



Universidad de Granada
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

**Betalactamasas de espectro
extendido en nuestro medio:
Aportaciones científicas.**

Antonio Sorlózano Puerto
Granada, 2004



D. GONZALO PIÉDROLA ANGULO,
CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICA:

**Que D. ANTONIO SORLÓZANO PUERTO,
Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo
de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre el tema
“Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio:
Aportaciones científicas.”, el cual ha finalizado con
aprovechamiento, para optar al Título de Doctor, siempre
que así lo considere el superior juicio del tribunal
nombrado al efecto.**

Fdo: D. GONZALO PIÉDROLA ANGULO



D. JOSÉ GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, PROFESOR
TITULAR DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICA:

**Que D. ANTONIO SORLÓZANO PUERTO,
Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo
de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre el tema
“Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio:
Aportaciones científicas.”, el cual ha finalizado con
aprovechamiento, para optar al Título de Doctor, siempre
que así lo considere el superior juicio del tribunal
nombrado al efecto.**

Fdo: D. JOSÉ GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ

A partir de esta tesis se han generado las siguientes publicaciones:

Artículos en revistas de difusión internacional:

Sorlózano A, Gutiérrez J, Fernández F, *et al.* 2004. *A preliminary study on the presence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in clinical isolates of Escherichia coli in Granada (Spain).* Ann. Microbiol. 54: 227-232.

Sorlózano A, Gutiérrez J, Palanca M, *et al.* 2004. *High incidence of extended-spectrum β -lactamases among outpatient clinical isolates of Escherichia coli: A phenotypic assessment of NCCLS guidelines and a commercial method.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (Aceptado para publicación)

Sorlózano A, Gutiérrez J, Piédrola G, *et al.* 2004. *A good performance of Vitek 2 system to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Escherichia coli: A comparative study of phenotypic commercial methods and NCCLS guidelines.* (Enviado a: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease)

Libros:

Sorlózano A, Gutiérrez J y Piédrola G. 2004. *Los antibióticos betalactámicos en el siglo XXI. Repercusiones clínicas de las resistencias emergentes.* Ed: Grupo Editorial Universitario. Granada.

Comunicaciones a congresos:

Palanca M, Sorlózano A, Carlos S, *et al.* 2003. *Alta incidencia de betalactamasas de espectro extendido en aislados clínicos de Escherichia coli de un hospital regional español.* XVI Congreso SAMPAC. Comunicación IIA/25. Sevilla.

Palanca M, Sorlózano A, Fernández F, *et al.* 2003. *Evaluación del sistema WIDER en la detección de betalactamasas de espectro extendido.* XVI Congreso SAMPAC. Comunicación IIA/30. Sevilla.

Antes de iniciar el desarrollo del presente trabajo, deseo expresar mi más sincera gratitud a todos aquellos que con su ayuda lo han hecho posible:

A mis directores, los profesores Gonzalo Piédrola Angulo y José Gutiérrez Fernández, por presentarme a las bacterias y descubrir y cultivar en mí un verdadero y creciente interés por estos organismos, así como por la colaboración e interés constante que han prestado a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral.

A la doctora María del Carmen Maroto Vela, jefa del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital "San Cecilio" de Granada, por el apoyo y estímulo a lo largo de estos años.

A los facultativos y compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital "San Cecilio", Juan Román, José Liébana, José Antonio Pérez, Marta Álvarez, Trinidad Escobar, Fernando García, Carmen Bernal y Federico García, por los momentos compartidos y por permitirme aprender de ellos.

A los amigos que me acompañaron en el recorrido de la Microbiología durante cuatro años: Rosa Guerrero, Sonia Suárez, Fernando Fernández, Rosa Daza, Francis Arjona, Natalia Chueca, Alejandro Peña, Mati Palanca y Silvia Carlos.

A los administrativos, auxiliares y técnicos de laboratorio, por los buenos momentos compartidos, cada día, durante estos años. No lo olvidaré.

A los laboratorios bioMeriéux, Francisco Soria Melguizo S.A., IZASA S.A. y Oxoid, por facilitar los medios técnicos y de laboratorio necesarios para realizar este estudio.

A los miembros del grupo de investigación CTS521, por el apoyo técnico y económico prestado.

A los doctores Rafael Cantón y María Teresa Coque, del servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, por sus conocimientos, y por proporcionar los aislados bacterianos necesarios para realizar los estudios moleculares de este trabajo.

Al doctor Jesús Oteo, del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, por su colaboración en los estudios de clonalidad.

Al doctor Juan de Dios Luna, por su inestimable ayuda en el campo de la Estadística.

A la "Fundación Hospital Clínico", por favorecer, en el ámbito del Hospital "San Cecilio", la realización de trabajos de investigación.

A mis amigos María, Puri, Noelia, Mari, Asun, Francis, José Luis y Javi.

A todos, gracias.

A mi familia.
A Merche.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	Págs.
1.1. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos	3
1.2. Clasificación de los antibióticos betalactámicos	6
1.3. Estructura química y actividad clínica de las penicilinas	7
1.3.1. Bencilpenicilina o penicilina G	7
1.3.2. Fenoximetilpenicilina o penicilina V	9
1.3.3. Cloxacilina	9
1.3.4. Aminopenicilinas	10
1.3.5. Piperacilina	11
1.4. Estructura química y actividad clínica de los inhibidores de betalactamasas	12
1.5. Estructura química y actividad clínica de las cefalosporinas	16
1.5.1. Cefalosporinas de primera generación	17
1.5.2. Cefalosporinas de segunda generación	18
1.5.3. Cefalosporinas de tercera generación	19
1.5.4. Cefalosporinas de cuarta generación	22
1.6. Estructura química y actividad clínica de los antibióticos monobactámicos	24
1.7. Estructura química y actividad clínica de los antibióticos carbapenémicos	26
1.8. Inactivación enzimática de los antibióticos betalactámicos por betalactamasas	29
1.8.1. Betalactamasas cromosómicas	33
1.8.2. Betalactamasas plasmídicas	36
1.9. Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs)	38
1.9.1. Introducción e historia	38

1.9.2. Tipos de BLEEs	40
1.9.2.1. Betalactamasas tipo TEM	40
1.9.2.2. Betalactamasas tipo SHV	43
1.9.2.3. Betalactamasas resistentes a inhibidores de betalactamasas (inhibitor-resistant betalactamasas o IRT)	45
1.9.2.4. Betalactamasas tipo CTX-M	47
1.9.2.5. Betalactamasas tipo OXA	49
1.9.2.6. Otras BLEEs	51
1.9.3. Epidemiología	63
1.9.4. Asociación de resistencias con otros antibióticos	76
1.9.5. Factores clínicos asociados a la presencia de BLEEs	80
1.9.6. Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEEs	81
1.9.7. Prevención y control	86
1.9.8. Métodos fenotípicos de detección de la presencia de BLEEs	90
1.9.8.1. Métodos de difusión con disco	92
1.9.8.2. Prueba de Epsilon (E-test)	95
1.9.8.3. Métodos automatizados	96
1.9.9. Métodos bioquímicos y moleculares para la caracterización de BLEEs	97
1.9.9.1. Isoelectroenfoco	98
1.9.9.2. Perfil de substrato	98
1.9.9.3. Cinética enzimática	99
1.9.9.4. Determinación de los IC₅₀	99
1.9.9.5. Sondas de DNA	99

1.9.9.6.	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
1.9.9.7.	Electroforesis en campo pulsado	100
2.	OBJETIVOS	103
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	107
3.1.	Selección de los aislados clínicos	109
3.2.	Detección fenotípica de la presencia de BLEEs	111
3.2.1.	Métodos de difusión con disco	113
3.2.2.	Prueba de Epsilon (E-test)	116
3.2.3.	Métodos automatizados	118
3.2.3.1.	Sistema VITEK 2	118
3.2.3.2.	Sistema WIDER	121
3.3.	Métodos bioquímicos y moleculares para la caracterización de BLEEs	124
3.3.1.	Isoelectroenfoque	124
3.3.1.1.	Sonicación	125
3.3.1.2.	Isoelectroenfoque	126
3.3.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	127
3.3.2.1.	Extracción del ADN bacteriano	129
3.3.2.2.	Amplificación del ADN bacteriano	129
3.3.2.3.	Electroforesis en gel de agarosa	130
3.3.3.	Electroforesis en gel por campo pulsado	131
3.3.3.1.	Preparación del ADN bacteriano	131
3.3.3.2.	Digestión con enzimas de restricción	133

3.3.3.3. Electroforesis en campo pulsado	133
3.4. Métodos estadísticos de análisis de los resultados	134
4. RESULTADOS	137
4.1. Descripción fenotípica y caracterización bioquímica y molecular de los aislados productores de BLEEs	140
4.2. Características demográficas de los aislados	164
4.3. Resultados obtenidos mediante el método de referencia (método A)	172
4.4. Resultados obtenidos mediante el método B	175
4.5. Resultados del estudio con cefepime y cefoxitina	178
4.6. Resultados obtenidos mediante la prueba de Epsilon	181
4.7. Resultados obtenidos mediante VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos estudiados	199
4.8. Resultados obtenidos mediante VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos estudiados	229
4.9. Resultados obtenidos mediante WIDER para los antibióticos betalactámicos estudiados	247
4.10. Evaluación de los diferentes métodos fenotípicos estudiados para la detección de BLEEs	275
4.11. Resultados del estudio de prevalencia	285
4.12. Resultados del estudio de clonalidad mediante electroforesis en campo pulsado	286
4.13. Resultados del análisis estadístico inferencial	287
4.13.1. Variables demográficas	287
4.13.2. Distribuciones de CMIs obtenidas mediante E-test en los aislados productores de BLEEs	288

4.13.3. Antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2	289
4.13.4. Antibióticos no betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2	295
4.13.5. Antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER	300
5. DISCUSIÓN	307
5.1. Métodos de difusión con disco	311
5.1.1. Método A	313
5.1.2. Método B	316
5.1.3. Difusión con disco con cefepime y ceftaxima	318
5.2. Estudio bioquímico y molecular de los aislados productores de BLEEs	319
5.3. Prueba de Epsilon	321
5.4. Resultados obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos	323
5.4.1. Concentración mínima inhibitoria <i>in vitro</i> en los antibióticos betalactámicos	324
5.4.2. Categorías clínicas para los antibióticos betalactámicos	331
5.5. Resultados obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos	332
5.6. Resultados obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos	336
5.6.1. Concentración mínima inhibitoria <i>in vitro</i> en los antibióticos betalactámicos	337

5.6.2. Categorías clínicas para los antibióticos betalactámicos	342
5.7. Evaluación de métodos fenotípicos	344
5.7.1. Métodos de difusión con disco y prueba de Epsilon	347
5.7.2. Métodos automatizados	354
5.8. Epidemiología	361
5.9. Estudio de clonalidad	367
5.10. Opciones terapéuticas	368
6. CONCLUSIONES	373
7. BIBLIOGRAFÍA	379

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) son moléculas químicamente diversas que tienen en común la presencia de un anillo betalactámico (figura 1) en su estructura.

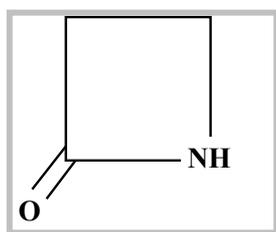


Figura 1: Anillo betalactámico

La similitud estereoquímica del anillo betalactámico con el dipéptido d-alanina-d-alanina (Tipper y Strominger, 1965) les permite interactuar con diversas proteínas enzimáticas con actividad de transpeptidasas y carboxipeptidasas situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana, moléculas encargadas de modelar la configuración definitiva de la capa del peptidoglucano, además de guiar su reorganización durante la división de las bacterias. A estas proteínas de membrana las conocemos genéricamente como proteínas fijadoras de penicilina (penicillin binding proteins o PBP) (Spratt, 1983). La actividad antibacteriana de los betalactámicos está, pues, en relación con su capacidad para interferir, de forma competitiva, en la actividad de las PBPs.

Varias de estas enzimas han sido caracterizadas estructural y bioquímicamente. Las PBPs poseen pesos moleculares variables entre 120 kD en el caso de PBP-1 y 40 kD en el caso de PBP-6. El número

total de PBPs por bacteria varía de una especie microbiana a otra, y es inversamente proporcional a su peso molecular.

La función de cada una de las PBPs es distinta, y las consecuencias para la bacteria de su bloqueo, también. Así, PBP-1 actúa, fundamentalmente, como una transpeptidasa, dependiendo de ella la integridad estructural de la pared, ya que cuando se bloquean con penicilinas, aparecen esferoplastos y la célula se lisa. PBP-2 modula la forma bacteriana, así que, cuando se bloquea su actividad, provoca el desarrollo de células redondas que se lisan fácilmente. PBP-3 interviene en la división bacteriana, provocando, al bloquearse, la aparición de formas filamentosas sin septos. PBP-4, PBP-5 y PBP-6 tienen actividad carboxipeptidasa, e intervienen en la liberación del quinto aminoácido del pentapéptido, que es necesaria para la polimerización del peptidoglucano.

La afinidad de los diferentes antibióticos betalactámicos por estas proteínas enzimáticas es variable. Así, por ejemplo, los carbapenémicos poseen mayor afinidad por PBP-2, PBP-1a y PBP-1b (Jones, 1985), transpeptidasas de cuya acción depende la integridad estructural de la pared hasta el punto que, cuando su actividad es anulada por estos antibióticos, las bacterias se convierten en esferoplastos, morfotipos que no resisten la presión osmótica y se rompen. Las aminopenicilinas tienen afinidad por PBP-2. Cefotaxima y aztreonam, entre otros, se fijan con elevada afinidad a PBP-3 (Costa y Botta, 1984), proteína que interviene en la división bacteriana.

La acción bactericida de los antibióticos betalactámicos no está ligada directamente a la interferencia con la síntesis del peptidoglucano. El bloqueo de las PBPs permite la actuación de enzimas hidrolíticas (autolisinas endógenas) en las bacterias que disponen de ellas, y como consecuencia se produciría la lisis (Tomasz, 1979). Las bacterias que carecen de autolisinas son inhibidas, pero no destruidas.

Para actuar, por tanto, los betalactámicos deben llegar a las PBPs. Eso es fácil en los microorganismos grampositivos, pero más difícil en gramnegativos y micobacterias. Por eso, en gramnegativos, deben aprovechar la presencia de poros proteicos (porinas). Además, la acción del betalactámico no es posible si la bacteria no se multiplica, porque ese es el momento de síntesis de la pared celular y de actuación de las PBPs. Es decir, actúan en fase de crecimiento exponencial.

1.2. Clasificación de los antibióticos betalactámicos

En la tabla 1 se recogen los principales antibióticos betalactámicos de interés clínico.

