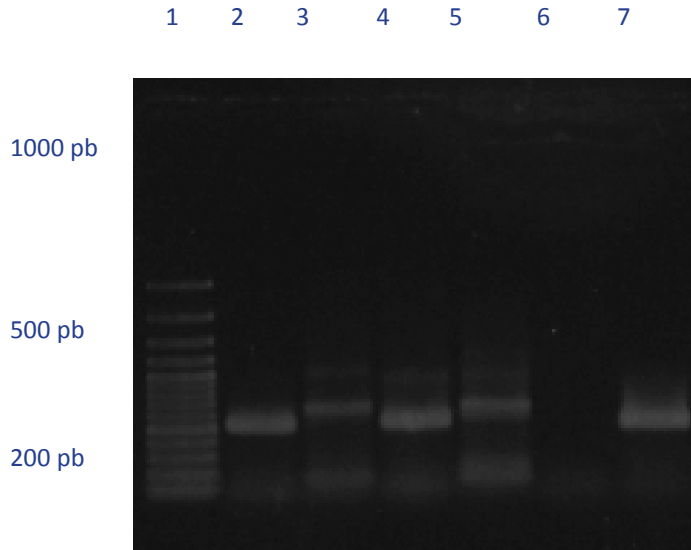


Fig. 1: Electroforesis de productos de PCR del gen *bla* TEM. Carril 1: marcador de peso molecular de 1000 pb plus; 2: control positivo; 3: EC-36; 4: EC-37; 5: EC-39; 6: EC-40; 7: EC-41.

En once de las muestras estudiadas se pudo constatar la presencia de genes *bla* tipo TEM, siendo el único de los cuatro genes estudiados que pudo amplificarse.

El resto de genes estudiados que fueron sometidos al proceso de amplificación a través de PCR, no se obtuvo resultados positivos, no logrando evidenciar la presencia de estos genes en los aislados clínicos obtenidos.

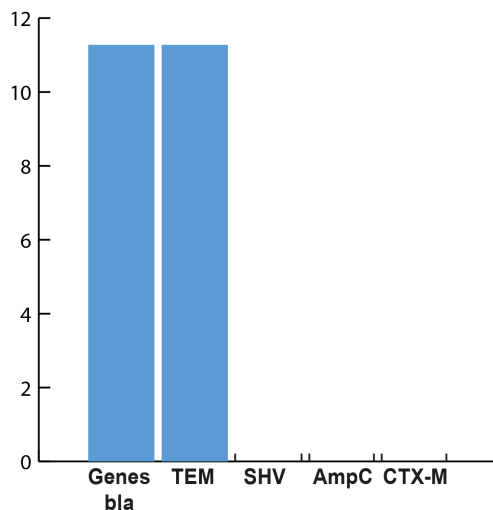


Gráfico 3. Presencia de genes *bla* en aislados de *Escherichia coli*.

ANÁLISIS

Las infecciones asociadas a la atención en salud son un verdadero problema de salud pública por los costos humanos y económicos que representan; y si estas IAAS son ocasionadas por microorganismos resistentes, el problema se agrava llegando, en algunos casos, a duplicar el tiempo de internamiento y la mortalidad asociada.

Para un país como El Salvador es prioritario implementar medidas de control de infecciones intrahospitalarias y, sobre todo, de diseminación de factores de resistencia bacteriana, debido a que el costo económico asociado a la atención de las mismas representa un impacto significativo en los recursos destinados a la atención en salud.

Una de las estrategias principales para el control de la resistencia bacteriana es el conocimiento e investigación de los principales microorganismos asociados a infecciones intrahospitalarias de cada establecimiento. Existen diversos mecanismos de resistencia y una especie bacteriana puede expresar uno o varios de esos mecanismos. Conocer en detalle las características microbiológicas de estos agentes bacterianos asociados a IAAS, proporciona a cada establecimiento mejores bases para la comprensión del fenómeno de resistencia y, por ende, mejores estrategias de control y prevención.

En la actualidad en El Salvador existen muy pocos estudios referentes a las características microbiológicas de los agentes resistentes asociados a IAAS de los principales nosocomios del país. Y los estudios hasta la fecha publicados enfocan el problema desde una perspectiva fenotípica únicamente.

