

# Evaluación del equipo automatizado Phoenix para la detección de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Reynerio Fagundo-Sierra,\* María Antonieta Cerros-Santos,\* José Pérez-Jáuregui,\* Eduardo Stalin García-López,\* Minerva Mata-Rocha,\* Verónica Andrade-Almaraz\*\*

## RESUMEN

El instrumento Phoenix® (BD Diagnostics, Sparks, MD) realiza en el mismo panel el antibiograma y la confirmación de las enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), proporcionando este resultado de forma rápida al médico y al paciente para evitar fracasos terapéuticos. El propósito de este estudio fue evaluar su sensibilidad para la detección de BLEE en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Se estudiaron 606 cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* obtenidas de forma consecutiva, a partir de muestras clínicamente significativas de orina en el Laboratorio de Microbiología de Carpermor, en las que se confirmó la expresión de BLEE mediante el equipo Phoenix. Se utilizó como método de referencia la prueba confirmatoria de difusión en agar indicada por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) y la detección, por reacción en cadena de la polimerasa, de los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>*. La detección por el laboratorio de BLEE evitó 257 resultados falsos susceptibles que pudieran representar fracasos terapéuticos. En las cepas estudiadas se observó buena susceptibilidad solamente al imipenem, amikacina y nitrofurantoina. De las cepas confirmadas por Phoenix, 589 (97%) fueron positivas en la prueba de difusión en agar, en 13 de las 17 cepas negativas se detectaron enzimas TEM o SHV. En 4 cepas (1%) no se detectó ninguna BLEE por ambos métodos. En un total de 602 (99%) cepas fue posible demostrar la presencia de BLEE. Estos resultados indican que el instrumento Phoenix tiene una sensibilidad del 99% para la detección de BLEE en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

## ABSTRACT

The BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostics, Sparks, MD) allows for antimicrobial sensitivity testing and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) confirmation in a single test panel for faster results in aiding physicians in treating patients with a lesser number therapeutic failures. The aim of this study was to assess the accuracy of the Phoenix system for the detection of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Six hundred and six ESBL clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* obtained from urine samples at the Carpermor Microbiology Laboratory detected by the Phoenix system for ESBL where studied. Agar disk diffusion phenotypic confirmatory tests performed following the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines, and molecular detection done using the polymerase chain reaction (PCR) for the *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* genes were used like reference methods. Laboratory detection of ESBL avoided 257 false susceptible results that could represent therapeutic failures in the end. The strains studied showed good susceptible only to imipenem, amikacin and nitrofurantoin. Of the strains confirmed using Phoenix, 589 (97%) were positive in the agar diffusion test. In 13 of the 17 negative strains, TEM or SHV enzymes were detected. In 4 strains (1%), no ESBL were detected using either method. These results indicate that Phoenix is 99% sensitive for ESBL detection in *E. coli* and *K. pneumoniae* clinical isolates.

\* Carpermor, Laboratorio de Referencia Internacional.

\*\* Hospital del Niño Morelense.

## Correspondencia:

Dr. Reynerio Fagundo Sierra

Monte Pelvoux 111, 9º piso, Lomas de Chapultepec

Del. Miguel Hidalgo, 11000 México, D.F. E-mail: reynerio\_fagundo@bd.com

Recibido: 24-03-2008

Aceptado: 08-09-2008

**Palabras clave:**  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, Phoenix, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

**Key words:** Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases, Phoenix, *E. coli*, *K. pneumoniae*

## INTRODUCCIÓN

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen una amplia familia, cuyo nombre deriva del hecho de poseer un anillo  $\beta$ -lactámico. Algunas cepas producen enzimas capaces de hidrolizarlos, en particular a las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación, estas enzimas son denominadas  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE).<sup>1</sup>

Las BLEE confieren resistencia a las penicilinas, a las cefalosporinas (de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación) y a los monobactámicos, pero no a los carbapenemos ni a las cefamicinas. La mayor parte de las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos capaces de conjugarse, permitiendo la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre distintos géneros bacterianos.<sup>1</sup>

La aparición inicial de las BLEE ocurrió en Europa oriental, probablemente debido a que las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación fueron inicialmente introducidas para la utilización clínica en esta zona geográfica, pero en poco tiempo, su uso se extendió y conllevó a la emergencia de las BLEE en todo el mundo. Actualmente se cuenta con más de 200 de estas enzimas, con diversidad en su estructura y actividad, los tipos más prevalentes son miembros de las familias TEM y SHV.<sup>2</sup>

La prevalencia de BLEE en Europa es del 5% para *Escherichia coli* y del 22% para *Klebsiella pneumoniae*, en América del Norte del 7% y 12% respectivamente.<sup>3</sup> En Latinoamérica la resistencia mediada por BLEE es mayor debido al uso menos prudente de los antibióticos, en particular las cefalosporinas. Existen reportes que indican que en esta región el 50% de las infecciones hospitalarias, y el 70% de las extrahospitalarias son tratadas con este tipo de antimicrobianos.<sup>2</sup> Esto sugiere una fuerte presión selectiva en esta zona de América donde la prevalencia presenta variaciones marcadas de un país a otro; para *E. coli* se reporta desde 5% en Argentina, hasta 63% en Perú, y para *K. pneumoniae* se reportan rangos entre 26% en Ecuador y 73% en Chile. La prevalencia en México es alta (del 28% en *E. coli* y del 56% en *K. pneumoniae*).<sup>3</sup>