Tabla 1: Clasificación de los antibióticos betalactámicos

Clase	Tipos	Antibióticos
Penicilinas	Bencilpenicilinas	Bencilpenicilina procaína Bencilpenicilina benzatina
	Alquilpenicilinas	Fenoximetilpenicilina benzatina
	Isoxazolpenicilinas	Cloxacilina
	Aminopenicilinas	Ampicilina / amoxicilina
	Ureidopenicilinas	Piperacilina
Inhibidores de betalactamasas	Sulfonas del ácido penicilánico	Sulbactam Tazobactam
	Oxapenamas o clavamas	Ácido clavulánico
Cefalosporinas	Primera generación	Cefazolina Cefalexina
	Segunda generación	Cefonicid Cefuroxima Cefaclor
	Tercera generación	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Ceftizoxima Cefixima Cefpodoxima Ceftibuteno
	Cuarta generación	Cefepime Cefpiroma
Cefamicinas	Cefalosporinas de 2ª generación parenterales	Cefoxitina
Monobactámicos o monobactamas		Aztreonam
Carbapenémicos o carbapenemas	Carbapenemas	Imipenem
	4-beta-metilcarbapenema	Meropenem
	1-beta-metilcarbapenema	Ertapenem

1.3. Estructura química y actividad clínica de las penicilinas

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras, en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades.

Las penicilinas pueden dividirse según su actividad antibacteriana. La clasificación de las penicilinas ha quedado reflejada en la tabla 1.

1.3.1. Bencilpenicilina o penicilina G

Bencilpenicilina (figura 2) incluye en su espectro a la mayoría de los microorganismos grampositivos, tanto aerobios como anaerobios, cocos gramnegativos y algunos bacilos gramnegativos, aunque hay que considerar que los aislados productores de betalactamasas son resistentes a este antibiótico.

La mayoría de las especies de estreptococos son sensibles, si bien se está produciendo un incremento de aislados resistentes, siendo especialmente importante, por su trascendencia clínica, el incremento de resistencia a la penicilina por *S. pneumoniae*. El género *Staphylococcus* spp. es generalmente sensible, si bien, aquellas cepas resistentes a meticilina o las que poseen betalactamasas, son resistentes a este antibiótico. El género *Enterococcus* spp. es, por lo general, más resistente que otros cocos grampositivos. Entre los microorganismos

gramnegativos sensibles se incluyen *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*, salvo las cepas con alteraciones de las PBPs, que presentan sensibilidad disminuída, y de las productoras de betalactamasas, que serán resistentes. Lo mismo ocurre con *Haemophilus influenzae* o *Haemophilus ducreyi*. Las espiroquetas (*Treponema pallidum*, *Leptospira* spp. y *Borrelia* spp.) son sensibles. Las enterobacterias, *Rickettsia* spp., *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium jeikeium* y la mayoría de *Nocardia* spp. son resistentes.

Es el antibiótico de elección en las infecciones producidas por *Streptococcus pyogenes*, neumococos (excepto cepas resistentes), enterococos, meningococos (salvo en la erradicación faríngea), gonococos y estafilococos no productores de betalactamasas (penicilinasas). Es el antibiótico de elección en las infecciones por *Clostridium* spp. Es útil en la profilaxis de la fiebre reumática y en el tratamiento de la endocarditis estreptocócica. Está indicada en infecciones por espiroquetas, actinomicosis, ántrax y difteria. Es útil en infecciones periodontales, angina de Vincent e infecciones pulmonares de origen orofaríngeo. No es útil en infecciones abdominales ni pélvicas, donde pueden estar presentes anaerobios gramnegativos resistentes como el género *Bacteroides* spp.

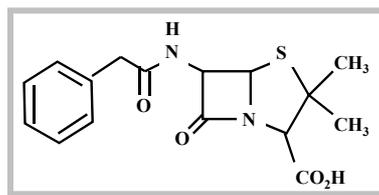


Figura 2: Bencilpenicilina

1.3.2. Fenoximetilpenicilina o penicilina V

Su espectro y actividad son similares a los de bencilpenicilina, siendo también activa frente a estreptococos, aunque algo menos frente a estafilococos, *H. influenzae*, gonococos y meningococos. Se usa en el tratamiento de faringitis y en infecciones leves orales o de tejidos (figura 3).

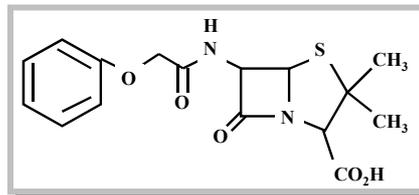


Figura 3: Fenoximetilpenicilina

1.3.3. Cloxacilina

Cloxacilina (figura 4) presenta actividad frente a estafilococos, estreptococos, gonococos y anaerobios grampositivos. Los enterococos son parcialmente resistentes. *H. influenzae* es resistente. No es activa frente a bacilos gramnegativos.

Su principal indicación terapéutica es el tratamiento de las infecciones producidas por *Staphylococcus* spp. no resistente.

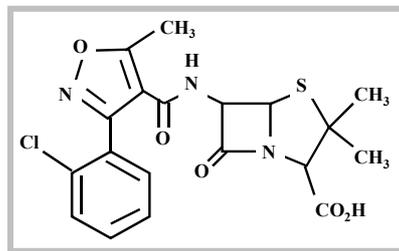


Figura 4: Cloxacilina

1.3.4. Aminopenicilinas

Son ligeramente más activas que bencilpenicilina frente a *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, enterococos, *N. meningitidis* y corinebacterias. Son más activas frente a *L. monocytogenes*, *H. influenzae* no productor de betalactamasas y algunos bacilos gramnegativos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. o *Proteus mirabilis* no productores de betalactamasas plasmídicas. La mayoría de *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp. y *Bacteroides* del grupo *fragilis*, son resistentes a estas penicilinas (figura 5).

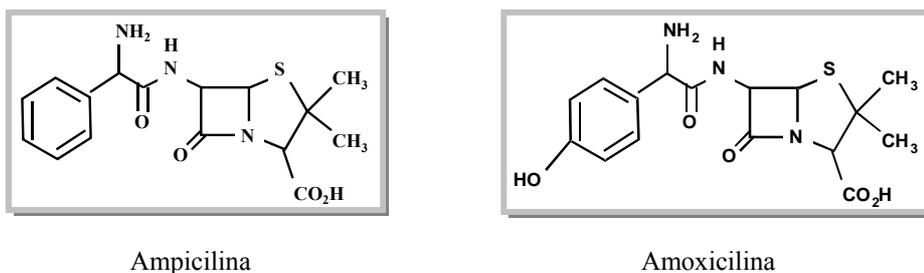


Figura 5: Aminopenicilinas

El incremento de aislados productores de betalactamasas plasmídicas ha disminuido su utilidad clínica, por lo que se asocian a inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico o sulbactam).

Son útiles en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y respiratorias, en el tratamiento de endocarditis por enterococos, meningitis y en sepsis, sobretodo combinadas con aminoglucósidos. Amoxicilina también se usa en la eliminación de portadores de *Salmonella typhi*.

1.3.5. Piperacilina

Presenta una buena actividad frente a estreptococos, enterococos, estafilococos, *H. influenzae* y gonococos. Los aislados resistentes a penicilina por alteración en las PBPs son también sensibles a este antibiótico, pero los gonococos productores de betalactamasas son resistentes. Es la penicilina más activa frente a *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *B. cepacia* y *S. maltophilia*. Es activa frente a la mayoría de especies de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. y *S. marcescens*. Son sensibles *Bacteroides* del grupo *fragilis* y otros muchos anaerobios (figura 6).

Es rápidamente hidrolizada por betalactamasas, de ahí que los aislados productores de éstas son resistentes, en especial aquellos que producen betalactamasas de tipo TEM y otras de codificación plasmídica. Sin embargo, su asociación con tazobactam mejora sensiblemente su actividad frente a este tipo de aislados. Esta asociación se muestra activa frente a *S. aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Bacteroides* del grupo *fragilis* resistentes a piperacilina, aunque esta asociación no mejora la actividad de piperacilina sola frente a *P. aeruginosa*.

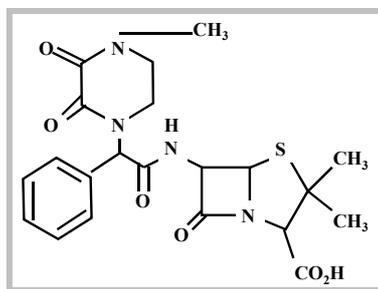
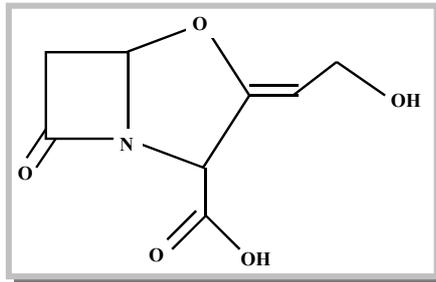


Figura 6: Piperacilina

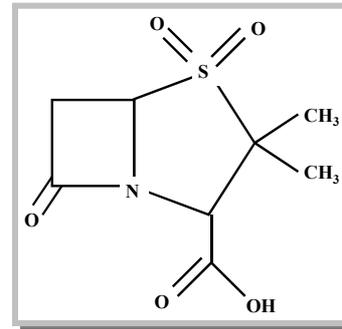
1.4. Estructura química y actividad clínica de los inhibidores de betalactamasas

Estos antibióticos pueden clasificarse según su mecanismo de acción en competitivos, si el inhibidor y el sustrato (amoxicilina, ampicilina, piperacilina) compiten por el lugar activo de la enzima, o no competitivo, si no se producen interferencias entre el inhibidor y el sustrato, debido a que se unen a lugares diferentes de la enzima. A su vez, la inhibición puede ser reversible, si la enzima recupera su acción después de desligarse del inhibidor, ya que no tiene lugar ningún tipo de modificación química, o irreversible, si la enzima permanece inactiva incluso después de liberarse del inhibidor debido a que se produce una alteración química y conformacional. Un tipo particular de inhibición irreversible es la conocida como inhibición “suicida”, en la cual el enzima queda covalentemente modificado e inactivo y el inhibidor se autodestruye. Los inhibidores suicidas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) exhiben este tipo de cinética de inhibición, aunque en las primeras fases se comportan como inhibidores competitivos debido a la similitud estructural con las moléculas a que se asocian. Estructuralmente los inhibidores pueden ser betalactámicos o no betalactámicos, determinando, en último término, el carácter competitivo o no competitivo respectivamente, de la reacción (Bush y Sykes, 1983).

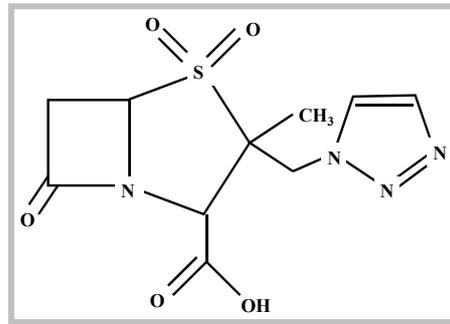
Hasta el momento sólo se han introducido en clínica compuestos de estructura química betalactámica: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (figura 7). En los inhibidores de estructura betalactámica la cinética de inhibición es de tipo competitivo y la reacción que se produce entre el enzima y el inhibidor es, en esencia, igual a la que tiene lugar entre una betalactamasa y cualquier molécula con estructura betalactámica.



Ácido clavulánico



Sulbactam



Tazobactam

Figura 7: Inhibidores de betalactamasas

Tanto ácido clavulánico como las sulfonas del ácido penicilánico, muestran una baja actividad antibacteriana frente a la mayoría de los microorganismos, por lo que como agentes únicos no son útiles clínicamente. Sólo se muestran sensibles a ácido clavulánico *Legionella* spp. y algunas cepas de *M. catarrhalis*, *C. jejuni*, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Algunos aislados de *Neisseria* spp., *B. fragilis* y *Chlamydia trachomatis* son sensibles a sulbactam, aunque el hecho más significativo es la buena actividad frente a *Acinetobacter* spp. Tazobactam, en comparación con los anteriores, muestra menor actividad intrínseca frente a enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores. *N.*

gonorrhoeae, *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* y *Acinetobacter* spp. son moderadamente sensibles *in vitro*.

Aunque son posibles otras combinaciones, el ácido clavulánico se encuentra disponible asociado a amoxicilina, sulbactam asociado a ampicilina y tazobactam a piperacilina.

La resistencia a las asociaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas puede aparecer por alteraciones de la permeabilidad (Reguera *et al.*, 1991), inducción de enzimas tipo OXA (Zhou *et al.*, 1994), o por hiperproducción de betalactamasas cromosómicas o plasmídicas normalmente sensibles a la inhibición (Martínez *et al.*, 1989). Éste último es el mecanismo de resistencia más frecuente, que supone una disminución de la sensibilidad de microorganismos previamente sensibles, ya que al aumentar la cantidad de enzima parte de ellas escapan a la acción del inhibidor e hidrolizan el antibiótico asociado. La sensibilidad podría ser restaurada incrementando la cantidad de inhibidor.

La asociación con ácido clavulánico supone la recuperación de la actividad de amoxicilina frente a microorganismos de las especies productoras de betalactamasas y la amplía a bacterias resistentes por producción natural de enzimas (*P. vulgaris*, *Klebsiella* spp., *P. pseudomallei*, *Aeromonas* spp., *B. fragilis*, *C. jejuni*, *H. influenzae*).

La asociación con sulbactam supone las mismas ventajas que para el caso del ácido clavulánico, pero hay que tener en cuenta la menor capacidad de sulbactam para inhibir las betalactamasas tipo TEM y SHV. Por otra parte, frente a *Acinetobacter* spp. únicamente es activa la asociación ampicilina-sulbactam, debido a la mayor afinidad de éste último por PBP-2 (Gales *et al.*, 1996).

La asociación con tazobactam restablece la actividad de piperacilina frente a especies productoras de betalactamasas como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *M. morgani*, *P. vulgaris*, *C. diversus*, y es la asociación

betalactámico-inhibidor de betalactamasas más efectiva frente al grupo de *B. fragilis* (Gobernado *et al.*, 1998).

Las indicaciones de la combinación amoxicilina-ácido clavulánico incluyen las infecciones del aparato respiratorio, tanto superior como inferior, del tracto urinario, infecciones obstetroginecológicas, infecciones de piel, tejidos blandos y osteoarticulares, infecciones odontógenas y periodontales. Las indicaciones de ampicilina-sulbactam son similares a las anteriores, además de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. multirresistentes, en las que ésta puede ser una de las escasas opciones terapéuticas. Por su parte, piperacilina-tazobactam está indicada en el tratamiento de infecciones polimicrobianas graves o producidas por microorganismos resistentes a otros antibióticos: bacteriemias, infecciones intraabdominales, ginecológicas y neumonías graves adquiridas en la comunidad, en las que se sospeche la presencia de *P. aeruginosa*, y en las nosocomiales.

1.5. Estructura química y actividad clínica de las cefalosporinas

Las cefalosporinas son fármacos cuya estructura básica está constituida por el anillo 7-aminocefalosporánico (figura 8), que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales de este anillo origina las diversas cefalosporinas (figura 9).

