Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos

Ana C. González, Beatriz Nieves, Marisé Solórzano, Jhon Cruz, Juan Puig y Magaly Moreno

Universidad de Los Andes,
Mérida, Venezuela.

Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Departamento de Microbiología y
Parasitología

Laboratorio de Investigaciones en
Bacteriología "Roberto Gabaldon"
(ACG, BN).

Laboratorio de Biomedicina
Experimental (LABIOMEX) (MS,
JC, JP).

Hospital Universitario de Los
Andes Mérida, Venezuela.

Unidad de Alto Riesgo Neonatal
(MM).

Los autores declaran la inexistencia
de conflictos de interés

Este proyecto se llevó a cabo a
través del Consejo de Desarrollo
Científico Humanístico y
Tecnológico (CDCHT). Proyecto
código: (FA-471-10-03-A) y del
Ministerio del Poder Popular para
Ciencia, Tecnología e Industrias
Intermedias Fonacit

Recibido: 19 de junio de 2012

Aceptado: 2 de junio de 2013

Correspondencia a:

Ana Carolina González Romero
anagonzalezr@ula.ve

Characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of two intensive care units

Background: Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* is more the frequently implied bacterium infections nosocomiales in the Neonatal High Risk Unit (NHRU), and adult intensive care unit (aICU) in the The Andes University Hospital Autonomy Institute. **Aim:** To determine the microbiological and molecular characteristics associated with infections caused by this bacterium. **Material and Methods:** 17 strains of *K. pneumoniae* isolated from neonates from NHRU with nosocomial infections and 11 isolates from patients hospitalized in the aICU between June to November 2009 were characterized by in vitro agar diffusion test and MIC, the production of β -lactamase, the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} genes and genotyping. **Results:** A high percentage of resistance to β -lactams and the presence of ESBL TEM, SHV and CTX-M in 41.2 y 82% of strains obtained at HRNU and at aICU respectively were detected. BLEE (+) phenotype was detected in 17,6% of HRNU strains and 91% of aICU strains. Genotypic analysis by REP-PCR detected several clones suggesting that resistant clones of ESBL-producing *K. pneumoniae* are endemic not only specific circulation and transmission of a single common among patients. **Conclusion:** *K. pneumoniae* strains that produce β -lactamases circulate in these critical units studied representing a therapeutic challenge that is necessary to fight against.

Key words: Nosocomial infection, *Klebsiella pneumoniae*, extended-spectrum β -lactamase.

Palabras clave: Infección nosocomial, *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamasa de espectro extendido.

Introducción

Klebsiella pneumoniae es un patógeno bacteriano importante, asociado a infecciones en la comunidad y nosocomiales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las cepas de *K. pneumoniae* tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos¹.

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas producidas por bacilos gramnegativos capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las cefamicinas ni los carbapenémicos. Son β -lactamasas mediadas generalmente por plásmidos y derivan de otras enzimas con menor espectro hidrolítico. La aparición de las BLEE ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas porque estas cepas presentan, además de resistencia a la gran mayoría de los β -lactámicos, altas tasas de resistencia a antimicrobianos de otras familias².

La mayoría de los genes que codifican BLEE son transmitidos por plásmidos y a menudo se encuentran en los transposones y los integrones, facilitando su movili-

zación con otro determinante de resistencia. Por lo tanto, los genes que codifican BLEE pueden ser fácilmente transferidos horizontalmente entre e intra especies^{3,4}. Las BLEE más frecuentes se han incluido en tres grupos: TEM, SHV y CTX-M. La enzima SHV se denomina sulfidril variable y se asocia con *K. pneumoniae*. La enzima TEM fue nombrada del paciente del que procedía, Temoneira, y fue descubierta por primera vez en *Escherichia coli* en Grecia. La BLEE tipo CTX-M está relacionada con la β -lactamasa cromosomal de *Kluyvera ascorbata*⁵, la cual se reportó en 1989 y se caracterizó por hidrolizar mejor a cefalosporinas como cefuroxima, cefotaxima y cefepima que ceftazidima⁶. Este tipo de BLEE se ha expandido rápidamente y es ahora uno de los tipos de BLEE más dominantes en muchos países^{7,8}.

