

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO EN *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* Y *KLEBSIELLA OXYTOCA* AISLADO DE PACIENTES DEL HOSPITAL
GENERAL SAN JUAN DE DIOS**

VERONICA DEL ROSARIO ITZEP SOLARES

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Agosto de 2005

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO EN *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* Y *KLEBSIELLA OXYTOCA* AISLADO DE PACIENTES DEL HOSPITAL
GENERAL SAN JUAN DE DIOS**

Informe De Tesis

Presentado por

Veronica Del Rosario Itzep Solares

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Agosto de 2005

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	DECANO
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	SECRETARIA
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	VOCAL I
Licda. Liliana Vides de Urizar	VOCAL II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	VOCAL III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayen	VOCAL IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	VOCAL V

AGRADECIMIENTO

Al personal técnico del Hospital General San Juan de Dios del área de Microbiología por su apoyo y colaboración.

Al Laboratorio Nacional de Salud por el financiamiento de esta investigación.

A mis asesores: Lic. Jorge Matheu y Licda. Tamara Velásquez, y Revisores Lic. Martín Gil, y Licda. Alba Marina Valdés de García

A la colaboración de Enrique Arbizú.

Y todas las personas que de alguna forma me apoyaron para alcanzar esta meta.

DEDICATORIA

ACTO QUE DEDICO:

A DIOS:

Gracias por la familia que me entregaste, que siempre ha estado conmigo. A todos los amigos que me presentaste y has regalado. Gracias por todos estos años de vida y salud que has compartido conmigo. Te agradezco este momento tan especial que lo he alcanzado gracias a ti y a mis padres.

A MIS PADRES:

FRANCISCO Y CLARA LUZ

Por darme la vida, por apoyarme y brindarme todo lo que he necesitado. Les agradezco el esfuerzo, sacrificio, paciencia, comprensión, cuidado y amor que me han brindado durante mi vida. Este logro es gracias al esfuerzo que tuvieron hacia mi, por lo que este momento es de ustedes, mil gracias y que Dios y la Virgen Maria los bendiga siempre.

A MIS HERMANOS Y HERMANA:

HECTOR, CARMEN Y FERNANDO

Gracias por el apoyo, ayuda y paciencia que me han brindado. Que Dios los bendiga siempre.

A MIS AMIGAS Y AMIGOS:

Quienes me han acompañado a lo largo de mi vida, y con quienes he compartido tantas experiencias y emociones, momentos inolvidables que siempre llevaré en mi corazón.

A mi promoción, gracias por acompañarme en este momento: Lesbia, Karlita, Gaby, Nancy, Dina, Jennifer, Vanessa, Carlitos, Luis Fernando, Luis, les deseo éxitos en su vida personal y profesional.

Además a mis amigas y amigos: Ingrid, Hayde, Aleida, Jovita, Maura, Ligia, Marta Verónica, Licda. Claudia García, Licda. Karla Ozuna; Marco Vinicio, Rolando, Fernando.

Y cada uno de ustedes que me apoyo.

A MIS CATEDRATICOS:

Por sus conocimientos y consejos compartidos.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA:

Por permitirme ser parte de ella y ser un privilegiado de llegar a pertenecer a esta Unidad Académica, en especial a la Escuela de Química Biológica y al personal del Departamento de Bioquímica.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA:

Por darme el privilegio de ser un egresado más de la Gloriosa Casa de Estudios Universitarios.

A MI PAIS GUATEMALA

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
A.	Género <i>Klebsiella</i>	5
1.	Características Bioquímicas y de su Cultivo	5
2.	Estructura Antigénica	6
3.	Determinantes de Patogenicidad	6
4.	Infección Clínica	7
B.	Beta-Lactámicos	7
1.	Mecanismo de acción de los beta-lactámicos	9
C.	Mecanismo de Resistencia Bacteriana a Penicilinas y Cefalosporinas	10
D.	Beta-Lactamasas	12
1.	Beta-Lactamasas de Espectro Extendido	13
2.	Epidemiología de Cepas Productoras de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido	15
3.	Inhibidores de Beta-Lactamasas	17
4.	Detección de Beta-Lactamasas Plasmídicas de Espectro Extendido	18
IV.	Justificación	20
V.	Objetivos	21
VI.	Hipótesis	22
VII.	Materiales y Métodos	23
VIII.	Resultados	27
IX.	Discusión de Resultados	35
X.	Conclusiones	42
XI.	Recomendaciones	44
XII.	Referencias	45

RESUMEN

La resistencia bacteriana es un problema de salud que afecta a todas las instituciones y a la comunidad en general, y es condicionante de altos costos hospitalarios, complicaciones y mayor morbilidad y mortalidad, afectando mayormente a los pacientes internados, especialmente a las unidades de cuidados neonatal y pediátrico.

Entre los mecanismos de resistencia existe las enzimas Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), que ha tomado auge en la actualidad por producir multirresistencia a los antibióticos, como las cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas y trimethoprim sulfametoxazol. Es de importancia la investigación de este mecanismo de resistencia en el género *Klebsiella* ssp., por ser un microorganismo causante de infecciones nosocomiales sobre todo neumonía y bacteremia.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la presencia de BLEE a través del método de difusión en disco, en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, y en qué tipo de muestra, sala y género se presentan un mayor porcentaje de estas cepas productoras de BLEE en el Hospital General San Juan de Dios.

Se analizaron 56 cepas, 47 *Klebsiella pneumoniae* y 9 *Klebsiella oxytoca*, que fueron aislados de muestras de pacientes referidos al Laboratorio de Microbiología. Los resultados obtenidos mostraron que existen un alto porcentaje de BLEE por parte de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* representando un 69.6 %, predominando *Klebsiella pneumoniae* con respecto a *Klebsiella oxytoca*. Las salas mayormente afectadas por estas cepas productoras de enzimas fueron la

Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica y la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos, determinándose los aspirado orotraqueales y orinas son las muestras que presentan un alto porcentaje de estas cepas productoras de BLEE.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos beta-lactámicos son los preferidos para el tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro, pero se han encontrado bacterias productoras de beta-lactamasas con capacidad de hidrolizar los antibióticos beta-lactámicos. Las beta-lactamasas mutan de acuerdo con la presión selectiva y uso de antibióticos, observando uno o varios mecanismos de resistencia como alteración de la permeabilidad de la pared bacteriana, producción de enzimas inactivadoras de antibiótico, modificación del sitio blanco de acción y eflujo (1,2).

A principio de los años ochenta se encontraron bacterias con capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación, que fue conocidas como Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs), que se originaron por mutaciones en los genes que codifican las beta-lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), y este tipo de resistencia es causante de la mayoría de fallas terapéuticas. Los microorganismos más comunes que sintetizan esta enzima son *Klebsiella spp.* , y *Escherichia coli* (2,3).

Las cepas productoras de BLEEs son resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y otros antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas SxT, pero continúan siendo sensibles a imipenem, a cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) y a esquemas combinados con inhibidores de beta-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam) (1).

Las cepas productoras de BLEEs han ocasionado brotes de infecciones nosocomiales; y los factores de riesgo son: estancia hospitalaria prolongada,

ingreso a la unidad de cuidados intensivos, cateterización arterial y urinaria y administración de cefalosporinas de tercera generación (2).

En el trabajo de investigación se detectó la presencia de BLEE en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* de muestras de pacientes que son referidos al Laboratorio de Microbiología del Hospital General San Juan de Dios. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio Nacional de Salud, donde se realizó la detección y confirmación de Beta-Lactamasa.

ANTECEDENTES

A. GÉNERO *KLEBSIELLA*

El miembro del género *Klebsiella* que se aísla con mayor frecuencia es *K. pneumoniae*, que puede causar neumonía, al principio se le consideró como la causa de la neumonía lobular clásica, de la cual el *Streptococcus pneumoniae* es el agente etiológico real. Otras especies de *Klebsiella* pueden causar enfermedades similares pero se las aísla con menor frecuencia (4).

Sobre la base de estudios de relación entre los DNA, el género está constituido por cinco especies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* y *Klebsiella* grupo 47. Dos especies anteriores, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*, son especies bioquímicamente inactivas de *K. pneumoniae*. *Klebsiella terrigena* se ha aislado sólo de fuentes ambientales. *K. planticola* también es un microorganismo del medio ambiente, sin embargo se lo ha implicado en infecciones humanas del tracto urinario y de heridas. El grupo 47 de *Klebsiella* ha sido aislado sobre todo de aparato respiratorio y en forma ocasional de la sangre. *Klebsiella oxytoca* fue clasificada primero como *Klebsiella pneumoniae* indol-positiva y produce el mismo espectro de enfermedades que la *Klebsiella pneumoniae*, aunque con una frecuencia mucho menor (4).

