

11219



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Medicina



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA

**BACTEREMIA POR KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORA DE B-LACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y FACTORES DE RIESGO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA**

PRESENTA:

JUAN LUIS MOSQUEDA GOMEZ

**TUTOR DE TESIS:
JOSE SIFUENTES OSORNIO**

**ASESORES DE TESIS:
LUIS ALFREDO PONCE DE LEON GARDUÑO
GUILLERMO M. RUIZ-PALACIOS Y SANTOS
MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE
ANGELINA VILLASÍS KEEVER**

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D.F.

HOJA DE FIRMAS



Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



Dr. Guillermo Ruiz-Palacios y Santos
Profesor titular del Curso de Infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



Dr. José Sifuentes Osornio
Jefe del Laboratorio de Microbiología Clínica
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Tutor de tesis



SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

AGRADECIMIENTOS

A Mónica:

Por su compañía, paciencia y amor. Por impulsarme en los momentos que más lo necesitaba. Porque sin su apoyo constante no hubiera podido alcanzar esta meta.

A mis padres:

Por darme la vida, por ser un ejemplo de lucha constante y por enseñarme a perseguir siempre un nuevo objetivo.

Al Dr. Ruiz-Palacios, al Dr. Sifuentes, Alfredo, Miriam y Angelina:

Por sus enseñanzas, paciencia y dedicación.

A Aldo Montaña, al Dr. Jesús Silva y a Ana Lilia por que les corresponde una gran parte del crédito de este proyecto.

A Carlitos, Melissa, Norma y Tomy por brindarme su amistad e invaluable ayuda.

INDICE

	Página
Resumen.....	3
Introducción.....	5
Antecedentes.....	6
Justificación.....	10
Planteamiento del Problema.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivo.....	13
Metodología.....	14
Diseño del estudio.....	14
Población.....	14
Grupos de estudio.....	14
Lugar de realización.....	14
Criterios de inclusión.....	15
Criterios de exclusión.....	15
Variables.....	15
Procedimientos.....	17
Análisis estadístico.....	22
Aspectos éticos.....	23
Resultados.....	24
Discusión y conclusiones.....	28
Bibliografía.....	32
Tablas.....	37

RESUMEN

Objetivo. Este estudio fue diseñado con el propósito de evaluar la prevalencia, la epidemiología molecular, los factores de riesgo y el desenlace clínico de los casos de bacteremia por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido (Kpn-BLEE).

Diseño. Estudio retrospectivo, observacional, de casos y controles.

Métodos: Se incluyeron todos los pacientes con bacteremia por Kpn-BLEE atendidos en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" desde 1993 a 2002. A todos los aislados clínicos se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana a quinolonas, aminoglucósidos, cefalosporinas y carbapenémicos. La producción de BLEE fue evaluada con prueba E en todas las cepas con concentración mínima inhibitoria $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ para ceftazidima. Los pacientes con infección por Kpn-BLEE fueron considerados como casos y el resto como controles. Todos los aislados clínicos fueron tipificados mediante electroforesis en campo pulsado (ECP) y un subgrupo de los aislados fue sometido a análisis de plásmidos y transferencia conjugada de resistencia a *Escherichia coli* J53-2. La clase de β -lactamasas se identificó con determinación de punto isoeléctrico y se confirmó mediante amplificación y secuenciación del gen *shv*.

Resultados: Se incluyeron un total de 121 pacientes, 57 (47%) del sexo masculino, con edad promedio de 48.1 (15-85) años. Diecisiete (14%) pacientes presentaban infección con Kpn-BLEE. En el análisis multivariado los factores de riesgo para bacteremia con Kpn-BLEE fueron: uso previo de cefalosporinas (RM 7.6; IC 95% 1.1-53.5, $p=0.039$) y estancia en terapia intensiva (RR 5.6; IC 95% 1.1-27.9, $p=0.033$). No se observaron diferencias entre los grupos en relación a estancia hospitalaria posterior al evento de bacteremia (promedio 20.9 vs. 15.9 d, $p=0.49$) y mortalidad (35 vs. 26.9%, $p=0.47$). En el grupo de cepas productoras de BLEE se observó mayor frecuencia de resistencia a amikacina (29 vs 0%, $p<0.001$), gentamicina (70 vs 17.3%, $p<0.001$), ofloxacina (29 vs 7.6%, $p=0.007$), ciprofloxacina (23.5 vs 0%, $p<0.001$), gatifloxacina (29 vs 5.7%, $p=0.002$), ticarcilina/clavulanato (100 vs 44.2%, $p<0.001$) y piperacilina/tazobactam (94 vs 20%, $p<0.001$). Con el análisis genómico de las cepas mediante ECP no se observó predominio clonal. Se observó un patron predominante de BLEE con punto isoeléctrico de 5.4 (TEM-1) y 8.2 (SHV-5).

Conclusiones: Los factores de riesgo para infecciones con Kpn-BLEE observados en nuestro estudio son semejantes a los observados en otras series, sin embargo la prevalencia es menor que la reportada en otras áreas de Latinoamérica. Los casos de bacteremia por Kpn-BLEE no se asociaron con un peor pronóstico a pesar del perfil de multirresistencia mostrado por estos organismos. La producción de BLEE se asoció con una mayor frecuencia de resistencia a otros grupos de antimicrobianos lo cual complica el manejo de este tipo de infecciones. No se observó un predominio clonal lo cual sugiere una baja tasa de transmisión nosocomial.

1. INTRODUCCION

El incremento en la resistencia a los antimicrobianos es uno de los mayores retos de salud pública en la actualidad y es tan antiguo como la introducción misma de los antibióticos a la práctica clínica.^{1,33} El abundante desarrollo de nuevos antimicrobianos pareció aclarar el panorama ofreciendo nuevas alternativas de tratamiento para las infecciones graves por microorganismos resistentes, sin embargo la aparición de organismos multirresistentes, como enterococo resistente a vancomicina o como bacilos gramnegativos resistentes a diversos antibióticos ha condicionado la aparición de infecciones casi imposibles de tratar.²

Los organismos resistentes se encuentran habitualmente en el ambiente hospitalario y son particularmente prevalentes en las Unidades de Cuidados Intensivos.^{3,4} En este contexto la asociación entre la resistencia antimicrobiana con enfermedades graves se incrementa de manera alarmante. Así, de los más de 2 millones de infecciones nosocomiales que ocurren cada año en E.U.A. 50-60% son producidas por bacterias resistentes.⁵ Las tasas elevadas de resistencia incrementan la morbilidad, la mortalidad y los costos asociados con las infecciones nosocomiales.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos son muy diversos y con frecuencia, más de un mecanismo puede existir en una misma cepa resistente, por tanto, el tratamiento de las infecciones por estos gérmenes debe hacerse de manera oportuna e individualizada.^{6,7}

Los paneles de expertos han concluido que los programas de vigilancia, la educación a los trabajadores de salud y la investigación de nuevos métodos de tratamiento y prevención de infecciones son necesarios para contrarrestar el problema de la resistencia a los antimicrobianos.