En el medio nosocomial, las BLEE son consideradas como causas importantes del incremento en la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados, de la prolongada estancia hospitalaria y del aumento de los costos globales de salud^{1,9}.

Numerosos estudios señalan que las tasas de infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE causantes de brotes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)

están en aumento. Debido al papel que ha jugado este microorganismo en estas unidades en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), se planteó un estudio con el propósito de determinar las características microbiológicas y moleculares asociadas a las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) y la Unidad de Cuidados Intensivos Adultos (UCIa), contribuyendo de esta manera con la prevención y control de las infecciones.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas. El estudio se realizó con cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados en las unidades clínicas UARN y UCIa, durante el periodo comprendido entre junio y noviembre de 2009. El procesamiento de las muestras y el estudio microbiológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica "Dr. Roberto Gabaldón", del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia; y el estudio molecular en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), Universidad de Los Andes.

El estudio fue aprobado por las instancias del IAHULA involucradas, y no requirió procedimientos clínicos distintos a los realizados habitualmente en la atención de los pacientes.

Estudio microbiológico

- **Identificación y biotipificación.** Las cepas de *K. pneumoniae* se identificaron mediante los procedimientos descritos por Koneman y cols.¹⁰. La biotipificación de las cepas se realizó mediante el sistema comercial API 20E (BioMérieux, Francia). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de la casa fabricante.
- **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**
Método de difusión del disco. A las cepas de *K. pneumoniae* se les determinó la susceptibilidad a agentes antimicrobianos mediante la prueba de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer) de acuerdo a las instrucciones del CLSI¹¹. Se ensayaron los siguientes agentes antimicrobianos:
 - β -lactámicos: cefotaxima (30 μ g bioDiscs), ceftazidima (30 μ g bioDiscs), ceftioxima (30 μ g BBL), cefepime (30 μ g BBL).
 - Combinaciones de inhibidores de β -lactamasas: ampicilina/sulbactam (10/10 μ g Difco); amoxicilina/ác. clavulánico (10/10 μ g Difco); piperacilina/tazobactam (10/10 μ g Difco).
 - Monobactámicos: aztreonam (30 μ g Difco).
 - Carbapenémicos: imipenem (10 μ g HIMEDIA).
 - Quinolonas: ciprofloxacina (5 μ g HIMEDIA).

- Aminoglucósidos: gentamicina (10 μ g Difco), amikacina (30 μ g Difco).

Se utilizó como cepa control una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

- **Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).** Se empleó el método Etest[®] (BioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los antimicrobianos que se utilizaron en estos ensayos fueron los siguientes: ceftazidima, piperacilina/tazobactam, gentamicina, amikacina y aztreonam. Los resultados se interpretaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial y del CLSI¹¹.
- **Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE)** se realizó mediante el método descrito por Pitout y cols.¹².

Estudio molecular

Detección de genes bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CTX-M} en cepas de *K. pneumoniae* mediante reacción de polimerasa en cadena-RPC. La extracción de ADN se realizó por calentamiento a 90°C. La secuencia del iniciador TEM1 fue (TCCGCTCATGAGACAATAACC) y TEM2 (TTGGTCTGACAGTTACCAATGC). Tamaño del fragmento 750 pb¹³.

La secuencia del iniciador SHV1 fue (TGGTTATGCGTTATATTCGCC) y SHV2 (GGTTAGCGTTGCCAGT-GCT). Tamaño del fragmento 370 pb¹³.

El iniciador CTX-M1 fue (5'-TTTGGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3') y CTX-M2 (5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'). Tamaño del fragmento 540 pb¹⁴.

Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto el ADN, y como control positivo se utilizó una cepa de *K. pneumoniae* productora de β LEE tipo TEM, SHV, CTX-M caracterizada previamente y donada gentilmente por el centro de colección de microorganismo. Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela.

Los programas de amplificación para TEM, SHV se realizaron bajo las condiciones descritas por Coque y cols.¹³ y para CTX-M por Edelstein y cols.¹⁴.

Genotipificación

Reacción en cadena de polimerasa de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR). La extracción de ADN cromosomal se realizó mediante el método descrito por Snelling y cols.¹⁵. Los oligonucleótidos utilizados se basaron en elementos palindrómicos extragénicos repetitivos de ADN altamente conservados, cuya secuencia es la siguiente:

REP-1 (5'-III ICGICGICATCIGGC-3').

REP-2 (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') (Invitrogen Versalovic¹⁶).

Con cada muestra se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, la cual se desarrolló con un volumen final de 12,5 µl, con 0,08 U/µl de Taq polimerasa, 25mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 50 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos opuestos y la muestra de ADN genómico a una dilución de 1/1.000.

Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes anteriormente citados, excepto el ADN. La amplificación se realizó en un termociclador (Eppendorf), el cual fue programado de acuerdo a las especificaciones descritas por Salazar y cols.¹⁷.

Criterios de interpretación

El tamaño de los fragmentos generados por electroforesis de los productos de RPC se determinó por comparación con la escalera de peso molecular. La presencia o ausencia de bandas en una línea del gel se determinó por

inspección visual de los patrones, por tres observadores diferentes. Cepas con patrones de RPC iguales sobre las bases de similitud en cuanto al número y posición de todas las bandas mayores se consideraron del mismo genotipo. Pequeñas diferencias en la intensidad y forma de las bandas mayores o pérdida de bandas débiles fueron ignoradas (Tenover y cols.¹⁸).

Resultados

Se caracterizaron 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos con infección nosocomial hospitalizados en la UARN, así como 11 cepas aisladas de pacientes hospitalizados en la UCla, durante el período de estudio.

Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los neonatos mostraron un alto porcentaje de resistencia a ampicilina (100%), ampicilina/sulbactam (100%), amoxicilina/ác. clavulánico (100%) seguido de amikacina (94%), ceftazidima (94%), cefotaxima (94%), aztreonam (94%), gentamicina (82%) y una sensibilidad de 100% a imipenem, 94% a cefoxitina, 88% a ciprofloxacina y 58,8% a piperacilina/tazobactam.

En las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los pacientes hospitalizados en la UCla, se observó similares porcentaje de resistencia a los β-lactámicos y su combinación con inhibidores que en las cepas aisladas de la UARN.

De las 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los neonatos, en siete (41,2%) cepas se detectaron los tres genes *bla* (TEM, SHV y CTX-M) investigados; sin embargo, las siete eran del fenotipo βLEE (-). Los valores de CIM de ceftazidima ante estas cepas fueron de 64 µg/ml. El resto de las cepas sólo poseían los genes *bla* (TEM y SHV); no obstante, sólo tres (3/17; 17,6%) eran del fenotipo βLEE (+) (Tabla 1).

Todas las 17 cepas fueron genotípicamente diferentes mediante REP-PCR (Tabla 1, Figura 1A y 1B).

De las cepas aisladas en la UCla, nueve (82%) poseían los tres genes *bla* (TEM, SHV y CTX-M) investigados y, a diferencia de las cepas aisladas de la UARN, las nueve eran del fenotipo βLEE (+). El resto de las cepas (n: 2) sólo poseían los genes de TEM y SHV y una de ellas era del fenotipo βLEE (-) (Tabla 1). En suma, 10/11 (91%) de las cepas estudiadas en la UCla eran BLEE (+).

Se encontraron siete genotipos diferentes entre las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de esta unidad, predominando el genotipo I (Tabla 1, Figura 2).

Discusión

Klebsiella pneumoniae es un patógeno de importancia en el ambiente hospitalario, frecuentemente relacionado con infecciones nosocomiales en las unidades de cuidados intensivos y salas de pediatría, donde se aíslan cada vez con mayor frecuencia cepas resistentes a cefalosporinas

Figura 1(A). Patrón de bandas obtenidas por REP-PCR de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UARN del IAHULA. Esc: escalera, Línea 1 (Genotipo 1N), Línea 2 (Genotipo 2N), Línea 3 (Genotipo 3N), Línea 4 (Genotipo 4N), Línea 5 (Genotipo 5N), Línea 6 (Genotipo 6N), Línea 7 (Genotipo 7N), Línea 8 (Genotipo 8N), Línea 9 (Genotipo 9N), Línea 10 (Genotipo 10N). Cb: Cepa de *K. pneumoniae* responsable del brote 2007 ocurrido en la unidad.

Figura 1(B). Patrón de bandas obtenidas por REP-PCR de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UARN del IAHULA. Esc: escalera, Línea 11 (Genotipo 11N), Línea 12 (Genotipo 12N), Línea 13 (Genotipo 13N), Línea 14 (Genotipo 14N), Línea 15 (Genotipo 15N), Línea 16 (Genotipo 16N), Línea 17 (Genotipo 17N). Cb: Cepa de *K. pneumoniae* responsable del brote 2007 ocurrido en la unidad.

Tabla 1. Características de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los pacientes con infección nosocomial en las unidades de Alto Riesgo Neonatal y Cuidados intensivos de adultos del HULA

Cepa n de laboratorio	Unidad	CIM CAZ (μg/ml)	CIM P/T (μg/ml)	CIM AZT (μg/ml)	CIM AMK (μg/ml)	CIM G (μg/ml)	Fenotipo de βLEE	Tipo de βLEE	Genotipo
1	UARN	64R	3S	128R	192R	24R	-	TEM,SHV,CTX	1N
2	UARN	64R	3S	96R	192R	24R	-	TEM,SHV	2N
3	UARN	96R	2S	64R	128R	2S	-	TEM,SHV	3N
4	UARN	16R	3S	16R	192R	192R	-	TEM,SHV	4N
5	UARN	128R	3S	128R	192R	256R	+	TEM,SHV	5N
6	UARN	64R	16S	128R	256R	256R	+	TEM,SHV	6N
7	UARN	64R	16S	128R	256R	256R	+	TEM,SHV	7N
8	UARN	16R	256R	16R	128R	128R	-	TEM,SHV	8N
9	UARN	0,50S	2S	0,64S	1,50S	6S	-	TEM,SHV	9N
10	UARN	64R	3S	96R	128R	96R	-	TEM,SHV,CTX	10N
11	UARN	64R	192R	256R	256R	256R	-	TEM,SHV,CTX	11N
12	UARN	64R	256R	16R	64R	128R	-	TEM,SHV,CTX	12N
13	UARN	64R	256R	16R	256R	96R	-	TEM,SHV,CTX	13N
14	UARN	96R	2S	32R	48R	2S	-	TEM,SHV	14N
15	UARN	64R	256R	16R	128R	96R	-	TEM,SHV,CTX	15N
16	UARN	16R	256R	16R	64R	64R	-	TEM,SHV	16N
17	UARN	64R	256R	16R	64R	128R	-	TEM,SHV,CTX	17N
1	UCIa	48R	32S	192R	256R	256R	+	TEM,SHV,CTX	1A
2	UCIa	48R	32S	192R	256R	256R	+	TEM,SHV,CTX	1A
3	UCIa	64R	3S	64R	256R	256R	+	TEM,SHV,CTX	2A
4	UCIa	16R	2S	24R	3S	256R	+	TEM,SHV,CTX	3A
5	UCIa	32R	48S	128R	256R	256R	+	TEM,SHV,CTX	4A
6	UCIa	16R	12S	32R	16R	1.5S	+	TEM,SHV,CTX	5A
7	UCIa	32R	32S	192R	16R	256R	-	TEM,SHV	4A
8	UCIa	128R	2S	192R	256R	192R	+	TEM,SHV	6A
9	UCIa	128R	2S	192R	256R	192R	+	TEM,SHV,CTX	7A
10	UCIa	128R	3S	256R	256R	192R	+	TEM,SHV,CTX	7A
11	UCIa	64R	192R	256R	256R	256R	+	TEM,SHV,CTX	1A

RN: neonatos. A: adultos, CAZ: ceftazidima. P/T: piperacilina/tazobactam. AZT: aztreonam. AMK: amikacina. G: gentamicina. S: sensible. R: resistente.

de tercera generación con resistencia combinada a múltiples antimicrobianos^{1,19}. Debido a la gravedad de estas infecciones, la investigación constante y la aplicación de medidas de control reconocidas y efectivas, enmarcadas dentro de un programa de vigilancia, constituyen estrategias que pueden reducir sustancialmente la incidencia y prevalencia de las infecciones nosocomiales²⁰.

Durante el desarrollo de este proyecto de infecciones nosocomiales, llevado a cabo en la UARN y UCIa del HULA, los bacilos gramnegativos representaron el mayor porcentaje de aislamiento en ambas unidades. En la UARN, 22% de los aislados pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuente (53,1%). Por otro lado, en la UCIa, *K. pneumoniae* se aisló con una frecuencia relativa de 55%

Figura 2. Patrón de bandas obtenidas por REP-PCR de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UCIa del IAHULA. Esc: escalera, Línea 1, 2 y 11 (Genotipo 1A), Línea 3 (Genotipo 2A), Línea 4 (Genotipo 3A), Línea 5 y 7 (Genotipo 4A), Línea 6 (Genotipo 5A), Línea 8 (Genotipo 6A), Línea 9 y 10 (Genotipo 7A), Cb :Cepa de *K. pneumoniae* responsable del brote 2007 ocurrido en la UARN, C-: Control negativo.

dentro del grupo de bacilos gramnegativos fermentadores. Estos resultados son similares a los encontrados en otras unidades de cuidados especiales en países de América Latina, donde aproximadamente 60% de las infecciones son causadas por bacilos gramnegativos, entre ellos, *K. pneumoniae*²¹. En investigaciones anteriores realizadas en la UARN del HULA, esta bacteria ha sido causa de brotes y se ha aislado de la sangre de los neonatos, de las soluciones parenterales y de las soluciones jabonosas, así como también, de las manos del personal^{1,19}. A pesar de las medidas de control y prevención de las infecciones nosocomiales implementadas en la UARN, la tasa de aislamiento de *K. pneumoniae* sigue siendo alta.

La resistencia a los agentes antimicrobianos en bacilos gramnegativos causantes de infecciones nosocomiales se ha convertido en un hallazgo común en los grandes hospitales en todo el mundo²². En la actualidad, una de las mayores preocupaciones de la comunidad científica internacional es la creciente incidencia de infecciones producidas por *K. pneumoniae* resistente a múltiples agentes antimicrobianos, especialmente a los β -lactámicos²⁰. Este fenómeno fue igualmente observado en el presente estudio. En la UARN, 87% de las cepas fueron resistentes a ocho o más agentes antimicrobianos, especialmente a los β -lactámicos y a los aminoglucósidos. De igual manera, en la UCla se observó un alto porcentaje de resistencia a estos dos grupos de antimicrobianos.

Con la proliferación de cepas multi-resistentes, el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por *K. pneumoniae* es aún mayor, ya que dan lugar a incrementos de las tasas de mortalidad, de las estancias hospitalarias y de los costos de atención⁴. El alto nivel de mortalidad a consecuencia de infecciones asociadas a la atención de salud con cepas de *K. pneumoniae* multi-resistente es alarmante; parece ser que la carencia de control de las fuentes de contaminación e higiene ha causado la diseminación de los microorganismos entre los pacientes, probablemente debido a que *K. pneumoniae* β LEE (+) coloniza transitoriamente las manos del personal de salud del hospital, facilitando su transmisión¹.

De aquí que es importante diferenciar cepas individuales y caracterizar los mecanismos de resistencia en este tipo de microorganismos⁴. El principal problema de resistencia entre los patógenos aislados en las unidades de cuidados especiales del HULA, es la prevalencia de *K. pneumoniae* productora de β LEE, quizás como consecuencia de la exposición incrementada a las cefalosporinas de amplio espectro ampliamente utilizadas en estas unidades en la terapia empírica inicial, aunado al hecho de que 50% de los neonatos de quienes se aisló *K. pneumoniae* multi-resistente eran prematuros, de bajo peso al nacer y sometidos a algún procedimiento invasor, al igual que los pacientes infectados en la UCla, donde 100% estaban sometidos a procedimientos invasores.

Es importante resaltar que los antimicrobianos carbapenémicos aún presentan actividad contra las cepas de *K. pneumoniae* productoras de β LEE aisladas en estas unidades del HULA, a diferencia de los estudios de resistencia realizados por el CIDEIM en Colombia, donde ya existen cepas de *K. pneumoniae* productoras de metalo- β -lactamasas que le confieren resistencia a carbapenémicos, circulando en varios hospitales del país²⁴. No obstante, su uso debe vigilarse permanentemente, por cuanto su utilización indiscriminada podría originar la selección de cepas de bacilos gramnegativos resistentes a carbapenémicos. Las cepas aisladas en la UARN mantienen la susceptibilidad en 100%, a carbapenémicos, cefamicinas y quinolonas. Mientras que las cepas aisladas en la UCla sólo permanecieron sensibles a carbapenémicos y cefamicinas pero no a quinolonas.

La prueba fenotípica de producción de β LEE permitió detectar que 82% de las cepas aisladas de la UCla eran productoras de β LEE. Mientras que un bajo porcentaje (17,6%) de las cepas aisladas de la UARN eran fenotipo β LEE (+), aunque a través de RPC se demostró que las restantes negativas eran portadoras de los genes *bla*. Ello puede deberse a la presencia de enzimas que actúan contra inhibidores de β -lactámicos, hiperproducción de enzimas, asociación con enzimas tipo AmpC o a la presencia de otros tipos de mecanismos de resistencia que interfieren con la prueba⁴.

Los resultados de esta investigación revelan la presencia de β LEE tipo TEM, SHV y CTX-M en las dos unidades estudiadas y se demostró que algunas cepas eran portadoras de más de un gen *bla*_(TEM, SHV y CTX-M), lo cual es similar a los hallazgos reportados por otros investigadores^{4,25}. Las enzimas más comúnmente encontradas en Latinoamérica son SHV-2, SHV-4, SHV-5, CTX-M-2, CTX-M-8 y PER-2^{9,26,27}. En el presente trabajo, aunque la mayoría de las β LEE eran del tipo TEM y SHV, las CTX-M se encontraron en mayor proporción en la UCla (82%) (9/11). En Colombia, las enzimas CTX-M, especialmente las del grupo 1, se están reportando con mayor frecuencia^{28,4}, mientras que en estudios realizados en Brasil predominan las CTX-M-2 en *K. pneumoniae* asociadas a brotes²¹.

Es importante señalar que al realizar el análisis genotípico mediante REP-PCR se detectaron varios clones en ambas unidades y al analizarlas en conjunto no coincidieron los patrones de bandas, lo cual sugiere que los clones que circulan en la UARN son diferentes a los que circulan en la UCla. Incluso, al comparar los genotipos aislados en la UARN durante este estudio, con los obtenidos en un estudio realizado en el 2007 por González y cols.¹, en esa misma unidad, se pudo observar que se trata de genotipos distintos. La mayoría de las cepas mostró una amplia diversidad, lo cual sugiere que existen cepas resistentes específicas no endémicas más que la circulación y trans-

misión de un aislado habitual entre pacientes. Los genes que codifican las β LEE, probablemente sean diseminados vía la transferencia de un determinante de resistencia entre los aislados clínicos. De hecho, en un estudio preliminar que se lleva a cabo actualmente con el propósito de verificar la presencia de plásmidos conjugativos, y si además éstos portaban los determinantes de resistencia en las cepas de *K. pneumoniae*, se encontró que 17 de estas cepas poseían determinantes de resistencia transferibles.

El ensayo de REP-PCR es útil como una alternativa para la tipificación rápida; sin embargo, es conveniente confirmar los resultados con procedimientos que tengan mayor poder de discriminación, como la electroforesis en gel de campo pulsado^{1,22}.

Agradecimientos. Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT). Proyecto código: 2012001234 y al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT). Proyecto código: FA-471-10-03-A por la financiación del estudio. De igual manera, a los pacientes y al personal de las unidades de cuidados intensivos neonatal y de adultos del IAHULA.

Resumen

Introducción: *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido (β LEE) es la bacteria

más frecuentemente implicada en infecciones nosocomiales en las Unidades de Alto Riesgo Neonatal (UARN) y Cuidados intensivos de adulto (UCIa) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. **Objetivo:** Determinar las características microbiológicas y moleculares asociadas a las infecciones causadas por esta bacteria. **Material y Métodos:** Se caracterizaron la susceptibilidad *in vitro* por difusión en agar y CIM, la presencia de β -lactamasa y la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} y la genotipificación en 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos con infección nosocomial, así como 11 aisladas de pacientes hospitalizados en la UCIa entre junio y noviembre de 2009. **Resultados:** Esta investigación reveló un alto porcentaje de resistencia a β -lactámicos y la presencia de genes tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en 41,2 y 82% de las cepas procedentes de UARN y UCIa, respectivamente. Producción de BLEE se detectó en 17,6% cepa de UARN y en 91% de las pertenecientes a UCIa. Mediante el análisis genotípico REP-PCR se detectaron varias clones lo cual sugiere que existen clones resistentes de *K. pneumoniae* productora de β LEE específicas no endémicas más que la circulación y transmisión de un aislado habitual entre pacientes. **Conclusión:** En las unidades críticas estudiadas circulan cepas de *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas constituyendo un problema terapéutico importante y necesario de combatir.

Referencias bibliográficas

- González A, Gil F, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Suárez M, Nieves B. Brote por *Klebsiella pneumoniae* multiresistente y productora de β -lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. *Rev Chilena Infectol* 2011; 28 (1): 28-34.
- Díaz M, Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Bano J, Pascual A y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27(9): 503-10.
- Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*CTX-M genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 14-23.
- Gaitán S, Espinal P. y Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana, Región Caribe. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26 (3): 239-46.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. β -lactamasas of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3045-9.
- Lin C F, Hsu S K, Chen C H, Huang J R, Lo H H. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. *J Med Microbiol* 2010; 59: 665-71.
- Lee S G, Jeong S H, Lee H, Kim C K, Lee Y, Koh E, et al. Spread of CTX-M-type extended-spectrum betalactamasas among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a Korean hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 76-80.
- Livermore D, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini G, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 165-74.
- Minarini L A, Climaco E C, Guimaraes D B, Ferreira J C, Palazzo I C, Martínez R, et al. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 2008; 56 (6): 587-91.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color. 6ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2007. Págs. 44-335.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 19th Informational Supplement. CLSI M100-S19.2010. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Pitout J, Reisbig M, Venter E, Church D, Hanson M. Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC β -lactamasas. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (8): 3933-5.
- Coque T M, Oliver A, Pérez-Díaz J C, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamasas are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 500-10.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski 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: 3724-32.

- 15.- Snelling A, Gerner P, Hawkey P, Heritage J, Parnel P, Poster C. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (5): 1193-202.
- 16.- Versalovic J, Koeuth T, Lupsky J. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6823-31.
- 17.- Salazar E Z, Nieves B, Araque M, Velazco E, Ruiz J, Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 27: 397-403.
- 18.- 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.
- 19.- Calderas Z, Nieves B, Araque M, Torres A, Mosqueda, N. *Klebsiella pneumoniae* productora de β LEE como agente etiológico de septicemia en una unidad de cuidados intensivos. Resumen de las XXVI Jornadas Venezolanas de Microbiología Dr. José Esparza "Infecciones Emergentes". Valencia, noviembre 1999; p. 33.
- 20.- Christian N, Roye-Green K, Smikle M. Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000-2004. *BMC Microbiol* 2010; 10: 27.
- 21.- de Oliveira García D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch J M, Vaz T M, Leite D, et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 54(5): 1790-3.
- 22.- García A, García E, Hernández A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, Gómez J. Bacteriemias por *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter* 2011; 24 (2): 57-66.
- 23.- Cirz R, Romesberg F. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (1): 220-5.
- 24.- López Vargas J, Echeverri Toro Lina. K. *pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *IATREIA* 2010; 23 (2): 25-30.
- 25.- 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.
- 26.- Casellas J, Nannini E, Radice M, Cocconi E, Lejona S, Noemí Borda N, et al. Estudio de un brote debido a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en un centro asistencial de Rosario-Argentina. *Rev Panam Infectol* 2005; 7 (4): 21-7.
- 27.- Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, et al. Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 84-8.
- 28.- 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.