En este estudio se utiliza una estrategia de laboratorio que en El Salvador resulta innovadora, ya que es la primera vez que se aplica metodología de PCR para la investigación del fenómeno de la resistencia bacteriana. Esto proporciona una perspectiva más amplia del fenómeno de resistencia, ya que permite iniciar una nueva ruta de investigación que oriente no solo a la prevención de la resistencia observada o expresada por el microorganismo en su contacto con el antimicrobiano, sino a la prevención considerando la presión selectiva sobre el genoma bacteriano, reduciendo la posibilidad de transferencia de genes de resistencia intra e inter especies.

En la actualidad, poco se consideran las características genéticas del agente bacteriano a la hora de decidir una terapia. El clínico se decide por terapias empíricas que han demostrado efectividad en el control de la infección, aunque esto suponga ejercer mayor presión selectiva sobre los microorganismos, favoreciendo el apareamiento de multiresistencia. Esto puede constatarse en los resultados obtenidos de este estudio, en donde la mayoría de aislados obtenidos presentaba resistencia a cefalosporinas de tercera generación como ceftriazona, siendo este uno de los medicamentos que más se eligieron para el tratamiento de las infecciones identificadas.

En este estudio pudimos comprobar que, en la mayoría de los pacientes con infecciones por microorganismos resistentes, se utilizó al menos un medicamento que durante las pruebas de susceptibilidad presentó valores de resistencia.

Otro elemento importante de mencionar es la frecuente utilización de ciprofloxacina como terapia para infecciones del tracto urinario, a pesar que la mayoría de aislados presentaban resistencia a este medicamento, y que además mucha de la literatura conocida los ubica como un medicamento que aumenta la selección de cepas productoras de BLEE.

Además, muchos de estos pacientes con infecciones resistentes fueron tratados con protocolos de tratamientos en combinación de antibióticos. Estas combinaciones muchas veces resultaron en éxito terapéutico, ya que frecuentemente en la elección de los medicamentos se incluyó al menos uno para el cual el microorganismo era susceptible.

A pesar de la disponibilidad del laboratorio de bacteriología del establecimiento de salud para la realización de pruebas rutinarias de susceptibilidad microbiana a través de métodos automatizados, estos resultados no siempre se toman en consideración a la hora de decidir la terapéutica a utilizar, ya que en ocasiones el clínico insta terapias basadas en consideraciones clínicas y su experiencia. Esto puede estar influenciado por la disponibilidad de medicamentos con los que cuenta el establecimiento, siendo los medicamentos que se eligen las únicas opciones con los que los médicos cuentan en el momento de atender al paciente.

Consideración aparte merece el uso de nitrofurantoina, medicamento de amplio espectro, utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario no complicado de origen comunitario, el cual interfiere con el metabolismo bacteriano de forma eficaz, y que en este estudio resultó que el 90% de los aislados presentaba valores de CMI por debajo de los puntos de corte establecidos como susceptibilidad para este medicamento y sin embargo solo fue utilizado en dos de los pacientes estudiados. Además de ser un medicamento con un costo menor que las cefalosporinas de tercera generación, siendo de administración oral lo que facilita su administración.

Por otro lado, debemos considerar que la producción de enzimas inactivantes es uno de los mecanismos de resistencia más ampliamente reportados a nivel mundial, siendo las BLEE las de mayor relevancia por el amplio perfil de resistencia que exhiben las bacterias que las producen. Existen más de 300 tipos diferentes de BLEE, siendo algunas de ellas más frecuentes en ciertas áreas geográficas. A pesar que en la actualidad existen múltiples reportes de microorganismos resistentes asociados a la producción de estas enzimas, en El Salvador, no existe ningún reporte previo que identifique el tipo de enzima que un microorganismo produce para la inactivación antibiótica.