1. Características bioquímicas y de su cultivo

Las especies de *Klebsiella* se presentan como colonias fermentadoras de lactosa en los medios diferenciales para aislamiento de bacilos entéricos. Todas las especies de *Klebsiella* son bacilos inmóviles de 0.3 a 1.5 por 0.6 a 6.0 μm , aislados

en pares o cadenas cortas, presentan una cápsula haciendo que las colonias que se desarrollan en agar se vean grandes, húmedas y mucoides (5).

Klebsiella pneumoniae y *Klebsiella oxytoca* tienen las mismas características bioquímicas [*K. pneumoniae* TSI A/A +-, LIA K/N ±- MIO --- Citrato + Urea + y *K. oxytoca* TSI A/A +-, LIA K/KN +- MIO --- Citrato + Urea +, ambas bacterias Voges proskauer (+), malonato (+), desarrollo a 50 °C (-)], pero se diferencia por la producción de indol, siendo *K. pneumoniae* indol negativo y *K. oxytoca* indol positivo. (4).

2. Estructura antigénica

Las bacterias del género *Klebsiella* poseen antígenos O y K. Los antígenos polisacáridos K son los más útiles para la tipificación serológica. Todas las especies comparten los mismos antígenos capsulares y por consiguiente pueden tipificarse con el mismo grupo de antisueros. Se han descrito 77 antígenos K y ninguno de los serotipos aparece como la causa más probable de un tipo particular de infección o como más virulento que otro serotipo (4).

3. Determinantes de patogenicidad

La cápsula capacita al microorganismo para resistir la fagocitosis y el poder destructivo del suero normal. Se han aislado cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de enterotoxina de pacientes con esprue tropical. Estas toxinas son similares, si no idénticas, a las toxinas termoestable (ST) y las toxinas termolabil (LT) de *E. coli* y la capacidad para producir enterotoxina está mediada por

plásmidos. Se ha comunicado sobre la presencia de una citotoxina filtrable que afecta diversos cultivos celulares en varios aislamientos de *K. oxytoca* obtenidos de pacientes con colitis hemorrágica. Se desconoce la naturaleza exacta de esta toxina y su papel en la enfermedad (4).

4. Infección clínica

K. pneumoniae puede causar una neumonía primaria adquirida en la comunidad, así como también una neumonía nosocomial; además de neumonía pueden causar infecciones de heridas y de las vías urinarias, bacteremia y meningitis. Alrededor del 25 al 75% de los pacientes con infección pulmonar producen un esputo sanguinolento, espeso y no pútrido. La formación de abscesos y necrosis son más probables en las infecciones por *K. pneumoniae* que otras neumonías bacterianas. La tasa de mortalidad se ubica entre 25 y 50% independiente de una cobertura antibiótica adecuada y se correlaciona de forma estrecha con el desarrollo de bacteremia (4).

K. oxytoca se parece a la *K. pneumoniae* en su espectro patológico y desde el punto de vista clínico puede considerarse que es el mismo microorganismo (4).

B. BETA-LACTÁMICOS

Los antibióticos beta-lactámicos son productos que se recetan frecuentemente y comparten una estructura y un mecanismo de acción común, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, en especial la formación de puentes cruzados entre las diversas capas de peptidoglucano, que brinda rigidez a la pared celular y protege del ingreso excesivo de agua a la bacteria, que ocurriría

debido a la elevada concentración de solutos en estos microorganismos. La formación de puentes cruzados es efectuada por proteínas con acción de transpeptidasas, denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PFPs). Cuando los antibióticos beta-lactámicos son expuestos a enzimas del grupo de las beta-lactamasas, estos se convierten en inactivos, debido a destrucción (ruptura) del anillo beta lactámico (6).

Entre las clases importantes de estos productos están las penicilinas G y V que son muy activas contra cocos Gram-positivo sensibles y poco activos contra Gram-negativo. Las cefalosporinas se clasifican por generaciones y son mas estables que las penicilinas a muchas beta-lactamasas bacterianas; la primera (cefolatina, cefadrozil, cefalexina, cefapirina, cefadrina y cefazolina) incluye compuesto con actividad contra microorganismos Gram-positivo, pero moderada contra Gram-negativo; la segunda (cefaclor, cefamandol, cefonicida, cefuroxima, cefprozil, cefalotina, cefotetán y cefmetazol) productos con actividad un poco mayor contra microorganismos Gram-negativo y algunos medicamentos con efectos contra anaerobios; la tercera (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefixima, cefpodoxima, moxalactan) tiene compuestos con menor actividad contra microorganismos Gram-positivo, pero posee acción intensa contra *Enterobacteriaceae*, y un subgrupo activo contra *Pseudomonas aeruginosa*; la cuarta (cefepima) tiene entre sus miembros, productos con un espectro semejante al de la tercera, pero una mayor estabilidad a la hidrólisis por beta-lactamasas (7,8).

1. Mecanismo de Acción

Las penicilinas, así como todos los antibióticos beta-lactámicos, inhiben el crecimiento bacteriano por interferir con un paso específico en la síntesis de la pared celular, en especial la formación de puentes cruzados entre las diversas capas de peptidoglucano, que normalmente brinda rigidez a la pared celular y protege a la membrana celular del ingreso de cantidades excesivas de agua a la bacteria. La pared celular está compuesta de un polímero complejo entrecruzado, peptidoglucano (mureína, mucopéptido), consistente de polisacáridos y polipéptidos. Los polisacáridos contienen aminoazúcares alternados, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Un péptido de 5-aminoácidos se une al azúcar ácido N-acetilmurámico; este péptido termina en D-alanil-D-alanina. Las proteínas fijadoras de penicilinas (PFPs) catalizan la reacción transpeptidasa que remueve la terminal alanina para formar un enlace cruzado con un péptido contiguo, el cual proporciona a la célula su estructura rígida. Los antibióticos beta lactámicos son análogos estructurales del sustrato natural de D-ala-D-Ala y se unen covalentemente a las PFPs en el sitio activo. Después que un antibiótico beta-lactámico se ha unido a la PFP, se inhibe la reacción de transpeptidasa, la síntesis de peptidoglucano se bloquea y la célula muere. El mecanismo exacto responsable de la muerte celular no es completamente entendido, pero las autolisinas, enzimas bacterias que remodelan y rompen la pared celular, están involucradas. Las penicilinas y las cefalosporinas son bactericidas solo si las células están activamente en crecimiento y sintetizando la pared celular (6-8).

C. MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA A PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS

La resistencia a los antibióticos beta-lactámicos puede ser debida a diferentes mecanismos: reducción de la permeabilidad, mecanismos de expulsión del antibiótico, inactivación enzimática por la acción de las beta-lactamasas, y modificación de las PFPs (6).

Todas las bacterias (o casi todas) contienen las proteínas fijadoras de penicilina (PFPs), pero los antibióticos beta-lactámicos no destruyen o ni siquiera inhiben a todas las bacterias, y operan algunos mecanismos de resistencia de los microorganismos patógenos a tales medicamentos. Los microorganismos pueden indicar resistencia intrínseca por diferencias estructurales en las PFPs que son los objetivos o blancos de tales fármacos. Otros casos de resistencia bacteriana a los antibióticos beta-lactámicos son causados por la incapacidad del compuesto para penetrar en su sitio de acción (espacio periplásmico), afinidad de la enzima al antibiótico y la cantidad de beta-lactamasas (7-9).

En bacterias Gram-negativo, las beta-lactamasas aparecen en cantidades relativamente pequeñas, pero están situadas en el espacio periplásmico entre las membranas internas y externas de la bacteria. Las enzimas de la síntesis parietal se encuentran en la superficie externa de la membrana interna, razón por la que estas beta-lactamasas de bacterias Gram-negativo son codificadas en los cromosomas por plásmidos y pueden ser de tipo constitutivo o inducibles. Los plásmidos son transferencias entre una y otra bacteria por conjugación; las enzimas en cuestión hidrolizan a las penicilinas, cefalosporinas o ambos fármacos (7,8).

La alteración en dos proteínas fijadoras de penicilinas (1A y 2X), al punto de que hay poca unión con las cefalosporinas, basta para volver al neumococo resistente a la tercera generación de cefalosporinas porque las otras tres proteínas fijadoras de penicilina de alto peso molecular tienen inherentemente poca afinidad. Las cefalosporinas de tercera generación son sensibles a hidrólisis por beta-lactamasas inducibles codificadas por cromosoma (tipo1); en cambio las cefalosporinas de 4a generación (cefepima o cefpirona) no son afectadas ya que estos antibióticos son más permeables y atraviesan rápidamente el espacio periplásmico donde están ubicadas las beta-lactamasas. Si estuviera afectada la permeabilidad de la membrana externa, estos antibióticos permanecerían más tiempo en el espacio periplásmico con la consecuente inactivación (3,7).

