

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
E INMUNOLOGIA



DETECCION DE *Beta Lactamasa* de Efecto Extendido (BLEE) EN  
*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* AISLADOS DE  
PACIENTES DE LA UNIDAD MEDICA DE ALTAS  
ESPECIALIDADES No. 34 IMSS

TESIS

QUE EN OPCION A TITULO DE  
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA

JUANA RODRIGUEZ BALDERAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. JULIO DE 2008

TL  
QR177  
.R63  
2006  
c.1



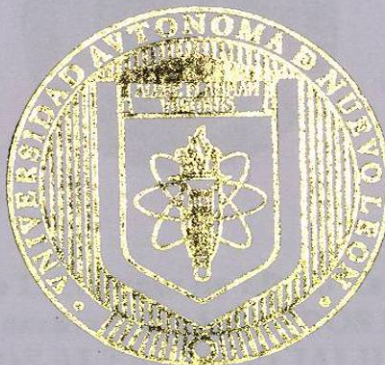
1080091474



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
E INMUNOLOGÍA



DETECCION DE *Beta Lactamasa de Efecto Extendido (BLEE)* EN  
*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* AISLADOS DE  
PACIENTES DE LA UNIDAD MEDICA DE ALTAS  
ESPECIALIDADES No. 34 IMSS

TESIS

QUE EN OPCION A TITULO DE  
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

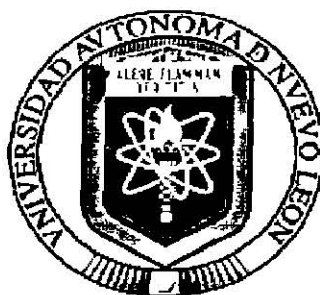
PRESENTA

JUANA RODRIGUEZ BALDERAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. JULIO DE 2006



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



**DETECCIÓN DE *Beta* Lactamasa de Efecto Extendido (BLEE) EN  
*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* AISLADOS DE PACIENTES DE LA  
UNIDAD MEDICA DE ALTAS ESPECIALIDADES # 34 IMSS**

**TESIS  
QUE EN OPCIÓN A TÍTULO DE  
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**Presenta:**

**JUANA RODRÍGUEZ BALDERAS**

**San Nicolás de los Garza, N. L. Julio de 2006**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E**  
**INMUNOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE *Beta* Lactamasa de Efecto Extendido (BLEE) EN  
*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* AISLADOS DE PACIENTES DE LA  
UNIDAD MEDICA DE ALTAS ESPECIALIDADES # 34 IMSS**

**COMISIÓN DE TESIS**

  
Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente

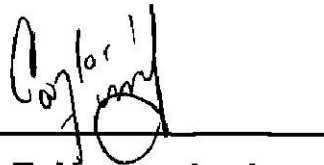
  
M.C. Ma. Manuela Vela Franco

Secretario



Dr. Juan Fco. Contreras Cordero

Vocal



Dr. Carlos E. Hernandez Luna

Suplente

**San Nicolás de los Garza, N.L. México. Julio 2006**



## **LUGAR DE TRABAJO**

La presente investigación se llevó a cabo en el departamento de Bacteriología del Laboratorio clínico Unidad Médica de Altas Especialidades (UMAE) # 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño y la asesoría del Dr. Julio Molina Gamboa.

## ***Dedicatoria:***

Con amor a mi esposo José Luis y a mis hijas Nayeli y Anayancy por ser parte fundamental en mi vida.

A la memoria de Junior.



## *Agradecimientos*

A la Dra. Licet Villarreal Treviño y al Dr. Julio Molina Gamboa por su sabia orientación y por compartir conmigo sus valiosos conocimientos.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, especialmente a la Facultad de Ciencias Biológicas por formar verdaderos profesionistas de excelencia al servicio de la sociedad y crear en nosotros la conciencia del bien común.

Al honroso Instituto Mexicano del Seguro Social, particularmente a la Unidad Médica de Altas Especialidades # 34 por facilitarme los medios y el espacio en el desarrollo de este trabajo de investigación y por darme la oportunidad de seguir laborando dentro de la Institución.

A todos los que aportaron información y a aquellos que en algún momento determinado me apoyaron en la realización de esta Tesis.

Muy fraternalmente a mi esposo e hijas por su comprensión al permitirme disponer del tiempo que les pertenecía para dedicarlo a los estudios, a mis padres que me dieron la vida, a mis hermanos y familia en general por alentarme de principio a fin.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Lugar de Trabajo.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de contenido.....	iv
Abreviaturas.....	vi
Lista de Tablas.....	vii
Lista de Gráficas.....	viii
Resumen.....	1
1.- Introducción.....	2
2.- Importancia.....	4
3.- Antecedentes.....	5
4.- Hipótesis.....	18
5.- Objetivo.....	19
6.- Material.....	20
7.- Método.....	21
7.1. Etapa de recepción y tratamiento de las muestras.....	21



7.2. Identificación de los microorganismos.....	22
7.3. Prueba de susceptibilidad antibiótica mediante la técnica de difusión en agar para probar la existencia de BLEE.....	23
7.3.1. Preparación de las placas con medio de cultivo.....	24
7.3.2. Preparación del inóculo.....	24
7.3.3. Siembra del inóculo.....	24
7.3.4. Aplicación de los sensidiscos.....	24
7.3.5. Lectura para determinar BLEE.....	25
8.- Resultados.....	27
9.- Discusión.....	36
10.- Conclusión.....	39
11.- Bibliografía.....	41

## ABREVIATURAS

AMIK	Amikacina
AMPI	Ampicilina
AMS	Ampicilina/Sulbactam
ATM	Aztreonam
$\beta$ -lactamasas	Betalactamasas
BLEE	Betalactamasas de Efecto Extendido
CAZ	Ceftazidima
CA	Ácido Clavulónico
C. Ext.	Consulta externa
CRO	Ceftriaxona
FEP	Cefepime
FUR	Nitrofurantoina
GENTA	Gentamicina
IMIP	Imipenem
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
$\mu$ g	Microgramos
MIC	Concentración mínima inhibitoria
mm	Milímetros
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PTA	Piperacilina/Tazobactam
SENTRY 16	Programa de monitoreo de frecuencia de aparición y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos
SXT	Trimetropin con Sulfametaxol
UCC	Unidad de Cuidados Coronarios
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos Adultos
UCIP	Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
UMAE	Unidad Médica de Altas Especialidades

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1	Antibiograma y lectura medida en mm de halos de inhibición, en <i>K. pneumoniae</i> ..... 27
2	Antibiogramas cuya lectura muestra la resistencia de <i>K. pneumoniae</i> a los antibióticos indicadores (CAZ y CRO)..... 28
3	Relación de resistencia y sensibilidad de las 9 cepas con BLEE (+) en <i>K. pneumoniae</i> y el comportamiento ante otros antibióticos..... 28
4	Antibiograma y lectura de medidas en mm de halos de inhibición, en <i>E. coli</i> en los diferentes tipos de muestra..... 32
5	Lectura en mm de inhibición para las cepas BLEE (+) de <i>E. coli</i> ..... 33
6	Relación de resistencia y sensibilidad de las 17 cepas con BLEE (+) en <i>E.coli</i> y el comportamiento ante otros antibióticos..... 33

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Pág.
1	Porcentaje de resistencia de <i>K. pneumoniae</i> a antibióticos indicadores en las diferentes áreas de cuidados intensivos.....	29
2	Incidencia de <i>K. pneumoniae</i> con BLEE (+) en áreas de Cuidados Intensivos.....	30
3	Incidencia de BLEE (+) de <i>K. pneumoniae</i> de acuerdo al tipo de muestra.....	31
4	Porcentaje de incidencia de BLEE en <i>K. pneumoniae</i> por Servicios.....	31
5	Susceptibilidad mostrada por <i>E. coli</i> a antibióticos indicadores (CAZ, CRO).....	34
6	Incidencia de BLEE en los diferentes servicios hospitalarios.....	34
7	Porcentaje de aislamiento de <i>E. coli</i> por tipo de muestra.....	35
8	Aislamientos de cepas de <i>E. coli</i> con BLEE según servicio hospitalario.....	35

## RESUMEN

El incremento en la resistencia desarrollada por las bacterias a los antibióticos ha suscitado la inquietud de probar las rutas implementadas por éstas para escapar a los efectos bactericidas de estas sustancias.

El que los seres humanos abusen del manejo de los antibióticos ha propiciado que su efecto esté quedando atrás frente a las bacterias y por el contrario se encuentren en un nivel superior al producir enzimas que abaten los efectos nocivos hacia ellas y sea precisamente medios hospitalarios donde han mostrado sus efectos reforzados de subsistencia.

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar el grado de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos y no betalactámicos mediante la producción de  $\beta$ -lactamasas de efecto extendido (BLEE), en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Por antecedentes bibliográficos e *in vivo* estas enzimas efectúan una respuesta antidroga destruyendo el anillo betalactámico de los antibióticos tipo penicilinas, cefalosporinas y derivados, inhibiendo el ataque producido por una antibióticoterapia que en algún momento fue acertada. Se procesaron 906 muestras de diversas procedencias de pacientes de la Unidad Médica de Altas Especialidades (UMAE) # 34 IMSS donde se obtuvieron 73 muestras positivas; 31 para *K. pneumoniae* y 42 muestras para *E. coli* posteriormente por metodología basada en normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), mediante la técnica de difusión en disco y utilizando 2 antibióticos indicadores Ceftazidima (CAZ) y Ceftriaxona (CRO); se determinó que de las 73 cepas 26 presentaron BLEE; 9 cepas de *K. pneumoniae* y 17 cepas correspondientes a *E. coli*. Las cepas con BLEE (+), presentaron amplia resistencia antibiótica a cefalosporinas, como a aminoglucósidos y otros antibióticos betalactámicos. Se demostró la alta incidencia de las bacterias con este tipo de resistencia antibiótica en pacientes con procedimientos invasivos así como la prevalencia en salas de cuidados intensivos.



# 1. INTRODUCCIÓN

La era de los antibióticos inició con la producción de la penicilina a partir del hongo *Penicillium notatum* en 1940 como tratamiento humano. En las siguientes décadas la fabricación de nuevas clases de antibióticos alivió la inquietud provocada por las enfermedades infecciosas. En la época actual la preocupación es la creciente resistencia creada por las bacterias a los antibióticos. Este fenómeno se presenta mundialmente y ningún centro hospitalario está exento de sufrirlo.

El ambiente hospitalario es considerado un potencial reservorio de patógenos por lo que las infecciones nosocomiales son un problema que ha sido tema de investigaciones, por ejemplo desde 1950 se ha reportado un incremento en bacteremias causadas por *estafilococos* y organismos gram-negativos tales como *E.coli*, *Pseudomonas*, etc.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es uno de los grandes retos actuales de los sistemas sanitarios. La importancia del fenómeno procede en parte por la creciente prevalencia de multiresistencia entre muchos patógenos. El incremento de la resistencia microbiana se relaciona principalmente con el uso de agentes de amplio espectro en la población que acude a atención médica, la exigencia de una mayor eficiencia de los sistemas de salud a través de tratamientos rápidos y potentes, así como la utilización inadecuada de antibióticos sin prescripción médica.

Otro caso que ha favorecido el desarrollo de resistencia bacteriana es el empleo de antibióticos en la industria agropecuaria y ganadera. Un mal uso de los antimicrobianos, ha dado lugar a mutaciones de resistencia en diversos patógenos.

Son los hospitales y, en especial, las unidades de cuidados intensivos las áreas con mayor generación y transmisión de bacterias resistentes a consecuencia del uso intenso de antibióticos aunado a un factor de riesgo siempre presente: las infecciones cruzadas. La reducción en el uso de antibióticos no es suficiente para poner freno al aumento de la resistencia, debido a que estos la promueven de manera diferente, según sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas, la biología del microorganismo, sus procesos de desarrollo de resistencia, y las condiciones del medio y del huésped.

Los antibióticos betalactámicos son los antimicrobianos más prescritos tanto en atención primaria como en hospitales. La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams e inhibidores de las beta-lactamasas. (fig. 1 y 3)

Los  $\beta$ -lactámicos ejercen su efecto inhibiendo la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana (fig. 2). Un mecanismo que las bacterias han desarrollado para presentar resistencia es la producción de  $\beta$ -lactamasa, una enzima que puede destruir el anillo betalactámico de los antibióticos tipo penicilinas, cefalosporinas y carbapenems.

Las cepas bacterianas que producen  $\beta$ -lactamasa de efecto extendido (BLEE), son clasificadas como multiresistentes a los betalactámicos, ya que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico, produciendo derivados ácidos carentes de actividad antibacteriana presentando vulnerabilidad a varias drogas y produciendo en el paciente un fallo terapéutico.

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son característicamente productoras de BLEE y son en el medio hospitalario la principal causa de infecciones nosocomiales, siendo *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, las principales bacterias productoras de esta enzima.

## 2. IMPORTANCIA

Las infecciones endémicas producidas por cepas con resistencia múltiple causan anualmente pérdidas económicas en los países en desarrollo por la prolongación de estancia hospitalaria así como la problemática situación de difícil manejo de estos microorganismos, siendo cada vez más complicada su eliminación.

Cada vez hay mayor número de organismos que manifiestan la presencia de betalactamasas de amplio espectro, y estas enzimas se presentan en mayores concentraciones, representando un serio problema en la salud del hombre. Este fenómeno debe atenderse de mayor manera en centros hospitalarios en donde no se lleva un debido control en la utilización de antibióticos.

En México se está evaluando la incidencia y prevalencia de este fenómeno para planear una efectiva solución, observando el patrón de resistencia bacteriana y ubicando el origen del mismo.

Por tal motivo creemos importante demostrar la incidencia de la enzima BLEE en base a la presencia de resistencia a cefalosporinas de 3ª y 4ª generación de acuerdo a las recomendaciones de la NCCLS, como respuesta a la utilización de antibióticos en este hospital y de acuerdo a esos resultados, replantear las recomendaciones sobre la terapéutica utilizada, como prevención a una mayor producción de cepas resistentes, que conlleva a estancia hospitalaria prolongada y por lo tanto una elevación en los costos de la atención médica.

### 3. ANTECEDENTES

El surgimiento de infecciones nosocomiales producidas por Enterobacterias multiresistentes se ha convertido en un problema importante de morbi-mortalidad en hospitales, donde el grupo de antibióticos frecuentemente usados para combatir estas infecciones son los  $\beta$ -lactámicos ( penicilinas y cefalosporinas) y el consumo excesivo e inadecuado de éstos ha propiciado la selección de cepas resistentes productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido originadas a partir de enzimas silvestres generalmente codificadas en plásmidos (Silva Sánchez 2002) .

Las BLEE, se consideran enzimas inducibles de difícil detección en el laboratorio. Son enzimas con un bajo nivel de expresión, pero que al contacto con el antibiótico en el paciente, se induce la producción de la enzima y de allí la resistencia observada y el consiguiente fallo terapéutico. Se les conoce como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido por su amplio rango de acción y de ser capaces de inactivar una gran variedad de antibióticos tales como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, ceftizoxima y aztreonam (Strulens J. 1998).

De este grupo de enzimas, se conocen varias categorías, cada una de ellas con diferente actividad antibiótica y su hallazgo es más frecuente en bacterias gram negativas. Varios autores sostienen que las cepas productoras de BLEE, deben ser consideradas como resistentes a todas las cefalosporinas y penicilinas aún cuando haya susceptibilidad in vitro (L. Herrera Marco 2002).

*Klebsiella pneumoniae* se puede aislar en un 77% de materia fecal cuando el paciente se encuentra hospitalizado, representando uno de los reservorios para la transmisión hospitalaria de la bacteria. Una característica de las cepas productoras de brotes nosocomiales es la resistencia a múltiples antimicrobianos; entre los perfiles de resistencia de *K. pneumoniae* productoras de infecciones nosocomiales se encuentran la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) generalmente acompañada de resistencia a otros antibióticos (Desimoni et al., 2004).

Las  $\beta$ -lactamasas son producidas tanto por bacterias gram negativas como por gram positivas, por bacterias aeróbicas facultativas y anaeróbicas. Las cepas bacterianas capaces de producir BLEE pueden ser clasificadas como multiresistentes, por lo que se aconseja que un bacilo gram negativo de tipo entérico con multiresistencia debiera estudiarse como posible productor de BLEE. Estas cepas pueden ser estudiadas usando métodos manuales o métodos automatizados. En el caso de los métodos manuales, está la técnica de discos usando inhibidores de  $\beta$ -lactamasa. Dentro de los métodos automatizados está el uso de las tarjetas GNS-120 en el sistema automatizado Vitek ambos de la casa BioMerieux (Herrera L. 2002).



La identificación de BLEES en cepas aisladas basadas en sus rasgos fenotípicos es difícil porque la resistencia (a cefalosporinas de espectro extendido y a aztreonam) de muchas cepas no es detectable con pruebas de susceptibilidad basadas en los criterios actuales de NCCLS.

Por lo tanto la NCCLS recomienda el uso de drogas indicadoras para BLEE: cefalosporinas de espectro extendido, por ejemplo; ceftazidima, o cefpodoxima para mostrar la potencial producción de BLEES en *E. coli* y *Klebsiella sp.* (Mauricio Sanguinetti, et al., 2002).

Un factor de riesgo para adquirir *K. pneumoniae* productora de BLEE es la duración de la estancia hospitalaria y la severidad de la enfermedad, el equipo utilizado, ventilación artificial, catéteres y cánulas así como el trabajo bajo presión de la enfermera. Es de particular interés conocer cuáles drogas están potencialmente asociadas a la producción de BLEE producidas por *K. pneumoniae* para determinar el tratamiento preferencial. (Schiappa et al., 1997).

En los años recientes ha aumentado la inquietud de que la era de los antibióticos está llegando a su fin debido en primer lugar porque la tasa de producción de nuevos agentes ha disminuido y en segundo lugar porque los virus, bacterias, hongos y protozoarios están mostrando una gran capacidad para la generación de mecanismos de evasión a la acción antimicrobiana de estas sustancias (Wise et al., 1998).

En los últimos años ocurrieron en hospitales del Reino Unido, brotes de infecciones o colonización con distintas cepas de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas por lo que se efectuó una investigación y se encontró la relación entre las betalactamasas de espectro extendido de la bacteria, el plásmido que la codifica y la resistencia que produce (Shannon 1998).

Muchos antibióticos son excretados del cuerpo humano en su forma activa, de esta manera las bacterias del medio ambiente entran en contacto con ellos. La resistencia puede ser transmitida no sólo verticalmente, de generación en generación, sino también mediante métodos horizontales de transferencia de genes, por ejemplo los plásmidos (Hart C A.1998).

En investigaciones realizadas para evaluar la resistencia antibiótica de los gram positivos y gram negativos aislados de hemocultivos, se pudo observar multiresistencia de enterococos, estafilococos con susceptibilidad reducida a vancomicina, y *K. pneumoniae* y *E. coli* no susceptibles o resistentes a cefalosporinas de amplio espectro (Sahm et al., 1999).

Cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina, antibiótico reservado para estas infecciones cuando ningún medicamento es efectivo, sugieren factores comunes como la modificación celular resultante de la exposición prolongada a vancomicina (Scott Gottlieb 1999).

Los organismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) han aparecido en clínicas y hospitales en los últimos años constituyendo un problema de salud pública grave. Las BLEE se derivan de enzimas TEM (nombre proveniente de Temoniera, paciente griega en quien primero se detectó) y sulfhidrilo por sustitución de uno o más aminoácidos (denominada SHV). La frecuencia de BLEE difiere según el área geográfica e institución de salud. El programa SENTRY16 las reporta con un 45% de frecuencia en Latinoamérica y solo 7% en los EEUU. En los EEUU, *Klebsiella* spp. productora de BLEE fue reportada hasta en un 34% (Saler HS, 1998).

BLEE son enzimas mutantes creadas por sustitución de uno o mas aminoácidos, la simplicidad de esta mutación en la enzima produce un marcado patrón de resistencia a los antibióticos. Muchos laboratorios reportan cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con una mínima concentración inhibitoria (MIC) de <8 mcg/mL como susceptible a ceftazidima, sin embargo cepas bacterianas con un MIC de 2-4 µg /mL pueden producir BLEE. La ceftazidima es la cefalosporina de amplio espectro mas susceptible a sufrir hidrólisis por las BLEE, por lo que cuando un antibiograma muestra resistencia a ceftazidima en un cultivo de *E. coli* o *K. pneumoniae* será sospechoso de presentar BLEE (Karam H. et al., 2000).

*K. pneumoniae* es uno de los bacilos Gram negativos resistentes a antibióticos más frecuentemente aislados a nivel hospitalario. Las cepas de esta especie presentan elevados niveles de resistencia, en especial a antibióticos de amplio espectro como son las cefalosporinas de 3ª. Generación y antibióticos aminoglicósidos, siendo su mecanismo de resistencia la síntesis de BLEE y enzimas modificantes de aminoglicósidos (Sanchez M. et al., 2006).

La resistencia a agentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacilos gramnegativos es principalmente mediada por  $\beta$ -lactamasas. Una variedad de estas enzimas han sido descritas, las enzimas TEM y SHV son frecuentemente observadas entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Mutaciones en los genes que codifican para TEM y SHV pueden extender el espectro de su actividad también para, cefalosporinas de espectro extendido (ESCs) por ej. ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) y ceftriaxona(CRO). Algunas  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC son codificadas por plásmidos mostrando también alto nivel de resistencia a cefalosporinas.

La definición original de que ésta constituía una BLEE fue principalmente por los sustratos hidrolizados de la enzima, recientemente el término BLEE ha sido limitado para aquellas  $\beta$ -lactamasas que son inhibidas por ácido clavulánico (CA).

La confirmación de presencia de BLEE por inhibición producida por CA puede ser difícil en algunas cepas, no solo porque la actividad de la  $\beta$ -lactamasas varía con diferentes sustratos, sino también porque algunos microorganismos pueden contener mecanismos de resistencia adicional que enmascaran la actividad de las BLEEs (D. Steward Chistine, 2001).

Enzimas modificadoras de antibióticos: Las  $\beta$ -lactamasas, grupo importante de enzimas reconocedoras de penicilina, clase conocida como  $\beta$ -lactamasas y las proteínas fijadoras de penicilina tienen un origen evolutivo común. Para ejercer su función, ambas clases de compuestos deben interactuar con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El mecanismo de acción tanto de las  $\beta$ -lactamasas como de las transpeptidasas fijadoras de penicilina, es la ruptura de un puente amida por un mecanismo de acilación enzimático. (W. Koneman E, 2001)

El análisis molecular mediante enzimas de restricción de los plásmidos contenidos en bacterias de brotes intrahospitalarios señalan complejas vías de transmisión. Se han descrito plásmidos que codifican  $\beta$ -lactamasas tipo SHV (manera de identificación de acuerdo a su expresión genética) como medio importante para la dispersión de BLEE (Garza Ramos 2003).

Las  $\beta$ -lactamasas producidas por las bacterias protegen a ésta contra los efectos letales de penicilinas y cefalosporinas, sobre la síntesis de la pared celular, produciendo por lo tanto resistencia antibiótica. Una variedad de  $\beta$ -lactamasas son los tipos; A, B, C y D de acuerdo a la homología de sus aminoácidos son comúnmente encontradas en *K. pneumoniae* y *E. coli*. (Hoon S. 2003).

Las BLEE son megaplásmidos transferibles (>100 Kda), que codifican frecuentemente resistencia cotransferida a aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol; estos megaplásmidos se diseminan rápidamente en ambientes hospitalarios entre diferentes especies bacterianas. Es una enzima mediada por un plásmido y se deriva de una mutación sufrida por otras beta lactamas (Barom E.J. 1999).

Las BLEE están codificadas por estos elementos móviles y pueden ser adquiridas de enterobacterias resistentes a múltiples antibióticos como *K. pneumoniae* y *E. coli*. Los bacilos gram negativos son patógenos nosocomiales oportunistas y son particularmente importantes en neumonía asociada a ventilador, infecciones urinarias, bacteriemias y en infecciones de herida (Pedro Martínez 2003).



Las betalactamasas producidas por las bacterias son enzimas que protegen contra el efecto letal de penicilinas, cefalosporinas o monobactams sobre la síntesis de la pared celular. La producción de  $\beta$ -lactamasas es el mecanismo responsable de la resistencia a los betalactámicos de las cepas clínicas aisladas de la familia *Enterobacteriaceae*. Una variedad de betalactamasas han sido clasificadas en diferentes clases A, B, C y D. Las BLEEs son enzimas clavulanato-susceptibles que confieren alta resistencia a penicilinas, aztreonam y cefalosporinas (con excepción de cefamicinas) y son detectadas comúnmente in *K. pneumoniae* y *E. coli*. Estas enzimas son frecuentemente mediadas por plasmidos y muchos mutantes de las subclases de enzimas TEM y SHV (clase A), con uno o mas aminoácidos sustituidos alrededor del sitio activo (Young H Kim, 2004).

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas, la importancia de las enterobacterias como agentes causales más frecuentes y el surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos son factores que concurren en uno de los mayores problemas de la medicina actual y del futuro: la multiresistencia.

De 1997 a 1999 se obtuvieron en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 13800 cepas de enterobacterias, entre las cuales se identificaron y caracterizaron las portadoras de BLEE y cefamicinasas. En función al patrón de resistencia por la técnica de difusión en disco y la posterior caracterización fenotípica y genotípica de las b-lactamasas, se identificaron 35 cepas de *Escherichia coli* (0.45% de las cepas aisladas de esta especie bacteriana) y 9 de *Klebsiella pneumoniae* (1.83%), portadoras de las enzimas investigadas. Además del patrón de resistencia, la caracterización incluyó ensayos de sinergia e identificación del gen respectivo mediante PCR (Aliaga Roxana, 2001).

## **ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS:**

Un anillo betalactámico define a esta familia de antibióticos. Se han originado diferentes grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactanes e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

Las penicilinas contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, las cefalosporinas tienen el anillo betalactámico más un anillo de 6 dihidrotiazina. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas (fig. 1).

### **CEFALOSPORINAS:**

Son antibióticos semisintéticos utilizados por su alta eficiencia y efectos colaterales mínimos, derivados de la Cefalosporina C, una sustancia producida por el hongo *Cephalosporium acremonium*.

Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona.

### **MONOBACTÁMICOS:**

Aztreonam derivado del *Chromobacterium violaceum*, un betalactámico monocíclico, su actividad se asemeja a la de los aminoglucósidos.

## CARBAPENEMS:

Imipenem es un carbapenémico derivado del *Streptomyces cattleya* con un rango amplísimo de actividad antimicrobiana, es resistente a las  $\beta$ -lactamasas de los gramnegativos y grampositivos, en particular aquellas mediadas por plásmidos.

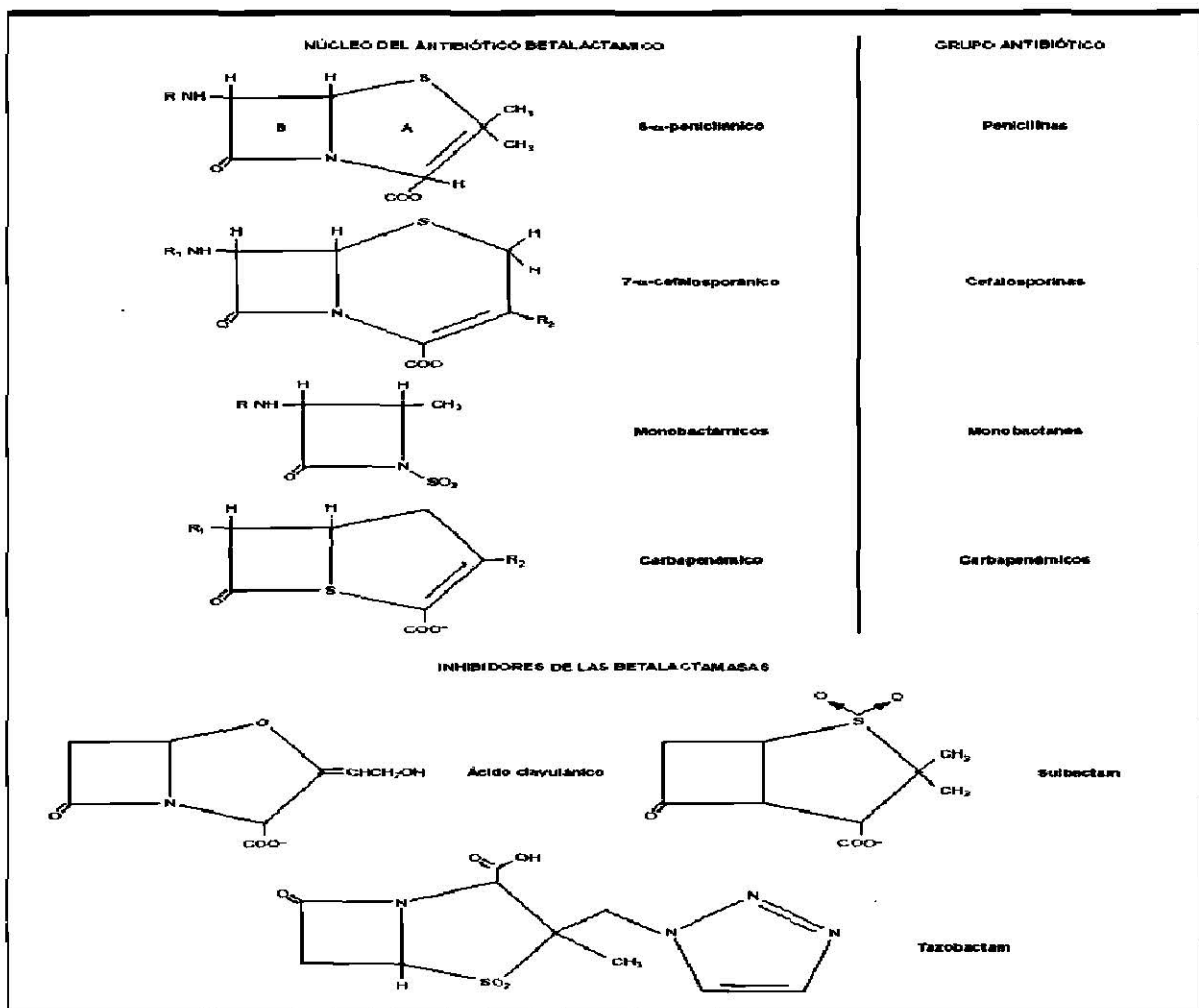


Figura 1. Estructura química de los betalactámicos

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS

Son agentes bactericidas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen un efecto autolítico. La pared celular de las bacterias gram negativas es el resultado de la unión mediante enlaces transversales de 2 cadenas de peptidoglicanos (transpeptidación) fig.2.

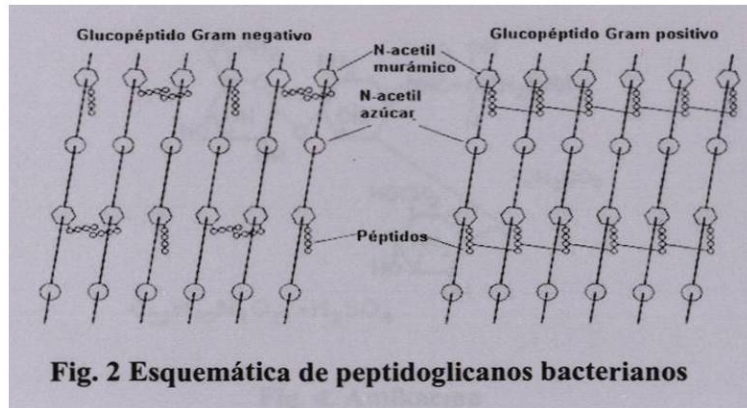


Fig. 2 Esquemática de peptidoglicanos bacterianos

Los betalactámicos inhiben la transpeptidación de este modo la pared se debilita y se rompe por la presión osmótica intracelular, activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (fig.3).

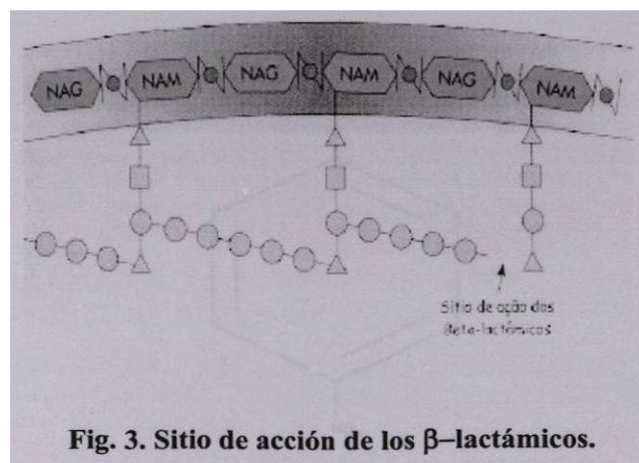


Fig. 3. Sitio de acción de los  $\beta$ -lactámicos.

## AMINOGLUCÓSIDOS

Inductor de error de lectura del RNA-mensajero con producción de una proteína anómala, la cual unido a las alternativas funcionales de la membrana, (induce fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales) produce la muerte bacteriana (fig. 4).

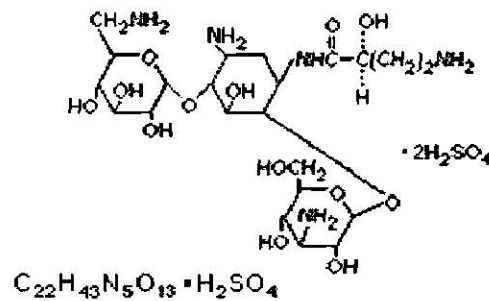


Fig. 4. Amikacina

## SULFAMIDAS

Trimetropin con sulfametaxol, efecto bacteriostático, su mecanismo de acción; funcionan como análogos de metabolitos, actuando como inhibidores competitivos respecto de cierta enzima (fig. 5).

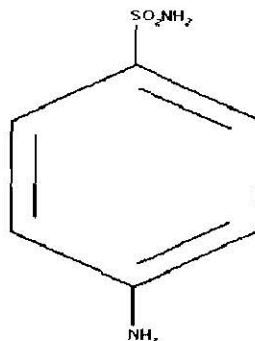


Fig. 5 Estructura química de la Sulfamida.

## NITROFURANOS.

Son drogas sintéticas derivadas del furano núcleo químico al que se le ha añadido un grupo nitro creando un nitrofurano, interfieren en el sistema enzimático regulador de mecanismos oxidativos y glucolíticos esenciales para el crecimiento bacteriano (fig.6).

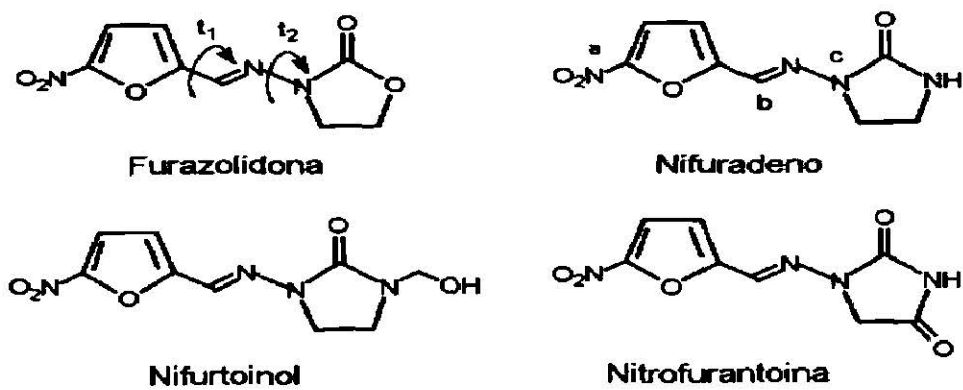


Fig. 6 Estructura química de los Nitrofuranos

#### **4. HIPÓTESIS**

La enzima *betalactamasa* de espectro extendido se encuentra frecuentemente en *E. coli* y *K. pneumoniae* y es responsable de la resistencia a diversos antibióticos  $\beta$ lactámicos.



## **5. OBJETIVO**

Determinar el grado de resistencia a los antibióticos betalactámicos y no betalactámicos en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de muestras de diversas procedencias de pacientes de la Unidad Médica de Altas Especialidades (UMAE) # 34 IMSS.

## **6. MATERIAL**

### **6.1. - MATERIAL BIOLÓGICO:**

*E. coli* ATCC 25922

*K. pneumoniae* ATCC 700603

Muestras de sangre

Muestra de orina

Muestras de expectoración bronquial

Muestras de secreción de heridas

Puntas de catéteres venosos

### **6.2. - MATERIAL DE LABORATORIO:**

Frascos de vidrio para urocultivos

Frascos para hemocultivos Bact-Alert

Frascos para muestras bronquiales o de expectoración

Placas preelaboradas con medio Muller Hinton 150mm

Tarjetas GNI para sistema Vitek

Tarjetas de pruebas bioquímicas para identificación BBL cristal

Sensidiscos de antibióticos específicos para determinar resistencia bacteriana mediante antibiograma

### **6.3. - EQUIPO MANUAL Y AUTOMATIZADO:**

Organon Teknika Bact-Alert 120 (incubadora de hemocultivos)

Sistema de identificación bacteriano automatizado Vitek

Sistema semiautomatizado BBL cristal panel Viewer

BBI Self Tamping Dispenser (dispensador de sensidiscos)

Estufa para incubación

Vitek colorimetrer HACH Company (Nefelómetro)

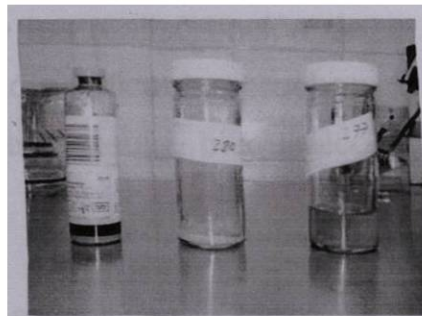
Portable Light Box Apollo (Lámpara fluorescente)

Calibrador Vernier (marca Scala)

## 7. MÉTODO

### 7.1.- ETAPA DE RECEPCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Mediante colaboración del departamento de bacteriología de UMAE # 34 se realizó la recepción de 906 muestras para cultivo de diversas procedencias; pacientes externos y encamados de los diferentes servicios hospitalarios; urocultivo, hemocultivos, cultivos de secreción bronquial, cultivo de punta de catéter y cultivo de herida.



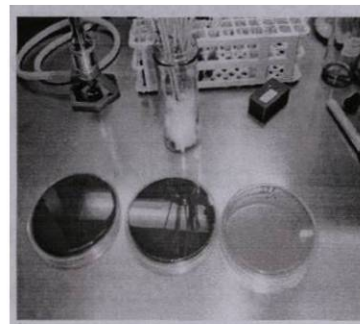
Los medios de cultivo que se utilizaron para cada tipo de muestra fueron:

Urocultivo; agar sangre (AS), agar azida (AZ) y Mc. Conkey (MC).

Hemocultivos; AS, agar chocolate, manitol, MC.

Cultivo de secreción bronquial; AS, agar chocolate, MC, manitol, Mueller Hinton (HM)

Punta de catéter; AS, manitol y MC.

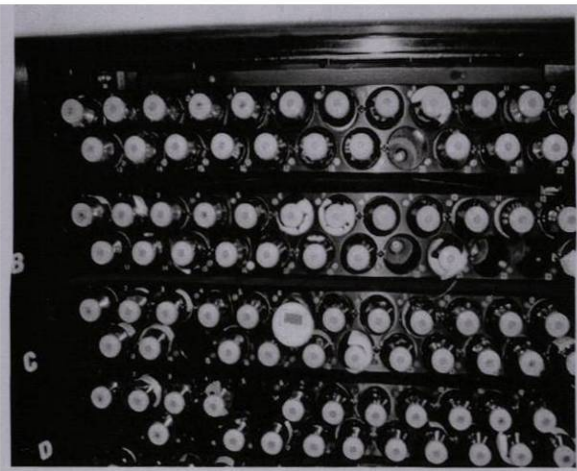


Se inoculó en los medios de cultivos correspondiente a cada tipo de muestra y se incubaron a una temperatura de 37° C por 24 h excepto los hemocultivos que se incubaron durante un máximo de 15 días o antes si captaba positiva la muestra.

## 7.2.- IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Se analizó todo tipo de muestra enviada al laboratorio cuyo cultivo fue positivo, excepto en cultivos de orina o de puntas de catéteres en donde se tomaron en cuenta si el crecimiento fue de 100,000 ó más gérmenes en el primer caso y en el segundo, se tuvo como positivo todo crecimiento de 15 unidades formadoras de colonias o más.

Las placas que presentaron crecimiento a las 24 horas se les realizó tinción de Gram para detectar los bacilos gram negativos, y se procedió a aplicar las pruebas confirmatorias para *E. coli* y *K. pneumoniae* mediante sistema bioquímico convencional o automatizado. (23)

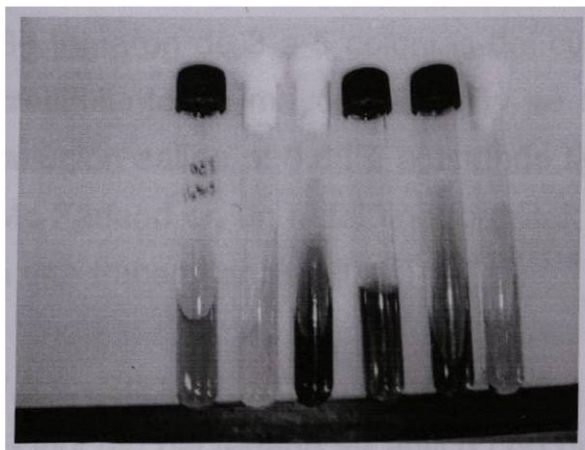


Con respecto a los hemocultivos la forma de identificación se llevó a cabo mediante la reacción positiva que muestre el Sistema Bact/Alert, este sistema utiliza un sensor colorimétrico y una luz reflejada para monitorear la presencia y producción de CO<sub>2</sub>, disuelto en el medio de cultivo. Cuando existen microorganismos en la muestra, éstos generan CO<sub>2</sub> metabolizando los

substratos del medio de cultivo, el color del sensor gas-permeable del fondo del frasco cambia de verde a amarillo, lo que activa el sensor de la incubadora para encender el foco correspondiente a la celda en que se encuentra el frasco positivo.

De este frasco se tomó una muestra y se inoculó en los medios correspondientes, conjuntamente se realizó una tinción gram y al identificarse como gram negativo se realizaron pruebas bioquímicas convencionales. Se consideró identificación positiva para *E. coli* cuando se cumplieron los siguientes criterios: pruebas de fermentación de lactosa y glucosa, producción de indol, movilidad y descarboxilación de la lisina, positivas.

Para identificación de *K. pneumoniae*: positividad en utilización de citrato y malonato, producción de ureasa, descarboxilación de la lisina, fermentación de lactosa y sacarosa. Al comprobarse e identificarse el microorganismo específico se realizó una resiembra en agar sangre colocándose en ambiente de CO<sub>2</sub> donde se incubó a 37° C por 24 h con el objetivo de obtener un cultivo axénico.



Las pruebas bioquímicas automatizadas se realizaron de acuerdo al material disponible: en el caso de las tarjetas del sistema Vitek: esta técnica se aplicó primordialmente a las muestras de hemocultivos y a aquellas muestras positivas que no se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales. (23)

#### Sistema de identificación BBL Cristal

Este método se utilizó en todas las muestras de cultivos, estipulando que en caso de una identificación mediante este sistema se procedió además a realizarse pruebas bioquímicas convencionales.

#### **7.3.- PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR PARA PROBAR LA EXISTENCIA DE BLEE.**

Para determinar la MIC y el grado de susceptibilidad a antibióticos se realizó el método de acuerdo a estándares establecidos por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (19)



### **7.3.1.- PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CON MEDIO DE CULTIVO**

Se utilizó el agar Müeller-Hinton, preelaborado en placas de 150mm de diámetro marca Becton Dickinson de México S.A. las cuales fueron adquiridas en una casa comercial.

### **7.3.2.- PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

Se tomaron de 3 a 5 colonias del cultivo contenido en medio agar sangre con un crecimiento no mayor de 24h y se hizo una suspensión en tubos con 3 mL de solución salina al 0.85% ajustando la densidad óptica al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland en un nefelómetro (Vitek colorimetrer HACH Company), éste equivale a una transmitancia 80 %.

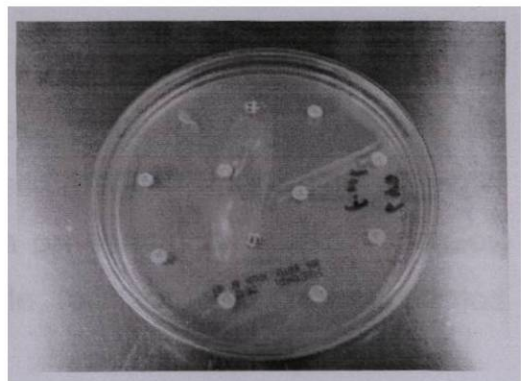
### **7.3.3.- SIEMBRA DEL INÓCULO**

El inóculo bacteriano se aplicó con un hisopo estéril sobre la superficie de placas Petri se rayó sobre la superficie del medio de cultivo de forma tal que se logre un crecimiento confluyente.

### **7.3.4.- APLICACIÓN DE LOS SENSIDISCOS**

En cuanto al antibiótico, las consideraciones fueron las siguientes: discos de papel impregnados con una concentración estimada en estándares establecidos NCCLS (19)

La colocación de los discos con los antibióticos específicos para cada cepa se realizó después de inocular las placas en un plazo no mayor de 15 minutos, con la ayuda de un dispensador automático de sensidiscos. Por último se procedió a la incubación de las placas a una temperatura de 37° C por 24 h.



Los paneles de antibióticos utilizados en cultivos positivos para *E. coli* fueron:  
AMIKACINA (AMIK) 30µg, AMPICILINA (AMPI) 10µg, CEFEPIME (FEP) 30 µg,  
CEFTAZIDIMA (CAZ) 30 µg, CEFTRIAXONA (CRO) 30 µg, GENTAMICINA  
(GENTA) 10 µg, IMIPENEM (IMP) 10 µg, NITROFURANTOINA (FUR) 300 µg,  
PIPERACILINA/TAZOBACTAM (PTA) 100/10µg,  
TRIMETOPRIM/SULFAMETHAXOL (SXT) 25 µg, AMPICILINA/SULBACTAM  
(AMS) 20 µg.

Los paneles de antibióticos utilizados en cultivos positivos para *K. pneumoniae* fueron:

AMIKACINA (AMIK) 30µg, CEFEPIME (FEP) 30 µg, CEFTAZIDIMA (CAZ) 30 µg,  
CEFTRIAXONA (CRO) 30 µg, GENTAMICINA (GENTA) 10 µg, IMIPENEM (IMIP)  
10 µg, NITROFURANTOINA (FUR) 100 µg, PIPERACILINA/TAZOBACTAM (PTA)  
100/10µg, AZTREONAM (ATM) 30 µg, TRIMETOPRIM/SULFAMETHOXAZOL  
(SXT) 25 µg.

### **7.3.5.- LECTURA PARA DETERMINAR BLEE**

La evaluación de los halos se realizó a las 24h colocándose las placas inoculadas sobre una lámpara fluorescente; la medición se efectuó manualmente con calibrador Vernier y se tomó como positivo para la presencia de BLEE aquellos halos cuyo diámetro fue menor a los límites de las zonas control de los antibióticos utilizados.



Criterio para determinar la presencia de BLEE según la medida del halo de inhibición de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos clave: CAZ y CRO.

ANTIBIÓTICO	CLAVE	Inhibición en mm
CEFTAZIDIMA	CAZ	22 ó <
CEFTRIAXONA	CRO	25 ó <

## 8.-RESULTADOS

La recopilación de datos se tomó en base al análisis de las muestras procesadas positivas para *K. pneumoniae* y *E. coli* y a la medición de los halos durante la lectura de los antibiogramas.

En la tabla 1 se puede observar las lecturas de los halos de inhibición mostrados por *Klebsiella pneumoniae* aislada de las diferentes muestras (31), en negritas 9 cepas resistentes a los 2 antibióticos indicadores, CAZ y CRO

MUESTRA	Servicio Hosp.	AMIKA 15-16	ATM 276< 16-21	FEP 15-17	CAZ 226< 15-17	CRO 256< 14-20	GENTA 13-14	IMIP 14-15	FUR 15-16	PTA 18-20	SXT 11-15
1.Bronquial	UCIN	20	28	28	25	25	19	25	19	24	24
2.Urocultivo	5º.piso	19	0	31	27	26	17	26	15	24	23
3.Bronquial	UCI	20	28	28	25	25	19	25	19	24	24
4.Bronquial	UCIN	16	7	26	18	15	15	24	23	20	28
5.Expectoración.	C.Ext.	19	0	31	27	28	20	23	14	27	24
6. Hemocultivo	UCI	19	0	30	28	29	21	26	16	26	27
7.Hemocultivo	UCIP	20	0	32	29	30	22	23	0	29	26
8.Hemocultivo	UCIN	19	0	33	31	35	21	24	18	29	30
9.Bronquial	UCI	20	6	22	10	12	19	25	16	22	6
10Bronquial	UCIP	20	7	21	9	13	6	26	18	22	27
11Hemocultivo	UCIR	16	6	13	6	6	18	25	15	15	6
12Bronquial	UCI	15	10	23	11	14	21	25	16	21	6
13Urocultivo	C. Ext.	18	31	28	28	29	20	26	17	21	24
14Bronquial	4º.piso	20	32	30	28	28	22	26	17	22	16
15Urocultivo	5º.piso	21	35	31	29	28	21	26	17	22	16
16Expectoración	4º.piso	20	33	20	29	31	19	28	22	25	29
17Urocultivo	5º.piso	20	33	28	30	27	22	29	18	19	17
18Expectoración	4º.piso	19	35	31	27	28	20	28	19	22	24
19.Hemocultivo	UCIP	111	6	19	6	11	18	28	20	23	21
20Urocultivo	UCC	20	32	30	27	28	20	23	16	22	24
21Hemocultivo	UCIP	12	7	21	8	13	16	27	20	20	21
22Hemocultivo	UCIP	11	6	20	20	12	16	26	19	20	22
23Expectoración	5º.piso	20	32	30	26	28	20	18	19	23	6
24Expectoración	C. Ext	20	0	30	27	25	19	21	12	27	26
25Catéter	UCC	18	0	29	26	27	17	18	16	24	6
26Expectoración	4º.piso	20	34	33	30	30	20	0	22	27	29
27Bronquial	4º.piso	19	27	28	26	27	19	26	17	23	25
28Urocultivo	UCIN	20	19	0	32	29	23	20	29	22	29
29Urocultivo	C.Ext.	21	21	0	33	29	22	20	30	22	28
30Urocultivo	3º.piso	20	6	0	33	30	30	19	29	24	29
31Urocultivo	3º.piso	11	6	0	13	6	6	14	23	22	17

UCIN=Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal; UCI=Unidad de Cuidados Intensivos Adultos; UCIP=Unidad de Cuidados Intensivos Pediatricos; UCIR=Unidad de Cuidados Intensivos Respiratorios; UCC=Unidad de Cuidados Coronarios

**Tabla No. 1.- Antibiograma y lectura medida en mm de halos de inhibición, en *K. pneumoniae***

La tabla 2 muestra 3 cepas (de 12) con susceptibilidad en uno de los antibióticos indicadores y de acuerdo a los criterios establecidos la resistencia debe presentarse en los dos antibióticos, por lo que se tomaran como positivas para BLEE solo 9 cepas de *K. pneumoniae* (marcado en negritas).

MUESTRA	SERVICIO HOSPIT.	AMIKA 15-16	ATM 276< 16-21	FEP 15-17	CAZ 22°< 14-20	CRO 256< 14-20	GENT A 13-14	IMIP 14-15	FUR 15-16	PTA 18-20	SXT 11-15
1.Bronquial	UCIN	20	28	28	25	<b>25</b>	19	25	19	24	24
3.Bronquial	UCI	20	28	28	25	<b>25</b>	19	25	19	24	24
4.Bronquial	UCIN	16	7	26	<b>18</b>	<b>15</b>	15	24	23	20	28
9.Bronquial	UCI	20	6	22	<b>10</b>	<b>12</b>	19	25	16	22	6
10.Bronquial	UCIP	20	7	21	<b>9</b>	<b>13</b>	6	26	18	22	27
11.Hemocultivo	UCIR	16	6	13	<b>6</b>	<b>6</b>	18	25	15	15	6
12Bronquial	UCI	15	10	23	<b>11</b>	<b>14</b>	21	25	16	21	6
19.Hemocultivo	UCIP	111	6	19	<b>6</b>	<b>11</b>	18	28	20	23	21
21Hemocultivo	UCIP	12	7	21	<b>8</b>	<b>13</b>	16	27	20	20	21
22Hemocultivo	UCIP	11	6	20	<b>20</b>	<b>12</b>	16	26	19	20	22
24Expectoración	C.Ext	20	0	30	27	<b>25</b>	19	21	12	27	26
31Urocultivo	3º.piso	11	6	0	<b>13</b>	<b>6</b>	6	14	23	22	17

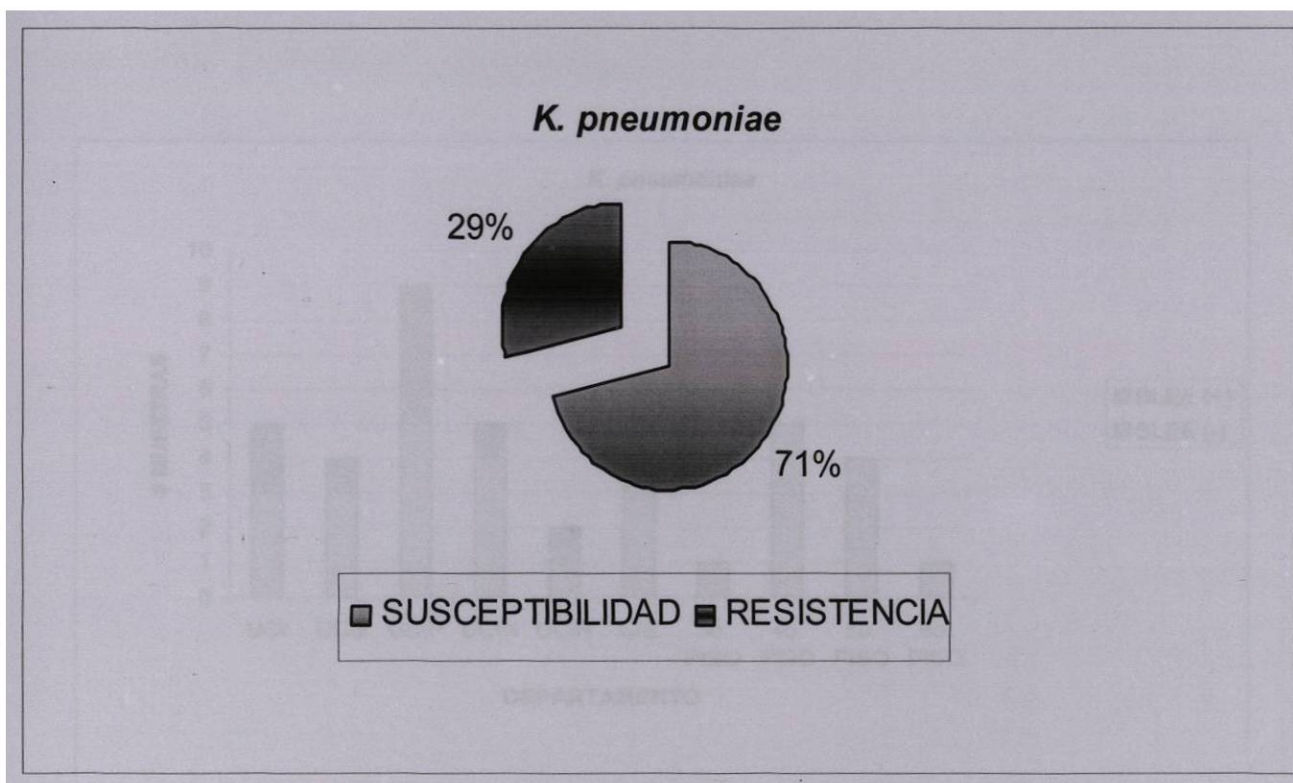
Tabla 2.- Antibiogramas cuya lectura muestra la resistencia de *K. pneumoniae* a los antibióticos indicadores (CAZ y CRO)

En la tabla 3 se muestra la existencia de cepas bacterianas que presentan BLEE y la notable resistencia a otros betalactámicos como el AZTREONAM (ATM), aun cuando muestre sensibilidad ante otros antibióticos *in vitro*, como IMIPENEM (IMIP), se debe considerar que habrá resistencia en la terapéutica del paciente.

Antibióticos	% Resistencia	%Susceptibilidad Intermedia	% Susceptibilidad
AMIKA	67	22	11
<b>ATM</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
FEP	22	0	78
<b>CAZ</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CRO</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
GENTA	22	0	78
<b>IMIP</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>89</b>
FUR	11	33	67
PTA	11	33	56
SXT	33	0	67

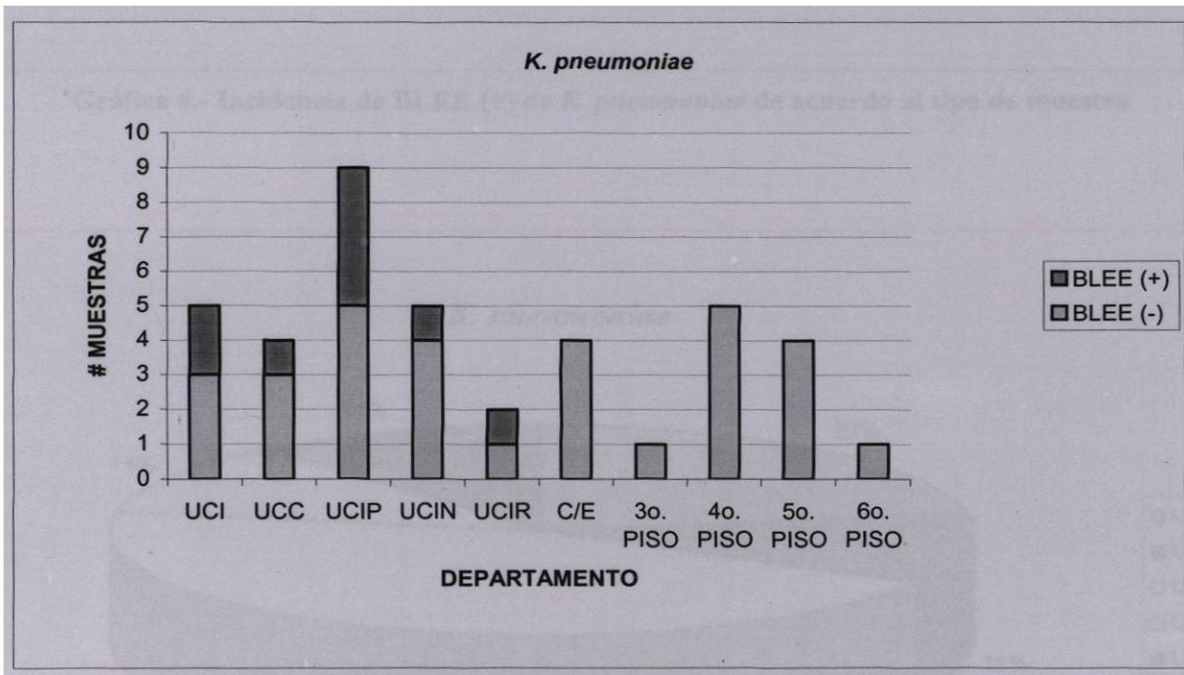
Tabla 3. Relación de resistencia y sensibilidad de las 9 cepas con BLEE (+) en *K. pneumoniae* y el comportamiento ante otros antibióticos.

La gráfica 1 muestra la presencia de BLEE en *K. pneumoniae* mediante la resistencia a antibióticos indicadores CAZ y CRO, cabe mencionar que el porcentaje de resistencia mostrado (29%), solo se manifestó en las áreas de cuidados intensivos y el 71% reportado se refiere a las muestras de los otros servicios hospitalarios.



**Gráfica 4.- Porcentaje de resistencia de *K. pneumoniae* a antibióticos indicadores en las diferentes áreas de cuidados intensivos.**

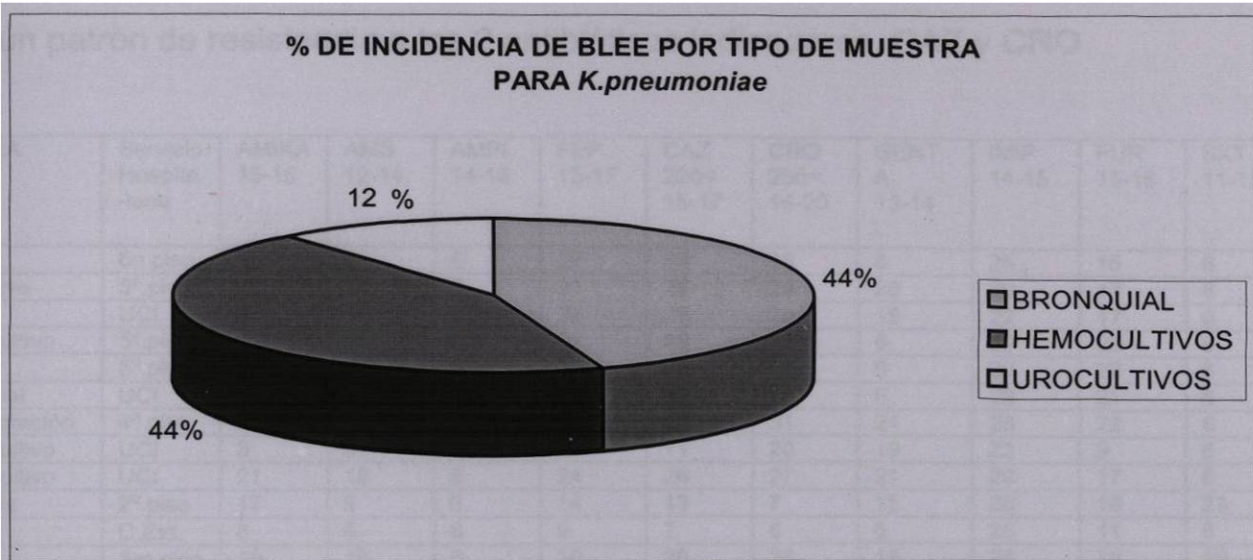
La gráfica 2 refleja las cepas productoras de esta enzima en las áreas de Cuidados Intensivos: se reportaron cepas productoras de BLEE (+) en *K. pneumoniae* en el orden siguiente: en UCI 2 de 5 cepas aisladas; en UCC 1 de 4; en UCIP 4 de 9 cepas aisladas; en UCIN 1 de 5 y en UCIR 1 de 2 cepas que se aislaron, mientras que en los restantes servicios hospitalarios, las cepas de *K. pneumoniae* no mostraron producción de BLEE. Esta gráfica también muestra la alta incidencia que se presenta en las áreas pediátricas con respecto a cepas productoras de esta enzima.



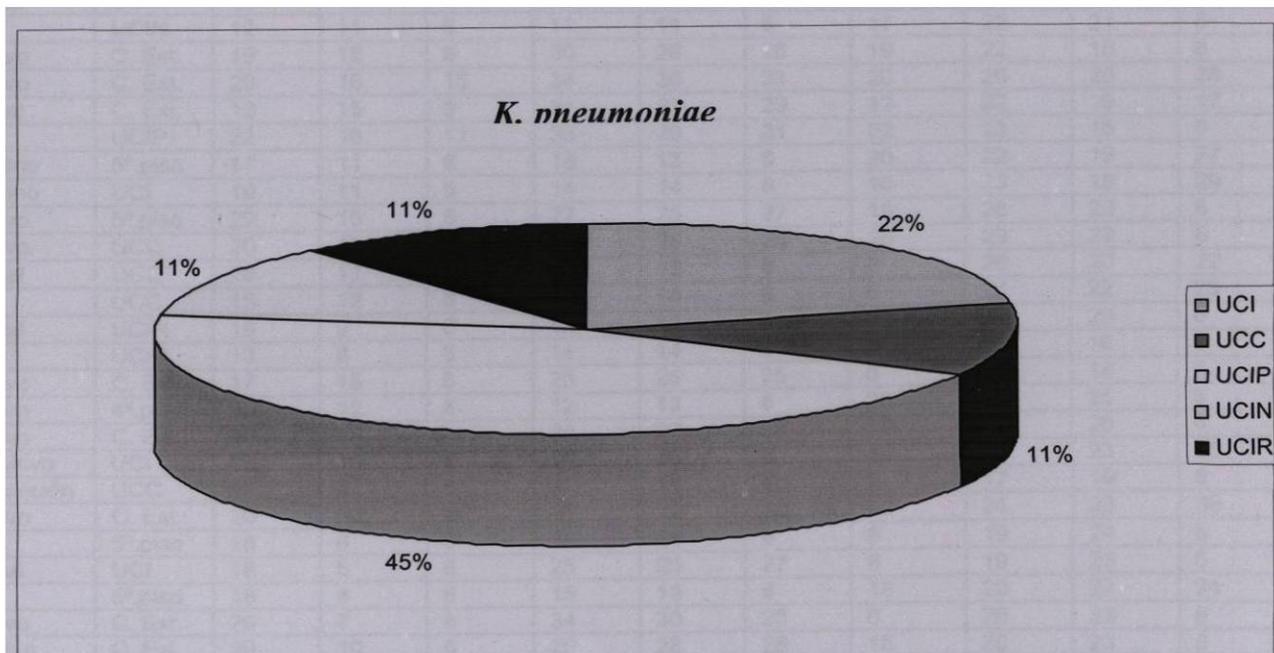
Gráfica 5.- Incidencia de *K. pneumoniae* con BLEE (+) en áreas de Cuidados Intensivos



La incidencia de las bacterias con BLEE es característica en hemocultivos y cultivos de secreción bronquial como se observa en la gráfica 3.



Gráfica 6.- Incidencia de BLEE (+) de *K. pneumoniae* de acuerdo al tipo de muestra



Gráfica 4.- Porcentaje de incidencia de BLEE en *K. pneumoniae* por Servicios.

En la gráfica 4 se demuestra una alta prevalencia de *K. pneumoniae* en servicios de Cuidados Intensivos.

En la tabla 4 se describen las lecturas de los halos de inhibición mostrados por *Escherichia coli* aislada de las diferentes muestras y de las cepas que presentan un patrón de resistencia a los 2 antibióticos indicadores, CAZ y CRO

MUESTRA	Servicio Hospita-lario	AMIKA 15-16	AMS 12-14	AMPI 14-16	FEP 15-17	CAZ 22ó< 15-17	CRO 25ó< 14-20	GENT A 13-14	IMIP 14-15	FUR 15-16	SXT 11-15	PTA 18-20
1.Catéter	6o.piso	18	6	6	27	<b>19</b>	<b>16</b>	6	25	16	6	23
2.Urocultivo	5º.piso	20	16	6	31	28	29	20	29	17	6	25
3.Herida	UCI	18	15	6	27	25	26	19	22	17	6	25
4.Hemocultivo	5º.piso	19	15	6	32	29	30	6	29	22	6	27
5.Catéter	5º.piso	20	16	6	35	30	31	6	30	22	6	27
6.Bronquial	UCI	22	14	6	32	29	30	6	29	21	6	25
7.Expectoración	4º.piso	21	16	6	33	30	31	21	28	22	6	27
8.Hemocultivo	UCI	6	6	6	23	<b>11</b>	<b>20</b>	19	22	9	6	30
9.Hemocultivo	UCI	21	16	6	24	26	27	21	29	17	6	18
10Prótesis	2º.piso	17	6	6	14	<b>13</b>	<b>7</b>	15	26	18	23	19
11Herida	C.Ext.	6	6	6	9	<b>7</b>	<b>6</b>	6	26	11	6	19
12Herida	3er.piso	19	16	6	30	26	28	18	28	19	19	24
13Urocultivo	UCI	19	16	6	30	28	29	10	24	23	26	28
14Bronquial	UCI	6	15	6	34	29	31	10	25	23	27	28
15Urocultivo	C. Ext.	18	16	6	32	30	30	19	25	21	6	27
16Urocultivo	C.Ext.	18	16	6	31	28	30	20	25	16	6	27
17Bronquial	UCIN	11	10	6	12	<b>11</b>	<b>6</b>	17	24	21	6	22
18Catéter	UCIN	12	11	6	11	<b>11</b>	<b>6</b>	17	22	21	6	20
19Urocultivo	C. Ext.	19	15	6	30	26	28	19	22	15	6	25
20Urocultivo	C. Ext.	20	16	15	34	30	31	20	26	20	26	30
21Bronquial	C. Ext.	18	15	9	31	27	29	19	22	19	17	27
22Pleural	UCIP	22	16	11	33	29	31	22	23	15	0	26
23Mediastino	5º.piso	17	11	6	16	<b>13</b>	<b>6</b>	20	22	19	27	18
24Mediastino	UCI	19	11	6	14	<b>14</b>	<b>6</b>	10	23	19	29	22
25Urocultivo	5º.piso	29	15	6	27	25	27	19	26	20	6	24
26Urocultivo	UCC	20	15	6	31	28	28	20	29	22	6	24
27Bronquial	UCC	16	11	6	11	<b>13</b>	<b>6</b>	6	26	20	22	20
28Catéter	UCC	15	12	6	12	<b>14</b>	<b>6</b>	6	27	22	23	21
29Bronquial	UCIR	19	9	6	12	<b>13</b>	<b>6</b>	6	28	20	6	20
30Catéter	UCIP	13	6	6	14	<b>14</b>	<b>6</b>	8	23	16	6	15
31Urocultivo	C. Ext.	17	15	6	28	25	25	6	25	18	6	24
32Urocultivo	4º.piso	20	12	6	12	<b>12</b>	<b>6</b>	20	32	25	6	22
33Urocultivo	C. Ext.	20	16	6	30	27	28	19	28	20	6	29
34Hemocultivo	UCI	18	16	6	15	<b>16</b>	<b>6</b>	19	28	23	25	18
35Expectoración	UCC	17	6	6	8	<b>11</b>	<b>6</b>	6	17	19	6	19
36Urocultivo	C. Ext.	20	10	6	33	29	30	20	21	23	30	26
37Herida	5º.piso	18	6	6	15	<b>16</b>	<b>6</b>	6	19	24	6	22
38Bronquial	UCI	18	6	6	25	25	27	6	19	23	6	17
39Herida	5º.piso	18	8	6	15	<b>15</b>	<b>6</b>	18	20	22	24	22
40Urocultivo	C. Ext.	20	7	6	34	30	28	0	20	23	6	23
41.Urocultivo	C. Ext.	20	10	6	26	28	28	18	20	23	6	22
42Hemocultivo	5º.piso	21	0	6	24	29	31	22	28	22	6	29

Tabla No. 4.- Antibiograma y lectura de medidas en mm de halos de inhibición, en *E. coli* en los diferentes tipos de muestra.

\* Los números en negrita representan las cepas productoras de BLEE



En la tabla 5 se muestra el patrón de las cepas aisladas de *E. coli* para BLEE (+) dada por la resistencia a los dos antibióticos indicadores (CAZ, CRO) sin excepción.

MUESTRA	Servicio Hospitalario	AMIKA 15-16	AMS 12-14	AMPI 14-16	FEP 15-17	CAZ 226< 15-17	CRO 256< 14-20	GENTA 13-14	IMIP 14-15	FUR 15-16	SXT 11-15	PTA 18-20
1.Catéter	6o.piso	18	6	6	27	19	16	6	25	16	6	23
8.Hemocultivo	UCI	6	6	6	23	11	20	19	22	9	6	30
10Prótesis	2º.piso	17	6	6	14	13	7	15	26	18	23	19
11Herida	C.Ext.	6	6	6	9	7	6	6	26	11	6	19
17Bronquial	UCIN	11	10	6	12	11	6	17	24	21	6	22
18Catéter	UCIN	12	11	6	11	11	6	17	22	21	6	20
23Mediastino	5º.piso	17	11	6	16	13	6	20	22	19	27	18
24Mediastino	UCI	19	11	6	14	14	6	10	23	19	29	22
27Bronquial	UCC	16	11	6	11	13	6	6	26	20	22	20
28Catéter	UCC	15	12	6	12	14	6	6	27	22	23	21
29Bronquial	UCIR	19	9	6	12	13	6	6	28	20	6	20
30Catéter	UCIP	13	6	6	14	14	6	8	23	16	6	15
34Hemocultivo	UCI	18	16	6	15	16	6	19	28	23	25	18
35Expectoración	UCC	17	6	6	8	11	6	6	17	19	6	19
37Herida	5º.piso	18	6	6	15	16	6	6	19	24	6	22
39Herida	5º.piso	18	8	6	15	15	6	18	20	22	24	22

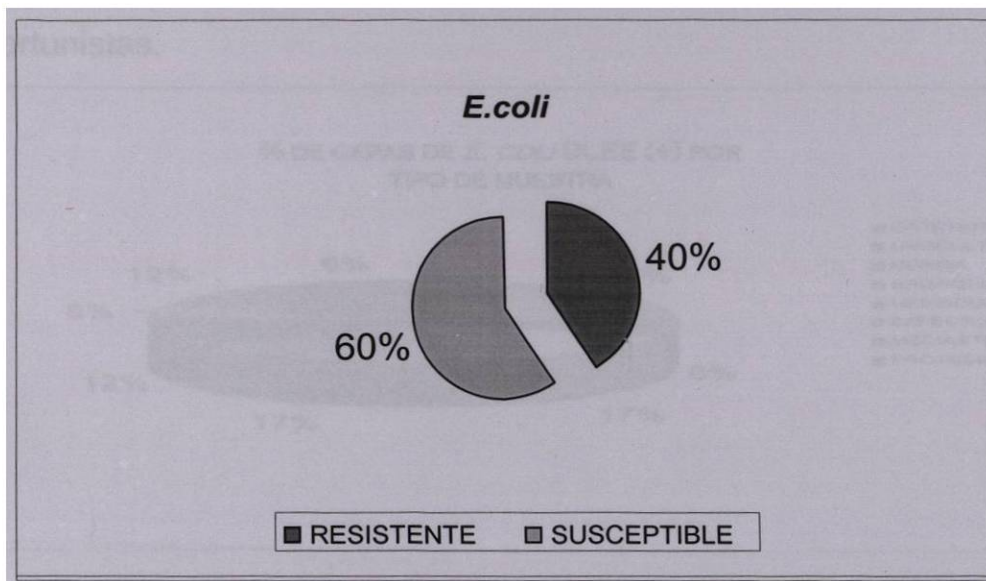
Tabla 5.- Lectura en mm de inhibición para las cepas BLEE (+) de *E. coli*

La tabla 6 nos muestra una acentuada resistencia a la cefalosporina de 4ª generación; CEFEPIME (FEP) como también la falsa sensibilidad a otros betalactámicos como IMIPENEM (IMIP) y por el contrario la alta resistencia a otro tipo de antibióticos, por ejemplo a AMPICILINA/SULBACTAM (AMS).

ANTIBIOTICOS	%RESISTENCIA	%SUSCEPTIBILIDAD INTERMEDIA	%SUSCEPTIBILIDAD
AMIKA	41	6	53
AMS	94	0	6
AMPI	100	0	0
FEP	82	6	12
CAZ	100	0	0
CRO	100	0	0
GENT	53	0	47
IMIP	0	0	100
FUR	12	12	76
SXT	59	0	41
PTA	18	35	47

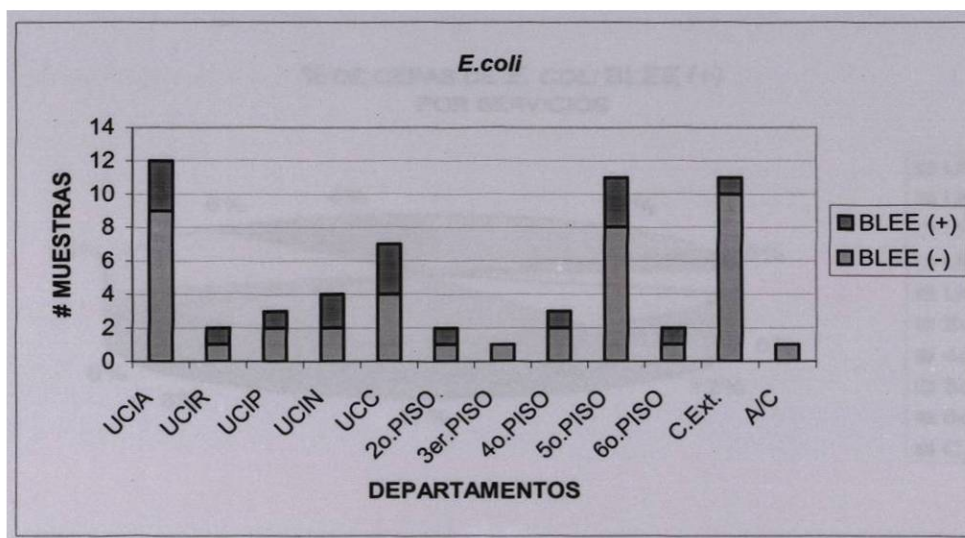
Tabla 6.- Relación de resistencia y sensibilidad de las 17 cepas con BLEE (+) en *E.coli* y el comportamiento ante otros antibióticos.

La gráfica 5 muestra el porcentaje de susceptibilidad de *E. coli* a los antibióticos indicadores del total de las muestras aisladas.



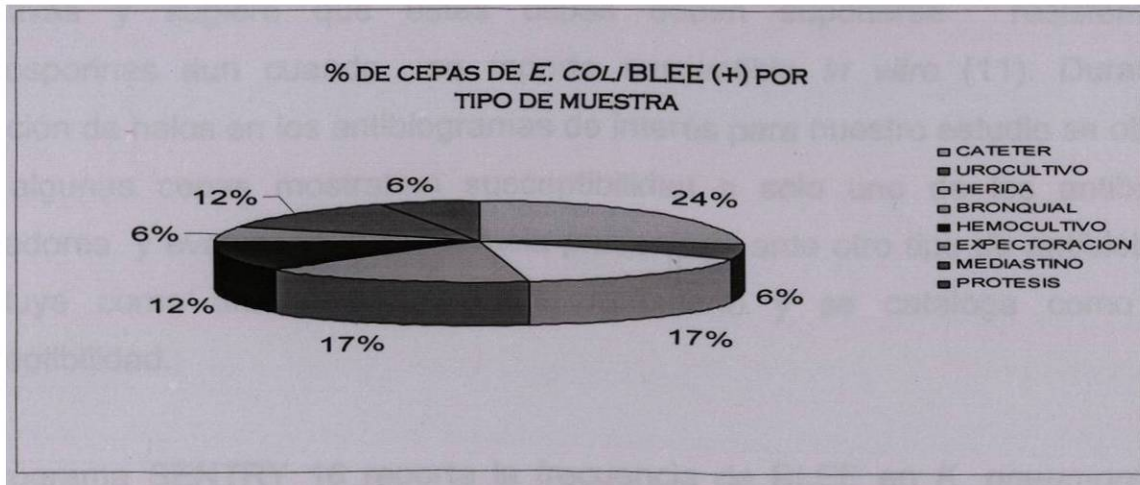
Gráfica 5.- Susceptibilidad mostrada por *E. coli* a antibióticos indicadores (CAZ, CRO)

La gráfica 6 muestra los aislamientos de *E. coli* según el servicio de donde provino la muestra, cabe mencionar que continúan las Unidades de Terapia Intensiva encabezando los servicios con prevalencia de BLEE.



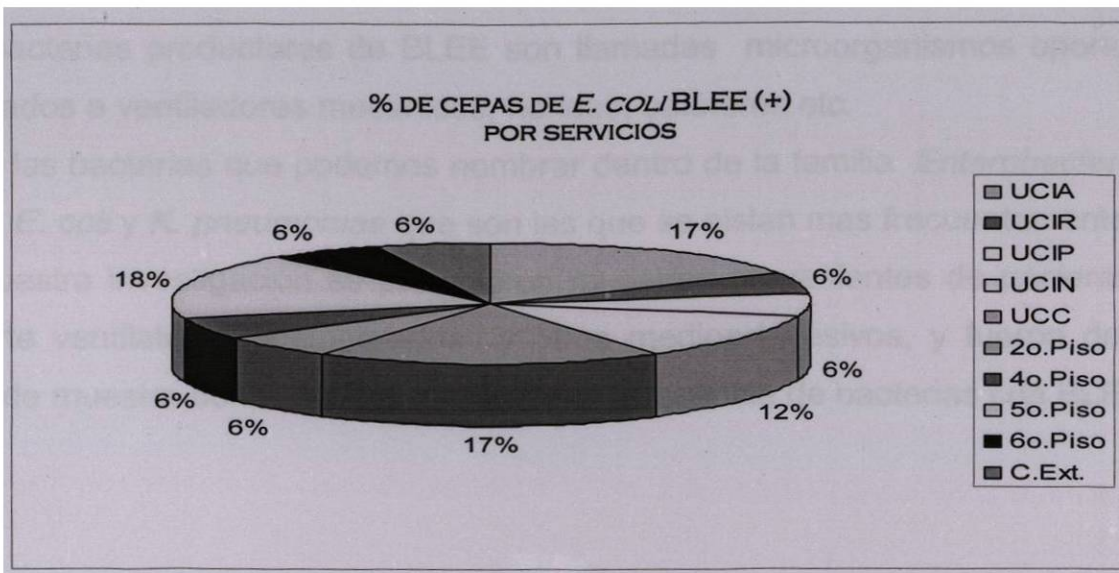
Gráfica 6.- Incidencia de BLEE en los diferentes servicios hospitalarios

La gráfica 7 indica tipos de muestra y procedencia de las cepas de *E. coli*, con BLEE (+), cabe mencionar que son los catéteres y las muestras bronquiales los contemplados como ideales para aislar estas especies bacterianas catalogadas como oportunistas.



**Gráfica 7.- Porcentaje de aislamiento de *E. coli* por tipo de muestra.**

La gráfica 8 muestra los servicios donde se tiene contemplado ser el medio óptimo para el desarrollo de bacterias que han desarrollado la producción de BLEE.



**Gráfica 8.- Aislamientos de cepas de *E. coli* con BLEE según servicio hospitalario .**

## 9.- DISCUSIÓN

Marco Herrera menciona que es común la producción de BLEE en bacterias gram negativas y sugiere que estas cepas deben suponerse resistentes a cefalosporinas aun cuando se reporte susceptible *in vitro* (11). Durante la medición de halos en los antibiogramas de interés para nuestro estudio se observó que algunas cepas mostraban susceptibilidad a solo uno de los antibióticos indicadores y evaluando la resistencia presentada ante otro tipo de antibiótico se concluye como una desviación este fenómeno y se cataloga como falsa susceptibilidad.

El programa SENTRY 16 reporta la frecuencia de BLEE en *K. pneumoniae* en hospitales de Latinoamérica en un 34% (18). Los datos estadísticos del presente estudio arrojan las siguientes cifras: 29% para *K. pneumoniae* y 40% para *E. coli* observando que la frecuencia es moderada en nuestro hospital donde se debe dar importancia a este tipo de sobrevivencia bacteriana para planear una terapéutica controlada.

Las bacterias productoras de BLEE son llamadas microorganismos oportunistas asociados a ventiladores mecánicos, heridas, catéteres etc.

Entre las bacterias que podemos nombrar dentro de la familia *Enterobacteriaceae* están *E. coli* y *K. pneumoniae* que son las que se aislan mas frecuentemente. (12). En nuestra investigación se procesaron muestras provenientes de pacientes con soporte ventilatorio, postoperados y otros medios invasivos, y fueron de estos tipos de muestra donde se reporta la mayor presencia de bacterias con BLEE.

Murray y cols reportan que las BLEE son megaplásmidos que muestran resistencia a diferentes antibióticos, indicando que al paso de los años ha disminuido la susceptibilidad a estos antibióticos (13). Durante el procedimiento de medición de los antibiogramas pudimos observar que cuando se mostraba resistencia a los medicamentos claves también se presentaba disminución en la susceptibilidad al resto de los antibióticos no betalactámicos utilizados.

La ceftazidima (CAZ) es la cefalosporina de amplio espectro susceptible a sufrir hidrólisis por las  $\beta$ -lactamasas por cuanto en un antibiograma que muestra resistencia a CAZ en cultivos de *E. coli* y *K. pneumoniae* estos serán sospechosos de presentar BLEE. (10). En el presente estudio el 100% de los antibiogramas identificados con presencia de  $\beta$ -lactamasas de efecto extendido en *Escherichia coli* como *Klebsiella pneumoniae* presentaron resistencia a ceftazidima uno de los antibióticos claves para detectar BLEE e indicador principal por ser susceptible a sufrir los efectos inhibidores por la acción de las enzimas.

Los genes productores de las BLEE, se encuentran unidos a otros genes de resistencia, por lo que podemos observar multiresistencia y en especial se observa resistencia a los aminoglucósidos y al trimetoprim sulfametaxol. (11). En los resultados mostrados durante nuestro análisis se pudo constatar la resistencia hacia otra clase de antibióticos y en algunas ocasiones evidenciándose la falsa susceptibilidad a estos.



BLEE es una enzima mediada por un plásmido y se deriva de una mutación sufrida por otras  $\beta$ -lactamasas tradicionales como la TEM 1 Y la SHV Las BLEE, presentan susceptibilidad a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato, el tazobactam y el sulbactam (2). En el presente estudio se utilizaron combinaciones de algunos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como AMPIC/SULBACTAM (AMS) y PIPERACILINA/AZOBACTAM (PTA) solo como referencia al no tener disponible el indicado por NCCLS; el ácido clavulónico, sin embargo también en este tipo de antibióticos se presentó un alto grado de resistencia.

Las BLEE son enzimas susceptibles al clavulanato y confieren alta resistencia a las penicilinas, aztreonam y cefalosporinas (con excepción de cefamicinas) y son detectadas comúnmente in *K. pneumoniae* y *E. coli*. Estas enzimas son frecuentemente mediadas por plásmidos y muchos mutantes de las subclases de enzimas TEM y SHV (clase A) con uno o más aminoácidos sustituidos alrededor del sitio activo (25). Durante la revisión y lectura de los antibiogramas de las cepas de *K. pneumoniae* se observó una resistencia del 100 % hacia el aztreonam, siendo ésta proporcional a la resistencia presentada a las cefalosporinas que utilizamos como antibióticos indicadores.

## 10.CONCLUSION

- Se determinó la presencia de BLEE en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherícha coli* mediante los criterios estipulados por NCCLS, presentándose un porcentaje de 29% en cepas de *K. pneumoniae* y 40% para cepas de *E. coli*.
- Se coobservó la susceptibilidad que tienen los pacientes de las unidades de terapia intensiva ante las bacterias oportunistas como *K. pneumoniae* y *E. coli*.
- Se corroboró que el antibiótico con menor actividad bactericida para las bacterias en estudio es la ampicilina al ser la mas utilizada en forma empírica, por lo que ha provocado el desarrollo de resistencia bacteriana.
- Se demostró que el fallo terapéutico se enmascara *in vitro* al efectuarse una falsa suceptibilidad a diversos tipos de antibióticos incluyendo los aminoglucósidos mas nobles terapéuticamente hablando.
- Se identificó *in vitro* una falsa efectividad antibiótica del Imipenem un carbapenem bactericida del tipo betalactámico, que de acuerdo a la literatura es suceptible ante el ataque enzimático de las bacterias con BLEE
- Se comprobó una relación propocional entre los procedimientos invasivos, la terapéutica con antibióticos de amplio espectro y la resistencia bacteriana, aunado a la estancia del paciente en áreas susceptibles al ataque de este tipo de microorganismos.



- Se observó que *E. coli* presentó una incidencia del 40% para la producción de BLEE y que el ambiente de subsistencia es también fuera de las áreas de Cuidados Intensivos no así en el caso de *K. pneumoniae* cuyo porcentaje de cepas aisladas con BLEE (+) fué de un 29% y esta incidencia fue claramente marcada en las áreas de cuidados intensivos característicamente en áreas de pediatría.
- Es recomendable implementar procedimientos que lleven a un control en la terapéutica utilizada actualmente donde se evalúe el uso de antibióticos de amplio espectro.
- Es necesario e indispensable realizar análisis moleculares a cultivos de cepas con BLEE (+) para una identificación exacta del tipo de  $\beta$ -lactamasas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aliaga Roxana, 2001 Caracterización de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona. Depto. Microbiología Genética, Universidad Autónoma de Barcelona pp. 54
2. Desimoni M.C., Esquivel G.P. y Merino L.A. 2004. Colonización fecal por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en una Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* pp 507-11
3. Garza Ramos 2003. Mecanismos moleculares en la propagación de la resistencia a antibióticos. En simposium L1.S3 Resistencia Bacteriana pp 13
4. Gottlieb Scott 1999. Aparece cepa de estafilococo resistente. *BMJ Latinoamérica* **7**: 49-96
5. Hart C. A., 1998. Resistencia a los antibióticos un problema creciente? *BMJ Latinoamérica* **6**: 145-192
6. Herrera L. 2002. *E. coli* fecal resistente a antibióticos en niños sanos. ¿Inducción por uso de antibióticos? *Revista de Investigación Clínica*. **54**: 108-112
7. Herrera L. Marco 2002. Cepas Productoras de  $\beta$ -Lactamasa de Efecto Extendido en el Hospital Nacional de Niños. *Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños* **37**:1-2

8. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. Staley J.T. and Williams S.T. 1994 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth ed. Williams & Wilkins.
9. Hoon S. 2003. Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Produced by Clinical Isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli* from Korean Nationwide Survey. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 2902-06
10. Karam H and Heffner J.E., 2000. Emerging Issues in Antibiotic Resistance In Blood-borne Infections. *AmJ Respir Crit Care Med* **162**: 1610-1616
11. Koneman W., Allen Stephen, Janda W. 2001 *Diagnóstico Microbiológico* 5a. ed, Editorial Médica Panamericana pp. 776
12. Koneman W., Allen Stephen, Janda W. 2001 *Diagnóstico Microbiológico* 5a. ed, Editorial Médica Panamericana pp. 797
13. Martínez P 2003. Determinación de  $\beta$ -Lactamasas de Espectro Extendido en Gérmenes Nosocomiales del Hosp. San Jerónimo. *Colombia Médica* **32**: 196-205.
14. Murray, P.R., Barom E.J. 1999 *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 264, 266-268
15. Sanchez M. et al., 2006 Transferecia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias *Rev. Méd. Chile* **134**: 415-420

16. Sánchez Silvia. 2002 *Caracterización Molecular de Brotes intrahospitalarios causados por Enterobacterias productoras de  $\beta$ -Lactamasa de Espectro Extendido*. En simposium L1.S3 Resistencia Bacteriana pp. 12
17. Sahm F. D., Marsilio M. and Piazza G.1999. Antimicrobial Resistance in Key Bloodstream Bacteria Isolates: Electronic Surveillance with The Surveillance Network Database-USA *Clinical Infectious Diseases* **29** No 2: 259-63
18. Sanguinetti M., Posteraro B 2003. *Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Detection Method*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:1463–1468
19. Saler HS, et al: Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with diagnosis of pneumnie analysis of results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998): sentry Latin American study group. *Diagn Microbil infect Dis* 1998; **32**: 289-301.
20. Schiappa DA 1998. *Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case control and molecular epidemiologic investigation*. *J Infect Dis* 1998; **174**: 529-36
21. Shannon Kevin, Stapleton P 1999 *Extended-Spectrum b-Lactamase - Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Nosocomial Outbreaks of Infection in the United Kingdom*. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; **36**: 3105-31

22. Struelens J. 1998. Epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos en infecciones hospitalarias: Problemas y posibles soluciones. *BMJ latinoamericana* **6**; 26-29
23. Steward D. 2001 Characterization of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 Laboratories Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Detection Methods. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 2902-06
24. Wise Richard 1998. La resistencia a los antimicrobianos. *British Medical Journal Latinoamérica* **6**: 1-48
25. Young H. Kim 2004 Molecular Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* Isolates Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases for Identification of Nosocomial Outbreaks in Stockholm, Sweden. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5917-20