En este estudio se pudo aislar varios microorganismos productores de BLEE identificados como *Escherichia coli*, en los cuales se determinó por métodos fenotípicos y moleculares la producción de BLEE tipo TEM, un grupo de Betalactamasas ampliamente diseminadas en el mundo y que frecuentemente se asocian a *E.coli* multiresistente. Dentro de este grupo de BLEE se encuentran algunas que tienen resistencia para inhibidores de Betalactamasas y que presentar mayor capacidad hidrolítica sobre cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima. Esto puede explicar los resultados presentes de CMI en los aislados clínicos obtenidos.

Es importante mencionar que los genes que codifican para esta enzima tipo TEM frecuentemente pueden encontrarse en elementos móviles del genoma bacteriano, facilitando su transferencia a otras especies bacterianas e incluso a géneros bacterianos diferentes.

A pesar que se intentó la amplificación de otros tres genes diferentes de BLEE, esto no fue posible, probablemente debido a la posibilidad de encontrarnos ante un clon de *E. coli* que exhiba el mismo patrón genético, lo cual no pudo ser comprobado en este estudio, lo que no significa que puedan encontrarse genes para otras Betalactamasas diferentes a las estudiadas.

La utilización de herramientas moleculares de estudio de la resistencia bacteriana, abre una puerta de posibilidades que permiten un mejor conocimiento, basado en la investigación del fenómeno desde una perspectiva más amplia, nunca antes abordado en El Salvador. Es necesario que las instituciones encargadas de estudiar y promover el adecuado uso de los antibióticos, y de la prevención de la resistencia bacteriana, destinen mayores recursos que permitan más y mejores investigaciones utilizando este tipo de herramientas moleculares de estudio.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- El método de doble disco resultó más eficaz para la determinación de BLEE que el método automatizado.
- La mayoría de las muestras estudiadas presentaban producción de BLEE determinada por los métodos utilizados.
- Los medicamentos más utilizados para el tratamiento empírico de estas infecciones fueron ceftriazona y ciprofloxacina a pesar que la mayoría de aislados resultaron resistentes a estos medicamentos.
- Únicamente se utilizó en dos pacientes nitrofurantoina como tratamiento a pesar que la mayoría de aislados clínicos fueron sensibles a este medicamento.
- El 33% de las muestras de *Escherichia coli* estudiadas resultó positivo a la presencia de genes bla tipo TEM.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se sugieren las siguientes recomendaciones:

- Al personal clínico del Hospital Nacional Zacamil, incluir de manera sistemática los resultados de laboratorio respecto a los patrones de sensibilidad de antimicrobianos para la elección del tratamiento a utilizar en pacientes con infecciones de origen nosocomial.
- Se recomienda a los médicos clínicos que prescriben antibióticos actualizar sus conocimientos respecto a los patrones moleculares de resistencia, y los riesgos asociados a la terapia antibiótica como mecanismo de presión selectiva para la generación de cepas multiresistentes.
- A las escuelas formadoras de Recursos de Salud apoyar e impulsar más investigaciones relacionadas al tema de resistencia bacteriana que permitan a sus estudiantes mejorar el conocimiento práctico respecto al uso racional de antimicrobianos.
- Al Ministerio de Salud fomentar la investigación en el tema de resistencia entre sus funcionarios para obtener información y evidencia pertinente que permita adoptar políticas adecuadas en cuanto al uso racional de antimicrobianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ambler R.P. The Structure of β -Lactamases. Phil. Trans. R. Soc. Lond 1980; 289: 321-331.
2. Bello H. Bases genéticas de la Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* aisladas de hospitales chilenos. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular, Universidad de Concepción, Chile 2005. 175pp.
3. Bonnet R., Sampaio J. L. M., Labia R., De Champs C., Sirot D., Chanal C. y Sirot J. A novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in CefotaximeResistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1936-1942.
4. Blair J M, Weeber M, Baylay A, Ogbolu D y Piddock L. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 2014; 13: 42-51.
5. Brenner P, Nercelless P, Pohlenz M *et al.* Costo de las infecciones intrahospitalarias en hospitales Chilenos de alta y mediana complejidad. Rev Chil Infect 2003; 20 (4): 285-290.
6. Books G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25^a edición. México. McGraw-Hill Interamericana Editores. 2011.
7. Bryce A, Costelloe C, Hawcroft C, Wootton M, Hay A. Faecal carriage of antibiotic resistant *Escherichia coli* in asymptomatic children and associations with primary care antibiotic prescribing: a systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases 2016; 16:359.
8. Bush K., Jacoby G. y Medeiros A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6): 1211-1233.
9. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. Ann Transl Med 2016; 4(17):326.
10. Casellas J. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la Infectología. Rev Panam Salud Pública 2011; 30(6) 519 – 528.
11. Cisneros J, Cordero E. Relevancia de las BLEE en el pronóstico y coste de las infecciones. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25(2): 48-53.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Ninth Edition. CLSI document M07-A9. (ISBN 1-56238-783-9). Clinical and Laboratory Standard Institute 2012, Wayne, Pennsylvania, USA.
13. Flores M K, Pérez L M, Trelles M G, Malaga M, Loza M, Tapia E. Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un hospital general. Rev Med Hered 2008; 19 (2): 46-52.
14. Gaitán S L, Espinal P y Grupo de investigación en Resistencia, Región Caribe. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β - lactamasa de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. Rev Chil de Infect 2009; 26(3): 239-246.
15. García C, Astocondor L, Banda C. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y el Perú. Acta Med Per 2012; 29(3): 163-169.
16. García Hernández A, García Vasquéz E, Hernández Torres A, Ruíz J, Yagüe G, Herrero J A, Gómez J. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter 2011; 24(2):57-66.
17. Horan T, Andrus M, Dudeck M. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control 2008; 36: 309-332.
18. Humera Javed, Hasan Ejaz, Aizza Zafar, Ahsan Waheed Rathore, Ikram ul Haq. Metallo-beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A rising threat for hospitalized children. JPak Med Assoc 2016; 66: 1068-1072.
19. Jafari A, Aslani M, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. IRAN. J. MICROBIOL. 2012; 4(3): 102-117.
20. Jayol A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. Euro Surveill. 2016; 21(37)pii=30339.

21. Kebede A, Kemal J, Alemayehu H, Habte Mariam S. Isolation, Identification, and Antibiotic Susceptibility Testing of Salmonella from Slaughtered Bovines and Ovines in Addis Ababa Abattoir Enterprise, Ethiopia: A Cross-Sectional Study. *International Journal of Bacteriology* Volume 2016, Article ID 3714785, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3714785>.
22. Nuesch-Inderbinen M, Kayser F, Hachler H. Survey and Molecular Genetics of SHV β -Lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 41: 943-949
23. Queenan A. y Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-458.
24. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in non hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1089-94.
25. Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología Médica. 4ª edición. Mexico. McGraw-Hill Interamericana. 2005.
26. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum [beta] lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:320-6.
27. Oteo J. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother* 2002;50:945-52.
28. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(3):473–8.
29. Paterson D L, Hujer K, Hujer A, Yeiser B, Bonomo M, Rice, L, Bonomo R y The International *Klebsiella* Study Group. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M Type β -Lactamases. *Anticomb Agents Chemoter* 2003; 47(11): 3554-3560.
30. Paterson D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* 2006; 119(6A): 20-28.

31. Rojas D. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009; 29:78-83.
32. Rubio C, Gil J, Gómez-Lus R. Significado clínico de las resistencias bacterianas. En (Gómez j, Gobernado M. Eds). *Enfoque clínico de los Grandes Síndromes Infecciosos*. Madrid Ergón Ed. 2° ed. 2006: 27-36.
33. Tenover F. C., Huang Ming B., Rasheed J. K. y Persing D. H. Development of PCR Assays To Detect Ampicillin Resistance Genes in Cerebrospinal Fluid Samples Containing Haemophilus influenza. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2729-2737.
34. Vasquez A, Montero M, Laughlin M, Dancy E, Melmed R, Sosa L, Watkins L, Folster J, Strockbine N, Moulton-Meissner H, Ansari U, Cartter M, Spalding Walters M. Investigation of Escherichia coli Harboring the mcr-1 Resistance Gene — Connecticut. *MMWR* 2016; 65 (36): 979 – 980.