Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia

Sandra L. Gaitán C., Paula A. Espinal M. y Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana, Región Caribe

Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in hospitals of the Caribbean Region, Colombia

ESBL-producing in *Enterobacteriaceae*, is the main resistance mechanism to extended spectrum cephalosporin and monobactams. Seventy isolates collected of hospitals in four cities of the Colombian Caribbean, were characterized to ESBL production and metallo- β -lactamases by microbiological test. The β -lactamases characterization were performed by IEF and RPC; genotyping by PFGE. Results evidenced the ESBL production at four cities with more frequency in *Klebsiella pneumoniae* isolated from UCI. The β -lactamases present in *Escherichia coli* and in *K. pneumoniae* contributed co-resistance to different antibiotic families. Enzymes were detected with resistance to cephalosporin and carbapenems, suggesting presence of carbapenemases. Polyclonal isolates noticed, neither demonstrated presence of endemic strains nor association with epidemic outbreak. It is evident the importance to combine clinical, microbiological and molecular information to surveillance the prevalence and evolution of these enzymes in these hospitals.

Key words: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamases, ESBL, Colombia.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamasas, BLEE, Colombia.

Universidad del Sinú, Montería, Colombia

Facultad de Ciencias de la Salud
Grupo de Enfermedades Tropicales
y Resistencia Bacteriana

Recibido: 6 de febrero 2008

Aceptado: 14 de enero 2009

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Este trabajo fue financiado por el Instituto Colombiano para el desarrollo de la Ciencia y Tecnología "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS (Código:1283-04-16546) y por la Universidad del Sinú.

Correspondencia a:

Paula A. Espinal Marín
paulaespinal@unisnu.edu.co

Introducción

Durante las últimas décadas, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) del tipo TEM, SHV, OXA, y recientemente, CTX-M descritas en bacilos gramnegativos han emergido como un mecanismo significativo de resistencia^{1,2}. Las BLEE son enzimas capaces de hidrolizar eficientemente cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima y ceftazidima, entre otras) y monobactámicos (aztreonam) por lo que se han asociado con fallas terapéuticas. Estas enzimas se han diseminado peligrosamente en amplias regiones geográficas³ y el éxito de esta diseminación se debe probablemente a que el gen de resistencia (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, entre otros) es frecuentemente transportado en plásmidos auto-transmisibles o móviles, capaces de diseminarse horizontalmente entre e intra especies⁴. Según el reporte del proyecto SENTRY, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con fenotipo de BLEE fueron más frecuentes en América Latina, seguida por la región del pacífico occidental, Europa, E.U.A. y Canadá⁵. En Colombia, según lo reportado por CIDEIM, se encontró entre 8 y 11% en *E. coli* y 20 a 30% en *K. pneumoniae* con fenotipos sugestivos de

BLEE⁶ y se describió la primera BLEE tipo cefotaximasa (CTX-M-12) en el país⁷.

En el presente estudio se realizó la caracterización molecular de β -lactamasas en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* recuperadas de seis instituciones hospitalarias en cuatro ciudades de la región Caribe, entre marzo de 2005 y agosto de 2006.

Materiales y Métodos

Aislados bacterianos y caracterización microbiológica. De 144 aislados consecutivos de *E. coli* y *K. pneumoniae* recuperados de pacientes hospitalizados en diferentes servicios, el análisis se llevó a cabo con 70 que fueron resistentes a alguna oximino-cefalosporina, recuperadas durante 18 meses en seis instituciones de tercer nivel de atención en salud de las ciudades de Barranquilla (19), Cartagena (16), Montería (29) y Sincelejo (6). Los microorganismos fueron identificados a nivel de especie por medio del sistema MicroScan (NC32, Dade Behring).

El tamizaje y la prueba confirmatoria para la producción de BLEE fueron realizadas por el método de difu-

sión en disco (Oxoid) en agar Mueller Hinton, de acuerdo con las guías del Clinical and Laboratory Standards Institute⁸ (CLSI, *Enterobacteriaceae* M2-Disk Diffusion Table 2A, 2006).