La detección oportuna de una cepa productora de BLEE facilita la selección del tratamiento antimicrobiano, evitando la morbilidad y mortalidad asociadas

a fracaso terapéutico, disminuyendo la estadía hospitalaria de los pacientes, así como los costos de hospitalización y/o tratamiento (la mortalidad asociada a infecciones causada por microorganismos productores de BLEE se considera entre el 6% y el 70%).<sup>2</sup> Por otra parte, el impacto económico de la no detección de este tipo de resistencia es alto, se describe un incremento de 9,620 dólares por cada paciente, sobre los costos de hospitalización, atribuidos a infección por cepas BLEE.<sup>4</sup>

En México existen algunos reportes que documentan este tipo de problema con altos índices de morbi-mortalidad. Entre éstos destacan el brote producido por *K. pneumoniae* (SHV-5) en un hospital de Cuernavaca, Morelos, que incluyó 21 niños menores de 2 meses, 13 de los cuales fallecieron (62%).<sup>5</sup> Así también, Andrade y cols.<sup>6</sup> reportaron un brote ocurrido en un hospital de la ciudad de México donde se obtuvieron cepas BLEE (SHV-5), procedentes de 8 pacientes, de los cuales 4 fallecieron (50%). Miranda y cols.<sup>7</sup> documentaron la diseminación de cepas de *K. pneumoniae* (SHV-5) en un hospital pediátrico de la ciudad de México, y en un hospital de Durango ocurrió un brote con 82 aislamientos clínicos en los Servicios de Pediatría y en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales donde se identificaron cepas BLEE (SHV-5 y TLA-1).<sup>8</sup>

Diversos estudios realizados en el Instituto Nacional de Salud Pública indican una alta prevalencia de las enzimas SHV-2, SHV-5 y TLA-1 en diversos hospitales del país. Las dos primeras corresponden a variantes de la familia SHV. La tercera enzima presenta mayor actividad contra la cefotaxima y se ha reportado únicamente en nuestro país, fue denominada TLA-1 en honor a la cultura prehispánica de Morelos.<sup>8,9</sup>

Debido al incremento de la frecuencia de aislamientos clínicos de enterobacterias, especialmente *E. coli*, productoras de BLEE, tanto en el ambiente hospitalario, como en pacientes ambulatorios, los laboratorios de microbiología clínica deben ser capaces de detectar este marcador de resistencia.

Las pruebas para la detección de BLEE se agrupan en las de tamizaje inicial y las de confirmación. Para el tamizaje inicial se debe realizar un riguroso análisis del perfil de resistencia a las cefalosporinas y a aztreonam, de cada enterobacteria aislada, para de-

tectar fenotipos compatibles con la presencia de BLEE, de acuerdo a las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI).<sup>10</sup> Jalier y cols.<sup>11</sup> describieron un método fenotípico de doble difusión consistente en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE: sin embargo, este método tiene limitaciones dependiendo fundamentalmente de la disposición de los discos y la interpretación de la sinergia.

Para la confirmación de BLEE se puede utilizar la prueba de Etest-ESBL® (AB Biodisk, Solna, Sweden), pero en ocasiones es difícil de interpretar por la baja producción de enzimas, la zona fantasma, la deformación de las elipses de inhibición y porque el clavulánato difunde en el agar interfiriendo con la mitad de la tira que contiene ceftazidima sola. CLSI recomienda las pruebas de difusión en agar o de microdilución (con ceftazidima y cefotaxima solas y en presencia de ácido clavulánico) pero éstas no detectan a todas las cepas que expresan enzimas BLEE.<sup>12,13</sup> Los equipos automatizados Vitek2® (bioMérieux), MicroScan WalkAway® (Siemens) y Sensititre® (Trek Diagnostics Systems), son capaces de detectar BLEE, considerándolos reportes presuntivos y cuentan con paneles adicionales para su confirmación, que incrementan el costo y el tiempo empleado en esta determinación.

Ya sea empleando métodos manuales o con los equipos Vitek2®, MicroScan® o Sensititre® la confirmación de un aislamiento clínico como productor de enzimas BLEE demora hasta un día más de proceso, lo cual trae como consecuencia que si el laboratorio reporta al médico un resultado como posible BLEE y posteriormente, luego de realizar la prueba confirmatoria, el resultado es negativo, se estaría promoviendo un uso innecesario de carbapenemos, alternativamente, si el aislamiento se confirma como BLEE, la terapéutica apropiada pudo haber sido demorada por un día.

En el año 2006 se introdujo en México el instrumento Phoenix® (BD), cuya evaluación realizada en Carpermor por Fagundo y cols.<sup>15</sup> indicó que es confiable para la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico, por lo que se procedió a su uso en la rutina del laboratorio. Este instrumento tiene la ventaja de realizar, en el mismo panel del antibiograma, la detección de las BLEE y las pruebas necesarias para su confirmación, permitiendo proporcionar este resultado oportunamente.

El propósito de este estudio fue evaluar la sensibilidad del instrumento Phoenix para la detección (confirmación) de BLEE en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

## METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio descriptivo y prospectivo con un muestreo de casos consecutivos.

