

11219



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

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

DETECCIÓN RÁPIDA DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO
EXTENDIDO EN BACILOS GRAMNEGATIVOS
PROVENIENTES DE HEMOCULTIVOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

P R E S E N T A :

JENNIFER MARGARITA CUELLAR RODRÍGUEZ

TUTOR DE TESIS:
ALFREDO PONCE DE LEÓN GARDUÑO

ASESORES DE TESIS:
JOSE SIFUENTES OSORNIO
GUILLERMO MIGUEL RUIZ-PALACIOS Y SANTOS
ARTURO GALINDO FRAGA

Facultad de Medicina



MEXICO, D.F

2005

0348783



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.

HOJA DE FIRMAS



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

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

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

Dr. Alfredo Ponce de León Garduño
Investigador Titular, Departamento de Infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Tutor de Tesis

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jennifer Margarita Cuellar Rodríguez

FECHA: 30/ Septiembre / 2005

FIRMA: [Handwritten Signature]



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

DEDICATORIA

A Paco a quien amo y admiro. Gracias por tu apoyo, paciencia y compañía.

A mis padres quienes siempre me han ayudado y estimulado a alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Ponce de León, al Dr. José Sifuentes Osornio, al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios, a la Dra. Angelina Villasis y al Dr. Juan Sierra por su asesoría académica, sus enseñanzas y dedicación.

A Ana Lilia Rolón Montes de Oca y Melissa Hernández Duran por su invaluable ayuda.

A Arturo y Mosqueda por su apoyo y su amistad.

A mis compañeros: Claudia, Santiago y Paco por los buenos momentos y por siempre apoyarme.

INDICE

Introducción.....	6
Justificación.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	13
Objetivo primario.....	13
Objetivos secundarios.....	13
Materiales y Métodos.....	14
Criterios de Inclusión.....	14
Criterios de Exclusión.....	14
Procedimientos Microbiológicos.....	14
Análisis Estadístico.....	16
Resultados.....	17
Población de Estudio.....	17
Sensibilidad y Especificidad.....	17
Tiempos de Detección.....	19
Resistencia asociada a BLEE.....	20
Discusión.....	21
Bibliografía.....	24
Tablas y Figuras.....	28

INTRODUCCIÓN

El aumento en la incidencia de resistencia antimicrobiana entre los patógenos nosocomiales, así como entre los de adquisición comunitaria, se ha convertido en un reto, por las escasas opciones terapéuticas y las posibles complicaciones derivadas de las mismas. Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor tasa de hospitalización, a un aumento en el tiempo de estancia hospitalaria y a un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad (1). Una estrategia útil para disminuir las complicaciones asociadas a infecciones causadas por gérmenes resistentes es la selección inicial de un adecuado régimen terapéutico, frecuentemente empírico. En un estudio realizado en los Estados Unidos se encontró una tasa de mortalidad de 17.5% en pacientes adultos bacterémicos; sin embargo, la tasa de mortalidad disminuyó significativamente (13.3%) en pacientes que recibieron un esquema terapéutico inicial adecuado (2,3). Para ello sería de gran ayuda clínica contar con nuevas opciones terapéuticas, pruebas diagnósticas rápidas y confiables, así como un mejor control de la transmisión nosocomial de estos patógenos.

Desde la década de los ochentas, la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ha surgido como un mecanismo de resistencia importante entre las bacterias gramnegativas. Las BLEE son β -lactamasas que hidrolizan las cefalosporinas de tercera generación y los monobactámicos como el aztreonam. Son producidas por las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. En 1960 se describió la primera β -lactamasa mediada por plásmidos en microorganismos gramnegativos, la TEM-1. Esta enzima se encontró originalmente en una cepa de *E. coli* aislada de un cultivo de sangre de un paciente llamado Temoiniera en Grecia, del cual tomó su nombre. Su diseminación hacia otras bacterias se ha facilitado por encontrarse en plásmidos o transposones y en pocos años se ha diseminado por todo el mundo y ahora se encuentra en

varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Otra β -lactamasa mediada por plásmidos encontrada frecuentemente en *K. pneumoniae* y *E. coli* es la SHV-1 (sulphydryl variable). Esta enzima es codificada a nivel cromosómico en la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae* y por plásmidos en *E. coli*. Las oxymino-cefalosporinas fueron diseñadas para ser resistentes al efecto hidrolítico de las β -lactamasas, por lo cual se popularizó su uso en la década de los ochentas, sobre todo para las infecciones graves causadas por bacilos gramnegativos. Debido al uso indiscriminado de estos antibióticos rápidamente emergieron bacterias resistentes a estos antibióticos de espectro amplio, por lo que a esta nueva clase de β -lactamasas se le denominó BLEE. La primera enzima capaz de hidrolizar a las oxymino-cefalosporinas fue una SHV-2 y se encontró en una cepa de *K. ozaenae* aislada en Alemania (4,5).

La prevalencia del tipo de BLEE varía de acuerdo a la región geográfica, siendo las enzimas más prevalentes en México las SHV-5 y TEM-1 (6-13). La capacidad para hidrolizar los diferentes antibióticos varía de acuerdo al tipo de enzima prevalente en cada región: en Estados Unidos la ceftazidima y el aztreonam son los antibióticos más susceptibles a la hidrólisis por las BLEE, mientras que en Latinoamérica la cefotaxima parece ser más susceptible. Esta es una de las razones por las cuales siempre se recomienda utilizar al menos dos clases de antibióticos para las pruebas de detección de BLEE.