Las bacterias Gram-negativo poseen en el cromosoma un gen (Amp C) que codifica para una beta-lactamasa más activa frente a cefalosporinas que frente a penicilinas; además, muchos bacilos Gram-negativo poseen genes reguladores de la producción de esta beta-lactamasa AmpC. En algunas oportunidades y por procesos de mutación, las bacterias se convierten en productoras de grandes cantidades de la enzima, que aunque no es muy eficaz para destruir los beta-lactámicos, es tan grande la producción que al final aparece la resistencia (10,11).

En las bacterias Gram-negativo las más importantes de estas beta-lactamasas ligadas a plásmidos son la TEM-1 y en menor grado la SHV-1 (en *K. pneumoniae*) y la PSE-1 (en *Pseudomonas aeruginosa*). Estas enzimas brindan resistencia a las bacterias Gram-negativo frente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. Se ha descrito además la existencia de beta lactamasas de espectro extendido, ligadas a plásmido, especialmente en *Klebsiella pneumoniae*, que producen la inactivación de cefalosporinas de tercera generación y monobactamos. Estas enzimas están

relacionadas a TEM-1 y TEM-2 (16 enzimas) y a SHV-1 (4 enzimas), y en ellas sólo hay variación de uno a tres aminoácidos en relación a las beta lactamasas originales TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las beta-lactamasas de espectro extendido no destruyen a la cefoxitina y su actividad puede ser anulada combinando un beta-lactámico con un inhibidor de las beta-lactamasas como ácido clavulánico o sulbactam. Existe una tercera clase de beta- lactamasas de espectro extendido y que está relacionada a la beta-lactamasa AmpC que sí brinda resistencia frente a cefoxitina y que no es inhibida por ácido clavulánico ni sulbactam. El imipenen no es afectado por ninguno de los tres tipos de beta lactamasas de espectro ampliado (10).

D. BETA-LACTAMASAS

Las beta-lactamasas son una familia de enzimas cuya actividad es hidrolizar el enlace amida cíclico de la penicilina G y otros beta-lactámicos, inactivando al antibiótico. En la actualidad se conocen alrededor de 300 enzimas diferentes. La especificidad de la beta-lactamasa por un antibiótico beta-lactámico determinará la eficiencia con la cual la bacteria hidroliza al antibiótico (7,8,12,13,14).

Las TEM-1, TEM-2 y SHV-1 son beta-lactamasas mediadas por plásmidos predominantes en los bacilos Gram-negativo y se clasifican en el grupo 2b de la clasificación de Bush. Su diseminación es consecuencia de la presión selectiva ejercida por la introducción de ampicilina, cabernicilina y las primeras cefalosporinas en los años sesenta (10,11,15).

Algunas beta-lactamasas como las sintetizadas por *Staphylococcus aureus* han permanecido estables por décadas y tienen un limitado espectro de actividad,

hidrolizando a la penicilina G, pero no a las penicilinas semisintéticas. En cambio, las beta-lactamasas sintetizadas por Gram-negativo TEM-1 y SHV-1 codificadas en plásmidos y con un amplio espectro de actividad contra beta-lactámicos permanecieron estables por muchos años, pero a partir de los años ochenta aparecieron cepas bacterianas productoras de variantes de las enzimas anteriormente mencionadas, con capacidad para hidrolizar cefalosporinas de 3ª generación (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima) y fueron llamadas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (11,13,16).

1. Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

Estas beta-lactamasas son enzimas que se han originado en los genes que codifican las beta-lactamasas de amplio espectro TEM-1, TEM-2 o SHV-1 tras sufrir diversas mutaciones. Estas mutaciones les confiere a la bacteria que produce estas enzimas cierta resistencia a las oximino-cefalosporinas como cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona (cefalosporinas de 3ª generación) y el oximino-monobactam, aztreonam, que fueron diseñados para resistir la actividad de las beta-lactamasas; pero no aportan resistencia a la acción de las cefamicinas o imipenem (10,11,17-20).

En 1988 se reportaron beta-lactamasas codificadas en plásmidos y su origen fue debido a la transferencia del gen cromosomal que codifica para la beta-lactamasas llamado AmpC a plásmidos. Las bacterias productoras de beta-lactamasas AmpC que más comúnmente se han aislado son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* y *Proteus mirabilis* (2,21,22).

Todas las BLEEs tiene el mismo espectro de actividad y son inhibidas por el ácido clavulánico, pero las beta-lactamasas AmpC plasmídicas, son constitutivas en su expresión, es decir, las células bacterianas siempre las están sintetizando, a diferencia de las cromosomales, las cuales requieren inducción por la exposición previa a beta-lactámicos. Además, los genes que codifican para las beta-lactamasas AmpC pueden ser transferidos a otras bacterias a través de la conjugación (16,12,22).

Las mutaciones en las beta-lactamasas, que son agrupados en el subgrupo 2be de la clasificación de Bush, tienen de uno a 4 sustituciones de aminoácidos comparado con las enzimas originales. Estas sustituciones remodelan el lugar activo de la enzima aumentando el espectro de su actividad hidrolítica. El carbapenem, las cefamicinas y la temocilina permanecen estables. Estas mutaciones en las diversas BLEEs conocidas, no necesariamente les confiere capacidad para hidrolizar a los mismos sustratos, por ejemplo, TEM-7 hidroliza ceftazidima y cefotaxima con la misma efectividad, mientras que SHV-2 hidroliza a cefotaxima cerca de 10 veces más rápido que a ceftazidima; sin embargo, *in vitro* se observa que la concentración mínima inhibitoria para ceftazidima es mucho más alta debido a que este antibiótico tiene pobre penetración al espacio periplásmicos bacterianos y por tanto tiene poco contacto con las beta-lactamasas (10-12,17,21).

Estas beta-lactamasas aparecen de manera predominantes en *Klebsiella*; la predilección de estas enzimas por *Klebsiella* refleja parcialmente el que estas bacterias sobreviven más que otras enterobacterias sobre la piel y otras superficies facilitando la infección-cruzada. La transferencia paciente a paciente de una cepa productora de la beta-lactamasa no explica totalmente la epidemiología de BLEEs,

y hay muchos casos donde la transferencia del plásmido codificante ha sido crítica para la diseminación de la resistencia (2,10,12,13,22).

Las diferentes BLEEs varían en la eficiencia cinética y en el grado de la resistencia que causan. Algunas tienen una actividad muy amplia con actividad similar frente a cefotaxima y ceftazidima y dan lugar a resistencia para todas las cefalosporinas de amplio espectro. Otras tienen un fenotipo de ceftazidimasa, con mayor actividad frente a ceftazidima que frente a otras cefalosporinas. Las ceftazidimasas dan una resistencia a ceftazidima, pero causa solo una pequeña reducción en la sensibilidad a cefotaxima, ceftriaxona y ceftizoxime (10).

2. Epidemiología de Cepas Productoras de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

Las primeras cepas reportadas como productoras de BLEEs pertenecían a las especies de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y fueron causantes de brotes de infección nosocomial en los Estados Unidos. La indiscriminada administración de cefalosporinas de espectro extendido, particularmente ceftazidima fue la principal causa de la aparición de estas cepas (11,17,23-25).

Las cepas productoras de BLEEs, han ocasionado brotes de infección intrahospitalaria, con multirresistencia a los antibióticos, dificultando el tratamiento y aumentando la morbimortalidad nosocomial (12).

El principal reservorio es el tracto digestivo y las manos la ruta de transmisión. La infección se desarrolla en el 50 % de los pacientes colonizados, siendo la mitad infección del tracto urinario. Los factores de riesgo para la

colonización o infección son la duración del tiempo de exposición a una cepa epidémica, estancia hospitalaria prolongada, ingreso a la unidad de cuidados intensivos, cauterización arterial y urinaria, administración de cefalosporinas de tercera generación y la frecuencia del contacto con personal sanitario (11,17,26).

Un estudio en los Estados Unidos mostró que el 15% de los aislamientos de *Escherichia coli* y el 24% de *Klebsiella pneumoniae* muestran concentraciones mínimas inhibitorias para ceftazidima igual o mayor a 2 mg/ml, lo que se relaciona con el fenotipo productor de BLEEs (27).