El tamizaje de productores de metalo- β -lactamasas (M β L), se llevó a cabo empleando la prueba de sinergia de doble disco: imipenem-EDTA (10 μ g/750 μ g) y ceftazidima-EDTA (30 μ g/750 μ g)^{9,10}. Los microorganismos fueron inoculados sobre placas de agar Mueller Hinton según CLSI⁸ y se siguió el protocolo establecido por Hemalatha y cols¹¹. Las zonas de inhibición de los discos de imipenem y ceftazidima, con y sin EDTA, fueron comparados después de 18 horas de incubación a 35 °C; la prueba de tamizaje fue considerada positiva si la diferencia en la lectura de halos de los discos solos y en combinación con EDTA era ≥ 7 mm.

Las cepas ATCC 25922 de *E. coli* y ATCC 700603 de *K. pneumoniae*, fueron usadas como control negativo y positivo para la producción de BLEE, respectivamente. La cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* (susceptible a imipenem) fue usada como control negativo para la producción de M β L.

Caracterización de β -lactamasas

Isoelectroenfoque. Se realizó la caracterización inicial de las β -lactamasas en todos los aislados seleccionados por iso-electroenfoque (IEF) de acuerdo al método de Mathew y cols¹², con el modelo 111 Mini IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, Calif.). Las preparaciones de β -lactamasas libres de células fueron obtenidas por cuatro sonicaciones, cada una durante 10 s con intermitente enfriamiento sobre hielo. Los sobrenadantes (10 μ l) de cada preparación fueron sometidos a IEF sobre geles de poliacrilamida (anfolitos con rango pH 3 -9,5) y separados a 100V (15 min), 200V (15 min) y 450V (60 min) con el sistema Bio-Rad's PowerPac 3000. Después del IEF, la actividad de las β -lactamasas fue revelada con nitrocefina 250 μ M (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England). El punto isoelectrico (pI) fue identificado por comparación con enzimas de referencia (TEM-1: 5,4, SHV-3: 7,0, SHV-2: 7,6, SHV-5: 8,2 y TLA-1: 9,0) corridos en carriles adyacentes a las muestras.

Reacción de polimerasa en cadena (RPC) para la detección de genes bla. Todas las cepas fueron evaluadas para la presencia de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} específicamente del grupo 1 y *bla*_{AmpC} usando las condiciones de RPC descritas previamente^{1, 13}. Los iniciadores son descritos en la Tabla 1. Los productos de RPC se resolvieron sobre geles de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con el sistema ChemiDoc XRSTM (Bio-Rad).

Genotipificación

El análisis por electroforesis en gel por campos pulsados (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) fue realizado siguiendo lo descrito por Miranda y cols¹⁴, con la enzima de restricción *XbaI* (Invitrogen) y el sistema CHEF DRII PFGE (Bio-Rad). Las comparaciones para *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron hechas usando el coeficiente de Dice. Los dendrogramas fueron generados usando el método de UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). La relación de ADN fue calculada sobre el coeficiente de Dice y los aislados fueron considerados genéticamente relacionados si la correlación del coeficiente de Dice fue de 85% o mayor lo cual corresponde al criterio "posiblemente relacionado" (4-6 bandas diferentes) de Tenover y cols¹⁵.

Resultados

Identificación y pruebas de susceptibilidad

Distribución de los aislados clínicos. De 144 aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* recuperados dentro del período de estudio, 48,6% de estos (70 aislados) fueron considerados resistentes a alguna oximinocefalosporina. De ellos, 39 (55,7%) correspondieron a *E. coli* y 31 (44,2%) a *K. pneumoniae*.

El servicio hospitalario del cual se obtuvo la mayoría de aislados fue la UCI, (44,3%, 31/70), seguido de hospitalizados (25,7%, 18/70) y medicina interna (20%, 14/70). En UCI, *K. pneumoniae* fue el microorganismo predominante (74,2%, 23/31), mientras que en hospita-

Tabla 1. Iniciadores usados para la amplificación de los genes bla

Gen	Iniciadores		T° de asociación	Tamaño producto (pb)
<i>bla</i> _{TEM} ¹	5'-AAA CGC TGG TGA AAG TA 3'	5'-AGC GAT CTG TCT AT 3'	45 °C	239
<i>bla</i> _{SHV} ¹	5'- ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG 3'	5'-TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA 3'	60 °C	241
<i>bla</i> _{CTX-M1} ¹¹	5'-GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC 3'	5'-AGC CGC CGA CGC TAA TAC A 3'	55 °C	499
Amp-C ¹	5'-ATC AAA ACT GGC AGC CG-3'	5'-GAG CCC GTT TTA TGC ACC CA-3'	60 °C	170

lizados y medicina interna predominó *E. coli* en 33,4% (13/39) y 30,1% (12/39), respectivamente.

