

# Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería

Pedro Javier Martínez Ramos, BLC\*  
Paula Andrea Espinal Marín, BLC MSc†  
Álvaro Bustos G, MD\*\* †  
Salim Mattar Velilla, PhD\*\* †

## Resumen

**Introducción.** Uno de los principales problemas en los hospitales de Latinoamérica han sido los microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) multirresistentes. **Objetivo.** Establecer el perfil de resistencia fenotípica de *Klebsiella pneumoniae* (KP) y *Escherichia coli* (EC) causantes de infección nosocomial en el hospital San Jerónimo de Montería (Colombia) y comparar cuatro métodos para la detección de BLEE. **Metodología.** Se analizaron 60 aislamientos, 30 KP y 30 EC provenientes de pacientes intrahospitalarios del HSJ, se emplearon los métodos de difusión de disco del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) y los métodos confirmatorios para la detección de BLEE el de disco combinado, la prueba Etest® ESBL y MicroScan® ESBL. **Resultados.** 14 de 60 (23.3%) aislamientos producían BLEE, 11 de 30 KP (36.6%) y 3 de 30 EC (10%). Los métodos difusión de disco del NCCLS, MicroScan® ESBL y Etest® ESBL fueron concordantes en los resultados para confirmación de la producción de BLEE, pero el método de disco combinado mostró diferencias en los resultados con respecto a los anteriores ya que determinó la producción de BLEE en 9 de 30 (30%) KP y 2 de 30 (6.6%) EC ( $p < 0.05$ ). Las cepas productoras de BLEE se clasificaron en cuatro fenotipos de resistencia. **Conclusiones.** El estudio permitió demostrar una alta producción de BLEE en KP y

EC en el HSJ. La frecuencia elevada de BLEE sugiere restringir el uso de  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y la utilización de medidas rigurosas de asepsia que prevengan la diseminación de BLEE a nivel intrahospitalario. [Martínez P, Espinal P, Bustos A, Mattar S. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *MedUNAB* 2005; 8(1):15-22].

**Palabras clave:**  $\beta$ -lactámicos, BLEE, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, Colombia, resistencia.

## Introducción

La emergencia de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE, se ha convertido en un problema creciente en el mundo.<sup>1,2</sup> Estos patógenos están asociados con hospitalización, especialmente con infecciones nosocomiales en infantes prematuros y pacientes de las unidades de cuidado intensivo, son causantes de neumonías, bacteriemias, infecciones del tracto urinario e infecciones de herida quirúrgica.<sup>3,4</sup> Los factores de riesgo para la adquisición de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE por parte de los pacientes incluyen estancia hospitalaria prolongada, terapia antimicrobiana previa con cefalosporinas y estancia en unidades de cuidado intensivo.<sup>5,6</sup> Uno de los principales problemas en los hospitales de Latinoamérica han sido los microorganismos multirresistentes productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro

\* Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.

† Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Sinú, Montería, Colombia.

\*\* Servicio de Infectología, Hospital San Jerónimo, Montería, Colombia.

**Correspondencia:** Dr Mattar, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. E-mail smattar@escarsa.net.co ó mattarsalim@hotmail.com

**Artículo recibido:** diciembre 12 de 2004; aceptado: 30 de abril de 2005.

BLC: Bacteriólogo y laboratorista clínico.

extendido (BLEE).<sup>7</sup> En un estudio realizado por el Programa de Vigilancia Antimicrobiana Sentry se encontró que los aislamientos de *K. pneumoniae* con un fenotipo BLEE fueron más prevalentes en América Latina (45.4%), seguidos por la región Pacífica (24.6%), Estados Unidos (7,6%), Europa (22.6%) y Canadá (4.9%).<sup>8</sup>

Las BLEE son enzimas que poseen actividad hidrolítica sobre los antibióticos β-lactámicos como las oximiino-cefalosporinas y el monobactámico aztreonam. Estas enzimas confieren grados variables de actividad contra las cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima y cefotaxima.<sup>1,9</sup> Muchas de las BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* son derivadas de β-lactamasas tipo SHV-1 y TEM-1, TEM-2, por una o más sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam.<sup>1,10</sup> Recientemente se han identificado enzimas no-TEM, no-SHV como la nueva familia CTX-M, encontradas en Sur América y Europa,<sup>11, 12</sup> las TOHO-1 y TOHO-2 en Japón, PER-1 en Turquía, PER-2 en Suramérica y VEB-1 en Vietnam y Tailandia.<sup>1, 9, 10, 13</sup> Las BLEE se encuentran codificadas principalmente en plásmidos, lo que les confiere una capacidad de diseminación mayor en distintas cepas y en periodos de tiempo corto; en algunos casos estos plásmidos codifican para otros genes de resistencia a antimicrobianos. Por lo tanto, es común que organismos que expresen una BLEE, expresen co-resistencia con los aminoglicósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas.<sup>14</sup>