Históricamente, los patógenos resistentes a los antibióticos han sido un problema particular de hospitales, especialmente la unidad de cuidados intensivos, sin embargo, es claro que el dilema también comienza a manifestarse en infecciones comunitarias. Los bacilos Gram-negativo comunitarios productores de BLEEs han sido detectados con mayor frecuencia en internos, en asilos de ancianos y varios estudios sugieren que es la única subpoblación en riesgo para la colonización e infección por estos patógenos (25,28).

Aproximadamente el 70% de las cepas de *Klebsiella* aisladas en Argentina son resistentes a todas las cefalosporinas de 3a generación debido a la presencia de una Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) plasmídica. Sin embargo continúan siendo sensibles a imipenem, a cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) y a esquemas combinados con inhibidores de beta-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam). Los plásmidos que contienen las beta-lactamasas generalmente transportan enzimas que inactivan a los aminoglucósidos, especialmente gentamicina. El 54% de las cepas son resistentes a gentamicina. Los carbapenemes siguen siendo activos frente a *Klebsiella* con y sin BLEEs, pero se

han documentado algunas cepas resistentes a meropenem (3,29).

Estas enzimas aparecían en 1994 en 20-25 % de los aislamientos de *Klebsiella* de algunas UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) del Sur y Oeste de Europa y posiblemente alcancen una amplia distribución como las enzimas TEM-1. En 1997 se presentaba con estas enzimas la misma proporción de *Klebsiella*, no observándose aumento de la frecuencia en este periodo. Desde 1994 a 1997 sí se observó aumento de la proporción de productoras de BLEEs resistente a piperacilina/tazobactan (desde 31 al 63 %; la mayoría con CMI = 128 ± 4 $\mu\text{g/ml}$). También ha aumentado la proporción de aislamientos de *K. oxytoca* hiperproductora de beta-lactamasa desde el 8 a 21 % (30).

3. Inhibidores De Beta-Lactamasas

Algunas moléculas se ligan a las beta-lactamasas y las inactivan y así evitan la destrucción de los antibióticos beta-lactámicos que sirven de sustratos para dichas enzimas. Los inhibidores de las beta-lactamasas tienen mayor acción contra beta-lactamasas codificadas por plásmidos (incluidas las enzimas de espectro extendido que hidrolizan ceftazidima y cefotaxima), pero son inactivas a las concentraciones que se alcanzan en seres humanos contra beta-lactamasas cromosómicas de tipo I inducidas en bacilos Gram-negativo por tratamiento con cefalosporinas de segunda y tercera generación (8).

4. Detección de Beta-Lactamasas Plasmídicas de Espectro Extendido

El laboratorio de microbiología es imprescindible en la detección de aislamientos de enterobacterias productoras de BLEEs y de posibles brotes

nosocomiales. La detección precoz de estas cepas es importante para instaurar el tratamiento adecuado y las medidas de aislamiento de los pacientes, necesarias para evitar la diseminación (11,17).

La acción hidrolítica de estas BLEEs hace que en algunas ocasiones generen CMIs más elevadas a ceftazidima que a cefotaxima, y en otras ocurra lo contrario; por lo tanto se debe determinar la sensibilidad antibiótica con los dos antibióticos. Cuando se detecte la producción de BLEEs se debe informar como resistente a cefalosporinas de tercera generación y monobactames para tomar las medidas epidemiológicas adecuadas y evitar que estos antibióticos se usen en el tratamiento (11,17).

a. Técnica de la doble difusión con discos.

Se realiza por difusión en agar utilizando una placa de Mueller-Hinton inoculada con una suspensión bacteriana ajustada al patrón de 0,5 de la escala McFarland; sobre ella se colocan, discos con carga estándar (30 mg) de cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima y aztreonam dispuestos a una distancia de 25-30 mm de discos de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 mg). Se considera sinergia positiva y, por tanto, presencia de una BLEEs, cuando se observa una ampliación del halo de inhibición en alguna de las cefalosporinas o del aztreonam (17).

b. Técnica de E-test

Son tiras comerciales de E-test especialmente diseñado para la detección de cepas productoras de BLEEs. Este E-test es una tira de papel impregnada con antibióticos, la mitad consta de una concentración decreciente de ceftazidima desde 32 µg/mL hasta 0,5 µg/mL; la otra mitad de la tira contiene

ceftazidima/ácido clavulánico (2:1) en concentraciones decrecientes desde 8 µg/mL hasta 0,12 µg/mL, se considera positiva la sinergia con ácido clavulánico cuando se observa una disminución de dos o más diluciones de la CMI de ceftazidima cuando se le añade ácido clavulánico (17).

c. Técnica de la sinergia con inhibidores de las beta-lactamasas

Se puede detectar la presencia de una BLEEs mediante la realización de una CMI por micro o macrodilución de cefalosporinas de tercera generación con y sin inhibidor de beta-lactamasa (17).

JUSTIFICACIÓN

La introducción de nuevos antibióticos en el uso clínico normalmente es seguida por el rápido y progresivo desarrollo de resistencia en bacterias patógenas. La causa más común de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos es la producción de las beta-lactamasas, que son enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico de las penicilinas G y otros beta-lactámicos, inactivando el antibiótico.

Las Beta-Lactamasas de Espectro Extendido son enzimas con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, también se ha visto acompañada a la resistencia de otros antibióticos como aminoglucósidos, trimetoprim sulfametoaxol, quinolonas, lo cual generan serios problemas terapéuticos; por lo que es de suma importancia determinar la prevalencia de este mecanismo de resistencia en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, que aportará la información para el uso racional de antibióticos y a controlar su acelerada diseminación.

El Hospital General San Juan de Dios es uno de los dos hospitales de referencia que tienen cobertura para regiones nororiente del país; es de gran relevancia realizar este tipo de estudio para establecer un sistema de vigilancia de las especies más comunes y su perfil de resistencia a fin de tomar las acciones necesarias para su prevención y control.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el porcentaje de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

Objetivos Específicos

1. Determinar el porcentaje de las cepas productoras de BLEE por tipo de sala.
2. Determinar el porcentaje de las cepas productoras de BLEE por tipo de muestras.
3. Determinar el porcentaje de las cepas productoras de BLEE por sexo.

HIPOTESIS

El porcentaje de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aislados del Hospital General San Juan de Dios está entre el 10 al 15 %.

MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

Muestras de Pacientes que son referidos al Laboratorio de Microbiología del Hospital General Sal Juan de Dios.

Muestra: cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aislados de muestras de pacientes referidos al Laboratorio de Microbiología del Hospital General San Juan de Dios.

Medios

1. Recursos Humanos

Autor: Verónica del Rosario Itzep Solares

Asesor: Lic. Jorge Raúl Matheu

Licda. Tamara Velásquez

Personal profesional y técnico de Laboratorio de Microbiología del Hospital General San Juan de Dios y el Laboratorio Nacional de Salud.

2. Recursos Materiales

a) Instalaciones

i. Instalaciones y equipo del Laboratorio de Microbiología del Hospital

General San Juan de Dios

ii. Instalaciones y equipo Laboratorio Nacional de Salud.

b) Equipo

- i. Incubadora
- ii. Balanza Analítica
- iii. Refrigeradora
- iv. Mechero
- v. Impresora
- vi. Computadora
- vii. Autoclave
- viii. Campana Bacteriológica

c) Materiales

- i. Guantes desechables
- ii. Espátula
- iii. Pinzas
- iv. Asas en Argolla
- v. Erlenmeyer de 250 ml, 500 ml
- vi. Cajas de Petrii 100 x 15 mm
- vii. Probeta de 10 ml, 100 ml, 500 ml
- viii. Tubos de ensayo
- ix. Hisopos estériles
- x. Papel pH
- xi. Papel Mayordomo
- xii. Resma de hojas bond tamaño carta

d) Reactivos y Medios de Cultivo

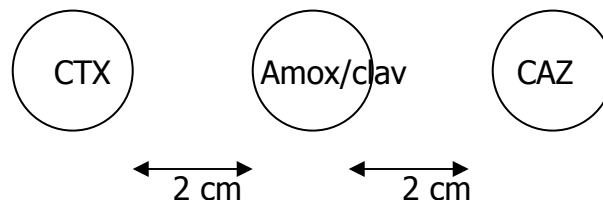
- i. Estándar de MacFarland 0.5
- ii. Discos de antibióticos de cefotaxima, ceftazidima y Ácido

Clavulánico con amoxicilina, entre otros (eritromicina, penicilina, tetraciclina, gentamicina, SxT, ampicilina, imepenem)

- iii. Agar Muller Hinton
- iv. Agar Tripticasa Soya
- v. Agua Destilada
- vi. Solución Salina

C. Procedimiento

1. Sembrar las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* presuntivas de BLEEs en Agar Tripticasa Soya.
2. Realizar una suspensión al 0.5 del Estandar de MacFarland de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* en solución salina.
3. Tomar un hisopo estéril e introducirlo en la suspensión bacteriana preparada en el paso anterior, exprimir el hisopo contra las paredes del tubo y sembrar con él en tres direcciones diferentes, una caja de agar Muller Hinton.
4. Dejar absorber por tres minutos
5. Colocar los discos de detección con una pinza a una distancia de 2 cm entre disco y disco, colocados en el siguiente orden:
 - a. Cefotaxima (CTX)
 - b. Acido Clavulánico/amoxicilina
 - c. Ceftazidima (CAZ)



Interpretación: Deformación del halo por la inhibición de la beta-lactamasa por parte del Ac. Clavulánico con amoxicilina y la consiguiente acción de la Cefalosporina de 3ra generación (CTX y CAZ)

6. Realizar la confirmación de BLEEs, con los discos de antibióticos de Cefalosporinas de 3ra Generación individual (CTX y CAZ) y la mezcla de los antibióticos con Ácido Clavulánico.