2. ANTECEDENTES

Desde el desarrollo de la penicilina, los β -lactámicos han permanecido como la más grande clase de antibióticos que comprende cuatro familias: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Desafortunadamente, el surgimiento de resistencia a este grupo de antibióticos inició incluso antes de que la penicilina fuera desarrollada.^{8,33} Se han descrito tres mecanismos principales para la resistencia a β -lactámicos: (1) reducción en la afinidad de la droga a las proteínas fijadoras de penicilina debido a mutaciones en dichas proteínas, (2) alteración en la permeabilidad de la membrana y (3) producción de β -lactamasas que inactivan a la droga.⁹ Entre los bacilos gramnegativos el mecanismo de resistencia más importante es la producción de β -lactamasas. La primera β -lactamasa fue identificada en *Escherichia coli* antes de la introducción de la penicilina a la práctica clínica.^{8,10}

En los últimos años se ha impulsado el desarrollo de nuevos antibióticos β -lactámicos específicamente diseñados con la capacidad de ser resistentes a la acción hidrolítica de las β -lactamasas, sin embargo con cada nueva clase que se ha utilizado para el tratamiento de los pacientes se ha seleccionado una nueva variante de β -lactamasas. Así, el entusiasmo inicial que siguió a la introducción de agentes oximino β -lactámicos en 1981 fue rápidamente aminorado por la emergencia de patógenos resistentes a este grupo de antibióticos.^{8,11}

Las denominadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) capaces de hidrolizar a las cefalosporinas de amplio espectro fueron inicialmente aisladas en organismos en Alemania en 1983 y pronto fueron descritos brotes debidos a estos gérmenes en varios centros de Europa y poco después en los E. U.^{12,13,14} Estas enzimas son mutantes de las TEM-1, TEM-2, SHV-1 y otras enzimas, todas ellas son producidas más comúnmente por enterobacterias tales como *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* aunque también han sido aisladas de otros bacilos gramnegativos.^{15,16}

Las BLEE hidrolizan drogas tales como ceftazidima, cefotaxima y aztreonam pero tienen poco efecto sobre las cefamicinas, cefotaxima y cefotetan, además tienen la característica de que pueden ser bloqueadas por inhibidores de beta-lactamasas tales como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.¹⁷

Un problema importante en el estudio de gérmenes productores de BLEE es la dificultad en su detección ya que a diferencia de sus predecesores, muchas de estas enzimas no confieren resistencia a β -lactámicos que sean fácilmente identificables con las pruebas rutinarias de susceptibilidad a antibióticos, ya que si bien producen resistencia a cefalosporinas de tercera generación o aztreonam, la producción de β -lactamasas AMPc mediadas por plásmidos pueden mostrar efectos similares. Por lo anterior y con la finalidad de incrementar su detección los lineamientos actuales del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomiendan el escrutinio en busca de BLEE a todas las cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli* cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona sean $\geq 2\mu\text{g/ml}$. Recientemente, se han desarrollado diversas pruebas para confirmar la presencia de estas enzimas, las más comúnmente usadas son las técnicas microbiológicas como la prueba de aproximación de doble disco, pruebas de microdilución en caldo con cefalosporinas de espectro extendido con y sin ácido clavulánico y la denominada prueba E. Todas estas pruebas se basan en la inhibición de las BLEE producida por el ácido clavulánico y solo permiten una evaluación presuntiva de su presencia que requiere la realización de pruebas de identificación definitiva como PCR, PCR-RFLP y secuenciación nucleotídica. A pesar de estas recomendaciones muchos laboratorios de microbiología no usan los métodos de escrutinio adecuados lo que genera variaciones en la prevalencia reportada pero lo más importante son los errores en la elección de la terapéutica antimicrobiana.^{8,18}

La prevalencia de la producción de BLEE se ha incrementado de manera importante. Según datos del National Nosocomial Infections Surveillance System la frecuencia de *K. pneumoniae* resistente a ceftazidima se elevó de 1.5% en 1987 hasta 3.6% en 1990.¹⁹ En 1993, Itokazu et. al. encontraron que la resistencia a ceftazidima en *K. pneumoniae* se había elevado hasta el 14.4% e incluso el 20% en los grandes hospitales de enseñanza.²⁰

Informes más recientes del SENTRY Antimicrobial Surveillance Program correspondientes a aislados obtenidos de 1997-1999 describen que los aislados de *K. pneumoniae* con fenotipo productor de BLEE son más prevalentes en Latino América (45.4%), seguido por la región del Pacífico Occidental (24.6%), Europa (22.6%), Estados Unidos (7.6%) y Canadá (4.9%).⁽²¹⁾ Asimismo, una evaluación prospectiva multicéntrica de bacteremias nosocomiales por *K. pneumoniae* encontró que un 30.8% de los episodios de bacteremia nosocomial y 43.5% de los episodios adquiridos en Unidades de Cuidados Intensivos se debían a organismos productores de BLEE.²²

Se ha identificado que las BLEE están codificadas en grandes plásmidos de 80-300 kb que se pueden conjugar entre diferentes especies bacterianas. Asimismo, los organismos productores de BLEE también pueden expresar resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclinas. Winokur et. al., observaron en su estudio que el problema de multiresistencia era frecuente en todas las regiones geográficas evaluadas e incluso casi el 85% de las cepas de *K. pneumoniae* de Latino América y el 81% de las obtenidas en Europa mostraron resistencia a tobramicina.^{21,23} La coexistencia de producción de BLEE y resistencia a quinolonas también ha sido observada.^{28,29}

Los factores de riesgo para la adquisición de BLEE han sido evaluados en diferentes estudios con algunas variaciones entre los mismos pero en general se ha identificado que el uso previo de antibióticos, colonización gastrointestinal previa con gérmenes productores de BLEE, uso de catéteres intravasculares, traqueostomía, inserción de sonda urinaria, sonda nasogástrica e intubación endotraqueal como los principales condicionantes para su desarrollo.^{11,24,25}

En investigaciones previas, donde se han evaluado las implicaciones de la infección con cepas productoras de BLEE, se ha observado un incremento en la duración de la estancia intrahospitalaria, aumento en el tiempo de hospitalización después del inicio de la bacteremia e incremento en los costos, sin embargo consistentemente los autores no han observado un impacto sobre la mortalidad.^{11, 26, 27}

A pesar de lo anterior, la identificación de cepas productoras de BLEE adquiere relevancia en el contexto del manejo de infecciones graves ya que como se mencionó previamente además de la inherente resistencia en contra de cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos, frecuentemente se observa la presencia de multirresistencia. En un estudio reciente se observó que el retraso en la administración de un antibiótico activo contra Kpn-BLEE en casos de bacteremia fue un factor asociado con mortalidad elevada.³⁰

3. JUSTIFICACION

Las infecciones por bacilos gramnegativos productores de BLEE son un problema creciente a nivel mundial que conduce a una notable limitación en las opciones de tratamiento antimicrobiano. Los reportes más recientes han ubicado a Latino América como una de las regiones con mayor prevalencia de producción de BLEE en bacilos gramnegativos. Desafortunadamente, la prevalencia de producción de BLEE se desconoce en la mayoría de las Instituciones en México. Esto constituye un grave problema ya que se ha observado que los retrasos en el inicio de una terapéutica adecuada para el manejo de infecciones graves por este tipo de gérmenes conduce a una elevada mortalidad. Por ello, consideramos necesario un conocimiento preciso de la epidemiología de las infecciones por bacilos gramnegativos productores de BLEE dentro de nuestro hospital lo que permitirá un tratamiento temprano y adecuado de los pacientes con infecciones por gérmenes resistentes particularmente en el caso de infecciones severas como es el caso de las bacteremias. Es además necesario, identificar los factores de riesgo que se relacionan con la producción de BLEE, lo que favorecerá el diseño de programas eficaces para la prevención de infecciones con este tipo de gérmenes. Finalmente, el análisis de la epidemiología molecular brindará un panorama de la dinámica de transmisión de los gérmenes resistentes entre nuestros pacientes.

4. PROBLEMA

4.1. Problemas generales.

a.-¿Cuál es la prevalencia de BLEE en bacteremias por *K. pneumoniae* en el Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ).

4.2. Problemas específicos

a.-¿ Cuáles son los factores de riesgo para bacteremia por *K. pneumoniae* productora de BLEE?

b.-¿Cuál es el impacto que tiene la producción de BLEE sobre la resistencia a otros grupos de antibióticos?

c.-¿Cuales son los tipos de BLEE más prevalentes en nuestra Institución?

d.-¿Cuál es el impacto de la producción de BLEE sobre el desenlace de los pacientes?

5. HIPOTESIS

5.1. General

a.-La prevalencia de bacteremias por *K. pneumoniae* productora de BLEE en el INCMNSZ es muy elevada.

5.2. Especificas

b.- Los pacientes con intubación endotraqueal, hemodiálisis, uso de oximino β -lactámicos, catéteres intravasculares, cirugía, cateterización urinaria, estancia intrahospitalaria prolongada y duración más corta de tratamiento con inhibidor de β -lactamasa tienen una prevalencia más elevada de BLEE.

c.- La producción de BLEE conduce a un incremento en la resistencia a otros grupos de antibióticos.

d.- Las BLEE tipo TEM y SHV son las más prevalentes en nuestra población.

e.- La infección con Kpn-BLEE conduce a un incremento en la estancia intrahospitalaria y en la mortalidad de los pacientes.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

a.- Determinar la prevalencia de BLEE en bacteremias por *K. pneumoniae* en el INCMNSZ.

6.2. Objetivos específicos

a.- Identificar cuales son los factores de riesgo para el desarrollo de bacteremia por Kpn-BLEE.

b.- Identificar el impacto que tiene la producción de BLEE en la resistencia a otros grupos de antibióticos.

c.- Conocer las clases de BLEE más prevalentes en nuestra Institución.

d.- Establecer el impacto de la producción de BLEE en el desenlace de los pacientes con bacteremia por *K. pneumoniae*.

7. METODO

7.1. Diseño

Es un estudio de casos y controles no pareado, observacional y retrospectivo.

7.2. Población

a) Pacientes en los que se haya aislado *K. pneumoniae* en hemocultivos de enero de 1993 a diciembre de 2002. Estos pacientes fueron identificados de la base de datos del laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ.

b) Cepas de *K. pneumoniae* aisladas de hemocultivos durante el periodo de estudio.

7.2.1. Grupos de estudio

1.- Casos: Pacientes con bacteremia por *K. pneumoniae* aislada de hemocultivo y productora de BLEE.

2.-Controles: Pacientes con bacteremia por *K. pneumoniae* aislada de hemocultivo que no fuera productora de BLEE.

7.2.2. Lugar de estudio

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", hospital de referencia nacional con 200 camas que brinda atención de tercer nivel a pacientes adultos en la Ciudad de México.

7.2.3. Criterios de inclusión

- a) Se incluyeron los pacientes en los que se aisló *K. pneumoniae* de hemocultivos entre enero de 1993 y diciembre de 2002.
- b) Los casos fueron los pacientes con bacteremia por Kpn-BLEE.
- c) Los controles fueron los pacientes con bacteremia por *K. pneumoniae* no productora de BLEE

7.2.4. Criterios de exclusión

- a) Se excluyeron los pacientes cuyos aislados clínicos no estuvieron disponibles o no fueron recuperables del banco de cepas del laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ
- b) Se excluyeron aquellos pacientes de los que no se dispuso de la información necesaria en el expediente clínico.

7.3. Variables

Variable dependiente: Producción de BLEE.

Variables independientes: Edad, estancia hospitalaria, estancia hospitalaria previa a la infección, enfermedades concomitantes,

Definición de las variables:

Producción de BLEE. Producción de β -lactamasas con capacidad para hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido identificadas por criterios y métodos establecidos.

Edad. Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la evaluación

Estancia hospitalaria. Tiempo transcurrido desde el ingreso del paciente al hospital hasta su egreso.

Estancia hospitalaria previa a la infección. Periodo de tiempo transcurrido desde el ingreso del paciente al hospital hasta el aislamiento en hemocultivos del germen de interés.

Enfermedades concomitantes. Enfermedades que acompañan al proceso infeccioso por el cual se está evaluando al paciente. Categorías: diabetes mellitus, historia de trasplante, infección por VIH, insuficiencia renal crónica, cáncer, neutropenia.

Procedimientos invasivos previos a infección. Procedimientos invasivos realizados al paciente previo a la detección del proceso infeccioso de interés. Categoría: Hemodiálisis, cirugía, colocación de catéteres intravasculares, colocación de sonda urinaria, colocación de sonda nasogástrica.

Antibióticos pre-infección. Antibióticos administrados antes del proceso infeccioso de interés. Categoría: cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas, ureidopenicilinas, carbapenémicos.

8. PROCEDIMIENTOS

8.1. Recuperación de las cepas.

Los aislados de *K. pneumoniae* de los pacientes incluidos en el estudio fueron recuperados del cepario del laboratorio de microbiología del INCMNSZ en caldo cerebro-corazón (BHI), se incubaron a 35°C por 18-24 hrs. Posteriormente, se resembraron en agar Mac Conkey y se incubaron a 35°C durante 18 a 24 hrs.

8.2. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

A todas las cepas de *K. pneumoniae* se les realizó pruebas de sensibilidad a gentamicina, amikacina, aztreonam, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, ofloxacina, gatifloxacina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/clavulanato e imipenem con el método de microdilución en caldo de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NCCLS.³⁹

8.3. Identificación de cepas productoras de BLEE.

A partir del cultivo puro se realizó prueba de escrutinio con el método de microdilución en placa.³⁹ Se usó caldo Müller Hinton y sal de ceftazidima (32µg/ml) de acuerdo a los estándares de NCCLS.

Interpretación: Se consideraron sugestivas de producción de BLEE aquellas cepas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) ≥ 1.0 µg/ml.

A los aislados sugerentes de producir BLEE se les realizó prueba fenotípica confirmatoria mediante prueba E con ceftazidima / ceftazidima + ácido clavulánico.

Interpretación: Se consideraron productoras de BLEE las cepas que mostraron una reducción mayor de 3 diluciones en la CMI de ceftazidima + ácido clavulánico en comparación con la CMI de ceftazidima.

8.4. Epidemiología molecular.

8.4.1. Tipificación de cepas mediante electroforesis por campo pulsado.

Para identificar la presencia de clonas de los aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos durante el periodo de estudio se utilizó electroforesis por campo pulsado. A partir de un cultivo puro y fresco en agar Mc Conkey, se tomó una colonia y se inoculó en un tubo con 5 mL de caldo BHI. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación lenta durante toda la noche. Después de la incubación se tomaron 150µL del cultivo y se colocaron en un tubo Eppendorff de 1.5mL. Los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm durante 2 min, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se lavó con 400µL de buffer PIV (Tris-HCl 1M, NaCl 1M, pH= 7.6). Después de lavar el paquete celular, éste fue resuspendido en 150µL de buffer PIV y se incubó a 50°C, después de la incubación, se agregó a los tubos 150µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1.6%, previamente fundida en microondas y estabilizada a 50°C.

De la mezcla resultante se tomaron 100µL y se colocaron en moldes especiales para preparar bloques. Los bloques se incubaron a temperatura ambiente hasta que se solidificaron y después se incubaron a 4°C durante 15 min.

Después de la incubación, los bloques fueron removidos y colocados en un tubo eppendorf con 500 μ L de buffer de lisis pH =7.6 (Tris 1M, NaCl 1M, EDTA 100mM, Brij 58 0.5%, desoxicolato ácido 0.2%, laurilsarcosinato de sodio 0.5%, ribonucleasa A 50 μ g). Los tubos con los bloques se incubaron a 50°C toda la noche.

Al siguiente día, se eliminó el buffer de lisis con micropipeta y se agregaron 500 μ L de buffer ESP (EDTA 0.4M, laurilsarcosinato de sodio 0.1%, pH 9-9.5 y 0.5 mg/mL de proteinasa K) y los tubos se incubaron a 50°C, durante 24 horas. Posteriormente los bloques se lavaron 7 veces con TE 1X (Tris 5mM, EDTA 5mM, pH=7.5, fenil-metil-sulfonil-fluorido 1mM), en cada lavado se incubaron a 37°C durante 30 min, posteriormente los bloques se lavaron 3 veces más con TE 0.1X (el buffer TE 1X se diluye 10 veces), cada lavado se hizo a temperatura ambiente durante 30 min. Luego los bloques fueron equilibrados con 300 μ L de buffer de restricción 1X durante 2-3 horas.

Finalmente, a cada bloque se le adicionaron 300 μ l de buffer y 30U de enzima *SpeI*, se mezclaron los tubos y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Después de la incubación se eliminó el buffer con la enzima y se lavaron 3 veces con buffer TE 0.1X, cada lavado a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mitad del bloque de cada cepa se colocó en cada pozo de un gel de agarosa para campo pulsado al 1% (Biorad, Hércules, Ca.). El gel fue colocado en la cámara de electroforesis en buffer TBE 0.5X. El DNA fue corrido en el quipo CHEF-DR-III (BioRad, Hercules, CA, USA) durante 19 horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se tomó fotografía. El análisis de los patrones electroforéticos se realizó con el programa BIOIMAGE AQ1-D

8.4.2. Aislamiento de plásmidos.

El DNA fue extraído de los aislados clínicos de acuerdo al método descrito por Kieser³¹. El DNA fue visualizado después de electroforesis vertical en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio.

8.4.3. Experimentos de conjugación.

Con la finalidad de documentar la capacidad de transferir la información genética contenida en los plásmidos se realizaron experimentos de conjugación. Esta conjugación de plásmidos se realizó de acuerdo al método descrito por Miller.³² Los plásmidos se conjugaron con la cepa *E. coli* J53-2 (F⁻, pro⁻, met^r, Rif). En todos los casos se seleccionaron transconjugantes en agar Luria suplementado con rifampicina (100µg/ml) en combinación con cefotaxima (1µg/ml) o ampicilina (50 µg/ml). Los transconjugantes fueron evaluados en agar Luria con tetraciclina (15 µg/ml), kanamicina (12.5 µg/ml), cloramfenicol (10 µg/ml) y gentamicina (16 µg/ml).

8.4.4. Amplificación de TEM- o SHV- por PCR y secuenciación.

Para amplificar los genes relacionados a TEM- de los aislados clínicos, se utilizaron los oligonucleótidos OT1 y OT2 descritos por Arlet y Philipon.³⁴ Para amplificar el gen SHV-específico incluyendo el péptido señal y el gen SHV completo como fue descrito por Silva *et al*³⁵ se utilizaron los oligonucleótidos SE5 (5'-GGT CGG AAT TCA GGA GGT TGA CTA TGC GTT ATA TTC GCC TG-3') y SB3 (5'-GGT GCG GAT CCT TAT TAG CGT TGC CAG TGC TC-3').

Las condiciones de la amplificación fueron: 94°C 5 min, luego 35 ciclos a 94°C 30 seg, 58°C 30 seg y 72°C 2 min; finalmente un ciclo a 72°C por 15 min. La reacción de secuenciación se hizo con el equipo de secuenciación fluorescente (Perkin Elmer, Foster City, EUA) y el secuenciador automatizado Applied Biosystems 373A (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante.³⁶

8.4.5. Determinación del punto isoeléctrico de las BLEE.

La determinación del punto isoeléctrico fue realizada de acuerdo con el método de Matthew et. al.³⁷ Se usó un minigel de pH de 3-10 (Pharmacia, Biotech) y se corrió en el equipo Phast system (Pharmacia, Biotech). Los extractos de cepas de referencia productoras de TEM-1, SHV-1 y SHV-5 fueron utilizados como estándares para los puntos isoeléctricos de 5.4, 7.6 y 8.2, respectivamente. Para determinar la BLEE codificada en las cepas se realizó un bioensayo de acuerdo a la descripción de Silva et al.³⁸

9. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron porcentajes para describir la frecuencia de cepas productoras de BLEE en bacteremias causadas por *K. pneumoniae*. Se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión, además de porcentajes para describir las características clínicas de los pacientes. Las características de los casos (bacteremia con Kpn-BLEE) y los controles (bacteremia con Kpn-no BLEE) fueron comparadas utilizando t-student y U-Mann-Whitney dependiendo del tipo de distribución de la población. Se evaluaron los factores de riesgo para desarrollar bacteremia por un germen productor de BLEE mediante razón de momios e intervalos de confianza, las variables que mostraron significancia estadística fueron evaluadas mediante un análisis de regresión logística. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

10. ASPECTOS ETICOS

Por tratarse de un estudio retrospectivo, donde la información primordial se obtuvo de los expedientes clínicos y de los cultivos de organismos bien identificados y previamente reportados como patógenos, consideramos que no fue necesario solicitar consentimiento informado de los pacientes, en virtud de que los métodos empleados en este estudio y sus resultados no modificaron en absoluto las decisiones terapéuticas ni el pronóstico de los pacientes, no obstante hemos mantenido estricta confidencialidad en relación a los resultados del estudio y se mantiene el anonimato de todo aquel paciente cuyo agente patógeno mostró un resultado positivo.

11. RESULTADOS

Descripción de los pacientes.

Identificamos 121 casos de bacteremia por *K. pneumoniae* durante el periodo de estudio. Los episodios de bacteremia se presentaron con un promedio de 12.1 episodios por año (límites 1 a 19 episodios por año). La edad promedio del grupo fue de 48.12 años y la mediana de 48 años (DE 18.22, límites de 15-85). (Tabla 1)

Análisis microbiológico.

Se encontraron 18 aislados clínicos que presentaron una CMI $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ para ceftazidima. Diecisiete de estos aislados fueron productores de BLEE y se consideraron como casos. La prevalencia total de cepas productoras de BLEE fue de 14% (17/121). La edad fue significativamente mayor entre los controles ($p=0.001$). No hubo diferencias en la distribución de género entre ambos grupos ($p=0.597$). Todos los casos correspondieron a bacteremias nosocomiales. Las características de los grupos son mostradas en la tabla 1.

Condiciones comórbidas de los pacientes.

Al analizar las condiciones comórbidas de los pacientes se observó un porcentaje significativamente mayor de pacientes con leucemia/linfoma en el grupo de casos ($p=0.008$). No hubo diferencias entre los grupos en relación al resto de las comorbilidades (Tabla 2).

Intervenciones realizadas a los pacientes.

Se observó un porcentaje significativamente más elevado de pacientes sometidos a intubación endotraqueal ($p=0.001$), colocación de catéter venoso central ($p=0.025$), catéter arterial ($p=0.022$), sonda nasointestinal ($p=0.001$) y sonda urinaria ($p<0.001$) entre el grupo de casos previo al episodio de bacteremia (Tabla 3).

Uso de antibióticos antes del episodio de bacteremia.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en relación al uso de cefalosporinas ($p<0.001$), aminoglucósidos ($p<0.001$) y quinolonas ($p=0.013$) previo al episodio de bacteremia (tabla 4).

Factores de riesgo para producción de BLEE.

En la regresión logística se incluyeron las variables que mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el análisis univariado. Los resultados de este análisis mostraron que los factores de riesgo independientes para el desarrollo de bacteremia por Kpn-BLEE fueron: uso previo de cefalosporinas ($p=0.039$) y estancia en terapia intensiva ($p=0.033$). (Tabla 5)

Desenlace.

No se observaron diferencias entre los grupos en relación al tiempo de estancia hospitalaria posterior al evento de bacteremia (promedio 20.9 vs. 15.9 d, $p=0.49$). Tampoco se observó diferencia entre los grupos en relación a mortalidad (35 vs. 26.9%, $p=0.47$).

Efecto sobre otros antibióticos.

En el grupo de cepas productoras de BLEE se observó mayor frecuencia de resistencia a amikacina ($p<0.001$), gentamicina ($p<0.001$), ofloxacina ($p=0.007$), ciprofloxacina ($p<0.001$), gatifloxacina ($p=0.002$), ticarcilina/clavulanato ($p<0.001$) y piperacilina/tazobactam ($p<0.001$). Ninguna de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* fue resistente a imipenem. (Tabla 6)

Análisis de plásmidos.

El análisis de plásmidos fue realizado en 14 aislados clínicos. Se observó que 13 cepas tuvieron un plásmido de alto peso molecular (mayor o igual a 120 kb), y algunas cepas contenían otro plásmido de menor peso molecular (cerca a 60-80 kb). (Tabla 7)

Determinación del punto isoeléctrico.

Se determinó el punto isoeléctrico de las BLEE producidas por los plásmidos y se observó un patrón predominante con punto isoeléctrico de 5.4 (TEM-1) y 8.2 (SHV-5). (Tabla 7)

Amplificación de TEM- o SHV-

Al realizar la amplificación de de los genes TEM- o SHV- se observó que las cepas que expresaron una BLEE con punto isoeléctrico de 5.4 hibridaron con la sonda TEM confirmando que esta fue la enzima codificada. Asimismo, se observó que las cepas que expresaron la BLEE con punto isoeléctrico de 8.2 hibridaron con la sonda molecular del gene *shv*.

Experimentos de conjugación.

Se realizaron experimentos de conjugación de los plásmidos de 14 aislados a la cepa de *E. coli* J 53-2. Se observó transferencia del plásmido en 10 cepas y se comprobó la transconjugación de las BLEE en solo 8 . (Tabla 7).

Electroforesis por campo pulsado.

El análisis mediante electroforesis de campo pulsado fue realizado a los 121 aislados. Todas las cepas tuvieron diferente patrón electroforético. En la figura 1 se puede observar una muestra representativa de trece cepas.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha hecho evidente un aumento en la prevalencia de producción de BLEE entre las enterobacterias, principalmente en grandes hospitales de enseñanza y Unidades de Cuidado Intensivo. En México Kpn-BLEE ha sido documentada como causante de brotes en unidades de atención pediátrica y se han documentado prevalencias elevadas entre aislados nosocomiales.^{35,40,41}

No obstante, la dificultad para detectar producción de BLEE con las pruebas rutinarias de susceptibilidad hace difícil establecer su prevalencia en la mayoría de las instituciones de nuestro país. Respecto a esta dificultad, es interesante señalar que en el análisis de nuestros aislados se confirmó producción de BLEE en 17 de 18 (95%) cepas que resultaron sospechosas en el escrutinio establecido por la NCCLS.³⁹ Estos resultados apoyan la utilidad de las pruebas de escrutinio en la búsqueda de BLEE particularmente en el caso de *K. pneumoniae* en la que han demostrado una especificidad del 84-100% que contrasta con el 16% de especificidad observado en cepas de *E. coli*.^{40,45}

Con respecto a la producción de BLEE los resultados de la presente investigación demuestran una prevalencia del 14% en cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de hemocultivos, esto representa una cifra mucho menor a la que ha sido reportada en países como Francia (40%),⁸ otras regiones de Latinoamérica (45%)²¹ e incluso en otros hospitales de nuestro país (62%)⁴⁰ aunque si bien, permanece por encima de las bajas prevalencias observadas en países como Canadá (5%)²¹ u Holanda (<1%).⁸ Ya que es bien conocido el hecho de que la presión selectiva creada por el uso de cefalosporinas de amplio espectro es uno de los factores más importantes para la producción de BLEE podría especularse que estas variaciones en la prevalencia pueden ser consecuencia de diferencias en la utilización de este grupo de antimicrobianos.

De hecho al realizar la evaluación de los factores de riesgo para producción de BLEE nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura al señalar al uso de cefalosporinas y la estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos como los principales factores que conducen al desarrollo de este tipo de resistencia. Por otra parte es importante señalar que en nuestro estudio también se observa una tendencia interesante del uso de otros antibióticos como quinolonas o aminoglucósidos a colocarse como factores de riesgo independientes para la producción de BLEE aunque sin alcanzar un valor estadísticamente significativo.

Por otro lado, es interesante recordar que la producción de BLEE ha conducido a una creciente preocupación a nivel mundial por la capacidad de estas enzimas de inactivar a las cefalosporinas de amplio espectro, pero además se ha observado que su transmisión mediada por plásmidos permite no solo diseminación entre especies, sino también diseminación de genes de resistencia para antibióticos no-beta lactámicos. Lo anterior, permite que los organismos que expresan una BLEE sean frecuentemente resistentes a otros agentes antimicrobianos habiéndose reportado entre estos aminoglucósidos, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol y quinolonas, aunque si bien, la resistencia a estas últimas es más comúnmente codificada cromosómicamente también se ha documentado resistencia mediada por plásmidos.^{21,23,29,43} En relación a este punto es importante destacar en nuestros resultados el perfil de multiresistencia documentado entre las cepas de Kpn-BLEE, lo cual elimina de las opciones terapéuticas a los aminoglucósidos, las quinolonas y las combinaciones de beta-lactámicos con inhibidores de beta-lactamasas permaneciendo los carbapenémicos como la única opción de manejo de estos episodios de bacteremia.

La restricción de opciones terapéuticas para este tipo de infecciones adquiere relevancia ante las observaciones de que la falla en el uso de un antibiótico activo contra Kpn-BLEE en los primeros 5 días después de la identificación de bacteremia se ha asociado con un incremento en la mortalidad.³⁰

Es por esto interesante el hecho de que en nuestra serie la presencia de bacteremia por Kpn-BLEE no se asoció a un incremento en la mortalidad lo cual probablemente es influido por el hecho de que en nuestra Institución se investiga la producción de BLEE en todos los aislados sugestivos y se establece manejo con carbapenémicos hasta que su presencia es excluida. La falta de impacto de la producción de BLEE sobre la mortalidad ha sido también reportada por otros autores, una explicación para esto puede ser también que el tratamiento inicial con agentes a los cuales el organismo es resistente resulte exitoso debido una combinación de niveles elevados de antibióticos y adecuados mecanismos de defensa locales.^{11,26,27,44} En contraste con el efecto sobre la mortalidad, los datos acerca del impacto de la producción de BLEE sobre la duración de la estancia hospitalaria han sido contradictorios, en nuestro caso tampoco observamos diferencias entre los grupos en relación a este punto.

En el análisis de los aislados mediante electroforesis en campo pulsado se observó una alta variabilidad genética sin un patrón de clonalidad lo cual sugiere una baja tasa de transmisión nosocomial, esto muy probablemente debido a la adecuada aplicación de precauciones de barrera y medidas de control de infecciones intrahospitalarias. La falta de transmisión nosocomial de estas cepas probablemente sea otro de los factores que influyen en la prevalencia relativamente baja de producción de BLEE entre nuestros aislados.

Interesantemente, a pesar de la variabilidad genética se logró identificar en las cepas el mismo o un muy similar plásmido de alto peso molecular (120 Kb) que codifica para una combinación de enzimas (TEM-1 y SHV-5) lo cual sugiere la transmisión horizontal de estos elementos genéticos.

Al llevar a cabo la secuenciación de las BLEE producidas por nuestros aislados se identificó a la enzima SHV-5 como la más prevalente lo cual coincide con los datos reportados en otros hospitales de nuestro país.^{35,40,41}

Es necesario señalar que nuestro estudio presenta algunas limitaciones, la primera de ellas es el hecho de que se basó en un análisis retrospectivo y la identificación de producción de BLEE en nuestros aislados pudo haber sido afectado por los procesos de almacenamiento y recuperación de las cepas. Por otro lado, no se realizó un análisis en relación al manejo establecido de los casos de bacteremia lo que impide obtener conclusiones del efecto de un manejo apropiado sobre el desenlace de estos casos. Finalmente, se ha cuestionado la investigación de factores de riesgo para infección con gérmenes resistentes basándose en la comparación con controles sin infección por estos, pero que pudieran presentar colonización con estos gérmenes condicionada por factores de riesgo similares.

En conclusión, nosotros encontramos una prevalencia intermedia de producción de BLEE en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de bacteremia en nuestro hospital. Esto obliga a una vigilancia continua de la producción de BLEE mediante el uso de métodos apropiados de escrutinio y confirmación que permitan un manejo adecuado de estos casos. Deberá mantenerse un control adecuado del uso de cefalosporinas dentro de nuestro hospital ya que permanece como un importante factor de riesgo para el desarrollo de la resistencia mediada por BLEE. Finalmente, las estrategias para el control de este problema deberán basarse en una combinación de estrategias epidemiológicas, de microbiología clínica y de biología molecular.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (suppl 1):S19-S45.
- 2.-Poutsiaka D. Antimicrobial resistance in the chronically critically patient. *Clin Chest Med* 2001; 22(1):87-103.
- 3.-Archibald L, Phillips L, Monnet D, et al. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: Increasing importance of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1997; 24:211-215.
- 4.-Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR, et al. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: Project ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) hospitals. *Clin Infect Dis* 1999; 29:245-252.
- 5.-Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:416-420.
- 6.-Dever LA, Dermody TS. Mechanism of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med* 1991; 151:886-895.
- 7.-Gold HS, Moellering RC. Antimicrobial-drug resistance. *New Engl J Med* 1996; 335: 1445-1453.
- 8.- Bradford P. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
- 9.- Hart SM, Bailey EM. A practical look at the clinical usefulness of the β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Ann Pharmacother* 1996; 30:1130-1140.
- 10.- Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-584.

- 11.- Lautenbach E, Baldus Patel J, Bilker W, et. al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1162-71.
- 12.- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1697-1704.
- 13.- Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: Extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med* 1993; 119:428-430.
- 14.- Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2193-2199.
- 15.- Medeiros AA, Crellin J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended spectrum beta-lactamases to ceftibuten: Effect of large inocula. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(suppl 3):S49-S55.
- 16.- Nordmann P. Trends in beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 1998; 27(suppl 1): S100-S106.
- 17.- Dubois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM and SHV-derived extended spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:7-32.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 48: 1167-71.
- 19.- Burwen DR, Banerjee SN, Gaynes RP et al. Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram negative bacilli in the United States. *J Infect Dis* 1994; 170:1622-1625.
- 20.- Iltokazu GS, Quinn JP, Bell-Dixon C, et al. Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: Evaluation of national postmarketing surveillance program. *Clin Infect Dis* 1996; 23:779-784.

- 21.- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl 2):S94-103.
- 22.- Paterson D, Ko Wen-Chien, Von Gottberg A, et. al. International Prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremias: implications of extended spectrum β -lactamase production in nosocomial infections. Ann Intern Med 2004; 140:26-32.
- 23.- Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-espectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:164-9.
- 24.- Pessoa-Silva C, Meurer B, Camara V, et. al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. J Hosp Infect 2003; 53:198-206.
- 25.- Lin M, Huang M, Lai S. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum β -lactamase-*Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. J Hosp Infect 2003; 53:39-45.
- 26.- Kim B, Woo J, Kim N, et. al. Clinical implications of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. J Hosp Infect 2002; 52:99-106.
- 27.- Menashe G, Borre A, Yagupsky P. et. al. Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bacteremias. Scand J Infect Dis 2001; 33:188-193.
- 28.- Paterson D, Mulazimoglu L, Casellas JM, et. al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 2000; 30:473-8.

- 29.- Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, et. al. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis 2001; 33:1288-94.
- 30.- Paterson D, Ko WC, Von Gottberg A, et. al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases. Clin Infect Dis 2003; 39:31-7.
- 31.- Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid 1984; 12: 19-36.
- 32.- Miller J. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; 1992, 82-85.
- 33.- Rice L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases. Chest 2001; 119: 391S-396S.
- 34.- Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). FEMS Microbiol 1991; 66:19-25.
- 35.- Silva J, Gatica R, Aguilar C, et. al. Outbreak of infection with extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. J Clin Microbiol 2001; 39:3193-6.
- 36.- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Res 1994; 22: 4673-4680.
- 37.- Matthew G, Hedges R, Smith J. Types of β -lactamases determined by plasmid in gram-negative bacteria. J Bacteriol 1979; 138: 657-662.
- 38.- Silva J, Aguilar C. B-lactamase bioassay: A simplified method to determine extended-spectrum- β -lactamases (ESBL) in Enterobacteria. Arch. Med. Res. 1997; 28: 285-287.

- 39.- NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement. Document M 100-S12. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- 40.- Alcantar D, Tinoco JC, Gayosso C, et al. Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1067-74.
- 41.- González-Vertiz A, Alcantar-Curiel MD, Cuauhtli M, et. al. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* causing an outbreak of nosocomial bloodstream infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22:725-8.
- 42.- Stobberingh E, Arends J, Hoogkamp-Korstanje J, et. al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Dutch hospitals. *Infection* 1999; 27:348-354.
- 43.- Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, et al. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999; 281: 517–23.
- 44.- Blot S, Vandewoude K, De Bacquer D, Colardyn F. Nosocomial bacteremias caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients: clinical outcome and length of hospitalization. *Clin Infect Dis* 2002;34:1600-6.
- 45.- Tenover F, Raney P, Williams P, et. al. Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum β -lactamase Confirmation Methods for *Escherichia coli* with Isolates Collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3142–3146.

TABLAS

Tabla 1. Características generales de los pacientes

Característica	Bacteremia por Kpn-no BLEE (n=104)	Bacteremia por Kpn-BLEE (n=17)	RM (IC 95%)	p
Edad, promedio±DE	50.21 ± 17.41	35.29 ± 18.32		0.001
Sexo masculino	50 (48)	7 (41.1)	1.3 (0.4-3.7)	0.597
Estancia hospitalaria, promedio±DE				
Antes del episodio de bacteremia	10.38 ± 29.26	29 ± 27.43		0.016
Después del episodio de bacteremia	15.97 ± 28.85	20.94 ± 17.37		0.493
Total	26.11 ± 46.86	50.53 ± 34.47		0.042
Estancia en UTI	18 (17.3)	14 (82.3)	22.2 (5.8-85)	< 0.001
Infección nosocomial	47 (45.1)	17 (100)	1.3 (1.1-1.5)	< 0.001
Mortalidad	28 (26.9)	6 (35.2)	1.4 (0.5-4.3)	0.477

Tabla 2. Condiciones comórbidas de los pacientes

	Bacteremia por Kpn-no BLEE (n=104) (%)	Bacteremia por Kpn-BLEE (n=17) (%)	RM (IC 95%)	p
Diabetes	33 (31.7)	3 (17.6)	0.4 (0.1-1.7)	0.239
Hipertensión arterial	25 (24.0)	1 (5.88)	0.1 (0.02-1.5)	0.091
Neoplasia	19 (18.2)	1 (5.88)	0.2 (0.03-2.2)	0.202
Leucemia/linfoma	15 (14.4)	7 (41.1)	4.1 (1.3-12.6)	0.008
Enfermedad autoinmune	15 (14.4)	5 (29.4)	2.4 (0.7-8.0)	0.123
Insuficiencia renal crónica	12 (11.5)	1 (5.88)	0.4 (0.05-3.9)	0.485
Cirrosis hepática	12 (11.5)	0 (0)	0.8 (0.8-0.9)	0.140
Infección por VIH	4 (3.84)	1 (5.88)	1.5 (0.1-14.8)	0.696
Pancreatitis	6 (5.76)	2 (11.7)	2.1 (0.4-11.8)	0.356
Sepsis abdominal	6 (5.76)	4 (23.5)	5 (1.2-20.2)	0.014

Tabla 3. Intervenciones durante la hospitalización

	Bacteremia por Kpn-no BLEE (n=104) (%)	Bacteremia por Kpn-BLEE (n=17) (%)	RM (IC 95%)	p
Intubación endotraqueal	30 (28.8)	12 (70.5)	5.9 (1.9-18.2)	0.001
Catéter venoso central	49 (47.1)	13 (76.4)	3.6 (1.1-11.9)	0.025
Catéter arterial	10 (9.61)	5 (29.4)	3.9 (1.1-13.4)	0.022
Sonda nasointestinal	8 (7.69)	6 (35.2)	6.5 (1.9-22.3)	0.001
Sonda urinaria	21 (20.1)	12 (70.5)	9.4 (3.0-29.8)	< 0.001
Cirugía	35 (33.6)	4 (23.5)	0.6 (0.1-1.9)	0.408

Tabla 4. Uso de antibióticos previo a la bacteremia

	Bacteremia por Kpn-no BLEE (n=104) (%)	Bacteremia por Kpn-BLEE (n=17) (%)	RM (IC 95%)	p
Cefalosporinas	16 (15.3)	14 (82.3)	25.6 (6.6-99.5)	< 0.001
Aminoglucósidos	12 (11.5)	12 (70.5)	18.4 (5.5-61.3)	< 0.001
Ureidopenicilinas	9 (8.65)	2 (11.7)	1.4 (0.2-7.1)	0.679
Quinolonas	9 (8.65)	5 (29.4)	4.3 (1.2-15.3)	0.013
Carbapenémicos	1 (0.96)	1 (5.88)	6.4 (0.3-108)	0.140

Tabla 5. Factores de riesgo independientes para el desarrollo de bacteremia por Kpn-BLEE

Factor	OR	p
Uso previo de cefalosporinas	7.6 (1.1-53.5)	0.039
Uso previo de aminoglucósidos	4.6 (0.8-25.9)	0.078
Uso previo de quinolonas	6.8 (0.9-50.4)	0.058
Estancia en UTI	5.6 (1.1-27.9)	0.033

Tabla 6. Resistencia a otros grupos de antibióticos

	Bacteremia por Kpn-no BLEE (n=104) (%)	Bacteremia por Kpn- BLEE (n=17) (%)	p
Amikacina	0 (0)	5 (29)	< 0.001
Gentamicina	18 (17.3)	12 (70)	< 0.001
Ofloxacina	8 (7.6)	5 (29)	0.007
Ciprofloxacina	0 (0)	4 (23.5)	< 0.001
Gatifloxacina	6 (5.7)	5 (29)	0.002
Ticarcilina/clavulanato	46 (44.2)	17 (100)	< 0.001
Piperacilina/tazobactam	21 (20)	16 (94)	< 0.001
Imipenem	0 (0)	0 (0)	---

Tabla 7. Análisis molecular de los aislados clínicos

No.	Plásmido (Kb)	Patrón de Pi	Transferencia por conjugación (CTX)	β -lactamasa producida por transconjugación
1	200,120,86	7.6	-	
2	120	5.4,(8.2)	+	5.4,(8.2)
3	120,65	5.4,(8.2)	+	5.4,(8.2)
4	120	5.4,(8.2)	-	
5	170,120,86	5.4,(8.2)	+	
6	120	5.4,(8.2)	+	5.4,(8.2)
7	120	5.4,(8.2)	+	
8	105	5.4,7.6,(8.2)	+	5.4,(8.2)
9	145,70	5.4,7.6,(8.2)	+	5.4,(8.2)
10	120	5.4,7.6,(8.2)	-	
11	120,65	5.4,7.7,(8.2)	+	5.4,(8.2)
12	170,120	5.4,7.7,(8.2)	+	5.4,(8.2)
13		7.6	+	7.6)
14	120,70			

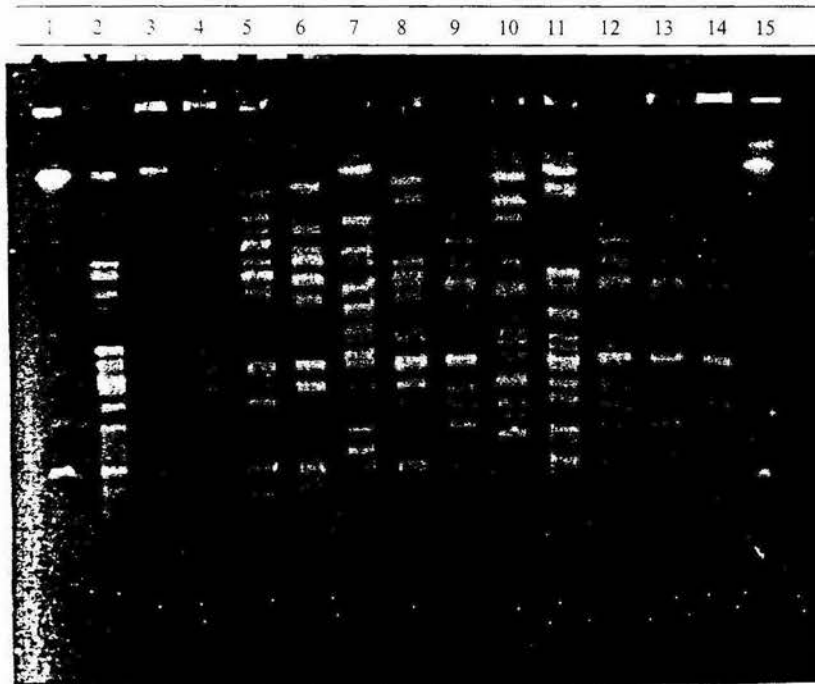


Figura 1. Muestra representativa de 13 aislados analizados mediante electroforesis por campo pulsado.

En los carriles 1 y 15 está colocado el marcador de peso molecular λ (*cl 857 ind 1 Sam 7*). En los carriles 2-14, cepas de *K.pneumoniae* aisladas de hemocultivos de pacientes con bacteremia.