De otro lado, la detección de la resistencia mediada por BLEE puede ser difícil de evaluar si no se dispone de metodologías y criterios estándares.<sup>15</sup> El *National Committee for Clinical*

*Laboratory Standards* (NCCLS)<sup>16</sup> sugiere evaluar varios agentes antimicrobianos como aztreonam, cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima, y ceftriaxona para realizar el tamizaje de detección de BLEE y confirmar la producción de estas enzimas en presencia de un agente inhibidor como el ácido clavulánico. También existen otros métodos reconocidos para la detección de BLEE como la prueba Etest-ESBL® y MicroScan® ESBL plus.

En el presente estudio se determinó la prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* causantes de infección nosocomial en el Hospital San Jerónimo (HSJ) de Montería (Colombia) y se compararon cuatro métodos para la detección de BLEE.

## Materiales y métodos

**Tipo de estudio y muestra.** Entre enero y agosto de 2003 se analizaron 60 aislamientos clínicos, 30 de *K. pneumoniae* y 30 de *E. coli*, los cuales fueron obtenidos de pacientes con infección nosocomial del hospital San Jerónimo (HSJ) de Montería, institución pública de segundo nivel de atención con 204 camas. Las muestras de donde se obtuvieron los microorganismos fueron secreción bronquial, secreción de herida, orina, catéter y fluidos corporales. La infección nosocomial se definió como aquella infección que no estaba presente ni en incubación en el momento de la admisión al hospital y que se presentó entre 48 a 72 horas después de la admisión.<sup>17</sup> Para el cálculo del tamaño de la población se tuvo en cuenta el número de aislamientos recuperados en el HSJ en el año 2000; durante este periodo se aislaron 900 bacilos gram negativos de origen nosocomial, de los cuales

**Tabla 1.** Perfil fenotípico de resistencia entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Microorganismo	Antibióticos									
	CAZ	CTX	CRO	IMI	MER	AZT	AK	CIP	SXT	n
<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	19
	R	R	R	S	S	R	S	S	S	3
	R	R	R	S	S	R	S	S	R	1
	R	R	R	S	S	R	S	R	S	2
	R	R	R	S	S	R	S	S	S	1
	R	R	R	S	S	R	S	R	R	1
	R	R	R	S	S	R	R	S	R	2
	R	R	R	S	S	R	R	R	R	1
<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	12
	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1
	S	S	S	S	S	S	S	R	R	6
	S	S	S	S	S	S	R	R	S	2
	S	S	S	S	S	S	R	R	R	6
	R	R	R	S	S	R	S	R	R	1
	R	R	R	S	S	R	R	R	R	2

S: Sensible; R: Resistente; n: Numero de aislamientos. CAZ: ceftazidima, S: < 2 µg/ml, R: ≥ 2 µg/ml; CTX: cefotaxima, S: < 2 µg/ml, R: ≥ 2 µg/ml; CRO: ceftriaxona, S: < 2 µg/ml, R: ≥ 2 µg/ml; IMI: imipenem, S: ≤4µg/ml, R: >4µg/ml; MER: meropenem, S: ≤4µg/ml, R: >4µg/ml; AZT: aztreonam, S: < 2 µg/ml, R: ≥ 2 µg/ml; AK: amikacina, S: ≤ 16 µg/ml, R: >16 µg/ml; CIP: ciprofloxacina, S: ≤ 2 µg/ml, R: > 2 µg/ml; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, S:< 2/38 µg/ml, R: >2/38 µg/ml . Región sombreada: aislamientos productores de BLEE.

el 20% correspondieron a *K. pneumoniae* y *E. coli*. Con base en estos datos, con un error máximo permisible del 1% y un nivel de confianza del 95%, se analizaron 60 aislamientos (30 de *K. pneumoniae* y 30 de *E. coli*).

La recuperación de los microorganismos se realizó en el laboratorio de microbiología del HSJ de Montería y en el Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), de la Universidad de Córdoba, donde se realizó la identificación y confirmación de las cepas con el sistema MicroScan® Neg Combo Panel Type 32 (Dade Behring, Ca, USA).