El origen de las muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislados, fue: orina (47,1%, 33/70), sangre (17,2%, 12/70), secreción bronquial (8,6%, 6/70) y secreción de tejidos blandos (7,1%, 5/70). *Escherichia coli* predominó en muestras de orina (81,3%, 27/33) y *K. pneumoniae* en sangre (58,3%, 7/12) y secreción bronquial (100%, 6/6).

Susceptibilidad antimicrobiana y detección de cepas productoras de BLEE

Los 70 aislados presentaron un perfil sugestivo de BLEE, mostrando resistencia a algunos de los antimicrobianos establecidos para el tamizaje. En las Figuras 1 y 2 se aprecia la frecuencia de resistencia intermedia y alta observada en *K. pneumoniae* y *E. coli* frente a diferentes grupos de antimicrobianos. La multi-resistencia observada incluye cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, quinolonas, cotrimoxazol y las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas; en su mayoría, las resistencias fueron más frecuentes en *K. pneumoniae* que en *E. coli*.

No se observó resistencia a carbapenems en aislados de *E. coli*, mientras que en *K. pneumoniae* se observó 9,7% a imipenem y 6,5% a meropenem. De tres aislados de *K. pneumoniae*, dos evidenciaron resistencia simultánea a imipenem y meropenem y uno solo a imipenem. La prueba de tamizaje para M β L fue negativa, lo cual indicó que el mecanismo de resistencia no era la producción de estas enzimas y sugirió la presencia de otros mecanismos de resistencia como carbapenemasas clase A, presencia de bombas de eflujo o modificación de las porinas de membrana (en estudio).

Se confirmó la presencia de BLEE en 28/70 aislados, 12 de *E. coli* y 16 de *K. pneumoniae* por medio de la prueba confirmatoria con ácido clavulánico. Los discos de cefotaxima y cefotaxima/ác. clavulánico confirmaron la presencia de BLEE en 10 de 12 aislados de *E. coli* y 15 de 16 cepas de *K. pneumoniae*. Los discos de ceftazidima y ceftazidima/ác. clavulánico demostraron menor capacidad para detectar BLEE, 11 de 12 aislados de *E. coli* y 12 de 16 cepas de *K. pneumoniae*.

De los 70 aislados resistentes a alguna cefalosporina, 42 no fueron inhibidos por ácido clavulánico; sin embargo, fueron caracterizados por IEF y RPC teniendo en cuenta su perfil de susceptibilidad.

Caracterización de las β -lactamasas

El análisis de IEF demostró la presencia de varias β -lactamasas en los 70 aislados estudiados que fueron resistentes a alguna cefalosporina.

El número de β -lactamasas producidas por cada uno de los aislados fue variable, encontrándose en

Figura 1. Susceptibilidad antimicrobiana en aislados con tamizaje de BLEE positivo en *Escherichia coli*, n = 39.

Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana en aislados con tamizaje de BLEE positivo en *Klebsiella pneumoniae*, n = 31.

algunos casos la producción simultánea de dos o más enzimas, como se observa en los datos obtenidos: producción de una enzima (61,4%; 43 aislados), dos enzimas (37,1%; 26 aislados) y tres (1,4 %; 1 aislado).

Dentro del grupo de aislados que expresaron sólo un pI, el más común fue 5,4, presente en 14 aislados de *K. pneumoniae* y 24 de *E. coli*.

De los 28 aislados confirmados como productores de BLEE, diez tuvieron un pI de 5,4; dos aislados de 5,8 y uno de 7,0. Los 15 aislados restantes tuvieron producción simultánea de pI diferentes.

El pI de los 42 aislados con prueba confirmatoria de BLEE negativa es detallado en la Tabla 2.

Tabla 2. Aislados con prueba confirmatoria de BLEE negativa pero resistentes a alguna oximino-cefalosporina

pI	Nº de aislados de <i>Escherichia coli</i>	Nº de aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
5,4	21	9
5,2 y 8,9	4	1
5,3 y 9,2	2	3
5,4 y 7,0	0	2

Se amplificó cada aislado que fue resistente a alguna cefalosporina con iniciadores específicos para los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} del grupo 1 y *bla*_{AmpC}.