De acuerdo al programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY, entre 1997 y el 2002, la incidencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE en Latinoamérica fue de 42.7%, en contraste con la incidencia descrita para Europa y Estados Unidos y Canada, de 21.7% y 5.8% respectivamente (1,2). En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), se encontró una prevalencia de 14% de producción de BLEE en cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de hemocultivos (13). Así mismo el porcentaje de colonización gastrointestinal por enterobacterias productoras de

BLEE en la unidad de terapia intensiva de este mismo centro hospitalario es de hasta 26% durante los primeros 15 días de estancia hospitalaria (27).

Las bacteriemias causadas por cepas de *E. coli* o *K. pneumoniae* productoras de BLEE se han asociado a una mayor mortalidad que las bacteriemias causadas por cepas no productoras de BLEE (14). Se cree que esta elevación en la tasa de mortalidad se asocia a un retraso en el inicio de una terapia apropiada (15). Por otro lado este retraso se ha asociado claramente a un incremento en los días de estancia hospitalaria y en el costo. En un estudio multicéntrico realizado por Paterson et al., se encontró que la tasa de falla terapéutica excedió el 50% cuando se utilizaron cefalosporinas para tratar infecciones serias causadas por *Klebsiella* spp. productoras de BLEE que *in vitro* eran aparentemente susceptibles a éstas (16).

Una estrategia importante en el tratamiento de infecciones graves, tales como bacteriemias, es el desarrollo de un método que le permita al laboratorio reducir el tiempo de detección de microorganismos productores de BLEE de manera confiable. *In vitro* las enterobacterias productoras de BLEE suelen ser susceptibles a inhibidores de β -lactamasas, como son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, lo cual permite su detección en el laboratorio. Sin embargo, otros mecanismos de resistencia a los β -lactámicos, como enzimas tipo AmpC, cambios en las porinas y variantes de las BLEE originales pueden interferir con los resultados de las pruebas (5).

Tradicionalmente en áreas de baja prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE y con el fin de disminuir la carga de trabajo de los laboratorios, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha recomendado el realizar pruebas de detección de BLEE únicamente en las enterobacterias con una concentración mínima inhibitoria para ceftazidima, cefotaxima y cefpodoxima $\geq 2\mu\text{g/mL}$ (19). Las pruebas fenotípicas confirmatorias recomendadas son el método de difusión de disco, microdilución en caldo y la prueba E. La detección molecular de estas enzimas solo debe realizarse en aquellos casos en

que existan resultados discordantes. Ya que no todas las bacterias tienen la misma capacidad de hidrolizar a los antibióticos, se recomienda siempre utilizar al menos dos clases de antibióticos para las pruebas confirmatorias fenotípicas. El proceso de aislamiento, pruebas de microdilución y prueba confirmatoria tarda 4 días en promedio. Como ya se mencionó, existen varios estudios que han demostrado que el tratamiento adecuado de una bacteriemia durante las primeras 48 horas disminuye significativamente el riesgo de mortalidad (25). Actualmente el único grupo de fármacos recomendados para el tratamiento de infecciones graves causadas por microorganismos productores de BLEE son los carbapenémicos, ya que estos componentes son resistentes a la hidrólisis por β -lactamasas. El amplio uso de estos fármacos favorece la emergencia de gérmenes resistentes, además de ser caros. Existen reportes de bacterias portadoras de carbapenemasas mediadas por plásmidos. Aun cuando estos son reportes esporádicos, la posibilidad de bacterias gramnegativas portadoras de plásmidos con diferentes mecanismos de resistencia como BLEE, Amp C y Carbapenemasas son ya una realidad, lo que a largo plazo podría alterar importantemente la ecología bacteriana (20).

Navon-Venezia et al., describieron un método de detección rápida de cepas productoras de BLEE en hemocultivos (21). En ese estudio los investigadores inocularon 40 botellas de hemocultivo con 10 UFC de bacterias, con cepas productoras y no productoras de BLEE. Después de 24 horas de incubación en el sistema BacT/Alert y una vez emitida la señal de desarrollo, se tomó sangre de la botella y se inoculó directamente en medio de cultivo Mueller-Hinton. Se determinó la presencia de BLEE de acuerdo al método de difusión de discos. Los autores describen una sensibilidad y especificidad para este método de 95% y 100%, respectivamente. Este mismo grupo de investigadores posteriormente probó su técnica en aislados clínicos de hemocultivos. Obtuvieron una sensibilidad y especificidad para el método de 100% y 98%, respectivamente, al compararlo con el método de difusión de disco

convencional. Así mismo, reportan una diferencia promedio entre el tiempo de reporte de la prueba acelerada y la prueba convencional de 2.3 ± 0.47 días ($p < 0.0001$)(15).

Este estudio tiene como objetivo el evaluar el desempeño del método de detección acelerada de BLEE en bacilos gramnegativos de aislados clínicos de hemocultivos descrita por Navon-Venezia y determinar el impacto sobre el tiempo de detección al compararla con el método usado por el laboratorio, concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para escrutinio y prueba E en los sospechosos, así como prueba de difusión de disco convencional.

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por bacilos gramnegativos productores de BLEE representan internacionalmente un problema grande, lo que conduce a una notable limitación en las opciones terapéuticas. Latinoamérica es una de las regiones con mayor prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE y en México este es un problema creciente. La detección de enterobacterias productoras de BLEE en forma oportuna puede traducirse en una mejoría en el pronóstico y menor estancia hospitalaria, lo que reduce el costo de la atención.

Una estrategia importante en el tratamiento de infecciones graves –bacteriemias y neumonías- es la detección temprana de BLEE en organismos gramnegativos a través de un método confiable y de bajo costo. Ello cobra relevancia en sitios donde se ha reportado una prevalencia elevada de gérmenes resistentes.

HIPÓTESIS

La prueba de detección rápida de BLEE en bacilos gramnegativos aislados de hemocultivos revela la presencia de BLEE por lo menos en la misma proporción que la pruebas de difusión de discos y prueba E recomendadas por la CLSI y reduce el tiempo de reporte.

OBJETIVOS

Determinar BLEE en bacilos gramnegativos aislados de hemocultivos a través de una prueba fenotípica de lectura rápida.

Objetivos secundarios

1. Evaluar la sensibilidad y la especificidad de la prueba de detección rápida de BLEE en bacilos gramnegativos en aislados clínicos de hemocultivos.
2. Comparar el tiempo de ejecución de las pruebas de detección BLEE rápida y las pruebas convencionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de inclusión

1. Botellas de hemocultivos enviadas al laboratorio de microbiología clínica de nuestro Instituto entre el 29 de julio del 2005 al 23 de septiembre del 2005.
2. Botellas de hemocultivo en la cuales se detecte crecimiento.
3. Botellas en las que se observe, mediante la tinción de Gram de la muestra, la presencia de bacilos gramnegativos.
4. Un hemocultivo positivo por cada paciente.

Criterios de exclusión

1. Muestras por duplicado del mismo paciente.
2. Que se observen cocos grampositivos en la tinción de Gram.

Procedimientos microbiológicos

Las botellas se incubaron en la consola BACTEC 9240 (Becton Dickinson, Cockesville, Ma, EE.UU.) y una vez que el aparato emitía la señal de desarrollo, se realizó la tinción de Gram de la sangre de la botella. En caso de observarse bacilos gramnegativos se identificaron con la tarjeta GNI-604 del sistema VITEK (bioMérieux, Lyon, Francia). La susceptibilidad antimicrobiana se realizó inicialmente por el sistema VITEK con la tarjeta GNS + (bioMérieux, Lyon, Francia) y mediante microdilución en caldo. Se realizó el protocolo de detección rápida de BLEE, la prueba de detección de BLEE por difusión de discos convencional, que de ahora en adelante se denominará método convencional 1, y el método utilizado rutinariamente en el laboratorio, que de ahora en adelante se denominará método convencional 2 (Figura 1).

Método de detección rápida de BLEE: Una vez que el sistema BACTEC 9240 emitía la señal de desarrollo del hemocultivo y que se corroboraba la presencia de bacilos gramnegativos mediante la tinción de Gram, se extrajeron 0.2ml de sangre de cada botella de hemocultivo utilizando una jeringa estéril (15). La sangre se inoculó con un hisopo en placas de agar Mueller-Hinton y se utilizaron discos de ceftazidima con y sin ácido clavulánico y de cefotaxima con y sin ácido clavulánico. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se denominó como positiva a una prueba cuando el diámetro del halo de inhibición de la combinación de ceftazidima/ácido clavulánico fue ≥ 5 mm que el diámetro del halo de inhibición del disco de la cefalosporina sola (19).

Método convencional 1 de detección de BLEE: De cada botella se extrajo sangre y se inoculó en placas de agar sangre de carnero, Mac Conkey y chocolate. A partir de cultivos puros se hizo la identificación microbiológica y la sensibilidad utilizando el sistema VITEK. Del cultivo puro también se obtuvo una suspensión ajustada a una turbidez semejante al estándar 0.5 McFarland, para detección de BLEE, utilizando los mismos discos con antibiótico que en la prueba rápida y con la misma interpretación.

Método convencional 2 de detección de BLEE: De cada botella se extrajo sangre y se inoculó en placas de agar sangre de carnero, Mac Conkey y chocolate, hasta que se obtenía un cultivo puro, para la identificación con el sistema VITEK. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por microdilución en caldo. A todos aquellos aislados con una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para ceftazidima o aztreonam se les consideró como probables productores de BLEE y se les realizó la prueba E de ceftazidima con y sin ácido clavulánico. Aquellos con una CMI < 2 $\mu\text{g/mL}$ se reportaron como sensibles. Aquellos con una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ ó ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ y con una prueba E negativa se consideraron sensibles. Aquellos con una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ y con

prueba E positiva se consideraron resistentes. Todos aquellos con CMI >8 ug/mL se reportaron como intermedios o resistentes (19).

La prueba E se consideró positiva para BLEE cuando se observó una disminución mayor a 8 logaritmos en la combinación de cefalosporina/ácido clavulánico al compararla con la cefalosporina sola. Se consideró como un verdadero resistente a aquel microorganismo que mediante pruebas de microdilución en caldo resultara resistente de acuerdo con los lineamientos de la CLSI. En todos los casos discordantes se realizó una segunda prueba E con ceftazidima sola y ceftazidima/ácido clavulánico, y con cefotaxima sola y cefotaxima/ácido clavulánico; se consideraron como verdaderos productores de BLEE aquellos organismos con resultado positivo en esta segunda prueba.. Se utilizaron como controles positivo y negativo las cepas de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *E. coli* ATCC 25922, respectivamente.

Análisis Estadístico

Para la descripción de los datos construimos tablas de contingencia expresando las proporciones en forma de porcentaje. En base a ellas se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de cada una de las pruebas. Para estimar la diferencia entre estos valores se aplicó una prueba de Chi-cuadrada o exacta de Fisher, de acuerdo a la distribución de los valores. Para la variable tiempo de reporte evaluamos la normalidad de la distribución con una prueba de Kolmogorov-Smirnoff y para comparar la diferencia ente los métodos se utilizó una prueba t de Student. Se tomaron como significativos los valores de $p < 0.05$ (26).

RESULTADOS

Población de Estudio

Se analizaron 1182 botellas de hemocultivos de 432 pacientes. De las cuales 160 (13.5%) mostraron desarrollo que pertenecían a 79 pacientes (tabla 1). A todas las botellas positivas se les realizó tinción de Gram. En 89 (55.6%) de las botellas positivas se observaron bacilos gramnegativos, en 58 (36.3%) cocos grampositivos, en 4 (2.5%) bacilos gramnegativos y cocos grampositivos, en 6 (3.8%) levaduras, en 2 (1.3%) bacilos grampositivos y en una (0.6%) no se observaron microorganismos, aunque el cultivo desarrolló *Mycobacterium tuberculosis*. Las 89 botellas con bacilos gramnegativos pertenecían a 48 pacientes y sólo se incluyó una botella por paciente (Tabla 2). De los 48 casos de bacteriemia incluidos, 7 (14.6%) fueron bacteriemias polimicrobianas y 41 (85.4%) monomicrobianas. Se aislaron 55 bacilos gramnegativos: 36 enterobacterias y 19 bacilos gramnegativos no-fermentadores. Los gérmenes más frecuentemente aislados fueron *E. coli* [27 (49.1%)] y *P. aeruginosa* [13 (23.6%)] (Tabla 2). De los 55 gérmenes aislados, 15 (27.3%) fueron productores de BLEE, provenientes de 14 episodios de bacteriemias, para una prevalencia de bacteriemias con gérmenes productores de BLEE de 29.2% (14/48) y de bacteriemias por bacilos gramnegativos resistentes a las cefalosporinas de 3º y 4º generación de 41.6% (20/48) (Tabla 2).

Sensibilidad y Especificidad

Con la prueba rápida de detección de BLEE se detectaron correctamente 13/14 bacteriemias con microorganismos productores de BLEE, lo que se traduce en una sensibilidad del 92.8% (I.C.95%, 66-97.7%) (Tabla 3). La única bacteriemia en que no se detectó BLEE, fue un hemocultivo polimicrobiano en el que se aisló *Serratia marscecens* y *P. aeruginosa*. La *S. marscecens* fue productora de BLEE, sin embargo la *P. aeruginosa* fue resistente a todas las

cefalosporinas y no productora de BLEE, por lo cual la prueba directa se interpretó como germen resistente. La especificidad de la prueba fue de 100% (I.C.95%, 87.8-100%). El VPP fue de 100% (I.C.95%, 73.2-100%) y el VPN 97.1% (I.C.95%, 83.8-99%).

En cuanto a bacteriemias causadas por gérmenes resistentes a cefalosporinas (BLEE y no-BLEE), se identificaron correctamente con la prueba rápida 20/20 bacteriemias. Tres episodios más de bacteriemia mostraron sensibilidad intermedia en la prueba rápida, pero en realidad fueron sensibles. La sensibilidad y especificidad para detección de gérmenes resistentes fue de 100% (I.C.95%, 80.8-100%) y 89.2% (I.C.95%, 71.5-95.5%) respectivamente. El VPP y el VPN fueron de 86.8% (I.C.95%, 66.5-94.2%) y de 100% (I.C.95%, 84-100%) (Tabla 3).

Con el método 1 se identificaron correctamente 15/15 (100%) bacilos gramnegativos productores de BLEE provenientes de 14 episodios de bacteriemia y no hubo falsos positivos. La sensibilidad, la especificidad, el VPP y el VPN de la prueba fueron de 100% (Tabla 3). Por este método se identificaron correctamente 20/21 (95.2%) gérmenes resistentes a las cefalosporinas. El microorganismo discrepante fue *P. aeruginosa* cuyos resultados fueron sensible a ceftazidima por el método convencional 1 y sensible a las cefalosporinas con efecto anti-pseudomonas por el sistema VITEK, mientras que por CMI resultó con sensibilidad intermedia (16 µg/mL). Dos aislados clínicos, una *Stenotrophomonas maltophilia* y un *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, tuvieron sensibilidad intermedia por esta prueba, pero fueron sensibles por CMI (Tabla 3 y 4). La sensibilidad y especificidad de la prueba para la detección de gérmenes resistentes fue de 95.4% (I.C. 95%, 78.2-99.8%) y de 93.9% (I.C. 95%, 80.4-98.3%), respectivamente. El VPP fue de 91.3% (I.C. 95%, 73.2-97.6%) y el VPN 96.8% (I.C. 95%, 84.4-99.8%).

Cuando se utilizó el método 2 se identificaron correctamente 13/15 (86.6%) gérmenes productores de BLEE y 12/14 (85.7%) bacteriemias causadas por microorganismos

productores de BLEE. La sensibilidad y especificidad del método fueron de 85.7% (I.C. 95%, 58.4-94.7) y de 100% (I.C. 95%, 87.7-100%), respectivamente; el VPP y el VPN fueron de 100% (I.C. 95%, 71.7-100%) y de 94.4% (I.C. 95%, 80.5-97.9%), respectivamente. Los casos discordantes fueron un aislado de *E. coli* y otro de *K. pneumoniae*. El aislado de *E. coli* mostró una CMI fue de 16 µg/mL para ceftazidima y 32 µg/mL para ceftriaxona; sin embargo la prueba E de ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulánico resultó en 0.5/0.125 µg/mL (no productora). Se repitieron las pruebas de los métodos 1 y 2 y el resultado fue positivo. Ello indica un problema de densidad del inóculo empleado en la primera prueba. El aislado de *K. pneumoniae* mostró una CMI para ceftazidima de 1 µg/mL y para ceftriaxona de 2 µg/mL por lo cual, siguiendo los lineamientos de la CLSI, de inicio no se realizó la prueba E y se consideró sensible. Por ser un resultado discordante se realizó prueba E con ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulánico y prueba E con cefotaxima y cefotaxima/ ácido clavulánico; la prueba con ceftazidima resultó negativa y la de cefotaxima fue positiva, al igual que en los métodos de difusión de discos (método rápido y método 1). Este aislado muy probablemente hidroliza cefotaxima pero no ceftazidima, es decir puede ser productor de cefotaximasa.

Al comparar la sensibilidad de las pruebas para la detección de BLEE, no existió diferencia significativa entre el método de detección rápida y el método 2 ($p=0.16$), entre el método 1 y la prueba de detección rápida si existió diferencia significativa ($p=0.018$).

Tiempos de detección

El tiempo promedio desde la tinción de Gram hasta la detección de BLEE por el método 2 fue de 4.48 ± 1.35 días, por el método 1 fue de 3.17 ± 0.43 días y por el método de detección rápida fue de 1 ± 0 día. La diferencia promedio de detección fue de 3.48 y 2.17 para el método 1 y el método 2. La diferencia en el tiempo de detección al comparar el método de

detección rápida con los otros dos métodos fue estadísticamente significativa (método 1, $p < 0.001$ y Método 2, $p < 0.001$).

Resistencia asociada a BLEE

En este estudio observamos una alta proporción de gérmenes resistentes a diversos antibióticos. De las 27 *E. coli.* aisladas el 48.1% fue resistente a las cefalosporinas, el 55.5% a las quinolonas y el 11.1% a piperacilina/tazobactam; de las *K. pneumoniae* el 16.6% fue resistente a las cefalosporinas y a las quinolonas. La proporción aislados de *P. aeruginosa* resistente a cefalosporinas, meropenem y piperacilina/tazobactam fue de 30.7% (Tabla 4). Los gérmenes productores de BLEE, presentaron con mayor frecuencia resistencia a las quinolonas ($p < 0.001$) y se mantienen susceptibles a los aminoglucósidos, meropenem y parcialmente a piperacilina/tazobactam (Tabla 5)]. El aumento en la resistencia a las quinolonas se ha observado ya en otros estudios, sin embargo la prevalencia de resistencia a quinolonas en gérmenes productores de BLEE (93.4%) en este estudio fue mayor que la observada en este mismo Instituto (23%) en un estudio previo y a la reportada en la literatura (17). La resistencia en general a meropenem y piperacilina/tazobactam no está mediada por BLEE, esto se debe a que en nuestro estudio encontramos una alta proporción de *P. aeruginosa* multirresistente (Tabla 4).

DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema creciente a nivel mundial, que repercute directamente en la sobrevida de los pacientes infectados por estos gérmenes, así como en la estancia hospitalaria y el costo de atención (3,14). Los programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana cada vez más reportan regiones donde la tasa de infecciones por gérmenes resistentes son mayores a 50% (1). La producción de BLEE es el mecanismo de resistencia más frecuente a las cefalosporinas de amplio espectro entre las enterobacterias; éstas a su vez son los gérmenes más frecuentemente aislados en pacientes bacterémicos fuera del contexto de un brote (4,5). Latinoamérica es uno de las regiones con prevalencia de gérmenes productores de BLEE más elevada (hasta 45%) (1). En México, hasta hace unos años la prevalencia de microorganismos productores de BLEE era menor al 20% y en nuestro Instituto dicha prevalencia ha aumentado en forma preocupante.

En este estudio la prevalencia de las bacteriemias causadas por gérmenes resistentes a las cefalosporinas, independientemente del mecanismo de resistencia, fue de 41.6% mientras que la proporción de bacteriemias causadas por microorganismos productores de BLEE fue de casi 30%. Nosotros encontramos que *E. coli* es responsable de casi la mitad de las bacteriemias en el Instituto, y de todas las *E. coli*, 48.1% son productoras de BLEE. De hecho, *E. coli* representa 86.6% de los gérmenes productores de BLEE en bacteriemias.

Esto limita de manera importante las opciones terapéuticas, pero además tiene un alto costo económico y ecológico. El uso de antibióticos no adecuados, además de repercutir directamente sobre el pronóstico de los pacientes, promueve el surgimiento de más gérmenes resistentes. Como se mencionó anteriormente, los carbapenémicos son el único grupo de fármacos recomendados en infecciones graves causadas por gérmenes productores de BLEE. Es probable que dada esta alta incidencia de gérmenes resistentes en bacteriemias, sea

necesario el utilizarlos como terapia empírica inicial en bacteriemias por gramnegativos. Sin embargo, esta maniobra terapéutica lleva consigo otros problemas como son la selección de cepas inherentemente resistentes a estos medicamentos. Entonces, es necesario poder distinguir rápidamente aquellos pacientes que requieren carbapenémicos de aquellos que pueden ser tratados exitosamente con otro grupo de drogas.

Las pruebas de rutina de detección de BLEE son una herramienta indispensable en el tratamiento de los pacientes infectados. Sin embargo el tiempo de detección de BLEE de estas pruebas es muy largo, tomando en cuenta que las primeras 48 hrs de tratamiento son las que más repercuten sobre el pronóstico de los pacientes (25). En este estudio se encontró que la prueba de detección rápida acorta significativamente el tiempo de detección de BLEE que los métodos recomendados por la CLSI, con una diferencia promedio en el tiempo de detección de BLEE de 3.48 y 2.17 días.

La sensibilidad de la prueba de detección rápida de BLEE fue de 92.8%, ya que en una bacteriemia polimicrobiana además de haberse aislado un germen productor de BLEE, se aisló una *P. aeruginosa* resistente a todas las cefalosporinas. Así pues, se detectaron correctamente 13/14 bacteriemias con bacterias productoras de BLEE; la que no se detectó correctamente no representó una falla, ya que se detectó un germen resistente a las dos cefalosporinas. La especificidad de nuestra prueba fue de 100%. Si analizamos la prueba en cuanto a su capacidad de detectar gérmenes resistentes a las cefalosporinas, la sensibilidad fue de 100%. Navon-Venezia et al. describen una sensibilidad y especificidad para el método de detección rápida de BLEE de 100% y 98%, respectivamente. Sin embargo, ellos excluyeron del análisis las bacteriemias causadas por más de un germen. En nuestro estudio casi 15% de las bacteriemias fueron causadas por dos bacilos gramnegativos, es decir el riesgo de bacteriemia mixta es elevado como se ha descrito en otros estudios recientes (28). Por ello, el beneficio de esta prueba rápida como método de escrutinio para la detección de

BLEE es la detección de la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro más que la definición de los propios mecanismos de resistencia.

El método 2 identificó correctamente sólo 86% de las cepas productoras de BLEE: esto probablemente se deba a que únicamente se utilizó un antibiótico en la prueba de detección fenotípica. Existen varios estudios que han evaluado la efectividad de las pruebas recomendadas por la CLSI. En éstos se ha demostrado que la combinación de al menos dos antibióticos en las pruebas de detección mejora de manera importante la sensibilidad y especificidad de la prueba (18-20). Por otro lado, el escrutinio mediante CMI recomendado actualmente por la CLSI probablemente sea adecuado para países con baja prevalencia de BLEE; sin embargo en hospitales como nuestro Instituto, donde 30% de todos los aislados de sangre causados por bacilos gramnegativos son productores de BLEE, es necesario emplear un método de escrutinio rápido y eficaz.

El método 1 (de difusión de discos) es una prueba altamente sensible y específica, la cual tiene el inconveniente de tardar entre 3 a 5 días para su detección.

Nuestro estudio tiene las limitantes de que a pesar de la elevada prevalencia de gérmenes resistentes, el tamaño de la muestra es pequeño, y por otro lado que no confirmamos la presencia de BLEE con una prueba genómica.

En conclusión, la detección rápida de BLEE en bacteriemias por bacilos gramnegativos es una herramienta de gran utilidad porque además de acortar el tiempo para definir el tratamiento por 2 a 3 días en promedio, es muy sensible y específico, lo que sin duda alguna redundará en el pronóstico de los pacientes con sepsis y eventualmente podría reducir el costo de la atención médica.

BIBLIOGRAFÍA

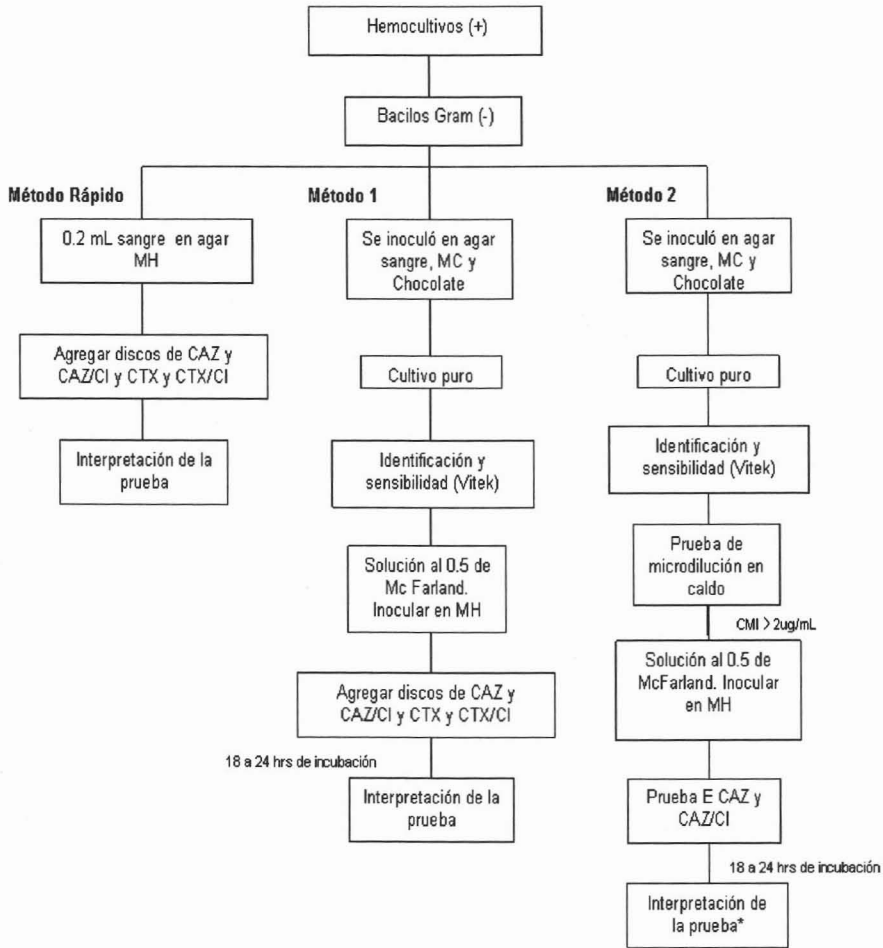
1. Sader HS., Biedenbacha DJ., Jones RN., Global patterns of susceptibility for 21 commonly utilized antimicrobial agents tested against 48,440 *Enterobacteriaceae* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001) **Diag Microbiol Infec Dis.** 2003;47:361-364
2. Biedenbacha DJ., Moeta GJ., Jones RN., Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002) **Diag Microbiol Infec Dis** 2004;50:59-69
3. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM et al., The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. **Clin Infect Dis** 1997; 24:584-602.
4. Patterson JE., Extended-Spectrum Beta-Lactamases. **Sem Resp Crit Care Med** 2003;24:79-87
5. Bradford PA., Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clin Microbiol Rev** 2001;14:933-951
6. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Outbreak of Infection with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital **J Clin Microbiol** 2001;39:3193-3196
7. Silva J, Aguilar C, Becerra Z et al., Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. **Microb Drug Resist** 1999;5:189-93.

8. Silva J, Aguilar C, Estrada MA et al., Susceptibility to new beta-lactams of enterobacterial extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Mexico. **J Chemother** 1998;10:102-7.
9. Alcantar-Curiel D, Tinoco JC, Gayosso C et al., Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. **Clin Infect Dis** 2004;38:1067-74.
10. Martinez-Aguilar G, Alpuche-Aranda CM, Anaya C et al., Outbreak of nosocomial sepsis and pneumonia in a newborn intensive care unit by multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: high impact on mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol** 2001;22:725-8.
11. Gonzalez-Vertiz A, Alcantar-Curiel D, Cuauhtli M, Daza C et al., Multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* causing an outbreak of nosocomial bloodstream infection. **Infect Control Hosp Epidemiol** 2001;22:723-5.
12. Espinal PA, Mantilla JR, Saavedra et al., Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido **Biomédica** 2004;24:252-61
13. Mosqueda Gomez JL. Bacteremia por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido en un hospital de tercer nivel en México. Epidemiología Molecular y Factores de Riesgo. Tesis de especialista en Infectología. Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
14. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE et al., Bloodstream infections by extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in

- children: epidemiology and clinical outcome. **Antimicrob Agents Chemother** 2002;46:481–1491
15. Navon-Venezia S, Leavitt A, Ben-Ami R. et al., Evaluation of an Accelerated Protocol for Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. **J Clin Microbiol** 2005;43: 439–441
 16. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A et al., Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum b-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **J Clin Microbiol** 2001;39:2206-12.
 17. Paterson DL., Ko WC, Von Gottberg A. et al., International Prospective Study of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Extended-Spectrum β -Lactamase Production in Nosocomial Infections **Ann Int Med** 2004;140:26-33
 18. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, et al., Extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. **Intensive Care Med** 2002;28:1718-23.
 19. Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing; Fifteenth International Supplement. **CLSI**. 2005;25(1).
 20. Colodner R, Extended-spectrum b-lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists **AJIC** 2005:104-107
 21. Navon-Venezia S., Ben-Ami R., Schwaber M. J. Et al, Protocol for the Accelerated Detection of Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from Blood Cultures. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2004;23: 200–202
 22. Katz O. T., Peled N., Yagupsky P. Evaluation of the current National Committee for Clinical. Laboratory Standards guidelines for screening and confirming extended-

- spectrum beta-lactamase production in isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species from bacteremic patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2004;23:813–817
23. Hadziyannis E, Tuohy M, Thomas L et al., Screening and confirmatory testing for extended spectrum b-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. **Diag Microbiol Infect Dis** 2000;36:113–117
24. Tenover FC., Raney PM. , Williams PP., 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
25. Apisarnthanarak A, Holzmann-Pazgal G, Hamvas A et al., Antimicrobial use and the influence of inadequate empiric antimicrobial therapy on the outcomes of nosocomial bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol** 2004;25:735-41.
26. Azzimonti JC. Failures of Common measures of agreement in medicine and the need for a better tool: Feinsein´s paradoxes and the dual vision method. **Scan J Clin Lab Invest** 2003;63:207-216.
27. Mosqueda-Gomez JL, Montañó A, Ponce de León A. et al., ESBL-production among *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in a tertiary-care center in México. Poster Session Antimicrobials: Resistance and Suceptibility. Abstract: 358. **42nd IDSA abstracts, IDSA 2004**, p. 104.
28. Matas L, Marti C, Morera MA, Sierra M et al., Bacteremia in 13 general hospitals of the province of Barcelona. Prospective study of 1,674 episodes. Group of Microbiologists of the County Hospitals of Catalonia. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 1995;13:345-55.

Figura 1. Diagrama de Flujo del Estudio: Detección Rápida de BLEE en bacilos gramnegativos de hemocultivos.



*En casos discordantes se repitió la prueba E

Tabla 1. Hemocultivos analizados y distribución de microorganismos identificados por tinción de Gram

Hemocultivos	Frascos n (%)	Pacientes n (%)
Total	1182	432
Positivo	160 (13.5)	79 (18.2%)
Tinción de Gram		
Bacilos gramnegativos	89	48
Cocos grampositivos	58	25
Levaduras	6	2
Mixtos	4	2
Bacilos grampositivos	2	1
No microorganismos*	1	1

* Este hemocultivo desarrollo *Mycobacterium tuberculosis*

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 2. Frecuencia de microorganismos productores de BLEE y resistentes a cefalosporinas en 48 bacteriemias por gramnegativos

	Total	BLEE n(%)	Resistente a Cef.* n(%)
Pacientes con Bacteremia	48	14 (29.2)	20 (41.7)
Un aislamiento	41	---	---
Polimicrobianas	7	---	---
Bacilos gramnegativos aislados			
<i>Escherichia coli</i>	27	13 (48.1)	13 (48.1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	0	5 (38.4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	1 (16.6)	1(16.6)
Otros no fermentadores	6	0	0
Otras enterobacterias	3	1 (33.3)	2 (66.6)
Total de aislamientos	55	15 (27.2)	21 (38.1)

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de la prueba rápida para detección de microorganismos productores de BLEE y resistentes a cefalosporinas en bacteriemias por bacilos gramnegativos

	Pos/neg.	Sensibilidad % (I.C. 95%)	Especificidad % (I.C. 95%)	VPP % (I.C. 95%)	VPN % (I.C. 95%)
BLEE +*					
Prueba rápida	13/34	92.8 (66-97.7)	100 (87.8-100)	100 (73.2-100)	97.1 (83.8-99)
Método 1	15/40	100	100	100	100
Método 2	13/42	85.7 (58.4-94.7)	100 (87.7-100)	100 (71.7-100)	94.4 (80.5-97.9)
Resistente a Cefalosporinas**					
Prueba rápida	23/25	100 (8.8-100)	89.2 (71.5-95.5)	86.8 (66.5-94.2)	100 (84-100)
Método 1	20/35	95.4 (78.2-99.8)	93.9 (80.4-98.3)	91.3 (73.2-97.6)	96.8 (84.4-99.8)

* Se consideraron BLEE + a todos aquellos aislados que fueron positivos por los tres métodos. En los casos discordantes se repitieron nuevamente el método 1 y 2 y se consideraron los resultados de esta segunda evaluación.

** El método 2 es el método referente para la comparación con los otros 2 métodos.

Tabla 4. Porcentaje de Gérmenes Resistentes a diversos antibióticos

Gérmenes	Total n=55	Resistentes Cefalosporinas n (%)	Resistentes Amikacina n (%)	Resistentes Ciprofloxacina n (%)	Resistentes Meropenem n (%)	Resistentes Piperacilina/ Tazobactam n (%)
<i>Escherichia coli</i>	27	13 (48.14)	0	15 (55.5)	0	3 (11.1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	1 (16.6)	0	1 (16.6)	0	0
Otras Enterobacterias*	3	2 (66.6)	1 (33.3)	0	0	2 (66.6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	4 (30.7)	3 (23)	3 (23)	4 (30.7)	4 (30.7)
Otros No-fermentadores**	6	1 (16.6)	2 (33.3)	1 (16.6)	2 (33.3)	2 (33.3)

*Otras enterobacterias: 1 *Serratia marcescens*, 1 *Proteus mirabilis*, 1 *Enterobacter cloacae*. **Otros no-fermentadores: 3 *Stenotrophomonas maltophilia*, 2 *Pseudomonas* sp., 1 *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii****Se excluyeron gérmenes inherentemente resistentes a Cefalosporinas (*S. maltophilia*).

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad a diversos antibióticos en gérmenes productores de BLEE

	BLEE + (n=15)	
	Sensibles n (%)	Resistentes n (%)
Amikacina	14 (93.4)	1 (6.6)
Cefalosporinas 3° ó 4°	0	15 (100)
Ciprofloxacina	1 (6.6)	14 (93.4)
Meropenem	15 (100)	0
Piperacilina/tazobactan	11 (73.3)	4 (26.7)