Interpretación: Se confirma con la lectura de la mezcla de antibióticos y con los discos de antibióticos Cefalosporinas de 3ra Generación individual con un halos \geq de 5mm.

7. Se determinó la resistencias acompañada a otros antibióticos como eritromicina, SXT, penicilinas, tetraciclinas, gentamicina.

D. Diseño de Investigación

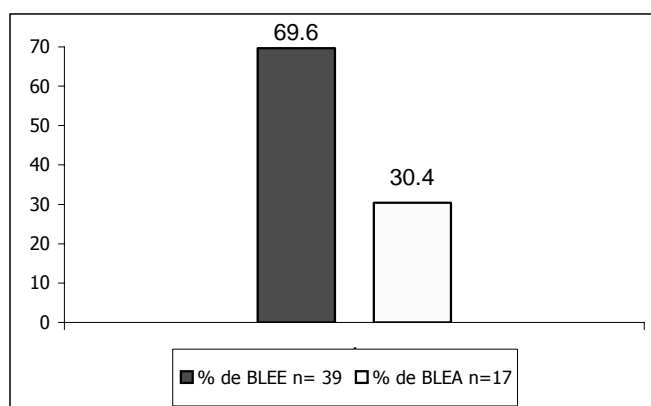
1. Muestra: Se recolectaron las muestras presuntivas de BLEE en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, comprendido en un tiempo de muestreo de 6 meses, analizando 56 cepas, 47 *Klebsiella pneumoniae* y 9 *Klebsiella oxytoca*.
2. Variable de Interés: Presencia de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.
3. Análisis de Resultados: Los resultados obtenidos se analizaron por medio del programa WHONET.
4. Diseño experimental: tipo de estudio descriptivo y transversal.

RESULTADOS

Un total de 56 cepas se analizaron en este estudio, 47 *Klebsiella pneumoniae* y 9 *Klebsiella oxytoca*, representando el 69.6 por ciento cepas productoras de Beta-lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) (39 de 56) y el 30.4 por ciento de cepa productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Ampliado (BLEA) (17 de 56) como se observa en la gráfica 1.

Gráfica 1

PORCENTAJE DE BLEE Y BLEA



Fuente: datos experimentales

De las 39 cepas aisladas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), el 82% corresponde a *Klebsiella pneumoniae* (n=32) y el 17.9% a *Klebsiella oxytoca* (n=7) como se observa en la tabla 1. De las 17 cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro (BLEA), el 88.2 % corresponde a *Klebsiella pneumoniae* y el 11.7 % a *Klebsiella oxytoca*, como se observa en la tabla 2.

Tabla 1

PORCENTAJE DE BLEE POR MICROORGANISMO

Microorganismo	No. aislamiento n=39	Porcentaje
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	82.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	17.9

Fuente: datos experimentales

Tabla 2

PORCENTAJE DE BLEA POR MICROORGANISMO

Microorganismo	No. aislamiento n=17	Porcentaje
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	88.2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	11.7

Fuente: datos experimentales

Como se observa en la tabla 3; de las distintas salas analizadas, es de importancia resaltar que las cepas de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) se concentran mayormente en las salas de Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) (38.5%) y Unidad de Cuidados Intensivos de Neonato (UCIN) (33.3%); en cambio la cirugía de hombres (52.9%) es más afectada por las cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro (BLEA).

Tabla 3

PORCENTAJE DE BLEE Y BLEA POR TIPO DE SALA

SALA	BLEE		BLEA	
	No. Aislamiento	Porcentaje	No. Aislamiento	Porcentaje
CH	5	12.8	9	52.9
EMA	2	5.1	2	11.8
U14	2	5.1	2	11.8
UCC	2	5.1	--	--
UCIN	13	33.3	--	--
UTIP	15	38.5	2	11.8
URO	--	--	2	11.8

Fuente: datos experimentales

BLEE= Beta-Lactamasa de Espectro Extendido

CH= Cirugía de Hombre

U14= Medicina de Mujer

UCIN= Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos

URO= Urología

BLEA= Beta-Lactamasa de Amplio Espectro

EMA= Emergencia de Medicina de Adulto

UCC= Unidad de Cuidados Coronarios

UTIP= Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica

De las distintas muestras analizadas en el estudio, las que presentaron mayor porcentaje de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) son los aspirados

oro-traqueales y las orinas (43.6 % y 17.9 %, respectivamente); mientras las muestras que presentan niveles altos de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro (BLEA) son las orinas y los aspirados oro-traqueales (47.1 % y 29.4%, respectivamente) como se observa en la tabla 4.

Tabla 4

PORCENTAJE DE BLEE Y BLEA POR TIPO DE MUESTRA

MUESTRA	BLEE		BLEA	
	No. Aislamiento	Porcentaje	No. Aislamiento	Porcentaje
Catéter	5	12.8	--	--
Orina	7	17.9	8	47.1
Sangre	5	12.8	2	11.8
Secreciones	5	12.8	--	--
Aspirado Orotraqueal	17	43.6	5	29.4
Espujo	--	--	2	11.8

Fuente: datos experimentales

BLEE= Beta-Lactamasa de Espectro Extendido

BLEA= Beta-Lactamasa de Amplio Espectro

De las 39 cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido, el 51.3 % corresponde al sexo masculino (n=20) y el 48.7 % al sexo femenino (n=19). El sexo femenino presenta un alto porcentaje de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro, como se presenta en la tabla 5.

Tabla 5

PORCENTAJE DE BLEE Y BLEA POR GÉNERO

GÉNERO	BLEE		BLEA	
	No. Aislamiento	Porcentaje	No. Aislamiento	Porcentaje
Femenino	19	48.7	12	70.6
Masculino	20	51.3	5	29.4

Fuente: datos experimentales

BLEE= Beta-Lactamasa de Espectro Extendido

BLEA= Beta-Lactamasa de Amplio Espectro

Las cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido afectan mayormente a los pacientes pediátricos; en cambio los pacientes adultos presenta alto porcentaje de las cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro, como se observa en la tabla 6.

Tabla 6

PORCENTAJE DE BLEE Y BLEA POR TIPO DE PACIENTE

TIPO DE PACIENTE	BLEE		BLEA	
	No. Aislamiento	Porcentaje	No. Aislamiento	Porcentaje
Adulto	12	30.8	13	76.5
Neonato	12	30.8	2	11.8
Pediátrico	15	38.5	2	11.8

Fuente: datos experimentales

BLEE= Beta-Lactamasa de Espectro Extendido

BLEA= Beta-Lactamasa de Amplio Espectro

A las cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) se determinó su patrón de resistencia a antibióticos no beta-lactámicos, dichas cepas fueron resistentes a trimethoprim sulfametoxazol; tobramicina, gentamicina y ciprofloxacina que pertenecen a la familia de los aminoglucósidos, como se presentan en la tabla 7 y gráfica 2.