### Cepas

Se estudiaron 606 cepas (592 *E. coli* y 14 *K. pneumoniae*), confirmadas como portadoras de enzimas BLEE, de un total de 4,728 obtenidas en un periodo comprendido de diciembre de 2006 a agosto de 2007. Las cepas incluidas en el estudio fueron aisladas de forma consecutiva en el laboratorio de Microbiología de Carpermor, a partir de muestras clínicamente significativas de orina (cultivos positivos con más de 100,000 UFC/mL de orina), procedentes de pacientes ambulatorios que acudieron a diversos laboratorios de México, fundamentalmente del Distrito Federal y Estado de México, con la indicación específica de realizarse un urocultivo.

La identificación de las cepas se realizó a partir de cultivos puros en placas de CHROMagar Orientador® (BD) con 18 a 24 horas de incubación a 37°C, las colonias cuya pigmentación fue compatible con *E. coli* y *K. pneumoniae* se confirmaron mediante pruebas bioquímicas adicionales, de acuerdo a procedimientos estándares de laboratorio.<sup>15</sup>

### Técnicas

En el instrumento Phoenix® (BD, Diagnostics Sparks, MD) se realizó el antibiograma y se confirmó la expresión de las enzimas BLEE. Todas las cepas estudiadas fueron reportadas con la regla 1505 "El aislado se confirma como positivo para beta lactamasas de amplio espectro". Se excluyeron del estudio aquellas cepas resistentes a diversos antibióticos en cuyo reporte no se aplicó esta regla.

Se utilizó el panel NMIC-101 (que por sus siglas en inglés se refiere al panel para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de gramnegativos). Se preparó una suspensión bacteriana en el caldo Phoenix ID broth SP1 ajustándola al 0.5 - 0.6 del estándar de McFarland, utilizando el nefelómetro Phoenix Spec® (BD), posteriormente se adicionaron 25 µL de la misma al caldo Phoenix AST broth SP, suplementándolo con una gota del indicador AST Phoenix (indica-

dor de óxido reducción basado en azul de Alamar). Los paneles inoculados fueron colocados en el instrumento para su incubación y lectura hasta la obtención de los resultados. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo indicado en el manual del usuario.<sup>16</sup>

Los antibióticos evaluados (y sus intervalos de concentración en  $\mu\text{g/mL}$ ) fueron: ampicilina (4-16), amoxicilina/clavulanato (4/2-16/8), ticarcilina (4-64), ticarcilina/clavulanato (2/2-64/2), cefalotina (2-16), cefuroxima sódica (4-16), cefotaxima (2-32), ceftazidima (0.5-16), ceftriaxona (2-32), aztreonam (1-16), cefoxitina (4-16), imipenem (1-8), amikacina (8-32), gentamicina (2-8), tobramicina (2-8), ciprofloxacina (0.5-2), levofloxacina (1-4), ácido nalidíxico (8-32), nitrofurantoína (16-64) y trimetoprim/sulfametoxyzol (0.5/9.5-2/38).

Para la prueba de confirmación de BLEE el panel NMIC-101 utiliza ceftazidima, ceftazidima/clavulanato, ceftriaxona/clavulanato, cefotaxima/clavulanato, cefpodoxima y cefepime, a concentraciones establecidas por el fabricante.<sup>16</sup>

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria, tanto de los antibióticos utilizados para realizar el antibiograma, como los empleados para la confirmación de las BLEE, fueron interpretados por el sistema de experto de Phoenix (BDXpert<sup>®</sup>), consistente en una serie de reglas que analizan los patrones de susceptibilidad para cada uno de los microorganismos identificados, aplica las reglas indicadas por CLSI<sup>10</sup> y con base a ellas, realiza cambios en el reporte final de los aislamientos. El software empleado fue la versión 1.06.

## Confirmación fenotípica de BLEE

Se utilizó la prueba fenotípica confirmatoria de BLEE mediante difusión en agar indicada por CLSI.<sup>10</sup> Se emplearon discos de ceftazidima (30  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ), ceftazidima/clavulanato (30/10  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ), cefotaxima (30  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ) y cefotaxima/clavulanato (30/10  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ) (BD), en agar de Mueller-Hinton (BD). La metodología empleada para la prueba fue la indicada por CLSI.<sup>17</sup> Se consideraron positivos los resultados con un incremento del diámetro del halo de inhibición mayor o igual a 5 mm en alguno de los discos con el ácido clavulánico, con respecto al halo de inhibición del antibiótico solo.<sup>10</sup>

## Confirmación molecular de BLEE

A las cepas confirmadas por Phoenix como BLEE, con resultado negativo a la prueba de difusión en agar, se les realizó la prueba de reacción en cadena de la polime-

rasa (PCR) empleando iniciadores genéricos de los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* que amplifican todas las enzimas BLEE tipo TEM y SHV, que son los tipos más frecuentemente encontrados en aislamientos clínicos de Latinoamérica.<sup>1,18,19</sup> La extracción de los plásmidos de las bacterias se realizó con el reactivo *Plasmid Purification Handbook* (QIAGEN, Hilden, Alemania), empleando el medio de Luria Broth (BD) a la concentración de  $3 \times 10^9$  células/mL, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las secuencias de los iniciadores se seleccionaron de acuerdo a lo indicado por Chmelnitsky y cols.;<sup>20</sup> las empleadas para la detección de los genes *bla<sub>TEM</sub>* fueron: F: 5'-ACAATAACCCCTGRTAAATGC-3' y R: 5'-AGTATATGAGTAAACTTGG-3' y para la detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>* fueron: F: 5'-TTTATCGGCCYTCACTCAAGG-3' y R: 5'-GCTGCGGGCCGGATAACG-3', (INVTROGEN, California, EU).

Las condiciones de la PCR fueron como sigue: desnaturización durante 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 57°C, y 3 minutos a 72°C y un periodo de extensión final de 10 minutos a 72°C. La prueba de PCR fue realizada empleando la ADN polimerasa Hot-Star/iTag (QIAGEN, Hilden, Alemania), utilizando los iniciadores a la concentración de 500 nmoles. Se utilizó un marcador de ADN de 123 pares de bases para establecer el tamaño del producto de la ampliación, que correspondió a 936 pares de bases (pb) para *bla<sub>TEM</sub>* y a 930 pb para *bla<sub>SHV</sub>*, de acuerdo a los estudios de secuenciación realizados a estos genes por Schlesinger y cols.<sup>21</sup> Los resultados obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

## Control de calidad

Se emplearon las cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922) y *K. pneumoniae* (ATCC 700603). En la prueba de difusión en agar la cepa de *E. coli* no debe mostrar un incremento del diámetro del halo de inhibición en cualquiera de los dos antibióticos combinados con ácido clavulánico, en comparación con el del antibiótico solo, y por su parte la cepa de *K. pneumoniae* debe mostrar un incremento de  $\geq 5$  mm en ceftazidima/clavulanato y  $\geq 3$  mm en cefotaxima/clavulanato en comparación con el diámetro del halo de inhibición de estos antibióticos solos.<sup>10</sup> Sus resultados fueron consistentemente satisfactorios.

## Análisis estadístico

La descripción de las variables de estudio se presenta en frecuencias y proporciones. La sensibilidad de la

prueba se determinó por el porcentaje de cepas BLEE positivas detectadas correctamente. Los cálculos fueron realizados en Microsoft® Office Excel 2003.

## RESULTADOS

En el periodo de estudio se aislaron un total de 4,728 cepas de *E. coli* (4512) y *K. pneumoniae* (216), a partir de cultivos de orina clínicamente significativos, de ellas, el equipo Phoenix detectó 606 como BLEE (*E. coli* 592 y *K. pneumoniae* 14), lo que indica una prevalencia del 13% y 6%, respectivamente en esta población. De las 606 cepas confirmadas por Phoenix; 589 (97%) fueron positivas en la prueba de difusión en agar (*E. coli*; 579 y *K. pneumoniae*; 9). En 13 de las 17 negativas, se detectaron enzimas TEM y/o SHV, para un total de 602 (99%) cepas en que fue posible demostrar la presencia de BLEE. En 4 cepas (1%) no se detectó ninguna BLEE por ambos métodos. Estos resultados indican que el instrumento Phoenix tiene una sensibilidad del 99% para la detección de BLEE en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Figura 1).

En las penicilinas y cefalosporinas hidrolizables por las BLEE (ampicilina, ticarcilina, cefalotina, cefuroxima sódica, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam) se obtuvieron 257 resultados de susceptible y 150 de intermedio, en todos ellos el equipo Phoenix aplicó la regla 1529 cambiando su interpretación a resistente (*Cuadro I*).

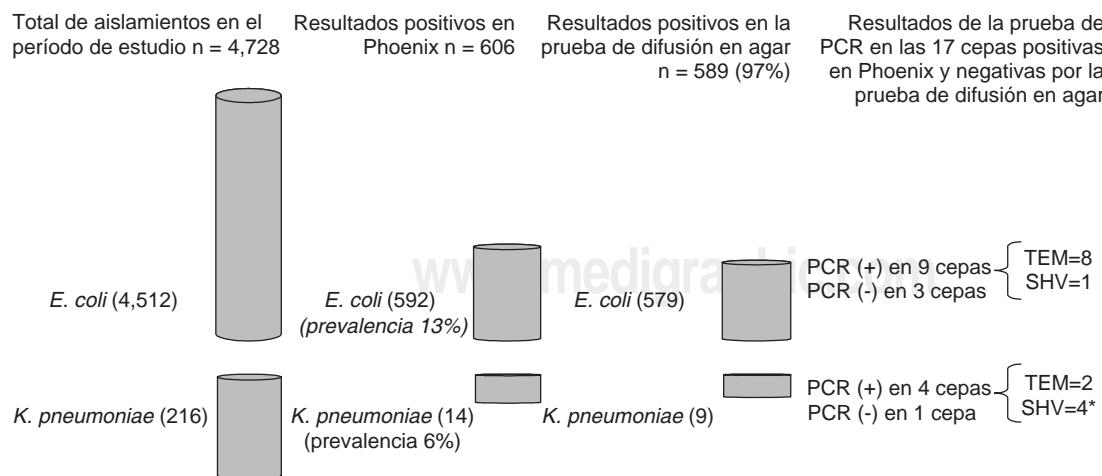
Para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos unidos a inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (amoxicilina con clavulanato y ticarcilina con clavulanato) se obtuvo una sus-

ceptibilidad del 11 y 6%, respectivamente. La susceptibilidad a la cefoxitina fue del 52%. El 100% de los aislamientos mostró susceptibilidad al imipenem. El comportamiento con los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos fue variable; se obtuvo buena susceptibilidad para amikacina (96%) y nitrofurantoína (81%), pero no así para los demás antibióticos: trimetoprim/sulfame-toxazol (43%), ácido nalidíxico (2%), fluoroquinolonas (6%) y el resto de los aminoglucósidos evaluados (gentamicina 44% y tobramicina 14%) (Figura 2).

## DISCUSIÓN

Hasta hace algunos años, muchas infecciones causadas por cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadoras de enzimas BLEE, habían sido asociadas a pacientes hospitalizados, sin embargo, en la actualidad se consideran también un problema emergente como causa de infecciones en pacientes ambulatorios.<sup>22,23</sup> La prevalencia de BLEE observada en la población estudiada fue del 13% y del 6% para *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente, similar a lo reportado por Andrade y cols.<sup>24</sup> para pacientes ambulatorios en México. Es de destacar que *K. pneumoniae* era considerada la más frecuentemente asociada con la producción de BLEE en las décadas anteriores, pero, actualmente está siendo desplazada por *E. coli*, sobre todo fuera del ámbito hospitalario, particularmente como causa de infección urinaria.

La alta incidencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE es un problema de salud debido a las limitadas opciones terapéuticas con las que se cuenta; porque no sólo son resistentes a la mayoría de los  $\beta$ -lactámi-



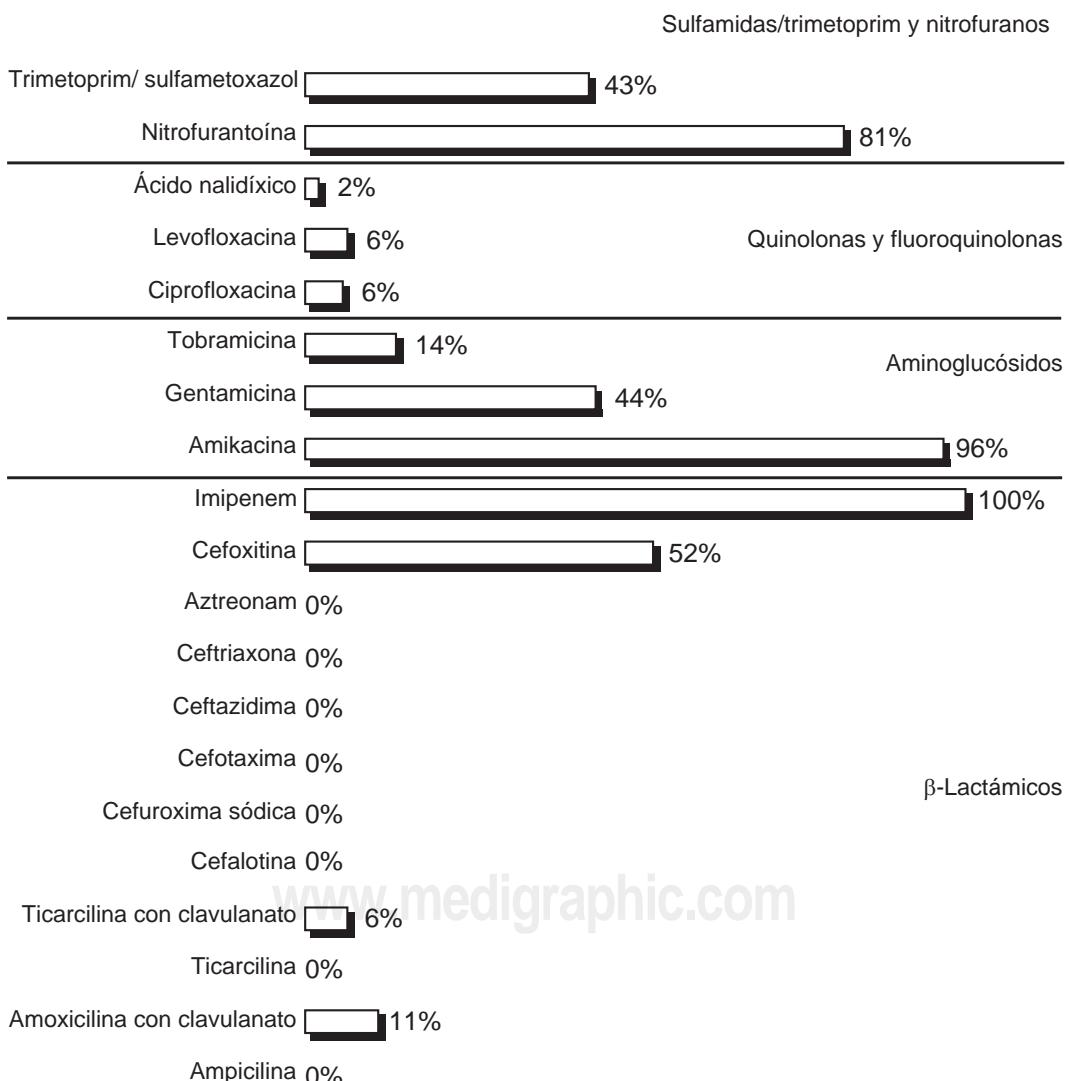
\*Dos cepas de *K. pneumoniae* eran portadoras de ambas enzimas

**Figura 1.** Diagrama de la marcha de trabajo y sus resultados.

**Cuadro I.** Resultados del antibiograma para  $\beta$ -lactámicos.

Antibiótico	Antes de la aplicación de la regla 1529*			Después de la aplicación de la regla 1529*		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	0	0	606 (100%)	0	0	606 (100%)
Ticarcilina	3 (< 1%)	0	603 (100%)	0	0	606 (100%)
Cefalotina	0	0	606 (100%)	0	0	606 (100%)
Cefuroxima sódica	7 (1%)	13 (2%)	586 (97%)	0	0	606 (100%)
Cefotaxima	32 (5%)	7 (1%)	567 (94%)	0	0	606 (100%)
Ceftazidima	122 (20%)	94 (16%)	390 (64%)	0	0	606 (100%)
Ceftriaxona	33 (5%)	19 (3%)	554 (91%)	0	0	606 (100%)
Aztreonam	60 (10%)	17 (3%)	529 (87%)	0	0	606 (100%)
Total	257 (5%)	150 (3%)	4,441 (92%)	0	0	4,848 (100%)

\* La regla 1529 de Phoenix convierte los resultados de susceptible (S) o intermedio (I) en resistente (R).

**Figura 2.** Susceptibilidad (%) obtenida en las cepas BLEE estudiadas.

cos sino que además, generalmente son resistentes a otros agentes antimicrobianos como aminoglucósidos, trimetoprim/sulfametoazol, fluoroquinolonas, tetraciclinas y cloramfenicol.

En este estudio se pudo apreciar una asociación significativa entre la producción de BLEE y la resistencia a las fluoroquinolonas, lo cual es frecuente, especialmente en cepas de *E. coli* causantes de infección urinaria de la comunidad.<sup>22</sup> Rodríguez y cols.<sup>25</sup> identificaron que el tratamiento previo con fluoroquinolonas en pacientes ambulatorios con infección urinaria, es uno de los factores de riesgo asociados a la adquisición de uropatógenos productores de BLEE. Puesto que la resistencia a las fluoroquinolonas depende casi exclusivamente de mutaciones en genes cromosómicos, esta asociación no se debe a la transferencia conjunta de plásmidos sino, probablemente, a la selección de cepas con ambos mecanismos de resistencia por el frecuente uso de  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas en el mismo contexto terapéutico, como es el caso de las infecciones urinarias.<sup>2</sup>

En los aminoglucósidos el comportamiento observado en las cepas BLEE estudiadas fue variable debido a que se observó gran susceptibilidad a la amikacina (98%) pero no a la gentamicina y tobramicina; si con base en estos resultados consideramos que la amikacina puede ser una buena elección terapéutica en infecciones provocadas por microorganismos productores de BLEE, hay que tener en cuenta que es ototóxica y neurotóxica.<sup>26</sup> Por otra parte, se observó un porcentaje elevado de susceptibilidad a la nitrofurantoína (88%), similar a lo reportado por Karlovsky y cols.<sup>27</sup> en las cepas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias de la comunidad en Estados Unidos y Canadá (4%), aunque en la actualidad su utilización ha ido disminuyendo continuamente, puede ser necesario recurrir a los antiguos antiinfecciosos, como la nitrofurantoína, por lo que se sugiere como una buena alternativa, particularmente en las infecciones urinarias, donde son limitadas las opciones terapéuticas orales disponibles.

Si bien las cepas BLEE son resistentes a las penicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas) y al aztreonam, en las pruebas de susceptibilidad realizadas en los laboratorios se obtienen con frecuencia resultados de susceptible o intermedio a estos antibióticos. Se ha reportado que hasta el 40% de las cepas BLEE revelan un patrón de susceptibilidad al menos a uno de ellos, la razón de esta aparente susceptibilidad radica en el diverso grado de hidrólisis de los antibióticos por las  $\beta$ -lactamasas, así como de su penetración a través de la pared bacteriana.<sup>18</sup> De

ahí la importancia de su detección en los aislamientos clínicos. En 257 resultados de susceptibles el instrumento Phoenix aplicó la regla 1529 cambiando su interpretación a resistente, esta regla también cambia la interpretación de intermedio a resistente (aplicada en 150 resultados), quedando como resistente en el reporte final para evitar fracasos terapéuticos.

Las cefamicinas y carbapenemos son estables a las enzimas BLEE y en este estudio se observó que, *in vitro*, la cefoxitina y el imipenem mostraron ser consistentemente efectivos contra los organismos evaluados. Si bien la experiencia clínica con las cefamicinas reportada en la literatura es menor, no son muy recomendables en este tipo de infecciones debido a que con frecuencia en estas cepas ocurre una pérdida de expresión de porinas, que condiciona una disminución en su permeabilidad, generando resistencia a estos antibióticos.<sup>2</sup> Por su parte, los carbapenemos han sido los antibióticos de mayor actividad evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana y generalmente se reservan para el tratamiento de infecciones graves por cepas BLEE, pero cada día se reportan más aislamientos clínicos resistentes a estos antibióticos y de acuerdo al reporte de SENTRY, las tasas de resistencia tienden a ser muy elevadas en Latinoamérica, limitando las opciones terapéuticas disponibles. El uso de los carbapenemos en la práctica clínica debe ser especialmente juicioso, primero porque constituye casi la única terapia eficaz frente a las BLEE y segundo porque su uso indiscriminado puede inducir la aparición de cepas de *Enterobacteriaceae* y bacilos gramnegativos no fermentadores (*Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia* y *Pseudomonas spp.*) multirresistentes, por tal motivo la no confirmación de los aislamientos BLEE puede inducir a un uso inapropiado de los mismos, generando resistencia.<sup>28-30</sup>

Con relación a los  $\beta$ -lactámicos unidos a inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, aunque son estables a la acción de las BLEE y pudieran ser considerados como buenas opciones terapéuticas, sobre todo la amoxicilina/clavulanato, cuya presentación oral la convierten en un buen candidato para el tratamiento de la infección urinaria aguda, no se recomiendan como terapia empírica inicial, su uso clínico debe establecerse con base en los resultados del antibiograma y en este estudio se observó alta resistencia a estos antibióticos.

La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas,<sup>31</sup> recomienda al trimetoprim/sulfametoazol para el tratamiento empírico de la cistitis aguda en mujeres y además como tratamiento alternativo en la piehonefritis aguda, sin embargo, en las cepas BLEE es-

tudiadas, este antimicrobiano mostró una susceptibilidad del 43%, por lo que cabe esperar que en la próxima revisión de estas guías, en el 2009, las recomendaciones para el tratamiento con este antimicrobiano sean diferentes; por otra parte la prevalencia de BLEE es mayor en México que en EUA por lo que es esperable también una mayor resistencia en nuestra población.

Idealmente, un equipo automatizado que realiza pruebas para la confirmación de BLEE debe ser preciso para discriminar a estas enzimas de otras  $\beta$ -lactamasas así como de proporcionar interpretaciones y recomendaciones de forma oportuna al médico y al paciente, sin necesidad de acciones adicionales por el personal del laboratorio. En nuestro país no se han reportado con anterioridad evaluaciones de estos instrumentos para la detección de BLEE. Por su parte Phoenix incorpora diversos antibióticos solos y en combinación con ácido clavulánico, que le permiten realizar la confirmación de las BLEE con alta precisión, de acuerdo a estudios realizados en diversos sitios empleando cepas clínicas y de colección.<sup>16</sup>

Sanguinetti y cols.<sup>32</sup> evaluaron la capacidad de Phoenix para la detección de BLEE en cepas de enterobacterias sospechosas de portar estas enzimas, realizando una clasificación inicial de las mismas, mediante la prueba de difusión en agar, en dos categorías; BLEE positivas (319 cepas) y BLEE negativas (189), el equipo identificó 321 aislamientos como BLEE (los 319 clasificados como positivos y dos cepas de *K. oxytoca* indicadas como negativas), la prueba de PCR reveló que estos dos aislamientos contenían BLEE (OXY-2), reportando alta sensibilidad y especificidad para este instrumento (100% y 98.9%, respectivamente). La sensibilidad reportada por estos autores fue similar a la observada en este estudio (99%), no se realizó una evaluación de la especificidad del instrumento debido a que el protocolo que se sigue en este laboratorio no incluye un tamizaje inicial de los aislamientos clínicos, precisamente porque Phoenix realiza en una misma etapa ambas determinaciones, lo que permite proporcionar resultados oportunos, de ahí la necesidad de asegurar su sensibilidad.

Wiegand y cols.<sup>33</sup> compararon diversas pruebas para la detección de BLEE: la prueba de doble difusión, el Etest, la prueba confirmatoria de difusión en agar recomendada por CLSI y los equipos Phoenix, Vitek2 y MicroScan WalkAway (con los paneles de rutina, no se utilizaron los paneles confirmatorios para BLEE de estos dos últimos), empleando 144 aislamientos clínicos de *Enterobacteriaceae* identificadas como posibles BLEE y utilizando la caracterización

molecular de las  $\beta$ -lactamasas como método de referencia, reportando que el equipo que mostró mayor sensibilidad fue Phoenix (del 98.8% para el total de cepas y del 100% en las de *E. coli* y *K. pneumoniae*), su sensibilidad también fue mayor que la obtenida por las pruebas manuales. De forma similar, en este estudio se observó mayor sensibilidad de Phoenix que la prueba fenotípica confirmatoria indicada por CLSI, debido a que en 13 de las 17 cepas positivas con Phoenix y negativas por esta prueba, se detectó la presencia de genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* mediante la prueba de PCR.

Thomson y cols.<sup>34</sup> evaluaron el equipo Phoenix empleando 76 cepas BLEE caracterizadas molecularmente, de ellas 73 fueron confirmadas por Phoenix, indicando una sensibilidad del 96%, estos autores emplearon 26 cepas portadoras de otros mecanismos de resistencia, en ellas el equipo Phoenix indicó correctamente como negativas 21, las 5 falsas positivas fueron por la presencia de  $\beta$ -lactamasas cromosomales, con fenotipos de resistencia similares a BLEE, que deben reportarse resistentes a los  $\beta$ -lactámicos para evitar fracasos terapéuticos (regla 1503 de BDxpert).

En este estudio se observaron 4 cepas positivas con Phoenix y negativas a la prueba confirmatoria de difusión en agar, con resultados negativos a la prueba de PCR, estos resultados pudieran corresponder a la presencia de otras  $\beta$ -lactamasas no exploradas en este estudio, como CTX-M que ha sido reportada en Latinoamérica, o TLA-1 que ha sido reportada únicamente en México o a la presencia de BLEE no descritas todavía.<sup>2,8,9,18</sup>

Debido a la frecuencia con que se están seleccionando en nuestra población cepas multirresistentes, es necesario que los laboratorios de microbiología clínica dispongan de metodologías confiables y oportunas que les permitan identificar aislamientos que porten este marcador de resistencia para realizar los ajustes necesarios al reporte, con la finalidad de apoyar al personal de salud en tomar acciones que repercutan favorablemente en la calidad de atención del paciente. En este estudio se demuestra que el instrumento Phoenix tiene un 99% de sensibilidad para la detección de BLEE en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

## REFERENCIAS

1. Jacoby G, Munoz S. The new  $\beta$ -lactamases. *N Engl J Med.* 2005; 352: 386-91.
2. Mattar S, Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiológico. *Infectio.* 2007; 11: 23-35.

3. Mendes C, Rossi A, Prado V, Zurita J, Robledo J, Guzman M, et al. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The Resistant Group summaries of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) 37 Annual Meeting Philadelphia, PA; 1999. p. 57.
4. Schwaber M, Navon S, Kaye K, Ben R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 1257-62.
5. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velázquez M, et al. Outbreak of infection with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3193-6.
6. Andrade V, Silva J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Pública Mex*. 2004; 46: 524-8.
7. Miranda G, Castro N, Leaños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 30-5.
8. Silva-Sánchez J, Garza-Ramoz U, Sánchez A, Rojas T, Reyna F, Carrillo B.  $\beta$ -lactamasas en enterobacterias como principal mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. *Rev Latinoam Microbiol*. 2006; 48: 105-12.
9. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada M, Garza R, Lara L, et al. TLA-1, a new plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 997-1003.
10. Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement*. 2008; 28(1): M100-S18.
11. Jalier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*. 1988; 10: 67-78.
12. Jacoby G, Walsh K, Walter V. Identification of Extended-Spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 1971-.
13. Song W, Bae K, Lee YN, Lee CH, Lee S, Jeong S. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by using boronic acid as an AmpC  $\beta$ -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella spp.* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1180-4.
14. Fagundo SR, Cerros MA, Pérez-Jáuregui J. Evaluación del instrumento automatizado Phoenix en la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico. *Bioquímia*. 2007; 32: 39-48.
15. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. 1. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2004.
16. BD *Phoenix System User's Manual*<sup>®</sup>. Copyright Becton, Dickinson and Company, 2004-2005.
17. Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard-ninth edition*. 2006; 26: M2-A9.
18. Paterson D, Bonomo R. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18: 657-86.
19. Mroczkowska JE, Barlow M. Fitness trade-offs in blaTEM evolution. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 2340-5.
20. Chmelnitsky I, Carmeli Y, Leavitt A, Schwaber MJ, Navon-Venezia S. CTX-M-2 and new CTX-M-39 enzyme are the major Extended-Spectrum Beta-Lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4745-50.
21. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamases among enterobacter isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 1150-6.
22. Jonathan N. [Letter]. Screening for Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing pathogenic enterobacteria in district general hospitals. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 1488-90.
23. Doi Y, Adams J, O'Keefe A, Quereshi Z, Ewan L, Paterson DL. Community-acquired Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase producers, United States. *Emerging Inf Dis*. 2007; 13: 1121-3.
24. Andrade V, Bustamante A. Prevalencia de *Escherichia coli* productoras de BLEE en infecciones de vías urinarias en pacientes pediátricos de la comunidad. Memorias. XXXII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica; 2006. p. 32.
25. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Munain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 1089-94.
26. Brunton LL, Lazo JS, Parker KI. Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. New York: McGraw-Hill. 2006.
27. Karlowsky JA, Hoban DJ, DeCorby MR, Laing NM, Zhanell GG. Fluoroquinolone-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatients are frequently multidrug resistant: results from the North American urinary tract infection collaborative alliance-quinolone resistance study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2251-4.
28. Sinha M, Srinivasa H. Mechanisms of resistance to carbapenems in meropenem- resistant *Acinetobacter* isolates from clinical samples. *Indian J Med Microbiol*. 2007; 25: 121-5.
29. Suarez CJ, Kattan JN, Guzman AM, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su preventión y control. *Infectio* 2006; 10: 85-93
30. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. The sentry participants group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis*. 2004; 8: 25-79.
31. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 745-58.
32. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccarelli D, Romano L, Fiori B, et al. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum  $\beta$ -lactamases detection method. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1463-8.
33. Wiegand I, Geiss H, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1167-74.
34. Thomson K, Cornish N, Hong S, Hemrick K, Herdt C, Moland E. Comparison of Phoenix and Vitek 2 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase detection tests analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 2380-4.