Dentro de los aislados estudiados, 87,1% (61/70) amplificaron para el gen *bla*_{TEM}; 41,4% (29/70) para *bla*_{AmpC}; 38,6% (27/70) para el gen *bla*_{SHV} y 32,9% (23/70) para *bla*_{CTX-M1} (Tabla 3).

Se presentó amplificación simultánea de más de un gen en 39 de los 70 aislados (55,7%). En cuatro aislados con pI evidenciado por IEF no se logró un producto de amplificación con alguno de los iniciadores específicos usados.

En los 28 aislados productores de BLEE se encontró que el gen amplificado en 89,3% (25/28) fue *bla*_{TEM}; 85,7% (24/28) del gen *bla*_{SHV}; 64,3% (18/28) del gen *bla*_{AmpC} y 53,6% (15/28) para *bla*_{CTX-M} del grupo 1. Más de un gen fue amplificado en 85,7% (24/28) de los casos (Tabla 3).

De los 42 aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a alguna cefalosporina pero que tuvieron una prueba confirmatoria negativa para BLEE, más de un gen fue amplificado en 35,7 % (15) de los casos. Los aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems (imipenem y meropenem) evidenciaron la producción por IEF y RPC de la enzima TEM (dos aislados) y un tercer caso, la co-existencia de TEM, SHV, CTX-M1 y AmpC.

La presencia de dos o tres β -lactamasas involucradas en resistencia a oximino-cefalosporinas, fue observada en 43,6% (17/39) de los aislados de *E. coli* y en 70,1% (22/31) de los aislados de *K. pneumoniae*.

En general, la amplificación sugirió la presencia si-

multánea de genes *bla*_{TEM} - *bla*_{AmpC}, *bla*_{SHV} - *bla*_{AmpC} y *bla*_{CTX-M} del grupo 1- *bla*_{AmpC}, que fue confirmada en 38,6% (27/70 aislados), de los cuales 18% (7/39 aislados) correspondieron a *E. coli* y 64,5% (20/31 aislados) a *K. pneumoniae*.

De un total de 70 aislados, se evidenció en 44 un pI que sugirió la presencia β -lactamasas tipo TEM (pI 5,3-5,6). Sin embargo, por RPC se confirmó amplificación con los iniciadores para el gen *bla*_{TEM} en 61 cepas. De estos aislados, se amplificó simultáneamente los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en 26, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} del grupo 1 en 23 y *bla*_{TEM} y *bla*_{AmpC} en 25 aislados.

Se observó amplificación de bandas con tamaños esperados para los genes de BLEE, predominantemente en *E. coli* de *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} del grupo 1 y para *K. pneumoniae* de *bla*_{AmpC} y *bla*_{SHV}. Cuando se relacionó la amplificación de estas bandas con el perfil de susceptibilidad se encontraron las siguientes asociaciones:

- La amplificación simultánea de bandas posiblemente de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en *E. coli*, se observó que los mayores porcentajes de resistencia estuvieron asociados a ceftazidima, aztreonam, ceftriaxona, cefotaxima, cefepime, amikacina y ciprofloxacina.
- La coexistencia de bandas posiblemente de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} del grupo 1 en *E. coli*, mostró mayor resistencia principalmente a cefoxitina, piperacilina/tazobactam, cefotaxima, cotrimoxazol, gentamicina, kanamicina y amikacina.
- Cuando se presentó la amplificación simultánea de bandas posiblemente de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{AmpC} para *K. pneumoniae*, se presentó resistencia a todos los antimicrobianos valorados, excepto ceftriaxona que mostró un mayor porcentaje para la coexistencia de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, situación en la que se observó porcentajes de resistencia iguales a los asociados con la presencia de *bla*_{TEM} y *bla*_{AmpC} en ceftazidima, cefoxitina, carbapenems y cefepime.