Tabla 7

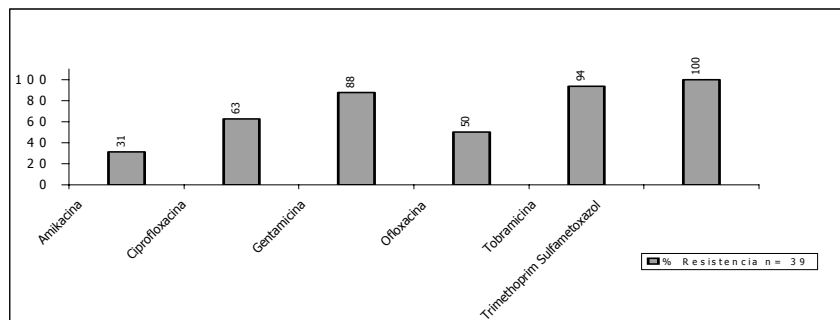
PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO BETA-LACTÁMICOS FRENTE A LAS CEPAS PRODUCTORA DE BLEE n = 39

ANTIBIÓTICOS	No. de RESISTENCIA	PORCENTAJE RESISTENCIA
Amikacina	12	31
Ciprofloxacina	25	63
Gentamicina	32	88
Ofloxacina	20	50
Tobramicina	37	94
Trimethoprim Sulfametoxazol	39	100

Fuente: datos experimentales

Gráfica 2

PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO BETA-LACTÁMICOS FRENTE A LAS CEPAS PRODUCTORA DE BLEE



Fuente: datos experimentales

A las 17 cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Extendido (BLEA) se determinó su patrón de resistencia frente a antibióticos beta-lactámicos y no beta-lactámicos, como se presentan en la tabla 8 y gráfica 3.

Las cepas productoras de BLEA fueron resistentes a ampicilina, y fueron susceptibles a amikacina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, imipemen, trimethoprim sulfametoxazol, como se presentan en la tabla 8 y gráfica 3.

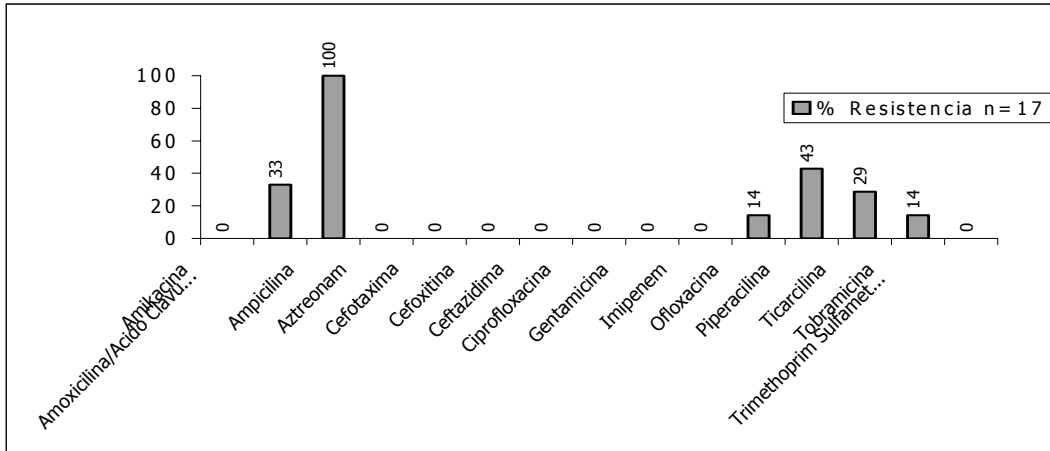
Tabla 8

PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS Y NO BETA-LACTÁMICOS FRENTE A LAS CEPAS PRODUCTORA DE BLEA n=17

ANTIBIÓTICO	No. DE RESISTENCIA	PORCENTAJE RESISTENCIA
Amikacina	0	0
Amoxicilina/Acido Clavulanico	6	33
Ampicilina	17	100
Aztreonam	0	0
Cefotaxima	0	0
Cefoxitina	0	0
Ceftazidima	0	0
Ciprofloxacina	0	0
Gentamicina	0	0
Imipenem	0	0
Ofloxacina	2	14
Piperacilina	7	43
Ticarcilina	5	29
Tobramicina	2	14
Trimethoprim Sulfametoxazol	0	0

Fuente: datos experimentales

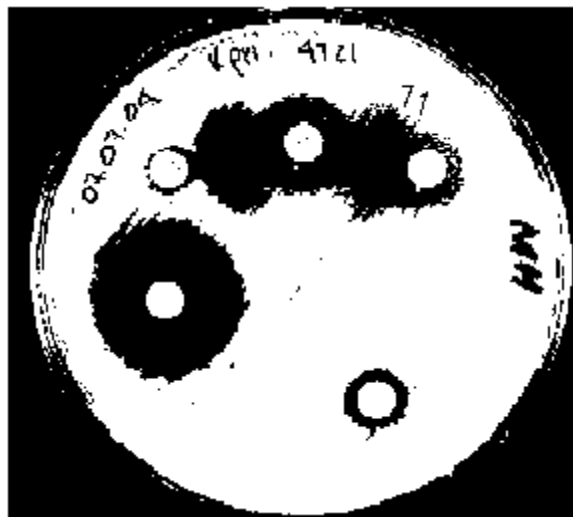
Gráfica 3
PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS Y NO BETA-LACTÁMICOS FRENTE A LAS CEPAS PRODUCTORA DE BLEA



Fuente: datos experimentales

Figura 1

En Agar Muller Hinton se colocaron los discos de Cefotaxima, Amoxicilina/Ácido Clavulánico y Ceftazidima; si la cepa es productora de BLEE, se observa una deformación del halo producido por la cefalosporina de tercera generación formando el fenómeno "efecto huevo".



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública y de la comunidad, afectando a todo tipo de instituciones, debido al uso inapropiado de antibióticos. La vigilancia de la resistencia bacteriana es fundamental, debido a la morbilidad y mortalidad que con lleva la resistencia a antibióticos, y es causante de altos costos hospitalarios.

La importancia de detectar estas cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido, es porque se ha visto acompañada a la resistencia de otras familias de antibióticos, generando serios problemas terapéuticos; así mismo este mecanismo de resistencia puede ser transferida a otras bacterias por medio de plásmidos, causando un problema mayor.

Las enzimas Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) tienen una singular peculiaridad en el género *Klebsiella* spp., por la incidencia de producir infecciones nosocomiales y su importancia de transferir resistencia antibiótica. En un estudio realizado en el hospital de Brasil en 1998, se encontraron 70 % de *Klebsiella* spp y 59 % de *E. coli*, productores de BLEE, (16.6 % *Klebsiella oxytoca* y 83.3.0 % *Klebsiella pneumoniae*); estas tasas son similares a las halladas en el presente estudio, donde se detectó un 69.6 % se *Klebsiella* spp productoras de BLEE, representado por el 82.0 % de *Klebsiella pneumoniae* y 17.9 % *Klebsiella oxytoca*. Esto indica que existe un alto porcentaje de las cepas productoras de la enzima BLEE en el hospital, los datos son de relevancia para el hospital para establecer un sistema de vigilancia epidemiológica a fin de tomar acciones necesarias para su prevención y control, para reducir la diseminación de estas cepas multirresistentes y la morbimortalidad que pueden ocasionar en pacientes intrahospitalarios, según se observa en la gráfica 1 y tabla 1 (33).

Es de importancia mencionar que se detectó un alto porcentaje de *Klebsiella pneumoniae* con respecto a *Klebsiella oxytoca*. *Klebsiella pneumoniae* es un potente productor de la enzima BLEE, además tiene una mayor diseminación dentro de los centros hospitalarios, según la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), éste muestra una similitud con respecto a este estudio, presentando *Klebsiella pneumoniae* un porcentaje mayor con respecto a *Klebsiella oxytoca* (34).

Otros estudios del National Nosocomial Infections Surveillance Systems (NNIS) realizado entre 1986 y 1993 en EE.UU. en cepas de *K. pneumoniae* informaron tasas de BLEE de hasta 58%. Otro estudio realizado en 1998 por el programa de vigilancia epidemiológica Resisnet en Latinoamérica, informó que la prevalencia de BLEE por *E. coli* en algunos países llega casi a 65% y en *K. pneumoniae* la prevalencia es aun más alta llegando hasta 73% (35).

Klebsiella pneumoniae y *Klebsiella oxytoca* productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro (BLEA) presentan resistencia natural inactivando a ampicilina, esto muestra relación con los resultados, presentando resistencia del 100% a la ampicilina, y son susceptibles a las cefalosporinas, aztreonam, trimethoprim sulfametoxazol. Estas cepas productoras de BLEA presentan resistencia a otro antibióticos como piperacilina, amoxicilina/ Ácido Clavulánico, como se observa en la gráfica 3 (36).