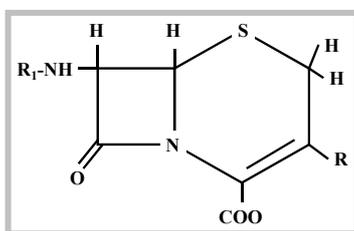


Figura 8: Anillo 7-aminocefalosporánico

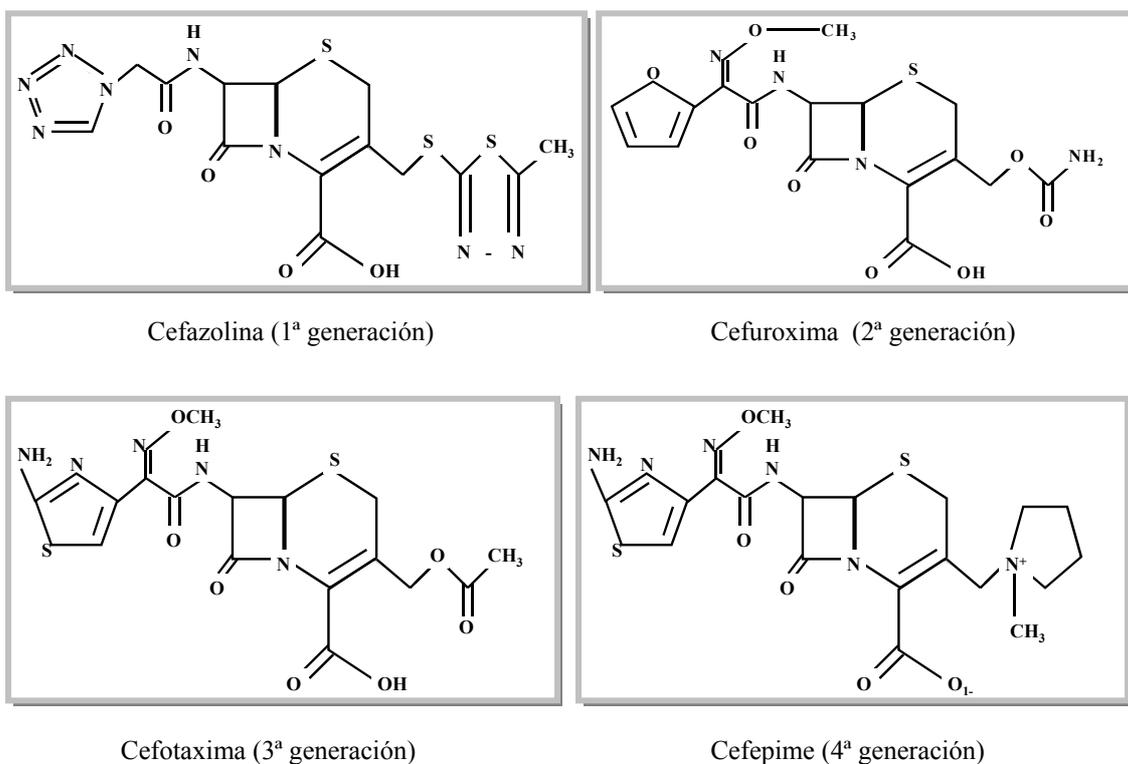


Figura 9: Cefalosporinas representativas de cada grupo

1.5.1. Cefalosporinas de primera generación

Las cefalosporinas de primera generación son las que mantienen una mejor actividad frente a microorganismos grampositivos, con la excepción de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), de los neumococos resistentes a penicilina y de los enterococos, resistentes de forma intrínseca a cefalosporinas. Mantienen una buena actividad frente a las enterobacterias más sensibles (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*) y frente a *Neisseria* spp., incluidas cepas con alteraciones de las PBPs, pero no frente a productoras de betalactamasas (todas ellas resisten en buena medida la acción de las betalactamasas de *S. aureus*, pero son hidrolizadas eficazmente por la mayoría de betalactamasas de otros tipos). Tienen una actividad de moderada a pobre frente a anaerobios, siendo activas principalmente frente a anaerobios grampositivos, con resistencia generalizada en el grupo de *B. fragilis*.

Actualmente, el desarrollo de nuevos fármacos, tanto cefalosporinas, como de otros grupos, ha limitado bastante sus aplicaciones, de modo que éstas se reducen, en buena parte, a procesos no complicados de adquisición extrahospitalaria, causados por microorganismos presuntamente sensibles. Se usan fundamentalmente en infecciones del tracto urinario no complicadas, faringoamigdalitis y neumonía neumocócica adquirida en la comunidad en áreas con baja incidencia de resistencia a penicilina, y en infecciones leves a moderadas de piel y tejidos blandos. Son también útiles en profilaxis quirúrgica, fundamentalmente en intervenciones traumatológicas y en implantación de prótesis, en las que se pretende evitar sobretudo las infecciones por grampositivos.

1.5.2. Cefalosporinas de segunda generación

La segunda generación mejora, tanto en espectro frente a bacterias gramnegativas, como en actividad intrínseca, respecto a las de primera generación, aunque a costa de una cierta pérdida de actividad frente a bacterias grampositivas. En este grupo el aumento de espectro y la mayor actividad antimicrobiana, junto con la mayor disponibilidad de fármacos orales, incrementan de forma notable el número de procesos en que son potencialmente útiles, tanto en el hospital como, sobretodo, en el ámbito extrahospitalario. Sin embargo, son muy pocas las infecciones en que alguna de estas cefalosporinas puede ser considerada como tratamiento de elección. Son, prácticamente en todos los casos, una alternativa más junto con otros fármacos, betalactámicos o no.

Gracias a su actividad frente a microorganismos grampositivos, especialmente estreptococos, y frente a *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., y *Moraxella* spp., son una alternativa en el tratamiento de diversos procesos otorrinolaringológicos (faringoamigdalitis, otitis, sinusitis), agudizaciones de origen infeccioso de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otro tipo de infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario, gonococia, y en el caso de cefuroxima, meningitis, aunque actualmente haya sido desplazada por las cefalosporinas de tercera generación con mejores resultados. Pueden ser útiles, además, como profilaxis quirúrgica en cirugía colorrectal y ginecológica.

Las cefamicinas (cefexitina), dado su espectro, son antibióticos adecuados en infecciones mixtas por microorganismos aerobios y anaerobios (infecciones intraabdominales, enfermedad inflamatoria pélvica y otras infecciones ginecológicas, pie diabético, celulitis secundarias a úlceras de decúbito y, en general, otras infecciones de

partes blandas en que se sospeche flora mixta). Sin embargo, no son muy recomendables en procesos graves, en los que quizá sean preferibles fármacos con mayor margen de seguridad frente a anaerobios (asociaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas, carbapenemas, metronidazol), y en cuadros de adquisición nosocomial, en los que puede ser preferible la administración de agentes más activos frente a enterobacterias de forma individual (carbapenemas) o en asociación (cefalosporinas de tercera generación o aminoglucósidos más un anaerobicida).

1.5.3. Cefalosporinas de tercera generación

Las cefalosporinas de tercera generación incrementan notablemente el espectro, la actividad y la resistencia a la hidrólisis por la mayor parte de las betalactamasas, e introducen algunas características farmacocinéticas interesantes como es su buen acceso al líquido cefalorraquídeo. Las cefalosporinas de tercera generación se muestran muy activas frente a todos los cocos y bacilos gramnegativos incluidos ya en el espectro de las generaciones anteriores (*Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Haemophilus* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.) y amplían su espectro a especies defectuosamente cubiertas por las generaciones previas, como *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. y *Citrobacter* spp. Se muestran además activas frente a neumococos moderadamente resistentes a penicilina y otros estreptococos, pero pierden actividad en comparación con las generaciones precedentes frente a estafilococos. Su actividad frente a anaerobios es escasa y respecto a *P. aeruginosa* hay que diferenciar dos grandes grupos: uno sin apenas eficacia frente a esta especie, que incluye moléculas como cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima, cefixima, cefpodoxima y

ceftibuteno, y otro con excelente actividad antipseudomónica como ceftazidima o cefoperazona. Todas ellas son ineficaces frente a estafilococos meticilin resistentes y enterococos, y tienen una actividad irregular frente a *Acinetobacter* spp. y géneros próximos a las pseudomonas, como *Stenotrophomonas* spp. y *Burkholderia* spp.

Cefotaxima es una aminotiazol-metoxi-imino cefalosporina con excelente actividad frente a enterobacterias, con las excepciones de las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y aquellas con producción desreprimida de cefalosporinas. Se muestra además muy activa frente a estreptococos, pero presenta escasa actividad sobre estafilococos y anaerobios. Tiene una hemivida de una hora, lo que permite dosificarla cada seis. No obstante, en el curso de su metabolismo diversas esterasas hepáticas actúan sobre el grupo acetoxi-metil presente en posición 3, dando lugar a desacetilcefotaxima, con menor actividad intrínseca que cefotaxima, pero con actividad sinérgica, potenciando su acción. Tal circunstancia puede permitir su dosificación cada 8 horas en infecciones no graves. Consigue una buena distribución en los tejidos y penetra bien en el líquido cefalorraquídeo, de modo que, a dosis altas, logra concentraciones que llegan a superar los 40 mg/l, y dada su excelente actividad frente a los patógenos meníngeos habituales, la convierte, junto con otras cefalosporinas de tercera generación, en un fármaco de elección en el tratamiento de la meningitis bacteriana. Su excreción es fundamentalmente urinaria, eliminándose la mayor parte del fármaco en forma de desacetilcefotaxima.

Sus efectos secundarios, escasos y habitualmente leves, se reducen a los comunes a todas las cefalosporinas, así como a la posibilidad, por su amplio espectro, de sobreinfecciones por microorganismos resistentes, como levaduras, enterococos o *P. aeruginosa*, así como casos de colitis pseudomembranosa. Estos efectos

son, por otra parte, comunes a todas las cefalosporinas de tercera generación.

Cefpodoxima es también una aminotiazol-metoxi-imino cefalosporina administrada en forma de éster. Se trata de un éster propil-carbonil-oxietil (proxztilo) en posición 4, diferenciándose de la anterior sólomente por su radical metoximetil en posición 3.

Ceftazidima es una aminotiazol-carboxi-propil-oxiimino cefalosporina, dotada de un grupo 1-piridinio con un amonio cuaternario en posición 3. Esto la convierte en una molécula dianiónica, donde la carga negativa del núcleo cefema es compensada por la carga positiva del grupo piridinio, quedando con una carga neta aniónica correspondiente al carboxilo del grupo carboximetil-oxiimino. Ceftazidima es prácticamente inactiva frente a grampositivos y anaerobios, pero en cambio es muy activa frente a gramnegativos, incluidos enterobacterias resistentes, *P. aeruginosa* y especies afines y *Acinetobacter* spp., debido a su baja afinidad por las betalactamasas y su baja capacidad de inducción. Tiene una hemivida próxima a las dos horas, que permite dosificaciones cada ocho, y penetra en el líquido cefalorraquídeo. Penetra bien en los tejidos y se excreta fundamentalmente por vía urinaria. Las cefalosporinas de tercera generación antipseudomónicas, sobretudo ceftazidima, son una alternativa en cuadros en que la etiología por *Pseudomonas* spp. sea segura o probable, como las infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística.

Las cefalosporinas de tercera generación constituyen un pilar fundamental de la terapéutica antimicrobiana, sobretudo en el ámbito hospitalario, donde tienen numerosas aplicaciones: infecciones respiratorias de adquisición nosocomial, ITU complicada, infecciones de piel y tejidos blandos de adquisición nosocomial, infecciones en inmunodeprimidos, etc. En todos estos casos, no obstante, ante la proliferación de infecciones hospitalarias por microorganismos

potencialmente resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cepas productoras desreprimidas de cefalosporinas, *P. aeruginosa* y especies afines, cepas productoras de BLEEs...), puede ser recomendable no utilizarlas de forma aislada sino en asociación con otros fármacos, como aminoglucósidos. Se hallan incluidos en la mayoría de los protocolos de tratamiento empírico de los pacientes neutropénicos febriles, habitualmente con un aminoglucósido.

Su empleo correcto fuera del hospital debería ser, en cambio, limitado, reduciéndose en la práctica al tratamiento de algunos cuadros específicos (gonococia, chancro blando, enfermedad de Lyme avanzada...) y a la terapia secuencial de cuadros tratados inicialmente en el hospital. Actualmente, su uso desmesurado está favoreciendo la proliferación, a nivel comunitario, de importantes mecanismos de resistencia como las betalactamasas de espectro extendido.

1.5.4 Cefalosporinas de cuarta generación

Son moléculas básicamente semejantes a las cefalosporinas de tercera generación, como cefotaxima, en las que la presencia de un grupo no cargado en posición 7, y la introducción de radicales con carga positiva en posición 3, que compensan la carga negativa correspondiente al grupo carboxilo en posición 2, da lugar a moléculas con una carga eléctrica neta nula. Ésta es una estructura que mejora notablemente su penetración a través de la pared bacteriana.

En conjunto, se trata de cefalosporinas que mejoran de forma notable la actividad de las de tercera generación frente a estafilococos sensibles a meticilina, neumococos y otros estreptococos patógenos. Algunas de ellas se comercializaron como activas frente a enterococos, pero estudios posteriores no demostraron dicha actividad (Gutiérrez *et*

al., 1996). Su actividad sobre los bacilos gramnegativos productores de betalactamasas plasmídicas clásicas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp.) es similar a la de las cefalosporinas de tercera generación, pero frente a especies productoras de cefalosporinas cromosómicas inducibles o desreprimidas (*E. cloacae*, *S. marcescens*, *C. freundii*) y frente a *P. aeruginosa* es mejor, con la excepción, en algunos casos, de ceftazidima.

Son activas, *in vitro*, frente a aislados productores de algunas betalactamasas de espectro extendido. Su actividad frente a anaerobios es limitada.

Sus principales indicaciones serían la neumonía nosocomial, en especial en áreas problemáticas (UCIs, unidades de quemados, hematología, etc.), episodios febriles en neutropénicos y cuadros sépticos de adquisición nosocomial, debido a la frecuente multirresistencia de los agentes etiológicos cuando las infecciones son de adquisición intrahospitalaria. También pueden estar indicadas en infecciones del tracto urinario nosocomiales complicadas, infecciones polimicrobianas de piel y tejidos blandos cuando están implicados estafilococos sensibles a meticilina y bacilos gramnegativos, y en infecciones intraabdominales, siempre combinados con un agente eficaz frente a anaerobios.

1.6. Estructura química y actividad clínica de los antibióticos monobactámicos

Los antibióticos monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla, con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario (figura 10).