Tipificación por electroforesis en gel de campo pulsado

Se realizó la genotipificación de la totalidad de los aislados (n: 144) con el fin de establecer cualquier

Tabla 3. Presencia de genes *bla* en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Resultado de la prueba confirmatoria de producción de BLEE	Presencia del gen <i>bla</i> en <i>Escherichia coli</i>				Presencia del gen <i>bla</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	<i>bla</i> _{CTX-M1}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{AmpC}	<i>bla</i> _{CTX-M1}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{AmpC}
Positiva	7	11	10	7	8	14	14	11
Negativa	6	23	0	0	2	13	3	10
Total	13	34	10	7	10	27	17	21

Tabla 4. Descripción de los clones obtenidos a partir de los 144 aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*

Clon	Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fecha de recolección	Servicio	Fuente	pl*	Genes bla
A	CC34	Diciembre 2005	UCI	Sec. bronquial	5.2 y 9.2	TEM y AmpC
	CC42	Enero 2006	Hospitalizados	Sangre	5.4 y 9.2	TEM
B	HSJ13	Marzo 2005	Urgencias	Sangre	5.4	TEM, AmpC, SHV y CTX-M1
	HSJ14	Mayo 2005	UCI	Sec. vesical	5.4	TEM, AmpC, SHV y CTX-M1
Clon	Aislado <i>Escherichia coli</i>	Fecha de recolección	Servicio	Fuente	pl*	Genes bla
A	HSJ3	Febrero 2005	Hospitalizados	Orina	5.2 y 8.9	TEM
	HSJ6	Marzo 2005	Cirugía	Sec. tejido blando	5.0 y 8.8	TEM
B	HI3	Marzo 2005	Cirugía	Orina	5.4 y 7.6	TEM, SHV, CTX-M1
	HB1	Diciembre 2005	Cirugía	Líqu. peritoneal	5.4	TEM

*pl: punto isoeléctrico

relación clonal. El análisis de los perfiles electroforéticos mostró, en promedio, la presencia de 27 a 30 bandas entre 50 y 1050 Kb. Con los perfiles electroforéticos obtenidos se generaron matrices de presencia (1) y ausencia (0), que fueron analizados con el software NTSYS PC 2.0. Para los dendrogramas obtenidos se estableció como porcentaje de similitud el 85%.

El análisis de PFGE de los 144 aislados, indicó que en las 51 cepas de *K. pneumoniae* se encontraron dos clones. Un clon A dos aislados con una similitud del 87% (CC34 y CC42) y el clon B con dos cepas idénticas (HSJ13 y HSJ14) (Tabla 4).

Para los 93 aislados de *E. coli*, se observaron dos clones. El clon A incluyó dos aislados, HSJ3 y HSJ6 con una similitud de 92%. El clon B incluyó los aislados HI3 y HB1 con 83% de similitud, recuperados de fuente e instituciones diferentes. Un aspecto en común fue el servicio (cirugía) en el cual se recuperó el microorganismo (Tabla 4).

Los aislados restantes para los dos microorganismos constituyeron un grupo heterogéneo con perfiles electroforéticos muy diferentes.

En general, los resultados obtenidos por tipificación por PFGE no evidenciaron relación clonal entre los aislados, lo cual fue consistente con la ausencia de un perfil característico en las pruebas de susceptibilidad.

Discusión

Los datos sobre la actividad de varios agentes antimicrobianos contra aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE, muestran que la combinación β -lactámico más inhibidores de β -

lactamasas (IBL), carbapenems, aminoglucósidos y fluorquinolonas son medicamentos potencialmente activos contra microorganismos productores de BLEE^{16,17}. Los resultados de los agentes antimicrobianos probados en este estudio demostraron que solamente los carbapenems tuvieron 100% de actividad contra aislados de *E. coli*, seguidos por amikacina, cefoxitina y piperacilina/tazobactam. Para *K. pneumoniae* hubo buena actividad con cefoxitina, ciprofloxacina, amikacina y carbapenems. Sin embargo, se encontró resistencia, inclusive a imipenem y meropenem, lo cual demuestra, que en las instituciones incluidas en el estudio sólo algunas de estas alternativas terapéuticas continúan siendo eficaces, y que ya se encuentran presentes aislados con varias enzimas y mecanismos co-existentes que confieren multi-resistencia, situación que ha sido reportado en otras regiones geográficas^{18,19}.

Aunque la resistencia a carbapenems en *K. pneumoniae* se detecta con baja frecuencia, en el presente estudio se encontraron aislados resistentes que fueron negativos a la prueba de tamizaje usando EDTA, lo que descartó la producción de M β L y sugirió como posible mecanismo de resistencia la producción de carbapenemasas, enzimas reportadas recientemente en Colombia²⁰. Debido a que la incidencia de estas enzimas en enterobacterias es muy baja y produce una resistencia de alto nivel, no sólo a imipenem, sino también al resto de β -lactámicos, actualmente se realizan estudios para su confirmación.