Las enzimas BLEE son una mutación de las enzimas de BLEA; el comportamiento de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* productoras de BLEE frente a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, ampicilina muestran una resistencia total a los antibióticos; las cepas productoras de BLEE presentan alta resistencia a otros antibióticos no Beta-Lactámicos como

tobramicina, gentamicina, amikacina que pertenecen a la familia de aminoglucósidos, trimethoprim sulfametoxazol, ciprofloxacina y ofloxacina que pertenecen a la familia de las quinolonas. El antibiótico que presenta una resistencia total es trimethoprim sulfametoxazol, el segundo antibiótico que presentan un nivel de resistencia alto es tobramicina esto indica que estos antibióticos son utilizados frecuentemente en dicho centro hospitalario causando el incremento de resistencia. La ciprofloxacina es el tercer antibiótico en presentar alta resistencia por parte de las cepas productoras de BLEE. Estas cepas productoras de la enzima son susceptibles *in vitro* a carbapemen, cefamicinas y a otros antibióticos combinados con ácido clavulánico que es un inhibidor de las beta-lactamasas, como se observa en la gráfica 2.

Al comparar la resistencia de las cepas productoras de BLEA contra las cepas productoras de BLEE, se evidencia que las cepas productoras de BLEE presentan resistencia a otras familias de antibióticos como las aminoglucósidos, quinolonas, trimethoprim sulfametoxazol, a comparación con las cepas productoras de BLEA que no presentan altas resistencia a esas familias de antibióticos. Esta resistencia que presentan las cepas productoras de BLEE, se debe al uso frecuente o cursos repetitivos de antibióticos de espectro extendido como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación o a la transferencia de la resistencia por medio de plásmidos hacia las cepas, como se presentan en la gráfica 2 y 3.

Las cepas productoras de BLEE por presentar una resistencia total a las penicilinas, cefalosporinas y monobactames, se debe informar todos estos antibióticos como resistentes, usándose como alternativa terapéutica las combinaciones de un beta-lactámico con un inhibidor de beta-lactamasa, cefamicinas (cefoxitina) y carbapenemes (imipenem). Sin embargo, el uso de estos antibióticos plantea el problema del desarrollo de resistencia por disminución de la

permeabilidad (modificaciones de las porinas), por lo que se recomienda buscar otras alternativas. Los carbapenemes, como el imipenem y el meropenem son resistentes a la acción hidrolítica de las Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (11,17,37).

El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomienda la confirmación de la producción de BLEE en todas las cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp. En el estudio se realizó la confirmación comparando el halo de inhibición de los discos ceftaxidima y cefotaxima con y sin amoxicilina/ácido clavulánico, el resultado fue mayor de 5 mm de diámetro de diferencia entre la combinación de los discos de antibióticos, con lo que concuerda con el criterio para confirmar una cepa productoras de BLEE (37).

La resistencia bacteriana es condicionante de altos costos hospitalarios, complicaciones y mayor morbilidad y mortalidad fenómeno al cual no escapan las unidades de terapia intensiva pediátrica o neonatal; los factores de riesgo son el uso de incremento de antibióticos, cursos repetidos de antibióticos, uso de antibióticos de espectro extendido, estancias prolongadas, y el uso de procedimientos invasivos.

En la tabla 3, se muestra que las salas mayormente afectadas por las cepas productoras de BLEE es la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica y la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonato, representando el 38.4 y 33.3 % respectivamente; este alto porcentaje en dichas salas es de suma importancia y de preocupación. Esto se debe a que los pacientes son tratados con medicamentos de espectro extendido cefalosporinas de tercera y cuarta generación y permanecen en el área de cuidados intensivos por periodos prolongados, que influye en la incidencia de la resistencia bacteriana favoreciendo de este modo el desarrollo de cepas

multiresistentes a antibióticos. Sin embargo, otros servicios han presentado este tipo de resistencias, esto es un gran problema a nivel hospitalario porque indica que existe una mutación de los genes o transferencia de los genes por plásmidos; por lo que es de suma importancia para el comité de investigación de infecciones nosocomiales del hospital dar un seguimiento a este tipo de resistencia, a fin de tomar las acciones necesarias para su control y propagación a otros servicios y a la comunidad porque algunos pacientes pueden seguir acarreando con estas cepas productoras de BLEE, causando una propagación extra hospitalaria.

Al contrario, la cepas productoras de BLEA predominan en el área de cirugía, esto puede deberse a que los pacientes están sometidos a procedimientos invasivos que es un factor de riesgo de infección nosocomial donde puede estar presente *Klebsiella*, no productoras de BLEE, sin embargo, esto no indica que en un futuro las cepas productoras de BLEA puedan mutar y producir las enzimas BLEE causando multirresistencia a los antibióticos.

Klebsiella pneumoniae es un patógeno importante en los hospitales por ser un causante potencial de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos. En la tabla no. 6 se muestra que el tipo de paciente mayormente afectado es el pediátrico (38.4%) por cepas productoras de la enzima BLEE porque este grupo etario es el más vulnerable ha adquirir infecciones, el adulto y neonato mostraron un porcentaje igual afectados por estas cepas productoras de BLEE. En cambio el grupo etario afectado por las cepas productoras de BLEA son los adultos, estos pacientes no son tan susceptibles a padecer infecciones que los pediátricos.

Basándose en los resultados de la tabla 4, el tipo de muestra que presenta un porcentaje mayor de las cepas productoras de BLEE es el aspirado orotraqueal, esta es una muestra clave, que se relaciona mucho con los pacientes que

permanecen por tiempo indefinido en las áreas de cuidado intensivo y que la mayoría padece de enfermedades respiratorias, estos pacientes son conectados a ventiladores artificiales. La segunda muestra que presentó alto porcentaje es la orina, esto se relaciona mucho porque *Klebsiella* es un causante de infecciones urinarias. Además los pacientes son tratados con una amplia gama de antibióticos; todo esto factores son de riesgos para que ocurra una infección nosocomial; porque el género *Klebsiella* spp., es causante sobre todo de neumonías, infecciones urinarias y bacteremias. En dicha gráfica se puede observar que la muestra de esputo no está aún afectada por estas cepas productoras de BLEE.

La muestra que representan un elevado porcentaje de cepas productoras de BLEA es la orina (47.1%) estos datos indican una asociación, debido a que el género *Klebsiella* spp., es causante de infecciones urinarias y la segunda muestra que presenta alto porcentaje es el aspirado orotraqueal, esto se debe a que los pacientes estén conectados a ventiladores artificiales, y que son fuentes donde *Klebsiella* se diseminan y desarrollan bien.

Con respecto al género afectado, no se evidenció diferencia con relación a la preferencia de las cepas productoras de BLEE, mostrando un 51.2 % por el sexo masculino y un 48.7 por el sexo femenino; en cambio las cepas productoras de BLEA se distribuyen en un alto porcentaje en el sexo femenino que en el sexo masculino, esto puede deberse a que el sexo femenino presenta mayor susceptibilidad a padecer infecciones urinarias, como se presenta en la tabla 5.

Se sabe que el sexo femenino es más vulnerable en padecer infecciones tipo urinarias, esto puede deberse al mal vaciamiento vesical por prolapso uterino, a la contaminación del periné por incontinencia fecal que son las causas más frecuentes en las mujeres. Este alto porcentaje de cepas productoras de BLEA

presente en el sexo femenino, se asocia mucho con el tipo de muestra que es la orina que también presenta un porcentaje alto de cepas productoras de BLEA.

CONCLUSIONES

1. Se detectó un alto porcentaje de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (69.6%)
2. *Klebsiella pneumoniae* se aisló en mayor proporción que *Klebsiella oxytoca* en proporción de 5:1.
3. Los tipos de sala que presentan mayor porcentaje de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido es la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica y la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos.
4. Las muestras que presentan un alto porcentaje de aislamiento de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido es el aspirado orotraqueal y orina.
5. El paciente pediátrico es mayormente afectado por las cepas productoras de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido.
6. Los aminoglucósidos y trimethoprim sulfametoxazol son los antibióticos no betalactámicos que se ven más afectados cuando hay presencia de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido.
7. La cirugía de hombres es la sala que presenta un alto porcentaje (52.9%) de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro.
8. En las muestras de orina de los pacientes se presenta mayor porcentaje (47.1%) de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro.

9. El sexo femenino presenta mayor porcentaje de cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro.

10. Las cepas productoras de Beta-Lactamasa de Amplio Espectro presentan resistencia natural a la ampicilina.

RECOMENDACIONES

1. Continuar realizando estudios como el presente para hacer conciencia sobre la importancia que tiene la resistencia mediada por las enzimas beta-lactamasas, y así poder hacer un uso racional de los medicamentos.
2. Establecer un Sistema de Vigilancia Epidemiológica en el hospital para difundir estudios relacionados a Beta-Lactamasa de Espectro Extendido, debido a que presentan un porcentaje alto, con el fin de tomar acciones preventivas y controlar las diseminación de estas cepas multirresistentes.