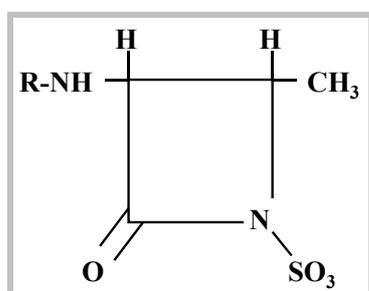


Figura 10: Anillo monobactámico

El fármaco representativo de este grupo es aztreonam. Éste tiene un mecanismo de acción similar al del resto de los antibióticos betalactámicos: tiene que pasar a través de las porinas proteicas de la pared celular bacteriana, resistir a la hidrólisis de las betalactamasas del espacio periplásmico y ejercer su acción uniéndose a las PBPs, principalmente a PBP-3 y a PBP-1a, a las que inhibe, produciendo directamente la lisis de la bacteria (es un antibiótico bactericida).

Aztreonam es muy sensible a la hidrólisis por las betalactamasas bacterianas, tanto las codificadas por plásmidos tipo TEM-1, TEM-2, OXA-2, OXA-3, PSE-1, PSE-3, PSE-4 y SHV-1, como a las determinadas por el cromosoma. Es poco inductor de betalactamasas, incluidas las de *Pseudomonas* spp., lo que es importante desde el punto de vista de la aparición de resistencias.

Aztreonam tiene una excelente actividad, semejante o superior a la de los aminoglucósidos y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, centrándose específicamente sobre bacterias aerobias gramnegativas. Su espectro de actividad abarca principalmente a *E. coli*, *S. marcescens*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Providencia* spp., *P. aeruginosa*, *Neisseria* spp. o *H. influenzae*. No tiene actividad sobre las bacterias grampositivas aerobias ni sobre anaerobios, tanto grampositivos como gramnegativos.

La administración conjunta de aztreonam con penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, fosfomicina, clindamicina, eritromicina, vancomicina o metronidazol, ha demostrado que produce un efecto aditivo o sinérgico. Este sinergismo tiene aplicaciones clínicas para tratar infecciones mixtas en las que una parte de los microorganismos causantes no puedan cubrirse con aztreonam, o para tratamientos empíricos iniciales. También hay actividad sinérgica de aztreonam con cefepime, mejorando la actividad de esta cefalosporina frente a *P. aeruginosa* al inhibir a las cefalosporinasas extracelulares. No es aconsejable asociar aztreonam con cefoxitina ni carbapenémicos debido a la capacidad de éstos para inducir betalactamasas cromosómicas en *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp. y algunos *Proteus* spp.

1.7. Estructura química y actividad clínica de los antibióticos carbapenémicos

Los antibióticos carbapenémicos (figura 11) son los antibióticos betalactámicos que presentan mayor espectro y actividad. Actúan como otros betalactámicos, uniéndose covalentemente a las PBPs, inhibiendo la síntesis de la pared celular y activando autolisinas endógenas, con lo cual la célula muere rápidamente. Debido a su bajo peso molecular y su estructura hidrofílica deben penetrar en las bacterias gramnegativas a través de porinas. Su acción se facilita por la estabilidad frente a un gran número de betalactamasas, tanto de microorganismos grampositivos, como de gramnegativos, cromosómicas o plasmídicas, aunque existen bacterias capaces de hidrolizarlos. Son potentes inductores de betalactamasas de tipo C en enterobacterias y *P. aeruginosa*, aunque habitualmente no producen desrepresión.

Puede aparecer resistencia a estos antibióticos por alteraciones de la permeabilidad, por expulsión activa, por modificación de PBPs o por inactivación por betalactamasas (carbapenemasas). El primero de estos mecanismos aparece en bacterias gramnegativas por alteraciones en la membrana externa, en *P. aeruginosa* por disminución de la porina OprD o hiperproducción de OprM, que afecta más a meropenem, en *E. cloacae* y *E. aerogenes* por modificaciones en OmpF y OmpD asociadas a hiperproducción de betalactamasas tipo C que incrementa la CMI de meropenem y en menor medida las de imipenem. La expulsión activa aparece ligada al operón mexA-mexB-oprM que afecta sobretodo a meropenem y a otros betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y quinolonas, confiriendo multirresistencia en *P. aeruginosa*. Las modificaciones de las PBPs son el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos en bacterias grampositivas (*S. aureus* meticilin

resistente asociado a PBP-2a, *E. faecium*, *E. faecalis* o *L. monocytogenes*); es un mecanismo raro en bacterias gramnegativas aunque puede aparecer en *P. mirabilis* (PBP-2 y PBP-1a), *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Son los antibióticos betalactámicos más estables a la hidrólisis por betalactamasas, siendo resistentes a la acción de la mayoría de estas enzimas.

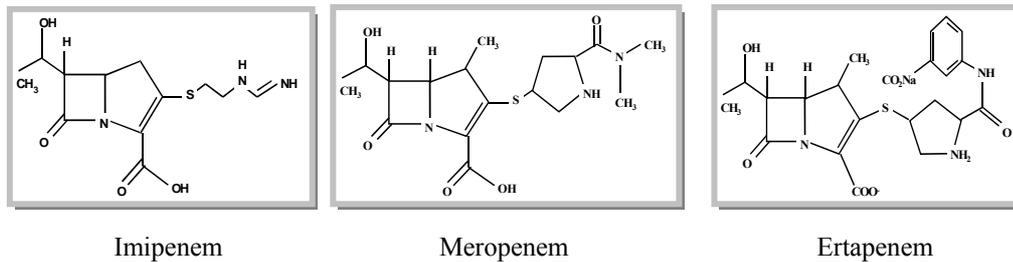


Figura 11: Principales antibióticos carbapenémicos

Poseen un espectro de actividad muy amplio. *In vitro* son activos frente a bacterias grampositivas (*S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bacillus* spp.), frente a bacterias gramnegativas (*Neisseria* spp., *Moraxella* spp., enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*) y bacterias anaerobias.

Deben emplearse en infecciones graves y nosocomiales, sobretudo si hay posibilidad de que estén producidas por bacterias multirresistentes o polimicrobianas. No son antibióticos de elección en infecciones leves ni en profilaxis quirúrgica. Pueden usarse como tratamiento empírico en pacientes neutropénicos febriles, siendo más útil meropenem en monoterapia por su mayor actividad frente a *P. aeruginosa*, en bacteriemias y septicemias de origen desconocido, en infecciones intraabdominales, en neumonías nosocomiales, en meningitis (sólo cuando se sospeche la presencia de bacilos gramnegativos resistentes

a otros antibióticos), en infecciones de tejidos blandos y osteoarticulares, en infecciones graves y complicadas del tracto urinario. Son especialmente útiles en infecciones por *Acinetobacter* spp., como endocarditis o neumonía.

La asociación de imipenem con aminoglucósidos presenta diversos grados de sinergismo sobre enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., enterococos, *L. monocytogenes* o *S. aureus*. Se ha descrito sinergismo entre este carbapenémico y ciprofloxacino en *Enterobacter* spp., y *P. aeruginosa*. Imipenem asociado con cefalosporinas puede actuar sinérgicamente sobre *S. aureus* resistente a meticilina y de la misma manera se puede comportar con vancomicina. También se ha demostrado sinergia con amikacina en *Mycobacterium tuberculosis* y *E. faecalis*.

La asociación de imipenem con tetraciclinas y eritromicina es antagónica. Lo mismo ocurre cuando se asocia con otros betalactámicos frente a *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* y *M. morgani*, probablemente por existir una potente inducción de betalactamasas por parte de imipenem. Por ello no es recomendable combinarlo con otros betalactámicos, ya que la inducción de betalactamasas puede disminuir la eficacia de cefalosporinas y penicilinas.

Meropenem presenta una acción sinérgica con teicoplanina, vancomicina y piperacilina frente a *S. aureus* resistente a meticilina. Con vancomicina, y especialmente con teicoplanina, puede ser sinérgico sobre *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos sensibles y resistentes a meticilina. Su asociación con ampicilina o cefazolina frente a *S. aureus* resistente a meticilina reduce las CMI de los otros betalactámicos. La asociación de meropenem, teicoplanina y gentamicina tiene un fuerte sinergismo frente a enterococos con grados moderados y altos de resistencia a gentamicina.

1.8. Inactivación enzimática de los antibióticos betalactámicos por betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico de penicilinas, cefalosporinas y otros betalactámicos, perdiendo capacidad de unión a las PBPs, y dando así lugar a compuestos sin actividad antibacteriana.

Desde un punto de vista clínico es esencial conocer la identidad del microorganismo que produce la betalactamasa, la localización del gen productor del enzima (plásmido o cromosoma), el carácter inducible o constitutivo de su expresión y el fenotipo de resistencia que determina (capacidad que tienen para hidrolizar los diferentes substratos betalactámicos y la mayor o menor inhibición de la que son objeto por parte de los inhibidores de betalactamasas). Estas características, así como el punto isoeléctrico y el peso molecular, se han empleado en la clasificación de las diferentes betalactamasas. También es necesario conocer la secuencia de aminoácidos, sobretodo la de su centro activo. Según éste existen cuatro clases de enzimas: A, B, C, y D (Ambler, 1980). Las enzimas de clase A, C y D poseen serina en su centro activo, que reacciona con el anillo betalactámico, abriéndolo irreversiblemente e inactivando el antibiótico; mientras que las enzimas de clase B poseen Zinc en su centro activo (metalobetalactamasas), que reacciona con el grupo carbonil del enlace amida del betalactámico inactivándolo (Samaha-Kfoury y Araj, 2003).

En la actualidad las betalactamasas se clasifican según la propuesta de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush *et al.*, 1995) que unifican criterios de clasificaciones anteriores (tabla 2).

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 2: Clasificación de las betalactamasas (modificada de Bush *et al.*, 1995)

Grupo	Clase	Substrato preferido	Inhibido por ácido clavulánico	Inhibido por EDTA	Genes	Enzimas	Microorganismo
1	C	Cefalosporinas	-	-	Crom Plas	Amp C MIR-1, MOX-1, FOX-1	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>
2a	A	Penicilinas	+	-	Crom / Plas	<i>S. aureus</i> (A, B, C, D)	<i>S. aureus</i>
2b	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a	+	-	Plas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Enterobacterias <i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>P. aeruginosa</i>
2be	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a Monobactámicos	+	-	Plas Crom	TEM 3-29, 43, 44, 50, 51, 52 SHV-2 a 10, 12 SHV-1 K1 <i>K. oxytoca</i>	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas Inhibidores betalactamasas	+ / -	-	Plas	TEM-30 a 42, 45	Enterobacterias
2c	A	Penicilinas Carbenicilina	+	-	Plas	PSE-1, 3, 4	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2d	D	Penicilinas Cloxacilina	+ / -	-	Plas	OXA-1 a 10	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2de	D	Penicilinas Cloxacilina Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a	+ / -	-	Plas	OXA 11 a 21	<i>P. aeruginosa</i>
2e	A	Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a	+	-	Crom	Cefuroximasa	<i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a Carbapenemas	+	-	Crom	NMC-A Sme-1 IMI-1	<i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i>
3	B	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a Carbapenemas	-	+	Crom Crom / Plas Plas	L-1 CcrA IMP-1	<i>S. maltophilia</i> <i>B. fragilis</i> Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
4		Penicilinas	-	?	Crom Plas	Nd SAR-2	<i>B. cepacia</i> <i>E. coli</i>

A continuación se exponen las características más importantes de los distintos grupos de betalactamasas.

Grupo 1:

- Según su secuencia de aminoácidos pertenecen a la clase C.
- Hidrolizan cefalosporinas.
- Presentan un residuo de serina en el centro activo.
- No se inhiben por ácido clavulánico.
- Incluye:
 - ❖ Betalactamasas cromosómicas inducibles (AmpC) de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp., y *P. aeruginosa*.
 - ❖ Betalactamasas cromosómicas constitutivas (AmpC) de *E. coli*.
 - ❖ Betalactamasas plasmídicas (MIR-1, MOX-1, FOX-1) de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, que son el resultado de la incorporación de genes cromosómicos (*ampC*) en plásmidos.

Grupo 2:

- Según su secuencia de aminoácidos pertenecen a las clases A o D.
- Todas presentan un residuo de serina en el centro activo.
- Se inhiben por ácido clavulánico.
- Incluye:
 - ❖ Penicilinasas cromosómicas y plasmídicas de bacterias grampositivas (*Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Enterococcus* spp.).
 - ❖ Betalactamasas plasmídicas clásicas (TEM-1, TEM-2, SHV-1) de *Enterobacteriaceae*.

- ❖ Betalactamasas plasmídicas de espectro extendido u oximinobetalactamasas de *Enterobacteriaceae* (por modificación del centro activo de TEM-1, TEM-2 y SHV-1).
- ❖ Betalactamasas derivadas de TEM que confieren resistencia a los inhibidores de betalactamasas o enzimas IRT de *Enterobacteriaceae*.
- ❖ Betalactamasas cromosómicas constitutivas de *K. pneumoniae* (SHV-1) y *K. oxytoca* (K1).
- ❖ Betalactamasas cromosómicas inducibles de *P. vulgaris* (o cefuroximasa).
- ❖ Oxacilinasas clásicas plasmídicas de *P. aeruginosa*.
- ❖ Oxacilinasas de espectro extendido plasmídicas de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (por cambios en el centro activo de OXA 1 a 10).
- ❖ Carbapenemasas cromosómicas de *E. cloacae*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*.

Grupo 3:

- Según su secuencia de aminoácidos y la presencia de Zinc pertenecen a la clase B (metalobetalactamasas).
- Hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas.
- No se inhiben por ácido clavulánico.
- Incluye:
 - ❖ Betalactamasas cromosómicas de *S. maltophilia*.
 - ❖ Betalactamasas plasmídicas IMP de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*.

Grupo 4: Son penicilinasas no inhibidas por ácido clavulánico y cuya caracterización molecular final está aún por realizar.

1.8.1. Betalactamasas cromosómicas

Casi todas las bacterias gramnegativas sintetizan una betalactamasa cromosómica, generalmente en muy poca cantidad, no confiriendo resistencia. Algunas de ellas, como *E. coli*, pueden incrementar de forma constitutiva la síntesis de esta enzima, AmpC, y, según su grado de expresión, se puede producir resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación (incluida cefoxitina), algunas de tercera generación como ceftazidima y pérdida de sensibilidad a las asociaciones con inhibidores de betalactamasas, mientras que permanecen sensibles cefalosporinas de cuarta generación y carbapenemas (Livermore, 1995).

La expresión de la betalactamasa cromosómica AmpC en otras enterobacterias como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. y *P. aeruginosa* es, sin embargo, de carácter inducible (Sanders, 1987). Este proceso de inducción por el cual se incrementa la síntesis de la enzima cuando la bacteria está en presencia del antibiótico inductor es un fenómeno reversible que desaparece cuando éste no está presente (Bennett y Chopra, 1993). En este último grupo de microorganismos, además, se pueden producir fenómenos de desrepresión, que también incrementan la cantidad de betalactamasa. A diferencia de la inducción, la desrepresión es un fenómeno irreversible, que no desaparece cuando la bacteria no está en presencia del antibiótico selector, sino que se seleccionan mutantes establemente desreprimidos que sintetizan gran cantidad de enzima. Este proceso genera resistencia a las carboxi, acilamino y ureidopenicilinas y a las cefalosporinas de tercera generación (Livermore, 1995).