La resistencia asociada a aminoglucósidos fue observada en cepas de ambas especies, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura científica donde la producción de la enzima tipo CTX-M en aislados de

E. coli y *Klebsiella* sp se ha asociado con resistencia a otros antimicrobianos, tales como ciprofloxacina y aminoglucósidos²¹.

La resistencia a fluoroquinolonas se observó principalmente en *E. coli* y, debido al alto nivel de resistencia observado (72%), es posible que varios mecanismos simultáneamente se encuentren asociados, entre ellos la reducción en la permeabilidad, bombas de eflujo y mutaciones en las topo-isomerasas. Aunque en *K. pneumoniae* la sensibilidad a este antimicrobiano fue buena (71%), es importante informar el porcentaje de aislados con resistencia intermedia, 16%, ya que esta situación aumenta la probabilidad de adquirir resistencia a fluoroquinolonas y el consiguiente riesgo de fracaso terapéutico²².

La prueba confirmatoria de productores de BLEE, permitió detectar 28 cepas y aunque la prueba fue negativa para los 42 restantes, se demostró por RPC la amplificación de bandas que sugirieron la presencia de genes *bla*. Esto puede ser explicado por la presencia de enzimas contra inhibidores de β -lactámicos, hiperproducción de enzimas, asociación con enzimas tipo AmpC o la presencia de otros tipos de mecanismos de resistencia. Al correlacionar esta información con los perfiles de susceptibilidad no se encontró concordancia, análisis similares han sido reportados por Tenover et al²³.

Los resultados de esta investigación revelan que la presencia de BLEE posiblemente de tipo TEM, CTX-M del grupo 1 y SHV, fueron encontradas en todos los hospitales participantes y en varios aislados se demostró la amplificación de bandas asociadas a más de un posible gen *bla* (TEM, CTX-M del grupo 1, SHV y/o AmpC) en una misma cepa, lo cual es coherente con lo reportado por otros investigadores²⁴⁻²⁷. La distribución de las β -lactamasas confirmó variabilidad en la epidemiología de estos determinantes de resistencia y evidenció la necesidad de monitoreo constante.

Aunque la mayoría de las BLEE, se sugiere, son del tipo TEM y SHV, las CTX-M se han reportado de manera incrementada en bacilos gramnegativos². En Colombia las enzimas CTX-M, especialmente del grupo 1, se están reportando con mayor frecuencia²⁸⁻³⁰, lo cual fue concordante con los resultados obtenidos en este estudio.

Se esperaba que la resistencia a ceftazidima fuera, en general, más baja que para cefotaxima, especialmente en aislados sospechosos de ser productores de CTX-M1; sin embargo, en nueve no se observó inhibición por ácido clavulánico. Lo anterior demuestra que el fenotipo clásico de resistencia conferido por la BLEE tipo CTX-M no es universal y que la producción simultánea de β -lactamasas adicionales en los 23 aislados constituye un factor que posiblemente haya alte-

rado la especificidad de sustrato de CTX-M, enmascarando su presencia^{17,31}.

Siete aislados (5 de *E. coli* y 2 de *K. pneumoniae*) no fueron detectados inicialmente como productores de BLEE, ya que fueron resistentes a clavulanato y a piperacilina/tazobactam y sólo por RPC se evidenciaron bandas asociadas con el gen *bla*_{TEM}. Un resultado similar fue reportado por Robin et al³², donde explica que el uso de cefalosporinas de espectro extendido ha conducido a la selección de BLEE, detectándose enzimas que combinan BLEE y mutaciones ITR (*inhibitor-resistant enzymes*) que ocurren en la región de los genes *bla*_{TEM} responsables de la producción de TEM-1y TEM-2, confiriendo resistencia cruzada a las combinaciones de amoxicilina/ác. clavulánico, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/tazobactam y piperacilina/tazobactam. Se han identificado en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes*. Es posible que este fenotipo encontrado en los aislados analizados corresponda a la nueva enzima por lo que se hace necesario continuar su estudio para la confirmación de esta hipótesis.

Para las cepas en las cuales se evidenció pI, pero no se logró amplificación con los iniciadores para los genes *bla*, se ampliará el estudio para la detección de otros tipos de β -lactamasas.

La relación clonal establecida por PFGE de este estudio, evidenció una gran variabilidad genética dentro de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, lo cual sugiere la aparición de cepas resistentes específicas más que la circulación y transmisión de un aislado habitual entre pacientes. La policlonalidad observada en los aislados de cada especie sugiere que durante el tiempo del estudio no se demostró la presencia de cepas endémicas en las instituciones ni tampoco la asociación con brotes epidémicos. Sólo dos cepas productoras de BLEE de dos instituciones diferentes, demostraron tener similaridad por PFGE, situación que sugiere la transmisión cruzada entre salas de cirugía de las dos instituciones de la misma ciudad.

En conclusión, el aislado de microorganismos productores de BLEE es un problema presente en las cuatro ciudades de la región Caribe, que tiene mayor frecuencia, en términos absolutos, en *K. pneumoniae*, y que más de la mitad de éstos se aíslan en UCI. Se pudo determinar que los resultados obtenidos por RPC concuerdan con la posible presencia de cuatro tipos de β -lactamasas en los dos microorganismos, siendo en *E. coli* predominantes las asociadas a SHV y CTX-M1 y para *K. pneumoniae* las enzimas AmpC y SHV, lo cual es concordante con lo reportado en otros estudios multicéntricos en los que se ha determinado que la enzima tipo CTX-M1 es más frecuente en *E. coli* y CTX-M9 en *K. pneumoniae*^{21,33}. Debido a que *K.*

pneumoniae no contiene genes constitutivos de AmpC, como sí sucede con *E. coli*, la presencia de bandas asociadas al gen *bla*_{AmpC}, evidencia la posibilidad del movimiento de estos genes sobre plásmidos como mecanismo de diseminación entre bacilos gramnegativos³⁴.

Este estudio multicéntrico es uno de los primeros en aportar información sobre la prevalencia y distribución de aislados *E. coli* y *K. pneumoniae* con fenotipo productor de BLEE, posibles tipos de enzimas producidas, relación clonal y susceptibilidad a medicamentos potencialmente activos dentro de algunas instituciones hospitalarias de la región Caribe Colombiana (2005-2006). Esta información contribuye al conocimiento de la epidemiología de la resistencia en cada institución, permite establecer la relación entre el uso de antimicrobianos y la resistencia bacteriana y de esta forma la implementación de recomendaciones para el manejo de antimicrobianos, precauciones de contacto y vigilancia activa de áreas de alto riesgo.

Agradecimientos. Al Instituto Colombiano para el desarrollo de la Ciencia y Tecnología "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS Proyecto código: 12830416546 Convenio: 471 y la Universidad del Sinú por la financiación del estudio, a Miguel Díaz por el apoyo técnico brindado y a Jesús Silva (INS, México) por la donación de cepas de referencia. De igual manera, al personal médico de las instituciones hospitalarias participantes por su valiosa colaboración: Hospital San Jerónimo: Llorente Genes y M. Helena

Díaz; Clínica de la Costa: Johana Soto; Clínica de la Asunción: Jefe Sandra Puello; Clínica de la Sabana: Wilmer Villamil e Ingrid Painchault; Clínica Santa María: Wilmer Villamil; Hospital Bocagrande: Wilfrido Coronel; Jefe Nasly Ortega y Julia Pimienta; Hospital Infantil: Inés Díaz y Hernando Pinzón.

Resumen

La producción de BLEE en *Enterobacteriaceae*, es el principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos. Setenta aislados recuperados de hospitales de cuatro ciudades del Caribe colombiano, fueron caracterizados microbiológicamente para la producción de BLEE y metallo- β -lactamasas. La caracterización de las β -lactamasas se realizó por IEF y RPC; la genotipificación por PFGE. Los resultados evidenciaron la producción de BLEE en las cuatro ciudades con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* aislada de UCI. Las β -lactamasas presentes en *Escherichia coli* y en *K. pneumoniae* aportaron co-resistencia a diferentes familias de antimicrobianos. Se detectaron enzimas con resistencia a cefalosporinas y carbapenems, sugiriendo presencia de carbapenemasas. La policlonalidad observada no demostró presencia de cepas endémicas ni asociación con brotes epidémicos. Se evidencia la importancia de combinar datos clínicos, microbiológicos y moleculares para vigilar la prevalencia y evolución de β -lactamasas en estos hospitales.

Referencias

- 1.- Paterson D, Hujer K, Hujer A, Yeiser B, Bonomo M, Rice L, et al. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (11): 3554-60.
- 2.- Kim J, Lim Y, Jeong Y, Seol S. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* Clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 (4): 1572-5.
- 3.- Bradford P. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance *in vitro*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
- 4.- Schwaber M J, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2137-9.
- 5.- Gales C, Jones R, Gordon K, Sader H, Wilke W, Beach M. Activity and spectrum of antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemother* 1998; 45: 295-303.
- 6.- Villegas M V, Correa A, Pérez F, Miranda M C, Zuluaga T, Quinn J P, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 217-22.
- 7.- Villegas M V, Correa A, Pérez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, et al. CTX-M-12 beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 629-31.
- 8.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006; 16th informational supplement.
- 9.- Yong D, Lee K, Yum J H, Shin H B, Rossolini G M, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3798-801.
- 10.- Lee K, Lim Y S, Yong D, Yum J H, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4623-9.
- 11.- Hemalatha V, Sekar U, Kamat V. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized Indian patients. *J Med Res* 2005; 122: 148-52.
- 12.- Mathew M, Harris A, Marshall M, Ross G. The use of analytical isoelectric focusing for

- detection and identification of β -lactamases. J General Microbiol 1975; 88: 169-78.
- 13.- Pitout J, Hossain A, Hanson N. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol 2004; 42: 5715-21.
- 14.- Miranda G, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Coria R, Paterson J. Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 1996; 34 (12): 3138-41.
- 15.- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33 (9): 2233-9.
- 16.- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, et al. Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. J Clin Microbiol 2006; 44 (5): 1659-64.
- 17.- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47 (12): 3724-52.
- 18.- Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). Clin Microbiol Infect 2005; 11 (Suppl 4): 1-16.
- 19.- Schwaber M J, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2137-9.
- 20.- Villegas M, Lolans K, Correa A, Suárez C, Quinn J. Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. First detection of KPC carbapenemases in *Klebsiella* isolates from South America. Program and Abstracts of 45th Interscience Conference on Antimicrob Agents and Chemotherapy (ICAAC). American Society for Microbiology Washington 2005; Abstract LB2-20.
- 21.- Eisner A, Fagan E, Feierl G, Kessler H, Marth E, Livermore D, Woodford N. Emergence of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum β -lactamase in Austria. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (2): 785-7.
- 22.- Cirz R, Romesberg F. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (1): 220-5.
- 23.- Tenover F, Raney P, Williams P, Rasheed K, Biddle J, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum β -lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. J Clin Microbiol 2003; 41 (7): 3142-6.
- 24.- Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G, et al. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 196-202.
- 25.- Hernández J, Martínez L, Canton R, Coque T, Pascual A. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) among *E. coli* and *K. pneumoniae* in a Nationwide Study in Spain. Program and Abstracts of 43th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Chicago 2003; abstr C2-57.
- 26.- Leverstein V, Paauw A, Box A, Fluit A, Vehoef J. A Wide variety of (extended-spectrum) beta-lactamases detected in an outbreak of multiresistant Enterobacteriaceae in the Netherlands, including ACC-1, CTX-M-9, and novel TEM- and LEN-type beta-lactamases. Program and Abstracts of 43th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Chicago 2003; abstr C2-49.
- 27.- Smith E, Geun S, Thomson K, Larone D, Hanson N. Letters to Editor. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different β -lactamases, including AmpC and KPC β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51 (2): 800-1.
- 28.- Espinal P, Garza U, Fernández A, Martínez P, Reyna F, Mattar S, et al. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) identified in multiresistant Enterobacteria in Colombia hospitals, including CTX-M-12, SHV-2a, SHV-5, SHV-12 and novel SHV-86 β -lactamases. Program and Abstracts of 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco. 2006. Abstr C2-98.
- 29.- Mantilla J, Reguero M, González E, García I, Leal A, Espinal P, et al. Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. Biomédica 2006; 26: 408-14.
- 30.- Villegas M, Correa A, Pérez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, et al. The Colombian Nosocomial Resistance Study Group. CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 629-31.
- 31.- Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Italy: Molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (6): 2700-6.
- 32.- Robin F, Delmas J, Archambaud M, Schweitzer C, Chanal C, Bonnet R. CMT-type β -lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum β -lactamase detection. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (7): 2403-8.
- 33.- Yan J, Hsueh P, Lu J, Chang F, Shyr J, Wan J, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (6): 1861-4.
- 34.- Schmidtke A, Hanson N. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated β -lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (6): 2030-7.