REFERENCIAS

1. Catherine Neuwirth, Roger Labia, Eliane Siebor, Andre Pechinot, Stephanie Madea, El Bachir Chaibi, and Antoine Kazmierczak. Characterization Of TEM-56 A Novel Beta-Lactamase Producer by a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy February 2000; 44 (2):453-455
2. Horri T. Yarakawa M. Ohta L. Ichiyama R. Wacharotayanjun and N. Kato. Plasmid-Mediated Ampc-Type Beta-Lactamase Isolated from *Klebsiella pneumoniae* Confers Resistance to Broad-Spectrum Beta-Lactams, Including Moxalactam. Antimicrob. Agents Chemother 1993; 37:984-990
3. Luna Carlos M. Gherardi Carlos, Flamigietti Angela. Vay Carlos. Resistencia Bacteriana y Antibioticoterapia en Medicina Respiratoria y Terapéutica Intensiva. Medicina 2001; 61:603-613
4. Zinser. Microbiología. 20 ed. Argentina: Panamericana. 1997. Pp 1696
5. Pelczar Michael J. Reid Roger D. Chan ECS. Microbiología. 4ª. ed. México: Mcgraw-Hill. 1982, Pág. 426, 777
6. Chirinos Pacheco, Julio. Los Mecanismos de la Resistencia Microbiana. Revista Medica del CIEM. Disponible en URL: <http://www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/home.htm> (septiembre 2003)
7. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª. ed. México: Mcgraw-Hill Interamericana. Vol. II 1996, pp. 1996
8. Katzung Bertram G. Farmacología Básica y Clínica. 7ª. ed. México: Manual Moderno. 1999, pp 1,310
9. Louis B. Rice, Lenore L. Carias, Andrea M. Hujer, Mary Bonafed, Rebecca Hutton, Claudia Hoyen, and Robber A. Bonomo. High-Level Expression of Chromosomally Encoded SHV-1 B-Lactamase and an Outer Membrane

Protein Change Confer Resistance to Ceftazidime and Piperacillin-Tazobactam in a Clinical Isolated of *Klebsiella pneumoniae* Antimicrobial Agent and Chemotherapy February 2000; 44 (2):363-367

10. Microbiología Clínica En La www. Disponible en URL: <http://microbiologiaclinica.Com/beta-lactamasas2.htm>. (Septiembre 2003)
11. Pérez, José L. Gimerio, Concepción. Beta-Lactamasa Plasmidica de Espectro Ampliado. Experiencias del Programa de Control de Calidad: dos años después. Boletín de Control de Calidad SEIMC 1999. Disponible en URL: http://www.seimc.org/control/revi_bacter/kpbca.htm (septiembre 2003)
12. Navarro-Navarro Moisés. Bolado-Martínez Enriques. Beta-Lactmasa de Espectro Extendido. Boletín Clínico Hospital General del Estado, en Hermosillo, Sonora, México. Disponible en: <http://actamedicasonora.com/beta-lactamasa.htm> (septiembre 2003)
13. Palavecina Rosales, Elizabeht Dr. Interpretación de Estudios de Susceptibilidad Antimicrobiana. Boletín Escuela de Median Pontificia Universidad Católica de Chile 1997; 26:156-160
14. Wong-Beringer A. Therapeutic Challenges Associated with Extended-Spectrum, Beta-Lactamase Producent *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacotherapy 2001; 21 (5):583-592
15. Melano R. Corso A. Petram A. Centron D. Orman B. Perreyra A. Moreno N. Galas M. Multiple Antibiotic Resistance Mechanims Includin A Novel Combination of Extend-Spectrum (beta)-Lactamses in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strain Isolated in Argentina. J. Antimicrob Chemother 2003; 52:36-42

16. Bedenic, B. Development of Beta-Lactam Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria and the impact of Resistance on Therapy. *Lijec Vje Sn* 1999; 121 (7-8):249-57
17. Ardanuy Tisaire, Carmen. Beta-Lactamasas Plasmidicas de Espectro Ampliado. *Boletín de Control de Calidad SEIMC* 1997; 9(1):11-18. Disponible en URL: http://www.seimc.org/control/revi_bacter/kpbca.htm
18. Jocoby G A. Antimicrobial-Resistant Pathogens in the 1190 S. *Anno Rev Med* 1996; 47: 169-179
19. Thomson K S. Controversies about Extended-Spectrum and Ampc Beta-Lactamases *Emer Inf Dis* 2001: 7:333-336
20. Laboratory Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Esbls). *Boletín de Centers for Disease Control and Prevention*. Disponible en URL: http://www.cdc.gov/ncidod/hip/A_zhtm
21. Livermora D M. B-Lactama in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995 8:557-584
22. Philip E. Cordón Ellen S. Moland and Kenneth S. Thomsom. Occurrence and Detection of Ampc Beta-Lactamasea among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* Isolates a Veterans Medical Center. *J. of Clin Microbiology*. May 2000 P 1791-1796 Vol 38. No.5
23. Rice, L. Evolution and Clinical Importance of Extended Spectrum B-Lactamases. *Chest* 2001; 119 (Supple 2) : 3915-3965
24. Rice L.B. Successful Interventions for Gram-Negative Resistance to Extended-Spectrum B-Lactam Antibiotics *Pharmacotherapy* 1999; 19:1205-1285
25. Gouby A. C. Neuwirth G. Boorg N. Bourigues M. Carles-Nurit E. Epydemiological Study by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of an Oubreak of Extended-Spectrum Beta-Lactama Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Geriatric Hospital. *J Clin Microbiol* 1994, 32:301-305

26. Medeiros A A. Nosocomial Outbreaks of Multiresistant Bacteria: Extended Spectrum B-Lactamase have arrived in North America, *Ann Intern Med.* 1993; 119:428-430
27. Jones RN. Pfaller M A. Forren G V, *et al.* Antimicrobial Activity and Spectrum Investigation of –Eight Broad-Spectrum B-Lactam Drugs a 1997 Surveillance Trial in 102 Medical Centres in the United States. *Diagn Microbiol Infect. Dis.* 1998; 119:428-430
28. Wener J. Quinn J P. Brad Ford. Multiple Antibiotic-Resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in Nursing Home. *JAMA* 1999; 282:517-523
29. Gold Hs. Moellering RC Jr. Antimicrobial-Drug Resistance. *N Engl J Med* 1996; 1335-1445
30. Babini, G.S. *et al.* Antimicrobial Resistance Amongst *Klebsiella* spp Collected from Intensive Care Units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J. Antimicrob Chemother* 2000; 45 (2):183-9
31. Crespo Maria Del Pilar. Lectura Interpretativa del Antibiograma: Una Herramienta para predecir la Resistencia Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología de Rutina. *Med.* 2002; 33:179-193
32. Resistencia Bacteriana. Supervivencia del más apto, *Iladiba*, vol. XII, septiembre 1998. disponible en: http://Www.Dinavar.Org/Microclin/Antibiot/Antibiot_104resistencia.htm (septiembre 2003)
33. Peixoto, A. L., Pirez M. D., Correa S. F., Barth, A.L. Extended-spectrum Beta-Lactamases in *klebsiella* spp and *E. coli* obtained in a Brazilian Teaching Hospital: detection, prevalence and molecular typing. *Braz. J. Microbiol.* Vol. 34 no. 4 Oct/dec2003. Disponible en http://www.scielo.bi/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=1517-838220030004&Ing=en&nim=iso

34. Steward, Christine P. *et al.* Characterization of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 Laboratories Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum B-Lactamase Detection Methods. *J. of Clinical Microbiology*. 2001; 39:2864-2872
35. Martínez, P., Mercado, M., Matlar, S., Determinación de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido en Gérmenes Nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb med* 2003;34(4):196-205. Disponible en: <http://www.colombiamedica.univalle.edu.co/vol34no.4/BLEE.html>
36. Galas M. Corzo A. Resistencia Antibacteriana en Argentina, Buenos Aires. *Servicios Antimicrobianos INEI* 2000
37. Oliver Antonio, Cantón, Rafael. Enterobacterias productoras de Beta-Lactamasa plasmídicas de Espectro Extendido. *Boletín Control de Calidad SEIMC*. Disponible en http://www.seimc.org/control/revi_bacter/kpbca.htm

Veronica del Rosario Itzep Solares
Autora

Lic. Jorge Raúl Matheu
Asesor

Licda. Tamara Velásquez
Asesora

Lic. Martín Gil
Revisor

Licda. Alba Marina Valdés de García
Revisora

Licda. Alba Marina Valdés de García
Directora

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano