
PRODUCCIÓN BACTERIANA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN PACIENTES DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL DE CALDAS, 2003

Jaime Alberto del Río G.¹
Rita Arango Álvarez del Pino²
Olga Clemencia Buriticá A.³
Gloria Inés Estrada⁴

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos va en aumento, lo que implica generación de problemas a las instituciones de salud y la comunidad en general como: elevación del gasto para medicamentos, sobreinfecciones, alteración de la microflora y la macroflora, y disminución en la calidad de atención en salud. Esta resistencia es más marcada cuando hay presencia de microorganismos gram negativos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). En el presente trabajo se buscó determinar el tipo, la frecuencia y la distribución de microorganismos productores de BLEE, por técnicas tradicionales y moleculares, y determinar los factores médicos o quirúrgicos asociados con dicha producción, en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital de Caldas, con el fin de aportar la información necesaria para tomar medidas epidemiológicas y plantear estrategias sobre el uso apropiado de los antibióticos y el tratamiento de las infecciones más frecuentes. Se realizó un estudio analítico de casos y controles: 11 pacientes (5 casos y 6 controles), con infección primaria o intrahospitalaria, en quienes se realizó aislamiento de microorganismos productores de BLEE, resistentes o no, a las cefalosporinas de tercera generación, respectivamente. Estas muestras se sometieron a análisis microbiológico, isoenzimático y molecular. Se identificaron

BACTERIAL PRODUCTION OF SPECTRUM BETALACTAMASES IN PATIENTS OF THE INTENSIVE CARE UNIT OF THE HOSPITAL DE CALDAS, 2003

ABSTRACT

The bacterial resistance to antimicrobials is increasing, which implies the generation of problems to health institutions and the community in general, such as: elevation of the expense for medications, superinfections, alteration of the micro and macroflora, and decrease in the quality of health attention. This resistance is stronger when there is a presence of microorganisms gram negative producing extended spectrum betalactamases (ESBL). The present work wished to determine the type, frequency and distribution of ESBL – producing microorganisms, by means of traditional and molecular techniques, and to determine the medical or surgical factors associated with this production, in the Intensive Care Unit of the Hospital de Caldas. The purpose of this work is to contribute the necessary information to take epidemiologic measures and to outline strategies on the appropriate use of antibiotics and the treatment of the most frequent infections. An analytic study of cases and controls was done: 11 patients (5 cases and 6

¹ Epidemiólogo de la Clínica Villapilar E.S.E.

² Antes, Epidemiólogo del Hospital de Caldas.

³ Profesora Universidad de Caldas. Correspondencia: Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. E-mail: olgacle44@hotmail.com

⁴ Profesora de la Universidad Católica de Manizales. Antes, Bacterióloga del Hospital de Caldas.

dos cepas de *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* sospechosas de producir BLEE; sin embargo, no fueron confirmadas con otras pruebas como VITEK, puntos isoeléctricos y reacción en cadena de la polimerasa. No hubo diferencias significativas para los factores de riesgo en los casos y los controles.

Palabras clave: Betalactamasas de espectro extendido, factores de riesgo, infección intrahospitalaria, Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

controls), with primary or nosocomial infection, with ESBL – producing microorganisms isolated, resistant or not, to the third generation cephalosporines, respectively. These samples underwent microbiological, isoenzymatic and molecular analysis. Two strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* were identified with suspicion of being ESBL – producer. Nevertheless, they were not confirmed with other tests, such as VITEK, isoelectric points and polymerase chain reaction. There were no significant differences for the risk factors between the cases and the controls.

Key words: Extended spectrum betalactamases, risk factors, nosocomial infection, Intensive Unit Cares (IUC), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter Baumannii*.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) representan un grave peligro para la vida de los pacientes que ingresan con diferentes patologías a las unidades de cuidado crítico hospitalario. Algunos estudios multicéntricos hospitalarios han evidenciado enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de BLEE con una frecuencia que va del 13.1% al 24% (1,2,3,4). Dicha problemática podría estar contribuyendo hasta en un 60% de las muertes en sujetos internados en las UCI (1,4,5).

En la UCI del Hospital de Caldas existe un gran volumen de pacientes que se infectan con enterobacterias (específicamente con *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y *Pseudomonas aeruginosa*, a una tasa de 30.3 por mil días de estancia; sin embargo, se desconoce con precisión si son productoras de BLEE y cuáles son los factores asociados a este fenómeno.

La determinación de la frecuencia y el tipo de microorganismos productores de betalactamasas que infectan a pacientes de la UCI del Hospital de Caldas, al igual que la determinación de los factores de riesgo asociados a este grave problema, permitirán apoyar las medidas que tiendan a prevenir y controlar la morbilidad y la mortalidad adicional en los pacientes internados en ese servicio y que padecen este fenómeno.

De otra parte, bajo la premisa de que la producción de betalactamasas de espectro extendido está íntimamente relacionada con el uso irracional de antimicrobianos, su comprobación será usada para mejorar la orientación terapéutica de dichos fármacos, con los subsecuentes beneficios para los pacientes en términos de salud y para el Hospital de Caldas en términos económicos.

El incremento de la resistencia a los antimicrobianos en los microorganismos

hospitalarios es un problema mundial que debe preocupar a los médicos y microbiólogos. Algunas infecciones causadas por familias de bacilos gram negativos y de cocos gram positivos se han incrementado y han causado epidemias de infecciones intrahospitalarias, especialmente en UCI (1,5,6,7,8). Las UCI representan un importante bastión para los microorganismos que requieren de pacientes inválidos o con detrimento grave de su salud o críticamente enfermos. Estas infecciones pueden comprometer hasta un 25% de los pacientes que egresan de dichas unidades hospitalarias (4,5,7,8,9). Entre los principales patógenos gram negativos resistentes se incluyen enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales pueden ser resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro (debido a la producción de plásmidos compuestos por betalactamasas de espectro extendido (BLEE)), hiperproducción de cefalosporinasa cromosómica o ambas, y a menudo presentan resistencia cruzada con otras clases mayores de antibióticos, tales como los aminoglicósidos y las fluoroquinolonas (10,11,12,13,14,15).

El primer aislamiento de microorganismos resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro fue hecho en Alemania en 1983, se determinó que ésta era producida por la betalactamasa del tipo SHV (1,14,15). De otra parte, el primer reporte de un brote de bacterias productoras de BLEE ocurrió en Francia en 1985 (1,15).

En muchos países se viven problemas con *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Acinetobacter baumannii* (AB) y *Enterobacter aerogenes* (EA), bacteria ésta asociada a menudo con enfermedades invasivas, incluyendo neumonías y bacteremias. Ciertas cepas de estos microorganismos tienen una marcada propensión a diseminarse en pacientes con grave compromiso de su salud, que reciben tratamiento antibiótico prolongado y cuidado de soporte, todo esto a pesar de los esfuerzos específicos en el control de la infección (16,17,18,19,20,21,22).

Microorganismos como PA son resistentes de forma natural a muchos antimicrobianos, debido a lo poco permeable de su membrana externa (alrededor de 1% de la permeabilidad de la *E. coli*) (23,24,25). Adicionalmente, también de forma natural presentan una AMP-betalactamasa, la cual le confiere resistencia, aun a niveles muy bajos, a penicilina G, aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación. Dichas betalactamasas no son inhibidas por los antibetalactamasas disponibles en el mercado, por lo tanto, estas bacterias son resistentes a los antibióticos que contengan una combinación de una aminopenicilina con el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Cuando se tienen concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) ≥ 8 mg/mL para cefotaxima, significa que este fármaco no debe ser usado contra infección por PA (14,15,16,17).

La PA puede generar resistencia a través de tres mecanismos conocidos: por producción de betalactamasas, por alteraciones en la permeabilidad o por cambios en las moléculas blanco.

Se han descrito más de 300 enzimas responsables de la producción de betalactamasas; sin embargo, la enzima cromosómica C está implicada en la mayoría de los casos, está codificada por el gen ampC, el cual está ligado al gen regulador ampR. La producción de betalactamasas es generalmente inducida, y especialmente por imipenem, pero la selección de mutantes es la causante de la mayor resistencia. La adquisición secundaria de betalactamasas a través de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposomas o integrones) puede generar resistencia adquirida de la clase A, B y D. Las enzimas de la clase A inhiben las cuatro penicilinas de amplio espectro, adicionalmente tres de espectro extendido; enzimas mediadas por plásmidos confieren resistencia adicional a ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepime y cefpirome, pero son contrarrestadas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Las enzimas de la clase B están representadas en la PA por el IMP-

1, el cual hidroliza la mayoría de betalactámicos incluyendo todas las cefalosporinas, el imipenem y el meropenem. El aztreonam y la piperacilina son menos afectados, pero el IMP-1 no es inhibido por el ácido clavulánico y el tazobactam. Las enzimas de la clase D incluyen un vasto grupo de oxacilinasas, las cuales parecen derivar del mismo ancestro; la mayoría se escapan al laboratorio de rutina debido a que no inhiben al ácido clavulánico. El OXA-18 es el distintivo, hidroliza la ceftazidima y el aztreonam, esta sustancia es inhibida por el ácido clavulánico de forma semejante a las enzimas de la clase A (17,23,24,25).

Otra bacteria implicada frecuentemente en la producción de BLEE es *Klebsiella pneumoniae* (KP). Muchos brotes de resistencia están relacionados con el uso de ceftazidima (CFZ) (25,26,27). El imipenem es universalmente activo contra cepas de KP productoras de BLEE. La *Salmonella* entérica también ha sido reportada como productora de BLEE (TEM-27). Este tipo de brotes han sido estudiados mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de restricción para plásmidos (28,29,30). Por otro lado, el incremento de la resistencia relativa se manifiesta a través de un incremento gradual en la concentración inhibitoria mínima (29,30).

La resistencia emerge principalmente debido a la presión selectiva generada por los antibióticos usados; estos separan subpoblaciones bacterianas que esconden ventajosas mutaciones de resistencia o determinantes móviles de resistencia adquirida tales como plásmidos o transposones. La diseminación de la resistencia sobreviene como consecuencia de la difusión de clones o determinantes genéticos móviles, los cuales están directamente favorecidos por la homogeneidad e intensidad de la exposición en determinada población de pacientes. La modificación de la flora endógena, debido principalmente al tratamiento antimicrobiano, lleva a la colonización con bacterias resistentes como sustituto exógeno. El uso intensivo de

antibióticos en los hospitales a menudo está asociado con el incremento de la resistencia (23,24,29,30).

Varios estudios han evaluado otros factores de riesgo, tales como severidad de la enfermedad, intensidad del cuidado, presencia de dispositivos invasivos y exposición a antibióticos de amplio espectro. Algunas investigaciones han evidenciado que la reducción en el uso de antibióticos es seguida de la disminución en la resistencia microbiana (30,31,32)

Ambiente microbiano de la UCI

La UCI es el sitio hospitalario donde los problemas de resistencia microbiana son mayores debido a la intensidad del uso de antibióticos; a menudo también porque son usados múltiples antibióticos y por prolongados períodos de tiempo (en estancias prolongadas). Estudios al respecto lo han demostrado en la resistencia a carbenicilina, cefamandol y ceftazidima (33,34,35).

El Instituto para estándares de laboratorio clínico (CLSI) ha propuesto los métodos de dilución para el tamizaje de *klebsiellae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* productores de BLEE, utilizando ceftazidima, aztreonam, cefotaxime o ceftriaxona a una concentración de 1mcg/mL. Si hay crecimiento bacteriano, a esta concentración, se sospecha que hay producción de BLEE y por lo tanto se deben realizar pruebas fenotípicas confirmatorias. Para lo cual, se han utilizado la detección por el doble disco de difusión (DDD), la prueba Vitek® E[®] ESBL, prueba E[®] ESBL, determinación de la concentración inhibitoria mínima, electroforesis de campos y puntos isoelectrónicos. Adicionalmente, se realizan métodos genéticos (1,36,37,38).

El aislamiento de cepas de KP y *Escherichia coli* (EC) se ha realizado mediante la técnica de Microscan® (29). Para esto se han empleado paneles que contienen ampicilina (AMP), piperacilina (PIP), CFZ, cefotaxima (CFX),

aztreonam (AZT), trimetoprim sulfamizol (TMP-SMZ), ciprofloxacina (CPF), tobramicina e imipenem (IMP). Los resultados pueden ser confirmados mediante la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs). La interpretación sobre la presencia de BLEE se realiza por el aumento de la zona inhibitoria entre el disco impregnado de amoxicilina (20µg) más clavulanato (10µg) y un disco ubicado a 20 ó 30 mm, compuesto por CFZ, CFX, AZT o cefoxitina. Varios estudios han demostrado la concordancia entre la susceptibilidad de la CFZ en el método de Microscan® y los resultados con el doble disco de difusión (29). Sin embargo, pueden hacerse estudios moleculares más complejos para el análisis de la presencia de BLEE, de los plásmidos, como los experimentos de conjugación y la electroforesis de campo pulsante.

Los factores de riesgo del paciente, identificados en estudios analíticos, incluyen la estancia previa en centros de cuidado, antes de la internación en UCI. También se ha demostrado la asociación con la presencia de dispositivos como las sondas de Foley, con gastrostomía, tubo de yeyunostomía, acceso venoso central, con el uso previo de antibióticos, y una escala de gravedad con score alto. A través de análisis multivariado (usando regresión logística) se ha encontrado asociación entre el empleo de catéter venoso central, uso de sonda de Foley e incremento en la escala de gravedad con resistencia significativa a la CFZ (30,31,32,33,34).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. De casos y controles.

Población. Pacientes de ambos sexos, de cualquier edad, que por motivos médicos o quirúrgicos fueron admitidos, de enero a diciembre de 2003, a la UCI del Hospital de Caldas; a los cuales se les diagnosticó infección intrahospitalaria ocasionada por enterobacteria o *Pseudomonas aeruginosa*.

Muestra. Se realizó un seguimiento diario a los pacientes de la UCI. Los pacientes en quienes se aislaron enterobacteria y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a cefalosporina de amplio espectro se ubicaron en el grupo de los casos, mientras que los pacientes con gérmenes sensibles fueron rotulados como controles; lo anterior en una proporción uno a uno (1:1).

Durante los doce meses de recolección se captaron 11 sujetos de la UCI. Estos pacientes fueron divididos en los casos (5), con sus respectivos controles (6). Para el último caso se tomaron dos controles, a través de la historia clínica, porque hubo dificultades en la recolección de la información. De todos los enfermos se recolectaron las muestras para análisis microbiológico, isoenzimático y molecular (genético).

Criterios de inclusión. Todo paciente hospitalizado en la UCI, independientemente de su diagnóstico clínico de base, con una infección primaria o nosocomial, cuyo microorganismo aislado sea una enterobacteria o *Pseudomonas aeruginosa* resistente a una cefalosporina de amplio espectro (de tercera generación). El paciente control será aquel paciente con infección primaria o intrahospitalaria en quien se aisle una enterobacteria o *Pseudomonas aeruginosa* no resistente a cefalosporina de amplio espectro.

Recolección de la información. Se llevó a cabo mediante la búsqueda activa de los casos, esto se realizó prospectivamente por integrantes del grupo investigador, con fundamento en la historia clínica y los registros del laboratorio clínico. Inmediatamente se determinó que se trataba de un caso. Con base en el estudio microbiológico del laboratorio clínico del Hospital de Caldas (difusión de doble disco), se procedió a diligenciar un registro diseñado y probado para el presente trabajo. Seguidamente se buscó el paciente control a quien también se le diligenció idéntico registro pero con la rotulación respectiva (control).

Posteriormente, las muestras de los casos fueron enviadas al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), en la ciudad de Cali, para la realización de los siguientes procedimientos: Test de BLEE, Puntos Isoeléctricos y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (39).

Técnicas y procedimientos

Se siguieron las normas NCCLS (Comité Nacional de los Estados Unidos para estándares de laboratorio clínico), ahora CLSI (Instituto para estándares de laboratorio clínico), y se utilizaron las tarjetas VITEK (método automatizado):

Técnica de difusión de Doble Disco (DDD). En una caja de Petri se colocaron en los extremos un disco de CTZ, AZT y CTX, a 20-30 mm de estos; en el centro se ubicaron un sensidisco de Amoxicilina más Clavulanato (20 y 10 µg respectivamente). Un incremento en la zona de inhibición entre el disco del centro y uno de los discos periféricos fue interpretado como evidencia presuntiva de presencia de BLEE.

Test de BLEE. El test de BLEE utilizado por las tarjetas VITEK posee 4 pozos, dos de ellos con ceftazidima y cefotaxima a una concentración de 0,5 mcg/mL; los otros dos pozos contienen los mismos antibióticos con ácido clavulánico a una concentración de 4 mcg/mL. Una disminución de turbidez en las lecturas de los pozos de más del 50% fue considerada como positiva.

Puntos isoelectroenfoque. Esta metodología, llamada también isoelectroenfoque, es una técnica de electroforesis que utiliza un gel de poliacrilamida cargado con una sustancia llamada anfolito. Estos anfolitos son sustancias que tienen la capacidad de comportarse como ácido cediendo protones o como base aceptándolos. Estas moléculas son las encargadas de permitir la migración de las proteínas en estudio a la región de pH, donde cada proteína logra un equilibrio y su carga neta es cero. En este punto la proteína encuentra su

punto isoelectroenfoque. El punto isoelectroenfoque es el pH en el que las moléculas no presentan migración en un campo eléctrico.

Electroforesis de campos. La electroforesis de campos pulsados (PFGE) es un sistema de electroforesis en gel de agarosa que permite separar fragmentos de DNA de mayor tamaño (entre 1000 y 5000kb), en este caso, el genoma bacteriano, fragmentado previamente con enzimas de restricción (se generan entre 10 y 30 fragmentos de 10 a 800 kb) y posteriormente sometido a diferentes campos eléctricos para lograr la separación de estos fragmentos en el gel. El resultado final es un patrón específico para cada cepa bacteriana analizada. Estos patrones son comparados entre sí para identificar similitudes entre ellos. Las cepas que poseen el mismo patrón son consideradas clonales. Existen diferentes sistemas, desde una visualización y conteo de bandas hasta software, para realizar este procedimiento de comparación. En el presente estudio, por el número pequeño de cepas, sólo se realizó examen visual.

Reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular que nos permite la amplificación de una secuencia o blanco que se encuentra en cantidades muy pequeñas y que se puede amplificar enzimáticamente utilizando los primers específicos. Esta amplificación requiere de deoxinucleótidos trifosfatos y de una enzima denominada *taq* polimerasa, que a altas temperaturas permite la polimerización de la doble cadena de DNA. Esta técnica fue utilizada en el estudio como herramienta para la detección de betalactamasas CTX-M.

Detección de la presencia de los genes codificantes para CTX-M. Las cefotaximas han sido clasificadas en 6 grupos de acuerdo con su similitud en la secuencia de aminoácidos. Así:

Grupo CTX-M 1, dentro de las cuales están CTX-M 1, 10, 12, 3, 28, 15, 22, 23 y FEC-1. Porcentaje de similitud > 97%.

Grupo CTX-M 2, dentro de las cuales están CTX-M 2, 6, 7, 4L, 4, 20, 5, KLUA 11, 1, 9, 8, 5, 6, 10. Porcentaje de similitud > 94%.

Grupo CTX-M 8, dentro de las cuales están CTX-M 8 y klug - 1. Porcentaje de similitud 98%.

Grupo CTX-M 25, dentro de las cuales están CTX-M 25 y 26. Porcentaje de similitud 98%.

Grupo CTX-M 9, dentro de las cuales están CTX-M 9, 21, 13, 17, 24, 19, 14, 27, 16. Porcentaje de similitud > 98%.

Grupo KLUC-1.

La CTX-M 12 identificada en Colombia pertenece a este grupo y por ello, en el presente trabajo, se realizó la amplificación génica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa primers específicos para este grupo (39).

Control de sesgos

Los casos se aparearon con los controles en cuanto al sitio de infección (ejemplo: de herida quirúrgica). Se estandarizaron y probaron los instrumentos de recolección y las técnicas de medición biológicas (microbiológicas e isoenzimáticas).

Los resultados se analizaron en el programa Epi Info 2002.

Variables

Tipo de Infección. Sitio anatómico donde se ubica la infección, de acuerdo con lo reportado por el CDC (11), por ejemplo: infección del tracto urinario.

Tipo de Microorganismo. El género y especie de la enterobacteria (*K. pneumoniae*, *E. coli*, etc) o *Pseudomonas aeruginosa*.

Resistencia a Betalactamasas de Espectro Extendido. Presente o no de acuerdo con los

hallazgos iniciales de DDD. Posteriormente, se caracterizó desde el punto de vista isoenzimático y genético.

Escala de gravedad establecida por el Sistema de Vigilancia de Infección Nosocomial en Estados Unidos (NNISS). Su score más alto es 5, el cual indica mayor gravedad:

1. Pacientes postoperatorios: requieren observaciones de rutina, cuidados médicos o de enfermería no intensivos. Los pacientes son dados de alta de la UCI a las 48 horas, algunos de los pacientes pueden ser manipulados en salas de recuperación.
2. Pacientes fisiológicamente estables: requieren observación integral profiláctica, cuidados médicos o de enfermería no intensivos. Ejemplo: adultos para descartar un infarto del miocardio, pacientes estables que requieren medicación.3.
4. Pacientes fisiológicamente estables: requieren monitoreo y cuidados de enfermería intensivos. Ejemplo: pacientes en coma o falla renal crónica.
5. Pacientes fisiológicamente inestables: requieren observación integral profiláctica, cuidados médicos o de enfermería intensivos, reevaluaciones frecuentes y ajustes de la terapia. Ejemplo: pacientes con arritmia cardíaca, cetoacidosis diabética sin coma, choque séptico, coagulación intravascular diseminada.
6. Pacientes fisiológicamente inestables que están en coma o choque (TA \leq 90 mmHg por 3 horas): requieren medicamentos vasoactivos o resucitación cardiopulmonar, cuidados médicos y de enfermería frecuentes para reevaluación.

Duración de la Antibioticoterapia: Ciclo largo o corto. El tiempo apropiado, en días, fue el establecido por los estándares de la

Asociación Médica Americana (AMA), los cuales generalmente duran hasta cuando los signos clínicos y/o paraclínicos indican que se puede suspender la terapia o se pueden realizar los cambios respectivos.

Tipo de Antibioticoterapia: Empírica. Cuando la antibiòticoterapia no se encontraba explicada por la prescripción **terapéutica o profiláctica**.

Dispositivo Invasivo. Cuando el paciente fue objeto de implantación de sonda vesical, catéteres centrales, ventilación mecánica o malla peritoneal. Todo lo anterior por un tiempo no menor de 24 horas.

Dificultades encontradas

La mayor dificultad fue la relacionada con la recolección de la información, puesto que en el Hospital de Caldas se presentó cese de

actividades inicialmente transitorio y luego cierre definitivo. Por lo cual, la consecución de las historias clínicas para la elaboración del informe final fue demorada.

RESULTADOS

Los microorganismos que se identificaron como posibles productores de BLEE en el ensayo de doble disco de difusión fueron *Pseudomonas aeruginosa* (40%), *Acinetobacter baumannii* (40%) e *Escherichia coli* (40%). Las bacterias halladas en los controles se pueden apreciar en la tabla 1. Para los microorganismos tamizados en los pacientes caso se calculó el punto isoeléctrico, y se tuvo como sugestiva la presencia de genes antibetalactamasas CTX-M/Amp-c y TEM. El análisis de dicha resistencia con la técnica de PCR resultó negativa para los marcadores antes mencionados.

Tabla 1. Microorganismos y factores de riesgo en los casos y los controles. BLEE en pacientes de UCI Hospital de Caldas.

	CASO (n=5)	CONTROL (n=6)	Significancia estadística
BACTERIAS	<i>A. baumannii</i> 2 (40%) <i>E. coli</i> 2 (40%) <i>P. aeruginosa</i> 2 (40%)	<i>A.baumannii</i> 1 (20%) <i>E.agglomerans</i> 1 (20%) <i>P.aeruginosa</i> 2 (40%) <i>Edwardsiella t.</i> 1 (20%) <i>Klebsiella o.</i> 1 (20%)	NS
DISPOSITIVOS	Catéter central 5 (100%) Sonda vesical 5 (100%) Ventilación 5 (100%) Mecánica	Catéter central 6 (100%) Sonda vesical 5 (90%) Ventilación 4 (70%) Mecánica	NS
INFECCIÓN	Urinaria 1 (20%) Neumonía 4 (80%)	Urinaria 2 (40%) Neumonía 2 (40%) Flebitis 2 (40%)	
ANTIMICROBIANOS DE AMPLIO ESPECTRO	Ceftriaxona 4 (80%)	Ceftriaxona 4 (70%) Cefepime 1 (20%) Cloranfenicol 1 (20%)	NS
ESTANCIA	10.4 días ($\sigma^2=14.3$)	12.5 días ($\sigma^2=5.5$)	F=1.3 NS
GRAVEDAD	3.6 ($\sigma^2=0.3$)	3.5 ($\sigma^2=0.3$)	F=0.1 NS

En cuanto a los factores de riesgo estudiados como el uso de dispositivos, el tipo de infección nosocomial, el uso de antimicrobianos de amplio espectro, el tiempo de estancia hospitalaria en UCI y la gravedad de acuerdo con la escala de NNIS, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles del presente estudio. (Ver tabla 1)

Las cepas bacterianas de *A. baumannii*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, aisladas en el laboratorio clínico del Hospital de Caldas (12 en total), provenientes de los pacientes caso y sospechosas de ser productoras de betalactamasas de espectro extendido por los resultados de la técnica de difusión de doble disco, fueron remitidas al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) de la ciudad de Cali, cuyo reporte fue el siguiente:

Se recibieron 12 cepas, de las cuales se recuperaron 6; las demás estaban contaminadas y fue imposible reaislarlas. Los repiques corresponden a: 2 *A. baumannii*, 2 *E. coli* y 2 *P. aeruginosa*.

A partir de los repiques recibidos, se realizó la identificación por VITEK para verificar la pureza de las mismas y pruebas de sensibilidad para conocer sus perfiles; a partir de estos resultados se les realizó puntos isoelectricos y amplificación génica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa primers específicos para la CTX-M 12 identificada en Colombia. (Ver tabla 2)

En la tabla 2 puede observarse la sensibilidad y la resistencia de las cepas analizadas a diferentes antibióticos, tales como: ampicilina-sulbactam, cefepime, ceftriaxona, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam y trimetoprim-sulfa.

Con la prueba de puntos isoelectricos se sospechó la presencia de CTX-M/ Amp-C en las cepas de *A. baumannii* y en *E. coli*. Para *P. aeruginosa*, se sospechó presencia de TEM. Con la PCR trató de confirmarse la presencia de betalactamasa de espectro extendido que se ha reportado en Colombia, sin embargo, el resultado fue negativo para todas las cepas.

Tabla 2. Sensibilidad de los microorganismos, puntos isoelectricos y PCR de los gérmenes recibidos en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, Cali.

CEPA	IDENTIFICACIÓN	AK	AMP	AMP/SUL	CFP M	CTX	CAZ	CFLT	CIP	GEN	IMI	MER O	PIP/TAZ	SXT	ESBL	pI*	ID SUGESTIVA	PCR PARA CTX-M GRUPO 1
8-684	<i>A. baumannii</i>	32 I	>=3 2 R	8 S	>=32 R	>=64 R	16 I	>=32 R	>=4 R	8 I	<=4 S	<=2 S	>=12 8 R	>=32 O R	***	8,9	CTX-M/Amp-C	NEG
																8,2		
4-634	<i>A. baumannii</i>	>=6 4 R	>=3 2 R	16 I	>=32 R	32 I	16 I	>=32 R	>=4 R	>=16 R	<=4 S	<=2 S	32 S	>=32 O R	***	9	CTX-M/Amp-C	NEG
																8,2	CTX-M/Amp-C	NEG
																5,1	TEM	?
6-608	<i>P. aeruginosa</i>	<=2	>=3 2 R	>=32 R	<=4	>=64 R	<=8 S	>=32 R	<=0,5 R	<=0,5 R	<=4 S	<=2 S	32 S	>=32 O R	***	5,1	TEM	?
6-440	<i>P. aeruginosa</i>	<=2	>=3 2 R	>=32 R	<=4	>=64 R	<=8 S	>=32 R	<=0,5 R	8 I	<=4 S	<=2 S	16 S	>=32 O R	***	8,3	CTX-M/Amp-C	NEG
7-6841	<i>E. coli</i>	>=6 4 R	>=3 2 R	<=4	<=4	<=4	<=8 S	>=32 R	>=4 R	1 S	<=4 S	<=2 S	<=8 S	>=32 O R	POS	8,4	CTX-M/Amp-C	NEG
2A	<i>E. coli</i>	<=2	>=3 2 R	16 I	<=4	<=4	<=8 S	8 S	<=0,5 R	<=0,5 R	<=4 S	<=2 S	<=8 S	<=10 S	NEG	***	***	

El análisis de los resultados por electroforesis de campos pulsados no se realizó en el software por el número pequeño de cepas, pero con el examen visual no se observó similitud entre las diferentes especies analizadas. (Ver figura 1)

DISCUSIÓN

Uno de los retos en el diagnóstico oportuno y el tratamiento específico de la infección intrahospitalaria (IIH) por bacterias gram negativas, es la detección de la resistencia a los antibióticos betalactámicos, a través de la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), el cual se considera el principal mecanismo de resistencia frente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y frente a los monobactámicos (7,11,30). Las IIH afectan más los ambientes hospitalarios, especialmente las UCI, las salas quirúrgicas y de inmunocomprometidos (14,34,42,43).

La prevalencia de gérmenes productores de BLEE varía según el área geográfica y la institución. En Estados Unidos se ha encontrado una prevalencia entre 0 y 25% (1,29,44,43). En Europa se han realizado diferentes reportes con cifras entre 0,5% y 40% (1,28,29,35). En Colombia la cifra oscila entre 10 y 15% para *E. coli* y entre 20 y 40% para *K. pneumoniae* (21,22,38,45).

Las BLEE han sido detectadas en casi todas las especies de enterobacterias predominantemente en *K. pneumoniae* y *E. coli*. La mayoría de ellas han evolucionado de las betalactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (23,44). Cepas productoras de BLEE se han encontrado en *K. pneumoniae* y *E. coli*, asociadas a brotes en áreas de cuidados intensivos y quirúrgicas (29,30,42).

En Europa la BLEE identificada con mayor frecuencia ha sido del tipo SHV-5, mientras que en EUA es TEM-10 Y TEM-12 (33,43). En América Latina existe poca información, pero estudios

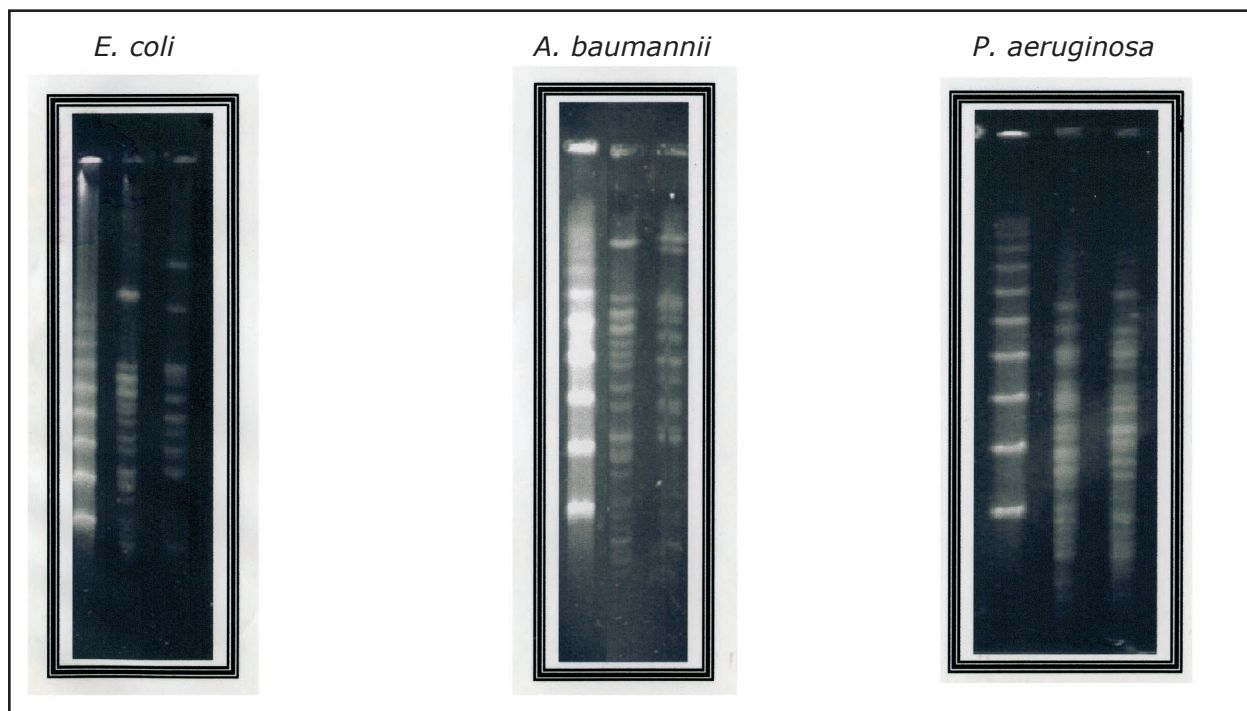


Figura 1. Análisis de resultados de electroforesis de campos pulsados. El número escaso de cepas no permite hacer una comparación de los aislados analizados con la ayuda del software, sin embargo, no se observa similitud entre las diferentes especies analizadas.

principalmente en Argentina, Venezuela, Brasil y México reportan SHV-S y CTX-M2 como las más prevalentes (1,29,45,46). En el país se considera que se presenta con mayor frecuencia la enzima CTX-M (21,22). En el departamento de Caldas hasta el momento no se ha confirmado la presencia de gérmenes productores de BLEE (comunicación personal obtenida en el Hospital Infantil de la Cruz Roja, la Clínica Rita Arango Álvarez del Pino y el Hospital Santa Sofía).

El hallazgo de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de BLEE requiere no solo el análisis del laboratorio clínico microbiológico, sino también la realización de técnicas especializadas para confirmar su presencia y caracterizar los genes bacterianos específicos (1,14, 26,33,42). Estas técnicas han sido sugeridas por el Clinical and Laboratory Standards (CLSI) (1,29,36,47).

Al momento de la realización del presente trabajo se consideró de gran importancia la detección de las bacterias gram negativas productoras de BLEE en la UCI del Hospital de Caldas, con el fin de aportar información útil para el diagnóstico y el tratamiento de las IIH y para el uso adecuado de los antibióticos de amplio espectro. Primero se realizó el aislamiento de las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los antibióticos betalactámicos provenientes de pacientes con IIH (casos). Dichas cepas de *E. coli*, *A. Baumannii* y *P. aeruginosa* fueron sometidas a las pruebas de sensibilidad utilizadas regularmente y luego se recurrió a la técnica de doble difusión en disco para determinar si podían ser consideradas como productoras de BLEE, prueba que fue positiva para las tres cepas. Como el estudio sobre bacterias gram negativas productoras de BLEE no puede quedar allí porque no es confirmatorio y como en la ciudad de Manizales no se cuenta con la tecnología apropiada para realizar otros estudios diagnósticos, se decidió remitir las cepas al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) de la ciudad de Cali, el cual cuenta

con amplia experiencia en dichos análisis. Allí realizaron nuevamente pruebas de sensibilidad a los antibióticos, aplicaron las técnicas de puntos isoeléctricos, electroforesis de campos pulsados y reacción en cadena de la polimerasa. El resultado en la técnica de puntos isoeléctricos fue sugestivo para la producción de BLEE en los tres microorganismos, pero luego negativo en la caracterización por reacción en cadena de la polimerasa para la enzima CTX-M. Por lo cual, podemos afirmar que en el tamizaje inicial se encontraron cepas de *E. coli*, *A. Baumannii* y *P. aeruginosa* sospechosas de producir BLEE, pero no confirmadas con las pruebas fenotípicas y genotípicas, realizadas posteriormente.

El diagnóstico de BLEE todavía es un dilema, para algunos es suficiente con realizar las pruebas de tamizaje con cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y con inhibidores de beta lactamasas, y para otros se requiere la confirmación del material genético y proteínico (1,28,29,38,41).

Entre los factores de riesgo asociados con la infección o colonización por enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de BLEE, tomados de estudios de casos y controles, están: catéter arterial, catéter venoso central, tubo de gastrostomía o yeyunostomía, catéter urinario, cirugía abdominal de urgencia, colonización gastrointestinal, tratamiento antibiótico previo, tratamiento previo con ceftazidima o aztreonam, enfermedad grave, ventilación asistida, estancia prolongada en las UCI y estancia hospitalaria prolongada (1,30,31,32).

En el presente estudio, la presencia de factores de riesgo como uso de dispositivos, antibióticos de amplio espectro, estancia y gravedad, no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pacientes con sospecha de gérmenes productores de betalactamasas de espectro extendido.

Los resultados de la investigación no son concluyentes para expresar que no existen

bacterias gram negativas productoras de BLEE en la UCI del Hospital de Caldas, debido a las limitaciones del estudio: el número de muestras, el tamizaje inicial y la remisión de las cepas a la ciudad de Cali.

Son necesarios más estudios para determinar la presencia o no de bacterias gram negativas productoras de betalactamasas de espectro extendido en las UCI de la ciudad de Manizales.

CONCLUSIONES

En el tamizaje inicial a través de las pruebas de sensibilidad y la técnica de doble difusión en disco, se encontraron cepas de *E. coli*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* como sugestivas de producir betalactamasas de espectro extendido.

Con la aplicación de las pruebas de caracterización de dichas enzimas (puntos isoeléctricos, electroforesis y reacción en cadena de la polimerasa) no se confirmó la presencia de dichas enzimas.

RECOMENDACIONES

Dada la asociación entre infección intrahospitalaria y la presencia de bacterias gram negativas productoras de BLEE, las políticas para evitar la diseminación de la resistencia bacteriana para ambas situaciones son similares. Entre ellas están el reforzamiento del lavado de manos, la identificación y el aislamiento de los pacientes colonizados e infectados, el uso de guantes y bata para atender a los pacientes infectados, la implementación de un programa de control de antibióticos, la identificación de los factores de riesgo para colonización y transmisión cruzada de la resistencia de estas cepas (24,48).

REFERENCIAS

1. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4):657-86.2.
2. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemoter 2007; 59(2):165-74.
3. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. microbiol 2004; 155(6):409-21.
4. Edmond MB, Wenzel RP. Nosocomial infections. In: Mandell GL, Benett JL, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. USA: Churchill Livingstone, 2000: 2988-3074.
5. Clark NM, Patterson J, Lynch JP 3rd. Antimicrobial resistance among gram-negative organisms in the intensive care unit. Curr Opin Crit Care 2003; 9(5):413-23.
6. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Med. 2006; 119(6 Suppl 1):S29-36.
7. Bassetti M, Cruciani M, Righi E, Rebesco B, Fasce R, Costa A, et al. Antimicrobial Use and Resistance Among Gram-negative Bacilli in an Italian Intensive Care Unit (ICU). J Chemother 2006; 18(3):261-7.
8. Hernández J, Muarra H, Villamil K. Resistencia bacteriana a gérmenes gramnegativos en la unidad de cuidados intensivos. Mediciogo 2004; 10(supl.2).

9. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P, Ambler. Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Pseudomonas*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003; 47(8): 2385-92.
10. Denton M. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29 (Suppl 3):S9-S22.
11. Sturenburg E, Mack D. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; 47(4): 237-95.
12. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 2006; 34 (5 Suppl 1):S20-8.
13. Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. GEIH. [Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(2):77-82.
14. Colodner R. Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologist and infection control specialists. *Am J Infect Control* 2005; 33(2): 104-7.
15. Giamanellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (Suppl 4): 1-16.
16. Gootz TD. Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2(2): 317-26.
17. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS. Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9):3318-24.
18. Daoud Z, Moubareck, Hakime N, Doucet-Populaire F. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: epidemiology and patterns of resistance. *J Gen Appl Microbiol* 2006; 52(3):169-78.
19. Wu TL, Chia JH, Su LH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in intensive care units of a medical center in Taiwan. *Microb Drug Resist* 2006; 12(3):203-9.
20. Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39(4):264-77.
21. Mantilla JR, Valenzuela EM, González EB, Méndez AM, Leal AL, Sierra P, et al. Alta prevalencia de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en Enterobacteria-ceae asociadas a infección intrahospitalaria en Bogotá. *Infectio* 2004; 8:143.
22. Valenzuela EM, Mantilla JR, Reguero MT, González EB, Pulido IY, Llerena ID, et al. Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bogotá, Colombia. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1919-20.
23. Rupp ME, Fery PD. Extended-Spectrum Beta-Lactamase producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 2003; 63(4): 353-65.
24. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657-86.
25. Bush K. New beta-lactamases in gram negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Infect Dis* 2001; 32(7): 1085-9.
26. Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 127-137.

27. Larson LL, Ramphal R. Extended-spectrum beta-lactamases. *Semin Respir Infect* 2002; 17(3): 189-94.
28. Bradford PA. Extended-Spectrum Beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of this Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-951.
29. Alpuche CM, Daza CA. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a Cefalosporinas de espectro extendido: asociación de 2 peligrosos enemigos. *Enf Infec y Micro* 2002; 22(4): 192-199.
30. Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. In: principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Fifth Ed. Churchill Livingstone, USA. 2000; 2: 236-252.
31. Mendelson G, Hait V, Ben-Israel J, Gronich D, Granot E, Raz R. Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24(1):17-22.
32. Ariffin H, Navaratnam P, Kee TK, Balan G. Antibiotic resistance patterns in nosocomial gram-negative bacterial infections in units with heavy antibiotic usage. *J Trop Pediatr*. 2004; 50(1):26-31.
33. Rosslini GM, Docquier JD. New beta-lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting. *Future Microbiol* 2006;1:295-308.
34. Toltzis P, Blumer JL. Nosocomial acquisition and transmission of antibiotic resistant Gram negative organisms in the pediatric intensive care unit. *Pediatric Infect Dis J* 2001; 20: 612-18.
35. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis. Variations in the prevalence of strains expressing an extended spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *CID* 2001; 32(Suppl. 2): S94-S103.
36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement (M100-S15). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
37. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol*. 2004; 30(1):25-32.
38. Crespo MP. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistenciabacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica* 2002; 33(4):179-193.
39. Correa A. Informe de resultados de caracterización molecular de mecanismos de resistencia bacteriana de cepas gram negativas. Cali: Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM); 2003.
40. Rosenau A, Cattier B, Gousset N, Harriau P, Philippon A, Quentin R. Capnocytophaga ochracea: characterization of a plasmid-encoded extended-spectrum TEM-17 β -lactamase in the phylum Flavobacter-Bacteroides. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 760-762.
41. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt 7):956-63.
42. Edmiston CE, Hennen C, Jeabrook GR. The importance of beta-lactamase resistance in surgical infections. *Surg Infect* 2001; 2 (Suppl1): S13-22.

43. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46:602–604. 334.
44. Gniadkowsky M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(11): 597-608.
45. Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Silva SH. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. *Infectious Disease Clinics of North America* 2000; 14: 67-81.
46. Aranque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini GM. Molecular basis of extended spectrum beta-lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from M inverted question Markerida, Venezuela. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15: 37-42.
47. John JF, Rice LB. The microbial genetics of antibiotic cycling. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: S22–S31.
48. Wong-Beringer A. Therapeutic challenges associated with extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Pharmacotherapy* 2001; 21(5): 583-92.