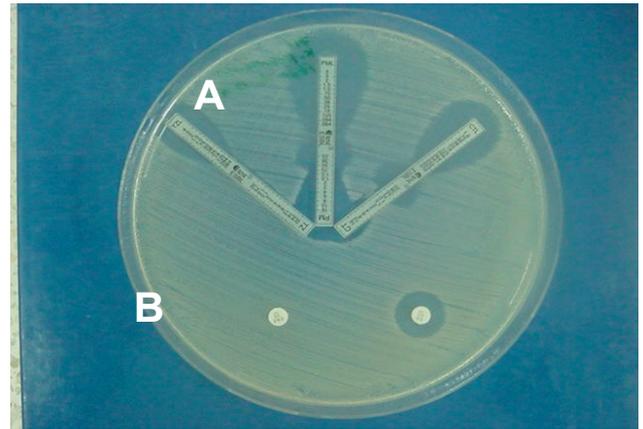
### Pruebas de susceptibilidad y de producción de BLEE.

Se realizó el método de difusión de disco en placas de agar Mueller Hinton (MH) para nueve antibióticos (cefepime, imipenem, meropenem, gentamicina, amikacina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y levofloxacina; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), así como el método de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el sistema MicroScan® Neg Combo Panel Type 32 (Dade Behring, USA). La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con las guías del NCCLS.<sup>16, 18</sup>

Como estrategia de tamizaje para detección de BLEE se utilizó el método de difusión de disco con los siguientes antibióticos: ceftazidima [30µg], cefpodoxima [10µg], ceftriaxona [30µg], cefotaxima [30µg] y aztreonam [30µg], siguiendo las normas del *National Committee Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).<sup>16</sup>

La confirmación de las cepas productoras de BLEE se realizó por tres métodos. El primero fue con la prueba de disco combinado<sup>16, 19</sup> sobre placas de agar MH con discos que contenían las cefalosporinas solas o en combinación con ácido clavulánico (Oxoid, Basingstoke, UK): ceftazidime [30µg], ceftazidime/clavulonato [30/10µg], cefpodoxima [10µg] y cefpodoxima/clavulonato [10/1µg]. El segundo fue el método MicroScan® ESBL plus™ (Dade Behring, Ca, USA), que contiene concentraciones dobles seriadas de imipenem [0.5-16 µg/ml], meropenem [0.5-16 µg/ml], cefotetan [1-32 µg/ml], cefepime [1-32 µg/ml], ceftazidime [0.5-128 µg/ml], ceftazidime/clavulonato [0.12/4-16/4 µg/ml], cefotaxima [0.5-128 µg/ml], cefotaxima/clavulonato [0.12/4-16/4 µg/ml], cefoxitin [2-32 µg/ml], piperacilina [16-64 µg/ml], aztreonam [0.5-64 µg/ml], cefpodoxima [0.5-64 µg/ml] y ceftriaxona [1-64 µg/ml]. El tercer método fue la prueba Etest® ESBL (Biodisk, So, Sweden) (20), utilizando tiras con gradientes de concentración para ceftazidime [0.5-32µg/ml], ceftazidime/clavulonato [0.064-4µg/ml], cefotaxima [0.25-16µg/ml], cefotaxima/clavulonato [0.016-1µg/ml], cefepime [0.25-16µg/ml], cefepime/clavulonato [0.064-4µg/ml]. Para los dos primeros métodos se siguieron las recomendaciones del *National Committee Clinical Laboratory Standards* (NCCLS);<sup>18</sup> para la interpretación de los resultados de la tercera prueba se siguieron las recomendaciones de la casa comercial.

Como control de calidad positivo para todos los métodos se empleó la cepa ATCC 700603 de *K. pneumoniae* productora de BLEE y como control negativo la cepa ATCC 25922 de *E. coli*.



**Figura 1.** Pruebas confirmatorias para la detección de BLEE. *Klebsiella pneumoniae* positiva para la producción de BLEE A: Prueba Etest® ESBL: Ceftazidime (TZ) >32µg/ml izquierda; zona fantasma en cefepime (PM) centro y cefotaxima (CT) 32µg/ml derecha. B: Método de disco combinado: resistencia a ceftazidime (CAZ 30µg/ml) izquierda; sinergismo de CAZ/ clavulonato (CAZ 30/10µg/ml) derecha.

**Análisis de los resultados.** Se creó una base de datos en el programa Excel en la cual se registraron datos de información clínica y los resultados de las pruebas de susceptibilidad. Mediante el programa EpiInfo v. 2001 se realizó el análisis descriptivo como distribución de porcentajes y frecuencias entre los gérmenes aislados. Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  para analizar las diferencias encontradas entre los cuatro métodos aplicados para la determinación de BLEE.

## Resultados

**Pruebas de susceptibilidad.** El porcentaje de resistencia de *K. pneumoniae* frente a cada uno de los antibióticos evaluados fue el siguiente: cefepime (11/30, 36.6%), gentamicina (11/30, 36.6%), amikacina (3/30, 10%), trimetoprim-sulfametoxazol (5/30, 16.6%) y ciprofloxacina (4/30, 13.3%), en donde imipenem y meropenem presentan sensibilidad del 100%. Para *E. coli* la resistencia fue: cefepime (3/30, 10%), gentamicina (12/30, 40%), amikacina (10/30, 33.3%), trimetoprim-sulfametoxazol (16/30, 53.3%) y ciprofloxacina (29/30, 96.6%), con imipenem y meropenem también con sensibilidad del 100% (tabla 1).

En la prueba de tamizaje de difusión de disco se encontraron (11/30, 36.6%) aislamientos de *K. pneumoniae* y (3/30, 10%) aislamientos de *E. coli* resistentes a ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona, cefotaxima y aztreonam (tabla 1). La producción de BLEE en los 11 aislamientos de *K. pneumoniae* y tres aislamientos de *E. coli* se confirmó por los métodos Etest® ESBL y MicroScan® ESBL plus. El método de disco combinado mostró inhibición en presencia del ácido clavulánico sólo en nueve aislamientos de *K. pneumoniae* y dos aislamientos de *E. coli* (figura 1).

**Tabla 2.** Porcentaje de resistencia total y por servicios de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE.

Gérmén	Antibióticos	Porcentaje total n (%)	UCI n (%)	Medicina interna n (%)	Pediatría n (%)	Cirugía n (%)
<i>K. pneumoniae</i> n= 11	Gentamicina	8 (72.7%)	3 (27.2%)	3 (27.2%)	1 (9%)	1 (9%)
	Amikacina	3 (27.2%)	0 (0%)	2 (18.1%)	1 (9%)	0 (0%)
	SXT <sup>a</sup>	5 (45.4%)	3 (27.2%)	1 (9%)	1 (9%)	0 (0%)
	Ciprofloxacina	4 (36.3%)	1 (9%)	2 (18.1%)	0 (0%)	0 (0%)
	Imipenem	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Meropenem	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>E. coli</i> n= 3	Gentamicina	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Amikacina	2 (66.6%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)
	SXT <sup>a</sup>	3 (100%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0%)	1 (33.3%)
	Ciprofloxacina	3 (100%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0%)	1 (33.3%)
	Imipenem	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Meropenem	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

<sup>a</sup> Trimetoprim- sulfametoxazol.

Al comparar los métodos no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre la prueba de tamizaje, la prueba E-test y el método MicroScan ESBL plus; sin embargo, la prueba de disco combinado presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los anteriores para la detección de las BLEE.

Los aislamientos productores de BLEE se recuperaron con mayor frecuencia en los servicios de pediatría (2/6, 33.3%), UCI (4/16, 25%), cirugía (2/7, 28.5%) y medicina interna (6/31, 19.3%).

**Perfil fenotípico de resistencia de los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEE.** Los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE mostraron resistencia a gentamicina (8/11, 72.7%) amikacina (3/11, 27.2%), ciprofloxacina (4/11, 36.3%), trimetoprim-sulfametoxazol (5/11, 45.4%), con 100% de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, pero sensibilidad del 100% para imipenem y meropenem (tabla 2). Para los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE se encontró resistencia para gentamicina (1/3, 33.3%), amikacina (2/3,

66.6%), ciprofloxacina (3/3, 100%), trimetoprim-sulfametoxazol (3/3, 100%), 100% de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, sensibilidad del 100% a imipenem y meropenem (tabla 2). En los aislamientos de *E. coli* no productoras de BLEE se presentó multirresistencia a amikacina, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol (6/27, 22.2%) (tabla 1). *K. pneumoniae* no productora de BLEE no presentó multirresistencia.

**Clasificación de los aislamientos productores de BLEE.** Los 14 aislamientos productores de BLEE se clasificaron en cuatro fenotipos de resistencia (tabla 3) teniendo en cuenta la CMI frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Los once aislamientos de *K. pneumoniae* mostraron perfiles asociados con los fenotipos I a IV y los 3 aislamientos de *E. coli* mostraron perfiles asociados con los fenotipos III y IV (tabla 3).

El fenotipo I se encontró en el servicio de cirugía en un 100%, e incluyó niveles de resistencia para ceftazidime con CMI<sub>90</sub> 64 $\mu$ g/ml, cefotaxima CMI<sub>90</sub> 64 $\mu$ g/ml, ceftriaxona CMI<sub>90</sub> 64 $\mu$ g/ml, cefepime CMI<sub>90</sub> 16 $\mu$ g/ml, aztreonam CMI<sub>90</sub> > 64 $\mu$ g/ml e

**Tabla 3.** Distribución porcentual de los fenotipos de resistencia de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEE.

CMI ( $\mu$ g/ml)						Fenotipo resistencia	UCI		Pediatría		Medicina interna		Cirugía	
CAZ	CTX	CRO	AZT	FEP	IMP		KP	EC	KP	EC	KP	EC	KP	EC
64	64	64	>64	16	<0.5		I	0	0	0	0	0	0	100
128	16	16	>64	4	<0.5	II	50	0	0	0	50	0	0	0
>128	64	64	>64	32	<0.5	III	25	12.5	25	0	25	0	0	12.5
>128	128	128	>64	32	<0.5	IV	0	0	0	0	66.6	33.3	0	0

CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, FEP: cefepime, AZT: aztreonam, IMP: Imipenem. EC: *Escherichia coli*. KP: *Klebsiella pneumoniae*.

**Tabla 4.** Susceptibilidad antimicrobiana (CMI µg/ml) de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEE frente aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas

Gérmén	Servicio	Fenotipo	AK	CN	TO	SXT	CP	MX
<i>E. coli</i>	Med. interna	IV	>32	2	>8	>2/38	>2	>4
<i>E. coli</i>	UCI	III	32	>8	>8	>2/38	>2	>4
<i>E. coli</i>	Cirugía	III	<4	<1	<1	>2/38	>2	>4
<i>K. pneumoniae</i>	Cirugía	I	<4	8	8	<2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	Pediatría	III	<4	<1	<1	>2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	Pediatría	III	>32	>8	>8	>2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	Med. interna	IV	32	>8	>8	>2/38	>2	>4
<i>K. pneumoniae</i>	UCI	II	<4	8	8	<2/38	>2	>4
<i>K. pneumoniae</i>	Med. interna	IV	32	>8	>8	>2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	UCI	III	<4	>8	8	<2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	Med. interna	II	<4	8	8	<2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	Med. interna	III	8	<1	>8	<2/38	<1	<2
<i>K. pneumoniae</i>	Med. interna	III	<4	<1	<1	>2/38	>2	>4
<i>K. pneumoniae</i>	UCI	III	<4	8	8	>2/38	>2	>4

Med. interna: Medicina interna; AK: Amikacina; CN: Gentamicina; TO: Tobramicina; CP: Ciprofloxacina;

imipenem CMI<sub>90</sub> ≤ 0.5µg/ml. El fenotipo II se encontró en un 50% de los aislamientos de medicina interna y 50% de UCI, e incluyó niveles de resistencia para ceftazidime CMI<sub>90</sub> 128 µg/ml, cefotaxima CMI<sub>90</sub> 16µg/ml, ceftriaxona CMI<sub>90</sub> 16µg/ml, cefepime CMI<sub>90</sub> 4µg/ml, aztreonam CMI<sub>90</sub> > 64µg/ml e imipenem CMI<sub>90</sub> ≤ 0.5µg/ml. El fenotipo III se encontró en el 25% de los aislamientos de medicina interna, 12.5% de cirugía, 37.5% de UCI y el 25% de pediatría, e incluyó niveles de resistencia a ceftazidime MIC<sub>90</sub> > 128 µg/ml, cefotaxima MIC<sub>90</sub> 64µg/ml, ceftriaxona MIC<sub>90</sub> 64µg/ml, cefepime MIC<sub>90</sub> 32µg/ml aztreonam MIC<sub>90</sub> > 64µg/ml, e imipenem CMI<sub>90</sub> ≤ 0.5µg/ml. Por último, el fenotipo IV se encontró solamente en el servicio de medicina interna en el 100% de los aislamientos, e incluyó niveles altos de resistencia para todas las cefalosporinas y aztreonam, (ceftazidime CMI<sub>90</sub> >128 µg/ml, cefotaxima CMI<sub>90</sub> 128µg/ml, ceftriaxona CMI<sub>90</sub> 128µg/ml, cefepime CMI<sub>90</sub> 32µg/ml y aztreonam CMI<sub>90</sub> > 64µg/ml), e imipenem con sensibilidad CMI<sub>90</sub> ≤ 0.5µg/ml (tablas 3 y 4).

## Discusión

La emergencia de *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam se ha convertido en un gran problema de salud pública mundial.<sup>1, 8, 9, 10</sup> En Colombia se ha informado niveles de resistencia a cefalosporinas de tercera generación del 44% para *K. pneumoniae* y 27% para *E. coli*.<sup>21</sup> En un estudio realizado en 2003 en unidades de cuidado intensivo en 11 instituciones de Colombia, se encontraron como microorganismos predominantes con un fenotipo de BLEE a *K. pneumoniae* (30%) y *E. coli* (10-13%) con una alta resistencia a ciprofloxacina (20-40%) y policlonalidad entre los aislamientos, indicando la presión selectiva de los antibióticos como el factor principal para adquirir BLEE.<sup>22</sup>

Con respecto a la Costa Atlántica, Villanueva et al<sup>23</sup> en dos hospitales encontraron *K. pneumoniae* productoras de BLEE en un 40% y *E. coli* en el 17.6%. En Montería, un estudio previo en el HSJ mostró una prevalencia de BLEE del 46% en *K. pneumoniae* y 20.5% en *E. coli*.<sup>24</sup> Los resultados del presente trabajo muestran prevalencia de BLEE de 36.6% para *K. pneumoniae* y 10% para *E. coli*, estos porcentajes han disminuido ligeramente y son similares a los informados por otros autores.<sup>21, 22</sup> El descenso en las tasas de BLEE podría obedecer al incremento del uso de los carbapenems, utilizados como alternativa frente a la resistencia de las cefalosporinas de amplio espectro y para el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos productores de BLEE y enzimas AmpC. Estas últimas no afectan la estructura química de los carbapenems aún siendo estos antibióticos potentes inductores de β-lactamasas de la clase molecular C.<sup>25, 26</sup> No obstante, el incremento de los carbapenems, podría sustituir un problema por otro, como es la emergencia y diseminación de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems.<sup>24, 27, 28</sup>

Los aislamientos productores de BLEE del presente estudio mostraron co-resistencia frente a los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol. Esta característica también ha sido informada en otros estudios,<sup>8, 29</sup> en los cuales los porcentajes de esta co-resistencia alcanzaron niveles altos, lo que limita el sinergismo terapéutico entre estas dos familias de antibióticos. En ese sentido, la resistencia presentada a los aminoglucósidos por las cepas productoras de BLEE, probablemente se deba a la expresión de enzimas modificantes de aminoglucósidos tipo N-6'-acetiltransferasas y N-2'-nucleotidiltransferasas, por las altas CMI<sub>90</sub> alcanzadas para amikacina (≥ 32 µg/ml), gentamicina y tobramicina (≥ 8 µg/ml; tabla 4).

La presencia de estas enzimas modificantes sugieren el amplio uso de amikacina y gentamicina en el HSJ.<sup>30</sup>

En el presente estudio también se encontró resistencia a las fluoroquinolonas de últimas generaciones como ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina con CMI<sub>90</sub> > 4 µg/ml. La resistencia frente a ciprofloxacina estuvo en un 36% (4/11) para *K. pneumoniae* y 100% (3/3) para *E. coli* productoras de BLEE y en 96% (26/27) en *E. coli* no productoras de BLEE. El porcentaje de resistencia a quinolonas ha venido incrementando de manera paralela con la producción de BLEE como lo han informado otros autores;<sup>31, 32</sup> sin embargo, no se considera una característica específica en cepas productoras de BLEE, dado que esta resistencia se ha presentado en productores y no productores de estas enzimas.

La clasificación de los niveles de resistencia teniendo en cuenta la CMI de diferentes antibióticos β-lactámicos, permitió agrupar los aislamientos productores de BLEE en cuatro fenotipos de resistencia. Los fenotipos III y IV con CMI más elevadas (tabla 3), se encontraron con mayor frecuencia en UCI, medicina interna y pediatría, servicios donde se describe el aislamiento de *Enterobacteriaceae* principalmente *K. pneumoniae* como agente oportunista de pacientes hospitalizados en estas unidades.<sup>3</sup> La presencia de fenotipos con CMI elevadas en estos servicios hospitalarios permiten resaltar la fuerte presión selectiva ejercida por el uso empírico de los agentes β-lactámicos en el HSJ. La prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* indica que los antibióticos de primera línea para estos microorganismos debería ser modificada por el uso prudente de imipenem o meropenem, para evitar la selección de mutantes resistentes de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp* a estos agentes antimicrobianos.<sup>24, 27</sup> Sin embargo, la administración de piperacilina & tazobactam sería útil para el tratamiento de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE, así como el tratamiento de reemplazo a imipenem, considerando que los microorganismos solo expresen la producción de BLEE y no otro tipo de β-lactamasas como AmpC o sus variantes.<sup>26, 31, 33</sup>

El análisis de estos fenotipos en los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* mostraron CMI elevadas con ceftazidima y cefotaxima entre 64 hasta >128 µg/ml, lo que sugiere la resistencia mediada por BLEE tipo SHV, enzimas frecuentemente informadas en América Latina: México, Chile, Colombia y Argentina.<sup>14, 34, 35</sup> Adicionalmente, la ausencia de un fenotipo de resistencia con hidrólisis preferencial para cefotaxima o ceftriaxona y baja o nula para ceftazidima permite descartar la presencia de enzimas tipo CTX-M.<sup>12</sup>

La resistencia mediada por BLEE puede ser difícil de detectar, debido a los diferentes métodos y agentes antimicrobianos evaluados.<sup>36</sup> Estudios realizados por Carter et al<sup>37</sup> mostraron diferencias al comparar los criterios de la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*

(BSAC) con los del NCCLS y encontraron tasas de BLEE de un 97.7% y 82.2%, respectivamente. Paralelamente, ellos utilizaron la metodología propuesta por Jarlier et al,<sup>19</sup> y encontraron tasas del 95.5%, de un total de 180 cepas de *Klebsiella spp* productoras de BLEE. Estas diferencias en los resultados de detección de BLEE también se encontraron en el presente estudio; de 14 cepas productoras de BLEE incluidas *K. pneumoniae* y *E. coli*, el método de disco combinado detectó 11 de 14 (78.5%)(p<0.05), mediante los métodos Etest® ESBL, MicroScan® ESBL plus y por el método de difusión de disco del NCCLS se detectaron las 14 cepas productoras de BLEE con resultados concordantes. Estas diferencias encontradas con las diferentes metodologías permiten proponer la estandarización de las mismas y el cuidado que se debe tener en la elaboración de las pruebas en cada laboratorio. Entre las variables a controlar se encuentran la concentración del inóculo, conservación y control del vencimiento de los antibióticos y la interpretación de las pruebas por parte del personal de laboratorio con el objeto de evitar errores que incidan en las tasas de resistencia reportadas.

En conclusión, la producción de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* en el HSJ con niveles de corresponsencia elevados frente a otros antibióticos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol indica posiblemente la presencia de plásmidos transferibles que debido a la presión selectiva ejercida por los antibióticos estén diseminando la resistencia en este hospital. La alta prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli*, sugiere restringir el uso de β-lactámicos de amplio espectro e implementar medidas rigurosas de higiene para el control de las infecciones y la prevención de la diseminación de microorganismos productores de BLEE en el ambiente hospitalario.

## Agradecimientos

Este trabajo fue patrocinado parcialmente con fondos de la Asociación Colombiana de Infectología, capítulo Costa Atlántica. Agradecemos al Hospital San Jerónimo por permitirnos llevar a cabo este estudio; también a la Universidad de Córdoba, al Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico y a la Universidad del Sinú por la financiación del trabajo.

## Summary

Introduction. One of the main problems at the Latin American hospitals has been the multiresistant microorganisms that produce ESBL. Objectives. To establish resistance phenotypic profile of *Klebsiella pneumoniae* (KP) and *Escherichia coli* (EC) that produce nosocomial infections at the San Jeronimo Hospital (HSJ) of Monteria, Colombia and to compare four methods for the detection of ESBL. Methods. 60 microorgan-

isms, 30 KP and 30 EC isolated of nosocomial patients of HSJ were analyzed; disk diffusion of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and the confirmatory methods for the detection of ESBL as combination of disk, Etest® and MicroScan® ESBL were used. Results. ESBL producers were determined in 14 of 60 (23.3%) isolates, 11 of 30 KP (36.6%) and 3 of 30 EC (10%). The disk diffusion procedure recommended by NCCLS, MicroScan® ESBL and Etest® ESBL were in agreement about productions and confirmation of ESBL ( $p > 0.05$ ). The combined disk method showed differences when it was compared with the other three methods: the production of ESBL in 9 of 30 (30%) KP and 2 of 30 (6.6%) EC ( $p < 0.05$ ). The strains ESBL producers were classified in four resistance phenotypes. Conclusions. The study showed a high ESBL producers in KP and EC at the HSJ. High frequency of ESBL found suggest to restrict the broad spectrum Beta lactams and the utilization of strictly hygiene measures for preventing the ESBL dissemination at intra-hospital level.

**Key words:** β-lactamics, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, bacterial resistance.

## Referencias

- Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su JJ. Prevalence of SHV-12 Among Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing Extended-Spectrum β-lactamases and identification of a Novel AmpC Enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1438-42.
- Jacoby GA, Han P. Detection of Extended-Spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:908-11.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* as nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 589-603.
- Karlowsky JA, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IA, Sahn DM. Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1672-80.
- Satovschi R. Infecciones hospitalarias, patógenos resistentes y estrategias de control. Reunión de consenso – La aparición de microorganismos productores de ESBL en América Latina: Recomendaciones para su control y tratamiento (San Pablo, Brasil). *Infect Dis Clin Pract* 2001; (Suppl):17-23.
- Sifuentes J. ESBL en América Latina: su repercusión clínica. Simposio β-lactamasas de espectro extendido: Incidencia, importancia y soluciones (Buenos Aires, Argentina). *Infect Dis Clin Pract* 2000; (Suppl):10-2.
- Casellas JM. Resistencia bacteriana por producción de β-lactamasas de espectro extendido: La perspectiva global y latinoamericana en el escenario hospitalario. Reunión de consenso – La aparición de microorganismos productores de ESBL en América Latina: Recomendaciones para su control y tratamiento (San Pablo, Brasil). *Infect Dis Clin Pract* 2001; (Suppl):12-6.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β-lactamases phenotype of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis* 2001; 32:94-103.
- Bradford, PA. Extended-Spectrum β-lactamases in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, Epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14: 933-51.
- Essack SY, May LM, Pillay DG, McFadyen ML, Livermore DM. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β-lactamases isolated in 1994 and 1996 at teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 88-95.
- Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu JJ. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β-Lactamases among Clinical Isolates of *Escherichia coli* in Southern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4320-5.
- Dutour C, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-14 β-lactamases from *Enterobacteriaceae* Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 534-7.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
- Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *Clin Microbiol* 2001; 39: 175-82.
- Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum β-Lactamase Confirmation Methods for *Escherichia coli* with Isolates Collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3142-6.
- National Committee Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test, 8<sup>th</sup> ed. Approved standard M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne PA; 2003.
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horau TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128-40.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6<sup>th</sup> ed. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2003.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78.
- Livermore D, Brown D. Detection of β-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 59-64.
- Mendes C, Rossi A, Prado V, Zurita J, Robledo J, Guzman M, et al. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The resinet Group. Abstracts of the IDSA 37 Annual Meeting Philadelphia, PA, 1999; p57 (Abstract 99).
- Villegas MV. Epidemiology of nosocomial gram (-) bacteria in Colombia: an update. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Antimicrobial Resistance. Cartagena, 2004.
- Villanueva A, Martínez P, Máttar S, Urbina D. Prevalencia de β-Lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital San Jerónimo de Montería y la Clínica General del Norte de Barranquilla. *Infectio* 2003; 7:103.
- Martínez P, Mercado M, Máttar S. Determinación de β-lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb Med* 2003; 34: 130-139.
- Sanders CC. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β-lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 1997; 41:573-93.

26. Nasim K, Elsayed S, Pitout J, Conly J, Church D, Gregson D. New method for laboratory detection of AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol 2004; 42:4799-802.
27. Prada G.  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido: Perspectivas y tratamiento. Rev Panam Infectol 2002; 5: 41-46.
28. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol 2000; 3: 489-495.
29. Espinal PA, Valenzuela EM, Leal AL, Saavedra C, Alpuche P, Mantilla R. Epidemiología molecular de infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de Beta-lactamasas de espectro extendido. Biomédica 2004; 24 (3):252-61.
30. Millar GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski N, Mackey P, Sales D, et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: A Reflection of aminoglycoside usage patterns? Clin Infect Dis 1997; 24 (Suppl 1):S46-S62.
31. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goznes H, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 2000; 30:473-8.
32. Valverde A, Coque T, Sanchez P, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004; 42: 4769-75.
33. Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thompson KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-10  $\beta$ -lactamases. J Antimicrobial Chemother 2002; 49:1011-4.
34. Heritage J, M'Zali FM, Gascoyne-Binzy H, Hawkey P. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 309-18.
35. Jacoby G, Muñoz L. The new  $\beta$ -lactamases. N Engl J Med 2005; 352:380-91.
36. Yan J, Ko W, Tsai S, Chuang C, Wu J. Complexity of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to both cephamycins and extended-spectrum cephalosporins at a teaching hospital in Taiwan. J Clin Microbiol 2004; 42: 5337-40.
37. Carter MW, Karen JO, Marina W, Livermore D: Detection of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid Combination Disk Method. J Clin Microbiol Rev 2000; 11: 4228-32.