Las cefalosporinas de tercera generación son buenos antibióticos selectores, pero malos inductores, de la producción de betalactamasas.

Por el contrario, carbapenémicos, cefamicinas e inhibidores de betalactamasas poseen un fuerte carácter inductor y baja capacidad de selección de mutantes establemente desreprimidos.

Desde un punto de vista clínico el fenómeno de la desrepresión puede suponer un fracaso terapéutico, que puede desarrollarse durante el tratamiento con betalactámicos (Livermore, 1987). En algunos hospitales, más del 30% de los aislamientos de *Enterobacter* spp. y *P. aeruginosa* pueden hiperproducir la betalactamasa AmpC. Por ello, en el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos con betalactamasas cromosómicas inducibles se recurre a la administración de antibióticos betalactámicos poco selectores como carbapenemas o cefalosporinas de cuarta generación, que presentan menor tasa de hidrólisis por estas enzimas, y un bajo carácter selector, o a la administración simultánea de un antibiótico betalactámico con un aminoglucósido.

El carácter inducible de estas enzimas es fácilmente detectable en los antibiogramas realizados mediante la técnica de difusión: cuando se disponen los discos de cefoxitina o imipenem próximos a los de las cefalosporinas de tercera o cuarta generación puede observarse un antagonismo entre ambos antibióticos, resultado de la inducción en la producción de betalactamasas que ejercen los primeros (Navarro *et al.*, 2002).

Sin embargo, ambos procesos son complejos y requieren la presencia del betalactámico y de, al menos, cinco genes en la bacteria: *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE* (Sanders, 1987). El mecanismo de inducción de la betalactamasa AmpC depende del gen *ampR* que actúa como activador durante el proceso de inducción y como represor en condiciones normales. Los genes *ampG* y *ampE* determinan la formación de proteínas de membrana (AmpG y AmpE, respectivamente) y *ampD* da lugar a una proteína soluble (AmpD) que se libera en el citoplasma,

donde favorece el reciclado de la pared celular y la síntesis del peptidoglucano a partir de los productos de degradación de la pared. En presencia de un antibiótico betalactámico inductor, AmpG actúa como permeasa y facilita la entrada en el citoplasma de los productos de degradación del peptidoglucano que se están produciendo como consecuencia del proceso de actuación del antibiótico betalactámico. Estos productos participan en la conversión de *ampR* de represor a activador de *ampC*. En ausencia del betalactámico inductor no se liberan grandes cantidades de productos de degradación del peptidoglucano, circunstancia que impide finalmente la activación de AmpR. La participación de AmpE en todo este proceso no está claramente demostrada.

Por su parte, los mutantes establemente desreprimidos no expresan el gen *ampD*, por lo que todo producto de degradación del peptidoglucano que se produce actúa como activador de *ampR*, liberándose siempre gran cantidad de betalactamasa AmpC.

Como se ha indicado con anterioridad, AmpC de *E. coli* se expresa de forma constitutiva. Esta peculiaridad se debe a la ausencia de *ampR* en la dotación genética, por lo que tampoco se produce activación en presencia de antibióticos inductores.

En ningún caso la enzima cromosómica AmpC es sensible a la acción de los inhibidores clásicos de betalactamasas. Por el contrario, las betalactamasas de *Klebsiella* spp. y *P. vulgaris* son sensibles al ácido clavulánico y otros inhibidores de betalactamasas como sulbactam y tazobactam (Livermore, 1995). Las primeras, representadas por LEN-1 o SHV-1 en *K. pneumoniae* o K1 en *K. oxytoca*, se expresan de forma constitutiva; sin embargo, la betalactamasa cromosómica de *P. vulgaris*, cefuroximasa, es de carácter inducible y, al igual que AmpC de *E. cloacae* o *P. aeruginosa*, pero con menor frecuencia, se pueden seleccionar durante el tratamiento mutantes que hiperproducen la enzima.

Además de estas betalactamasas cromosómicas existen otras de clase B, metaloenzimas, con un perfil hidrolítico muy amplio, que afectan a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas y no son inhibidas por ácido clavulánico. Reciben el sobrenombre de carbapenemasas (Livermore *et al.*, 1995). Algunas se producen en microorganismos multirresistentes considerados como patógenos de interés creciente: *S. maltophilia* (enzima L1), *Flavobacterium odoratum* y *B. cepacia*.

1.8.2. Betalactamasas plasmídicas

Las primeras betalactamasas plasmídicas que se describieron fueron las encontradas en *S. aureus* poco tiempo después de introducirse la penicilina en la terapéutica clínica. En España, como en la mayoría de los países, más del 90% de los aislados clínicos de *S. aureus* producen penicilinasas (Livermore, 1995). Por el momento, estas enzimas son el único ejemplo, entre bacterias grampositivas, de betalactamasas plasmídicas inducibles (Bonfiglio y Livermore, 1994). No se han descrito betalactamasas en *Streptococcus* spp. y sólo se han identificado, fuera de nuestro país, unas pocas cepas de *Enterococcus* spp. capaces de sintetizar estas enzimas (Murray, 1992).

En las bacterias gramnegativas las betalactamasas plasmídicas están ampliamente difundidas, aunque su incidencia depende de la especie. TEM-1 es la enzima más conocida y está presente en más del 40% de los aislamientos de *E. coli* y de *N. gonorrhoeae* y en más del 30% de los aislamientos de *H. influenzae* (Livermore, 1995). Además, en España, cerca del 90% de los aislamientos de *M. catarrhalis* producen una betalactamasa plasmídica, BRO-1. Ninguna de estas betalactamasas es inducible y su hiperproducción se debe a la presencia de los genes *bla* en plásmidos multicopia. Con el incremento de la cantidad de enzima se

produce resistencia a los inhibidores de betalactamasas y a las cefalosporinas de primera generación (Livermore, 1995).

Otras enzimas plasmídicas ampliamente difundidas son las oxacilinasas. Son enzimas de clase D con un perfil hidrolítico común muy parecido a las TEM, pero a diferencia de éstas hidrolizan fuertemente a cloxacilina y se inhiben pobremente con los inhibidores de betalactamasas (Livermore, 1995). OXA-1 es la más prevalente ya que, según algunos estudios, hasta el 10% de los aislamientos de *E. coli* pueden producirla (Wiedemann *et al.*, 1989). Su hiperproducción afecta de forma característica a las cefalosporinas de cuarta generación, sin modificar apenas los valores de CMI de las de tercera generación. Otras enzimas como OXA-10 son más prevalentes en *P. aeruginosa*.

Las betalactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos (MIR-1, MOX-1, FOX-1, CMY-1...) son el resultado de la incorporación de genes cromosómicos en plásmidos. Esto ha dado lugar a betalactamasas plasmídicas con un perfil de sustrato similar a la enzima de la que proceden, con una excepción, no son inducibles. La salvedad es la enzima ACT-1, la única betalactamasa plasmídica inducible entre bacterias gramnegativas (Bradford *et al.*, 1997).

La presión ejercida por el uso de las cefalosporinas de tercera generación ha determinado que algunas enzimas plasmídicas clásicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, modifiquen, por mutación, su centro activo. Con ello se modifica también el perfil de sustrato y se produce la hidrólisis de los betalactámicos de amplio espectro, las cefalosporinas de tercera generación, los monobactámicos y, en menor medida, las cefalosporinas de cuarta generación. Sin embargo, conservan la sensibilidad a cefamicinas (cefexitina), carbapenémicos e inhibidores de betalactamasas. Las enzimas resultantes de este proceso adaptativo, llamadas betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) surgieron en Alemania en el año 1983 y en España en 1988.

1.9. Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs)

1.9.1. Introducción e historia

La primera betalactamasa que se describió en una bacteria, concretamente en *E. coli*, lo fue incluso antes de que el primer betalactámico, la penicilina, fuese usado en la práctica médica (Abraham y Chain, 1940). La primera betalactamasa codificada por plásmidos en microorganismos gramnegativos, la enzima TEM-1, fue descrita a principios de la década de los 60 (Datta y Kontomichalon, 1965). Fue encontrada en un aislamiento de *E. coli* procedente de un hemocultivo de una paciente llamada “Temoniera” en Grecia, de ahí la designación de la enzima como TEM. El hecho de que esta enzima esté mediada por plásmidos y transposones ha facilitado el paso de la misma a otras especies bacterianas. Así, años después de este primer aislamiento, la betalactamasa TEM-1 puede encontrarse en múltiples especies de la familia de las *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*.

Otra betalactamasa comúnmente encontrada en *K. pneumoniae* y *E. coli* es SHV-1 (de “sulphydryl variable”). La betalactamasa SHV-1 está codificada por el cromosoma en la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae*, pero usualmente es de origen plasmídico en *E. coli*.

En los últimos 20 años se han incorporado nuevos antibióticos betalactámicos con la finalidad de ser resistentes a la hidrólisis por las betalactamasas. Sin embargo, con cada nuevo antibiótico que se ha venido usando para los tratamientos de los pacientes, nuevas betalactamasas han aparecido causando resistencia a este grupo de fármacos: “Tan pronto como un nuevo antibiótico es introducido para el uso clínico, es identificada una betalactamasa con la capacidad de

destruir esta actividad.” (Bush, 1989). Presumiblemente la presión selectiva del uso de nuevos antibióticos en el tratamiento de las infecciones ha seleccionado nuevas variantes de betalactamasas. Una de estas nuevas clases han sido las oxiiimino-cefalosporinas, que desde la década de los 80 comenzaron a extender su uso para el tratamiento de las infecciones graves por bacterias gramnegativas.

La primera descripción de una betalactamasa plasmídica con un perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera generación y sensibles a cefoxitina se realizó en Europa, en Alemania (Knothe *et al.*, 1983). El análisis de estas cepas demostró con posterioridad que la resistencia era debida a la producción de una betalactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1 y que se denominó SHV-2 (Kliebe *et al.*, 1985). El incremento de espectro que generaba este descubrimiento, especialmente frente a las oxiiimino-cefalosporinas, hizo que se las denominara betalactamasas de espectro ampliado, por hidrolizar un rango de betalactámicos más amplio que las enzimas plasmídicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Hoy se las denomina con mayor propiedad betalactamasas de espectro extendido o BLEEs (Philippon *et al.*, 1989). Hay descritas diferentes BLEEs, por todo el mundo, en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*.

Las BLEEs están codificadas por plásmidos (Jacoby y Sutton, 1991). La mayor parte de ellas pertenecen a la clase molecular A, y sus características principales son poseer el aminoácido serina en su centro activo, tener un peso molecular de 29 kD y llevar a cabo la hidrólisis preferentemente de penicilinas (Medeiros *et al.*, 1988). Utilizando el esquema propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros (Bush *et al.*, 1995) las BLEEs son definidas como betalactamasas capaces de hidrolizar oxiiimino-cefalosporinas, son inhibidas por ácido clavulánico y quedan incluidas en el grupo funcional 2be de esta clasificación (tabla 2).

1.9.2. Tipos de BLEEs

Muchas de las betalactamasas de espectro extendido derivan de las enzimas TEM o SHV, aunque no todas. Mutaciones puntuales en el gen que las codifica incrementan el espectro fenotípico. Las BLEEs se encuentran fundamentalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, también se han descrito en otros géneros de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*.

1.9.2.1. Betalactamasas tipo TEM

La expresión de una betalactamasa tipo TEM-1 es el mecanismo más común de resistencia a los betalactámicos entre las bacterias gramnegativas (Du Bois *et al.*, 1995). Por encima del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* es debida a la producción de una TEM-1 (Sanders, 1987). Este mecanismo de resistencia ha sido habitualmente descrito entre *Enterobacteriaceae*, pero no está confinado sólo a este grupo de bacterias. El gen responsable se localiza en un transposón cuya transposición hace que este gen también se haya descrito en otras especies bacterianas como *H. influenzae*, *Vibrio* spp. y *N. gonorrhoeae*.

TEM-2, la primera enzima derivada de TEM-1, presenta una única sustitución, la de glutamina en la posición 39 a lisina respecto a la secuencia de TEM-1 (Barthélémy *et al.*, 1985). Esto genera un cambio del punto isoeléctrico (pI) de 5,4 de TEM-1 a 5,6 en TEM-2, pero no se modifica el perfil de sustrato. La prevalencia de TEM-2 entre plásmidos en enterobacterias resistentes a betalactámicos no supera el 4%. TEM-3, originalmente descrita en 1988, fue la primera betalactamasa tipo TEM que mostró un fenotipo propio de una BLEE (Sougakoff *et al.*, 1988).

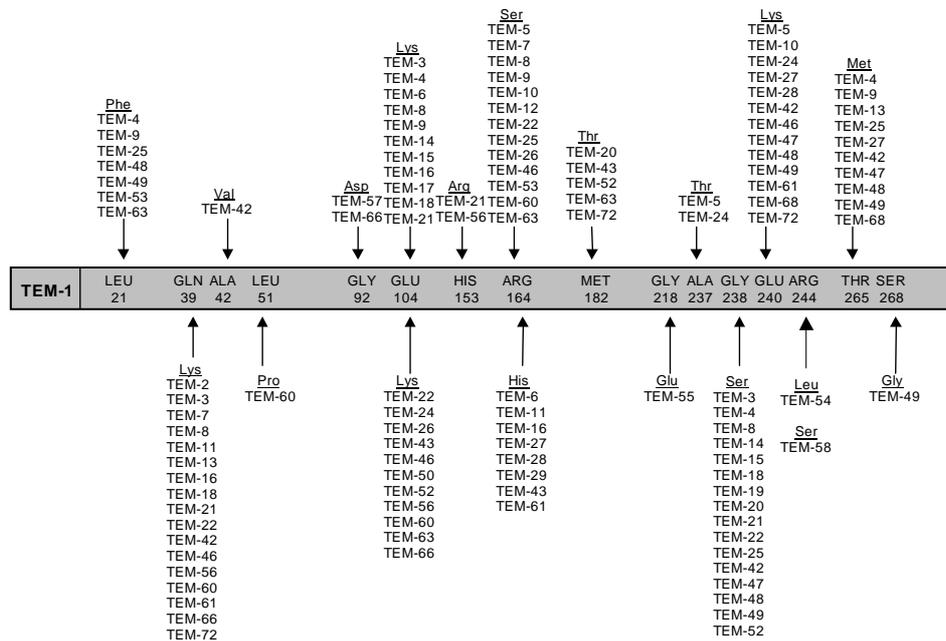


Figura 12: Sustituciones de aminoácidos en la secuencia de TEM-1 dando lugar a los diferentes TEM-BLEE (Bradford, 2001)

Como se muestra en la figura 12 las sustituciones en los aminoácidos que ocurren en la secuencia de la enzima TEM se producen en un número limitado de posiciones. La combinación de estos cambios de aminoácidos produce la aparición de los fenotipos BLEEs, tales como la capacidad de hidrolizar oximiino-cefalosporinas como ceftazidima y cefotaxima, o un cambio en el punto isoelectrico, que va desde 5,2 a 6,5 (tabla 8, ver más adelante). Algunos de estos cambios son especialmente importantes a la hora de generar un fenotipo BLEE. Por ejemplo, la sustitución de glutamato por lisina en la posición 104 de TEM-1 (TEM-17), arginina por serina en la posición 164 de TEM-1 (TEM-12) o glicina por serina en la posición 238 de TEM-1 (TEM-19).

TEM-12 es una enzima que muestra CMI's más elevadas para ceftazidima que para cefotaxima. La misma sustitución pero en la secuencia de TEM-2 da lugar a TEM-7, que tiene las mismas

propiedades que TEM-12. El incremento de la capacidad para hidrolizar oxiiimino-cefalosporinas no es debida a la adquisición de serina en esta posición sino a la pérdida de arginina. La sustitución de la arginina 164 por histidina en TEM-2 da lugar a TEM-11, que tiene las mismas propiedades (Du Bois *et al.*, 1995). Esta sustitución en la posición 164 de arginina por otro aminoácido sólo se da en las enzimas TEM, no aparece en las enzimas SHV. La sustitución en la posición 104 del ácido glutámico a lisina (TEM-17) no tiene efectos sobre la CMI de ceftazidima pero incrementa la CMI de cefotaxima. La presencia de las dos mutaciones descritas en las posiciones 104 y 164 (TEM-26) incrementa la CMI de ceftazidima mucho más que cualquiera de ellas por separado, sin embargo la CMI para cefotaxima en TEM-26 es la misma que en TEM-17.

La presión ejercida por el uso de las cefalosporinas hace que se vayan seleccionando nuevas enzimas como consecuencia de segundas, terceras... mutaciones en la secuencia de aminoácidos, para ir creando enzimas cada vez más eficaces en la hidrólisis de las cefalosporinas. Así por ejemplo, la transición de TEM-26 a TEM-9 se produce por una tercera mutación en la posición 265 de treonina a metionina, incrementando la CMI de cefotaxima en una enzima con una CMI de ceftazidima ya de por sí elevada. Pero además pueden existir mutaciones en determinados lugares que no afectan para nada el perfil de substratos de la enzima. Estas son mutaciones en puntos alejados del centro activo. Así la sustitución de ácido glutámico a lisina en la posición 39 o de treonina a metionina en la posición 261 en las enzimas TEM, no afecta la CMI para las oxiiimino-cefalosporinas.

Aunque las betalactamasas tipo TEM han sido encontradas sobretodo en *E. coli* y *K. pneumoniae*, también han sido halladas en otras especies de bacterias gramnegativas con elevada frecuencia. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM han sido descritas en

géneros de la familia *Enterobacteriaceae* como *E. aerogenes* (Dumarche *et al.*, 2002), *M. morgani* (Perilli *et al.*, 2000), *P. mirabilis* (Bonnet *et al.*, 1999), *P. rettgeri* (Marchandin *et al.*, 1999) y *Salmonella* spp. (Morosini *et al.*, 1995). Más aún, BLEEs tipo TEM también han sido descritas en otras bacterias gramnegativas no enterobacterias; así por ejemplo, TEM-42 fue descrita en un aislamiento de *P. aeruginosa* (Mugnier *et al.*, 1996) y también se ha descrito una betalactamasa TEM-17 expresada por un plásmido en un hemocultivo de *Capnocytophaga ochracea* (Rosenan *et al.*, 2000).

1.9.2.2. Betalactamasas tipo SHV

La betalactamasa SHV-1 generalmente se encuentra en *K. pneumoniae*, siendo responsable de más del 20% de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en esta especie (Tzouveleki y Bonomo, 1999). Sin embargo, en muchas cepas de *K. pneumoniae* el gen *bla_{SHV}* se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano (Livermore, 1995). El gen que codifica SHV-1 comparte un 65% de identidad con el de TEM-1 (Huletsky *et al.*, 1990). No está claro por qué TEM-1 es más prevalente que SHV-1, con un 80% de plásmidos que codifican resistencia a betalactámicos en enterobacterias frente a un 5% para SHV-1 (Du Bois *et al.*, 1995), posiblemente se deba a que el transposón que contiene a TEM-1 es más móvil.

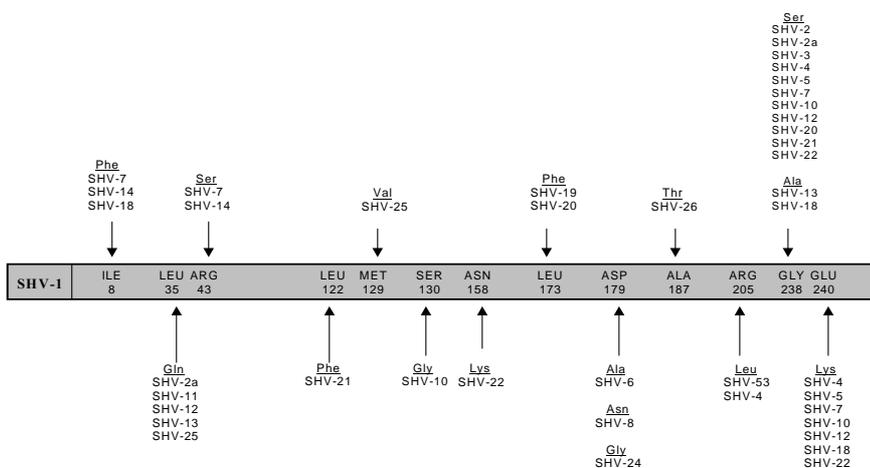


Figura 13: Sustituciones de aminoácidos en la secuencia de SHV-1 dando lugar a las diferentes SHV-BLEE (Bradford, 2001)

Al contrario que las betalactamasas tipo TEM, existen relativamente pocas betalactamasas derivadas de SHV-1 (figura 13 y tabla 6, ver más adelante). La mayor parte de las variantes SHV poseen un fenotipo BLEE que está generado por la sustitución de un aminoácido serina en lugar de glicina en la posición 238 de su secuencia. Esta mutación está asociada con un gran incremento de la CMI de cefotaxima y un incremento moderado en la CMI de ceftazidima respecto a las CMIs de SHV-1 para estos mismos antibióticos. SHV-3 posee una sustitución de arginina a leucina en la posición 205, y eso no incrementa las CMIs de cefotaxima ni ceftazidima. SHV-5 y todas las variantes derivadas de ésta poseen una sustitución de lisina en lugar de glutamato en la posición 240.

El residuo de serina en la posición 238 es fundamental para una hidrólisis eficaz de ceftazidima, y el residuo de lisina en la posición 240 para la hidrólisis eficaz de cefotaxima (Huletsky *et al.*, 1993). Cuando la enzima SHV-5 tiene una sustitución adicional del aminoácido arginina por leucina en la posición 205 tiene un fuerte incremento en la CMI de cefotaxima y ceftazidima.

En conclusión, cuando hay un único cambio en la posición 238 de glicina a serina se incrementa mucho la resistencia a cefotaxima y menos a ceftazidima. Un cambio en la posición 205 no altera el perfil de resistencia de una SHV, sin embargo, la misma sustitución en la posición 205 junto con un cambio en la posición 240 incrementa la capacidad de la enzima para hidrolizar cefotaxima y ceftazidima y aumentan considerablemente los niveles de resistencia a estos antibióticos (Du Bois *et al.*, 1995).

Hoy día la mayor parte de las enzimas SHV poseen un fenotipo de BLEE. Sin embargo, una variante, SHV-10, tiene un fenotipo de betalactamasa resistente a inhibidores de betalactamasas (IRT). Esta enzima, derivada de SHV-5, contiene una sustitución adicional en la posición 130, glicina en lugar de serina (Primarakis *et al.*, 1997).

La mayor parte de BLEEs tipo SHV se han encontrado en aislados de *K. pneumoniae* (Tzouveleki y Bonomo, 1999), sin embargo, también se han visto en *C. koseri* (anteriormente denominado *C. diversus*) (El Harrif-Heraud *et al.*, 1997), *E. coli* (Rasheed *et al.*, 1997) y *P. aeruginosa* (Naas *et al.*, 1999).

1.9.2.3. Betalactamasas resistentes a inhibidores de betalactamasas (inhibitor-resistant betalactamases o IRT)

Aunque las IRT no son propiamente dichas BLEEs, también derivan de las enzimas clásicas TEM y SHV. En los primeros años de la década de los 90 se describieron betalactamasas plasmídicas resistentes a la inhibición por ácido clavulánico. El estudio de la secuencia de nucleótidos reveló que estas enzimas eran variantes de las betalactamasas TEM-1 o TEM-2. A estas enzimas, a las que se les llamó IRT (inhibitor-resistant TEM beta-lactamase), actualmente se les asigna un número más de las designadas como TEM. Así existen más de 19 distintas IRT.

Las IRT se han encontrado preferentemente en aislamientos clínicos de *E. coli* (Alonso *et al.*, 2002), pero también en aislados de *K. pneumoniae* (Lemozy *et al.*, 1995), *K. oxytoca* (Bermudes *et al.*, 1999), o *P. mirabilis* (Bret *et al.*, 1996), entre otros.

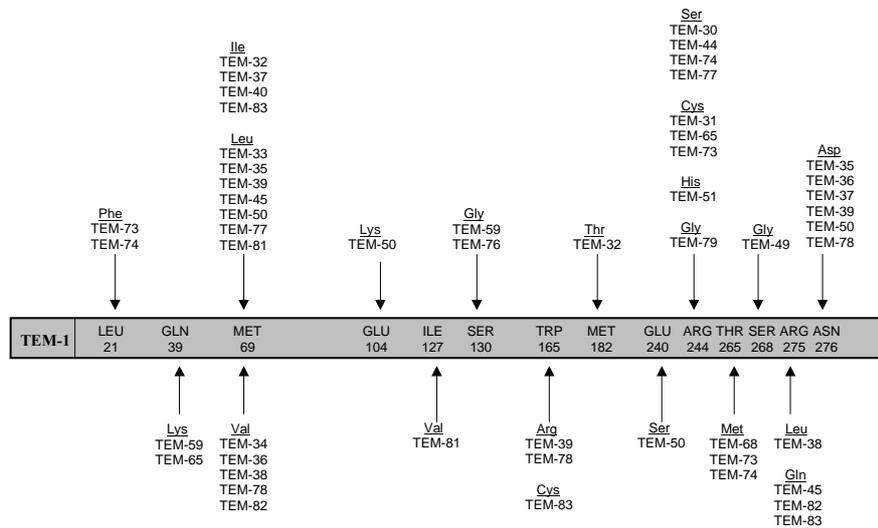


Figura 14: Sustituciones de aminoácidos en la secuencia de TEM-1 dando lugar a las diferentes IRT-BLEE (Bradford, 2001)

Como consecuencia de que las IRT son resistentes a la inhibición por ácido clavulánico y sulbactam, muestran resistencia clínica al uso de las combinaciones de antibióticos betalactámicos con inhibidores de betalactamasas como amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam, pero pueden presentar cierta capacidad de inhibición por tazobactam y en consecuencia a la combinación piperacilina-tazobactam (Chaibi *et al.*, 1999).

En un estudio sobre resistencias a amoxicilina-ácido clavulánico en *E. coli* en un hospital de Francia (donde por primera vez se detectaron

IRT) encuentran por encima de un 41% de cepas resistentes productoras de IRT (Lefton-Guibout *et al.*, 2000).

Como muestra la figura 14, las mutaciones que dan lugar a las enzimas IRT ocurren en puntos muy específicos sobre la estructura del gen de la enzima TEM-1. Cambios en la metionina 69, en la arginina 244, en la arginina 275 y en el aspártico 276 son algunos ejemplos (Henquell *et al.*, 1995).

Generalmente, las cepas aisladas poseen un fenotipo de enzima BLEE o de IRT, pero no suelen darse ambos fenotipos a la vez. Se ha descrito, sin embargo, una enzima, TEM-50, que posee una sustitución común, para un fenotipo BLEE y también para IRT (Sirot *et al.*, 1997). Esta enzima es resistente al ácido clavulánico, pero también posee una leve resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, esto puede ser el inicio de un nuevo grupo de betalactamasas que combinen dos fenotipos de resistencia.

Además de las variantes TEM también se han descrito variantes derivadas de SHV-1 (Primarakis *et al.*, 1997) y la enzima denominada OHIO-1 (Bonomo *et al.*, 1992).

1.9.2.4. Betalactamasas tipo CTX-M

En los últimos años ha ido surgiendo una nueva familia de BLEEs denominada CTX-M, caracterizadas por conferir resistencia de alto nivel a cefuroxima, cefotaxima y cefepime, prácticamente sin incrementar las CMIs de ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Además de la rápida hidrólisis de cefotaxima, otra característica de estas enzimas es que son inhibidas mejor por tazobactam que por sulbactam o ácido clavulánico (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Principalmente estas enzimas se han descrito en cepas de *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium (Tzouvelekis *et al.*, 1998) y en *E. coli*, pero también se han descrito en otras especies de *Enterobacteriaceae* (tabla 3). El residuo serina en la posición 237, que está presente en todas las CTX-M, juega un papel importante en la actividad tipo BLEE de estas betalactamasas.

Este grupo incluye las betalactamasas CTX-M1 (Bauernfeind *et al.*, 1990), CTX-M2 (Bauernfeind *et al.*, 1992), pasando por CTX-M9 (Sabaté *et al.*, 2000), CTX-M10 (Oliver *et al.*, 2001), y hasta CTX-M31 (Quinteros *et al.*, 2003), así como las enzimas Toho-1 (Ishii *et al.*, 1995) y Toho-2 (Ling *et al.*, 1998). Estas enzimas no están estrechamente relacionadas con las betalactamasas TEM o SHV, mostrando sólo un 40% de proximidad genética con estas dos (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Sin embargo, hay un alto grado de parecido entre la betalactamasa cromosómica de *Kluyvera ascorbata* (Klu-1 y Klu-2) y las enzimas tipo CTX-M, lo que sugiere un posible origen en esa especie (Humeniuk *et al.*, 2002). Sin embargo, se han expresado una alta variedad de variantes de las enzimas CTX-M, por lo que es muy improbable que estas enzimas tengan un mismo origen filogenético (Bradford, 2001).

Cepas en las que se han aislado enzimas tipo CTX-M han aparecido por múltiples partes del mundo, pero sobretodo se han asociado con brotes focales en el este de Europa, Suramérica y Japón. En menos ocasiones se han descrito aislamientos en el oeste de Europa, y generalmente en pacientes inmigrantes procedentes de las zonas donde se han descrito brotes. Sin embargo, aquí cabe destacar la alta incidencia de aislamientos de enterobacterias con estas betalactamasas en España, lo que puede sugerir una zona endémica en el oeste de Europa. En las zonas donde se han descrito brotes epidémicos los laboratorios describen que los aislamientos con CTX-M son los más frecuentes del grupo de BLEEs (Sabaté *et al.*, 2000).

Tabla 3: Características de algunas BLEEs tipo CTX-M (Bradford, 2001)

β -lactamasa	pI	País donde se describe	Microorganismos (primer aislamiento)
CTX-M1	8.9	Alemania, Italia	<i>E. coli</i>
CTX-M2	7.9	Argentina	<i>S. enterica</i>
CTX-M3	8.4	Polonia	<i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i>
CTX-M4	8.4	Rusia	<i>S. enterica</i>
CTX-M5	8.8	Lituania	<i>S. enterica</i>
CTX-M6	8.4	Grecia	<i>S. enterica</i>
CTX-M7	8.4	Grecia	<i>S. enterica</i>
CTX-M8	7.6	Brasil	<i>P. mirabilis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>C. amalonaticus</i>
CTX-M9	8.1	España	<i>E. coli</i>
CTX-M10	8.1	España	<i>E. coli</i>
Toho-1	7.8	Japón	<i>E. coli</i>
Toho-2	7.7	Japón	<i>E. coli</i>

1.9.2.5. Betalactamasas tipo OXA

Son otro creciente grupo de la familia de las BLEEs. Difieren de las betalactamasas tipo TEM o SHV en que pertenecen a la clase molecular D y a la clase funcional 2d (tabla 2). Las betalactamasas clásicas tipo OXA confieren resistencia a ampicilina y cefalotina y se caracterizan por su alta capacidad hidrolítica sobre oxacilina y cloxacilina y son pobremente inhibidas por ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1995).

Mientras que muchas BLEEs han sido descritas en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otras *Enterobacteriaceae*, las BLEEs tipo OXA han sido descritas principalmente en *P. aeruginosa* (tablas 4 y 7, ver más adelante). Muchas de las OXA con actividad BLEE derivan de OXA-10

(Danel *et al.*, 1999); OXA-14 difiere de OXA-10 en un sólo aminoácido, OXA-11 y OXA-16 difieren en dos y OXA-13 y OXA-19 difieren en nueve. Entre las enzimas relacionadas con OXA-10 las secuencias de aminoácidos difieren en uno o dos aminoácidos. En particular, la sustitución de aspártico en lugar de glicina en la posición 157 es necesaria para una resistencia de alto nivel a ceftazidima (Danel *et al.*, 1999); ésta u otras mutaciones son necesarias para dar a las OXAs un perfil fenotípico propio de una BLEE.

A diferencia de las OXAs tipo BLEE que confieren resistencia preferentemente sobre ceftazidima, OXA-17 confiere resistencia a cefotaxima y ceftriaxona (Danel *et al.*, 1999).

Con respecto a los inhibidores de betalactamasas, la enzima OXA original se caracteriza por su falta de inhibición por ácido clavulánico, sin embargo, se ha descrito inhibición por éste en OXA-18 (Philippon *et al.*, 1997).

En 1997 se describió OXA-21 en *A. baumannii*, el primer aislamiento de este microorganismo con una enzima de este tipo (Vila *et al.*, 1997). Otras OXAs no BLEE han sido descritas: OXA-20 (Naas *et al.*, 1998), OXA-22 (Nordmann *et al.*, 2000), OXA-24 (Bou *et al.*, 2000), OXA-25, OXA-26, OXA-27 (Afazal-Shah *et al.*, 2001) y OXA-30 (Siu *et al.*, 2000).

La mayor parte de estas betalactamasas se han aislado en Turquía y Francia, lo cual puede representar, o bien puntos de focalidad de estas enzimas, o bien que el interés mostrado por los científicos en las mismas ha favorecido su descubrimiento.

Tabla 4: Características de algunas BLEEs tipo OXA (Bradford, 2001)

β -lactamasa	pI	País donde se describe	Microorganismos
OXA-11	6.4	Turquía	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-13	8.0	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-14	6.2	Turquía	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-15	8.7	Turquía	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-16	6.2	Turquía	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-17	6.1	Turquía	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-18	5.5	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-19	7.6	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
OXA-28	7.6	Francia	<i>P. aeruginosa</i>

1.9.2.6. Otras BLEEs

Existen otras BLEEs que no han podido clasificarse dentro de ninguna de las familias típicas descritas hasta ahora para estas enzimas (tabla 5). La betalactamasa PER-1 fue la primera, descrita en *P. aeruginosa*, aislada de un paciente en Turquía (Nordmann *et al.*, 1993). Más tarde se aisló en *Salmonella typhimurium*, en *A. baumannii* (Vahaboglu *et al.*, 1997) y también se ha descrito en *P. mirabilis* (Pagani *et al.*, 2002). Esta enzima representa en Turquía el 60% de las resistencias a ceftazidima en *A. baumannii*. La enzima PER-2, con un 86% de parecido genético con la enzima PER-1, ha sido descrita en *S. typhimurium* en Argentina (Bauernfeind *et al.*, 1996). Es curioso que PER-1 haya sido descrita casi exclusivamente en Turquía mientras que PER-2 lo haya sido casi exclusivamente en suramérica.

La betalactamasa VEB-1 se describió por primera vez en un aislamiento de *E. coli* en un paciente en Vietnam (Poirel *et al.*, 1999). CME-1 fue descrita en *Chryseobacterium meningosepticum* (Rossolini *et*

al., 1999). TLA-1 fue identificada en *E. coli* en México (Silva *et al.*, 2000).

Todas estas enzimas confieren resistencia a las oxiiimino-cefalosporinas, especialmente a ceftazidima, y a aztreonam. Muestran cierta similitud con cefalosporinasas cromosómicas de *Bacteroides* spp., pudiendo ser éste su origen filogenético (Rossolini *et al.*, 1999).

En un aislamiento de *S. marcescens* en Brasil se detectó una nueva BLEE, denominada BES-1 (Brazil extended-spectrum beta-lactamase), que presenta unas CMIs de aztreonam (512 µg/ml) y de cefotaxima (64 µg/ml) mayores que la de ceftazidima (8 µg/ml). Al secuenciar el gen se comprobó que no se parecía a ninguna de las BLEEs conocidas hasta la fecha, presentando sólo un 47-48% de identidad genética con el de las del tipo CTX-M y un 51% de identidad con la betalactamasa cromosómica de la clase A de *Y. enterocolitica*. Además tiene resistencia a la inhibición por tazobactam, pero no a la inhibición por ácido clavulánico o sulbactam, algo excepcional en betalactamasas (Bonnet *et al.*, 2000).

Tabla 5: Características de otras betalactamasas de espectro extendido (Bradford, 2001)

β -lactamasa	pI	Substrato	País donde se describe	Microorganismos
BES-1	7.5	Cefotaxima, ceftazidima, aztreonam	Brasil	<i>S. marcescens</i>
FEC-1	8.2	Cefotaxima	Japón	<i>E. coli</i>
GES-1	5.8	Ceftazidima	Guinea	<i>K. pneumoniae</i>
CME-1	> 9.0	Ceftazidima		<i>C. meningosepticum</i>
PER-1	5.4	Ceftazidima	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER-2	5.4	Ceftazidima	Argentina	<i>S. enterica</i>
SFO-1	7.3	Cefotaxima	Japón	<i>E. cloacae</i>
TLA-1	9.0	Cefotaxima, ceftazidima, aztreonam	Méjico	<i>E. coli</i>
VEB-1	5.3	Ceftazidima, aztreonam	Vietnam	<i>E. coli</i>

Tabla 7: Betalactamasas de espectro extendido tipo OXA (De: <http://www.lahey.org/studies/webt.asp>). Última revisión 14 de enero de 2004.

Betalactamasa	Secuencia de aminoácidos																			pI
	10	20	48	58	67	76	110	127	131	144	149	164	167	169	184	208	240	258	272	
OXA-10	I	G		D		N	T	A		Y		W	G		Y		E	S	E	6.1
OXA-11										S			D							6.4
OXA-14													D							6.2
OXA-16								T					D							6.2
OXA-17						S														6.1
OXA-19	T	S		N			S						D		F		G	N	A	7.5
OXA-28	T	S		N			S					G			F		G	N	A	8.1
OXA-35	T	S		N			S								F		G	N	A	8.0
OXA-2													D							7.7
OXA-15													G							8.0
OXA-18																				5.5
OXA-32															I					
OXA-45																				
OXA-1			A		A				R								D			
OXA-31			V		P				G								L			

A: alanina, C: cisteína, D: ácido aspártico, E: ácido glutámico, F: fenilalanina, G: glicina, H: histidina, I: isoleucina, K: lisina, L: leucina, M: metionina, N: asparagina, P: prolina, Q: glutamina, R: arginina, S: serina, T: treonina, V: valina, W: triptófano, Y: tirosina.

Betalactamasa	Secuencia de aminoácidos																												pI											
	4	5	6	21	39	42	51	69	80	84	92	104	115	124	127	130	145	153	163	164	165	182	184	196	204	218	237	238		240	244	262	265	268	275	276	280	289		
TEM-62																																								
TEM-63				F								K								S		T																		5,6
TEM-65					K																									C									5,4	
TEM-66					K						D	K																S											6	
TEM-67				I	K																									C									5,2	
TEM-68																												S	K				M		L				5,7	
TEM-69																																								
TEM-70																										Q													5,2	
TEM-71																												S	K										6	
TEM-72					K																	T						S	K										5,9	
TEM-73				F																										C			M						5,2	
TEM-74				F																																			5,2	
TEM-75				F																H														M						
TEM-76																G																								
TEM-77								L																						S										
TEM-78								V												R																	D			
TEM-79																														G										
TEM-80								L							V																						D		5,2	
TEM-81								L							V																									
TEM-82								V																													Q			

1.9.3. Epidemiología

Las enterobacterias productoras de BLEEs se han aislado con mayor frecuencia en muestras procedentes de pacientes hospitalizados, pero también pueden encontrarse en muestras de origen comunitario. Estos aislamientos pueden aparecer de forma esporádica, sin relación epidemiológica, o dar lugar a brotes nosocomiales. La mayoría de estas epidemias afectan a pocos pacientes en un periodo corto de tiempo, pero también es frecuente la descripción de brotes nosocomiales más extensos.

La codificación plasmídica de este tipo de resistencia hace que sea fácilmente transferible por conjugación entre diversas especies bacterianas. Así, podemos detectar brotes debidos a la diseminación de un plásmido (diferentes especies de enterobacterias con un plásmido común), o bien a la diseminación de una cepa resistente (epidemia clonal). Además, estos plásmidos pueden llevar asociada resistencia a otros grupos de antimicrobianos (aminoglucósidos, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol...) por lo que nos encontramos con microorganismos multirresistentes. Todo ello determina que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por bacterias que producen BLEEs sean muy limitadas.

El tubo digestivo actúa como reservorio de estos microorganismos multirresistentes; además es el nicho ecológico adecuado para que la resistencia se transmita a otras especies bacterianas. En algunos casos de epidemia la colonización fecal de los pacientes ingresados en unidades de riesgo ha llegado a más del 40%. Algunos factores de riesgo asociados a la colonización fecal por *K. pneumoniae* productor de BLEEs son la gravedad del proceso clínico al ingreso, la cateterización arterial, la nutrición parenteral, el sondaje vesical, la ventilación mecánica o la terapia antibiótica previa. Todos estos factores

están relacionados con el tiempo de estancia en UCI y la posibilidad de contacto horizontal a través del personal sanitario.

El microorganismo en el que más frecuentemente se han descrito brotes nosocomiales de BLEEs es *K. pneumoniae*. Probablemente está relacionado con el hecho de que esta especie forma parte de la flora normal, sobrevive durante bastante tiempo sobre la piel y los fómites y acepta con cierta facilidad plásmidos conjugativos. Las primeras epidemias de infección hospitalaria por *K. pneumoniae* productor de BLEEs fueron descritas en Francia a finales de los ochenta (Legrand *et al.*, 1989). Desde entonces se han documentado por todo el mundo, incluida España, numerosos brotes nosocomiales causados por enterobacterias productoras de BLEEs.

Durante muchos años, por tanto, el problema predominante con relación a las BLEEs ha sido la observación de brotes epidémicos nosocomiales de infecciones por *K. pneumoniae*, especialmente en las unidades de cuidados intensivos y en otras áreas hospitalarias (Legrand *et al.*, 1989; Meyers *et al.*, 1993; Peña *et al.*, 2001b). Más recientemente se ha constatado en Estados Unidos que esta circunstancia incluye también a las residencias geriátricas (Wiener *et al.*, 1999) y orfanatos (Weill *et al.*, 2004). Por otra parte, se han observado también infecciones esporádicas por *K. pneumoniae* intra o extrahospitalarias (Lautenbach *et al.*, 2001a).

Es un hecho reconocido la relación existente entre la observación de estos brotes epidémicos y un amplio consumo de antibióticos, especialmente de cefalosporinas de tercera generación. El consumo elevado de estos antibióticos favorecería la aparición de estos clones de *K. pneumoniae* productores de BLEEs, que se diseminan con particular facilidad en centros o unidades con factores predisponentes para la transmisión cruzada entre pacientes sometidos a múltiples manipulaciones (Paterson y Yu, 1999).

Los brotes nosocomiales publicados por *E. coli* y otras enterobacterias han sido, sin embargo, menos frecuentes (Paterson *et al.*, 2001a) aunque se refieren cada vez más infecciones producidas por estos microorganismos que son de carácter endémico o esporádicas, tanto nosocomiales como de aparente adquisición en la comunidad. Así, el problema se ha extendido de forma muy notable a *E. coli* y en menor medida a otras enterobacterias (Winokur *et al.*, 2001). Los datos de resistencia antibiótica proporcionados por el proyecto SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), procedentes de aislamientos en pacientes hospitalizados desde 1997 hasta 1999 y englobando hospitales de Norteamérica, Latinoamérica, Europa y el sudeste asiático, han puesto de manifiesto la amplia distribución mundial de estas infecciones, aunque con grandes diferencias según las áreas geográficas (Winokur *et al.*, 2001). Como puede observarse en la figura 15 y en la tabla 9, el mayor porcentaje corresponde a América Latina, con el 45% de los aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEEs, seguido de la región del Sudeste asiático y de Europa, con el 25% y el 22% respectivamente, siendo la incidencia mucho menor en Estados Unidos o Canadá, con cifras del 8% y el 5%. Teniendo en cuenta ésto, los autores plantean la posibilidad de que en estas áreas la presión selectiva ejercida por el abuso de cefalosporinas de tercera generación podría ser la explicación. Los datos que este estudio aporta sobre la presencia de BLEEs en Europa son similares a los aportados por el grupo GEIH para España, tal como veremos.

En este mismo estudio SENTRY la aplicación de técnicas de tipado molecular en aislados de enterobacterias con BLEEs, confirmó algunos aspectos epidemiológicos importantes. En primer lugar, demostró la diseminación dentro de los hospitales de determinados aislamientos de bacilos gramnegativos productores de BLEEs con idéntico patrón de campo pulsado, situación que corresponde a una

transmisión clonal. Estas situaciones ya fueron descritas en brotes nosocomiales epidémicos producidos por *K. pneumoniae*, como ocurrió, por ejemplo, en España (Peña *et al.*, 1998) y como se muestra en la figura 16. También el estudio SENTRY pone de manifiesto la diseminación geográfica entre diferentes especies bacterianas de plásmidos portadores de genes responsables de la codificación de las BLEEs. Una experiencia parecida había sido publicada por el grupo de Wiener demostrando una transmisión similar de plásmidos entre diferentes especies de enterobacterias en pacientes hospitalizados en centros de larga estancia y residencias geriátricas en el área de Chicago con una tasa de infección del 46% de los residentes colonizados con *E. coli* productor de BLEEs (Wiener *et al.*, 1999).

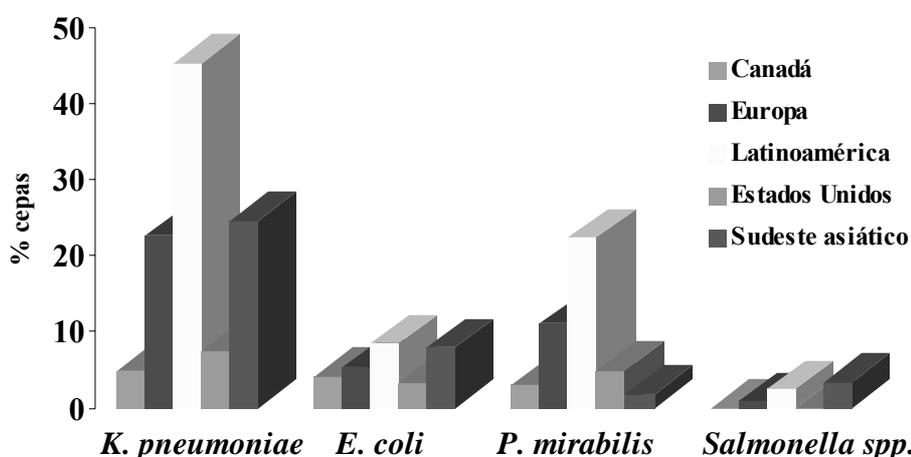


Figura 15: Prevalencia de enterobacterias con fenotipo BLEEs en América, Europa y Asia. Estudio SENTRY. (Winokur *et al.*, 2001)

En otros países también se han descrito epidemias como el brote nosocomial de origen clonal en una UCI neonatal del hospital de Cuernavaca, México (Silva *et al.*, 2001); el de un hospital de Río de Janeiro, donde los principales factores de riesgo asociados a esta

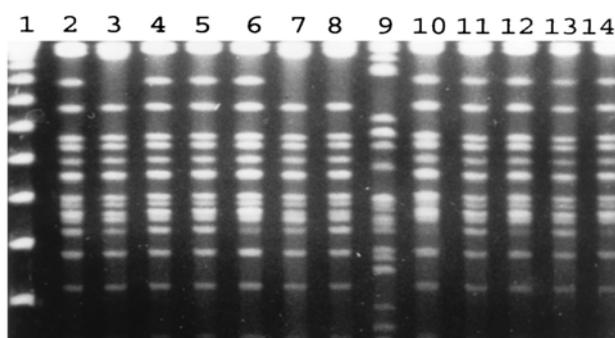
infección fueron parto prematuro, peso muy bajo al nacer y asfíxia (Martins-Loureiro *et al.*, 2001); o el brote en una UCI por *K. pneumoniae* en un hospital de Amman, Jordania (Shehabi *et al.*, 2000), o en un hospital de Lisboa, Portugal (Barroso *et al.*, 2000), en ambos casos por una enzima TEM-10.

Tabla 9: Distribución de los microorganismos productores de BLEEs en las zonas del estudio SENTRY (Winokur *et al.*, 2001)

Organismo, país o región (número de aislamientos estudiados)	Número (%) de aislamientos con fenotipo BLEE			
	Todos los substratos ¹	Ceftazidima ²	Ceftriaxona ²	Aztreonam ²
<i>K. pneumoniae</i>				
Canadá (n=368)	18 (4.9)	15 (83.3)	9 (50.0)	14 (77.8)
Europa (n=946)	214 (22.6)	204 (95.3)	192 (89.7)	199 (93.0)
Latinoamérica (n=897)	407 (45.4)	397 (97.5)	385 (94.6)	371 (91.2)
Estados Unidos (n=2.017)	153 (7.6)	133 (86.9)	111 (72.5)	113 (73.9)
Sudeste asiático (n=560)	138 (24.6)	134 (97.1)	128 (92.8)	129 (93.5)
<i>E. coli</i>				
Canadá (n=1.203)	51 (4.2)	40 (78.4)	20 (39.2)	33 (64.7)
Europa (n=3.822)	202 (5.3)	160 (79.2)	125 (61.9)	154 (76.2)
Latinoamérica (n=2.026)	173 (8.5)	164 (94.8)	146 (84.4)	157 (90.8)
Estados Unidos (n=4.966)	166 (3.3)	117 (70.5)	83 (50.0)	128 (77.1)
Sudeste asiático (n=1.104)	87 (7.9)	79 (90.8)	62 (71.3)	80 (92.0)
<i>P. mirabilis</i>				
Canadá (n=97)	3 (3.1)	2 (66.7)	2 (66.7)	1 (33.3)
Europa (n=442)	49 (11.1)	42 (85.7)	34 (69.4)	23 (46.9)
Latinoamérica (n=196)	44 (22.4)	26 (59.1)	39 (88.6)	28 (63.6)
Estados Unidos (n=589)	29 (4.9)	21 (72.4)	12 (41.4)	16 (55.2)
Sudeste asiático (n=111)	2 (1.8)	1 (50.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
<i>Salmonella spp.</i>				
Canadá (n=11)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Europa (n=128)	1 (0.8)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Latinoamérica (n=125)	3 (2.4)	3 (100.0)	2 (66.7)	2 (66.7)
Estados Unidos (n=79)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Sudeste asiático (n=88)	3 (3.4)	3 (100.0)	3 (100.0)	3 (100.0)

¹ CMI de ceftazidima, ceftriaxona o aztreonam > 2 µg/ml

² CMI > 2 µg/ml. Porcentajes calculados sobre el total de aislamientos con fenotipo BLEE detectado por cualquiera de los tres antibióticos



En las líneas 2 y 3, aislamientos de sangre de pacientes no ingresados en UCI.
Líneas 4, 5, 6 y 10, aislamientos de sangre de pacientes de UCI
En las líneas 7 y 8, 11 y 12, 13 y 14 aislamientos de sangre y heces respectivamente de tres pacientes, (como vemos son idénticas dos a dos)
En la línea 9 un aislamiento de sangre con un perfil de sensibilidad distinto al resto de las muestras, esta cepa era la única sensible a gentamicina y ciprofloxacino.

Figura 16: Resultados de electroforesis en campo pulsado. Brote nosocomial por *K. pneumoniae* productor de BLEEs en el hospital de Bellvíge (tomado de Peña *et al.*, 1998)

En España, los primeros microorganismos productores de BLEEs se describieron en 1988, aunque en estudios retrospectivos se identificaron microorganismos con perfiles de sensibilidad compatibles con la producción de BLEEs en bacterias aisladas en Madrid entre 1985 y 1987 (Baquero *et al.*, 1988). La primera epidemia por bacterias poseedoras de BLEEs conocida en nuestro país (1988-1990) incluyó aislamientos de *K. pneumoniae* (61%), *S. marcescens* (31%), *K. oxytoca* (5%) y *E. coli* (3%). Estos aislados también eran resistentes a aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfamidas y tetraciclinas (Fernández-Rodríguez *et al.*, 1992a).

De entre los estudios posteriores sobre microorganismos productores de BLEEs en nuestro país, cabe destacar los realizados sobre el brote ocurrido en el hospital de Bellvitge (Barcelona) entre 1993 y 1995, durante el cual los aislados de *K. pneumoniae* productores de

BLEEs supusieron el 35% del total de aislamientos de esta especie. El 72% de los pacientes en los que se aislaron *K. pneumoniae* productor de BLEEs estaban ingresados en UCI. Entre estos existía un clon predominante que producía, en la mayoría de los casos, una BLEE de punto isoeléctrico 7,6 (Peña *et al.*, 1998).

También se realizó en Barcelona (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) un estudio con aislados clínicos resistentes a cefalosporinas de tercera generación obtenidos entre 1994 y 1996, en el que encontraron solamente expresión de BLEEs en el 0,17% de *K. pneumoniae* y en el 0,14% de *E. coli*. Las BLEEs se identificaron como TEM-12, SHV-2 y CTX-M9. En el mismo hospital, en un periodo posterior al de este estudio (1997-1999), los porcentajes de aislamientos productores de BLEEs aumentaron ligeramente (*K. pneumoniae* 1,6% y *E. coli* 0,5%) siendo en este periodo más del 70% de las BLEEs observadas del tipo CTX-M9 (Sabaté *et al.*, 2002).

En otro estudio del Hospital Ramón y Cajal (Madrid) sobre aislados de *K. pneumoniae* entre 1989 y 2000, los aislados productores de BLEEs representaron el 4,8% del total de *K. pneumoniae*. La mayoría de los aislamientos procedían de pacientes ingresados en la UCI y en unidades quirúrgicas. En este estudio se observó una gran variabilidad genética (31 clones en 62 aislados evaluados) y se reconocieron 6 BLEEs diferentes (Coque *et al.*, 2002a). Uno de los clones produjo una epidemia en una UCI neonatal entre 1997 y 1998 (Asensio *et al.*, 2000).

Hasta ahora se carece de datos que permitan conocer la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs en España. Por este motivo, el Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) inició un estudio prospectivo multicéntrico para conocer la prevalencia real de los dos principales patógenos productores de BLEEs, *K. pneumoniae* y *E. coli*, en diferentes áreas geográficas de nuestro país

(Hernández *et al.*, 2003a). En este estudio participaron 40 hospitales nacionales y los resultados quedan resumidos en la tabla 10. A lo largo de los 4 meses de estudio, se enviaron 352 aislados clínicos: 262 *E. coli*, 81 *K. pneumoniae* y 9 aislamientos de otras especies. De los 352 aislados se confirmó la producción de BLEEs en 240 (68%). De éstos, 170 (71%) se identificaron como *E. coli* y 70 (29%) como *K. pneumoniae*. Estos valores indican que el porcentaje de aislados productores de BLEEs del total de cada especie recibidos fue del 64,9% (170/262) en el caso de *E. coli* y del 86,4% (70/81) en el de *K. pneumoniae*. Se aislaron *E. coli* productores de BLEEs en 33 hospitales de los 40 participantes (82,5%) y *K. pneumoniae* productores de BLEEs en 17 (42,5%). En conjunto, se aislaron bacterias productoras de BLEEs de una u otra especie en el 90% de los hospitales participantes. *E. coli* productores de BLEEs supusieron el 0,5% del total de esta especie aislada en todos los centros. En el caso de *K. pneumoniae* este porcentaje fue de 2,7%, existiendo mayor dispersión geográfica en los centros con mayores tasas de aislamientos de BLEEs que en el caso de *E. coli*.

Cabe destacar que los 4 hospitales con mayor porcentaje de *E. coli* productor de BLEEs se encuentran en la comunidad autónoma de Andalucía. Destaca el elevado porcentaje detectado en el Hospital Virgen de la Candelaria de Tenerife (16,7%).

1. Introducción

Tabla 10: Frecuencia de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs en hospitales españoles (Hernández *et al.*, 2003a)

HOSPITAL	CIUDAD	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Txagorritxu	Vitoria (Álava)	0	0
Marina Baixa	Villajoyosa (Alicante)	0,8	0
Vega Baja	Orihuela (Alicante)	0,19	2,17
Severo Ochoa	Cangas del Narcea (Asturias)	0	0
General de Asturias	Oviedo (Asturias)	0,93	0
Mérida	Mérida (Badajoz)	0,43	0
Son Dureta	Palma de Mallorca (Baleares)	0	0,8
Bellvitge	Barcelona	0,33	4,97
Clínic	Barcelona	0,68	1,75
Vall d'Hebron	Barcelona	0,26	1'42
General Yagüe	Burgos	0,22	0
Puerta del Mar	Cádiz	0	7
Marqués de Valdecilla	Santander (Cantabria)	0,36	0
La Mancha Centro	Alcázar San Juan (Ciudad Real)	0,7	0
Reina Sofía	Córdoba	2,02	1,69
Doctor Negrín	Gran Canaria	0,16	4,39
Virgen de las Nieves	Granada	2,38	0
San Cecilio	Granada	0,59	2,53
Ntra Señora de Aránzazu	San Sebastián (Guipúzcoa)	0,05	0
General Ciudad de Jaén	Jaén	1,23	11,11
Juan Canalejo	A Coruña	0,22	2,4
Arquitecto Marcide	Ferrol (A Coruña)	0,59	0
Ramón y Cajal	Madrid	1,01	1,51
Gregorio Marañón	Madrid	0,76	5,66
12 de Octubre	Madrid	ND	ND
Alcorcón	Alcorcón (Madrid)	0,1	0
Virgen del Camino	Pamplona (Navarra)	1,16	0
Navarra	Pamplona (Navarra)	0,26	3,57
Santa María Nai	Orense	ND	ND
Provincial de Pontevedra	Pontevedra	0,09	0
Xeral Cies	Vigo (Pontevedra)	0,34	0
Clínico	Salamanca	0	0
Virgen Macarena	Sevilla	2,37	0
San Camilo	S. Pere de Ribas (Barcelona)	0,17	0
Virgen de la Candelaria	Tenerife	1	16,67
Alcañiz	Teruel	0,3	0
Parapléjicos	Toledo	0	7,32
Basurto	Bilbao-Vizcaia	0	0
Lozano Blesa	Zaragoza	0,62	0
Miguel Servet	Zaragoza	0,33	0

ND: No determinado por no disponer de los datos de aislamientos totales.

En la mayoría de los estudios previos, los microorganismos productores de BLEEs se han aislado principalmente en el ámbito hospitalario, y, dentro de éste, en UCIs, ya sea en forma de brotes o como casos aislados. Varios estudios sobre la prevalencia de infección por *K. pneumoniae* productor de BLEEs en hospitales europeos, indican que hasta el 42% de las *K. pneumoniae* aisladas en UCIs y el 20% de las aisladas fuera de UCIs producen BLEEs, aunque existen notables variaciones en distintos países, y en diferentes centros del mismo país (Bradford, 2001). En Estados Unidos estas cifras disminuirían hasta el 10% dentro de las UCIs y al menos al 5% fuera de éstas.

Si en el estudio GEIH nos referimos exclusivamente a los aislamientos de UCI, la frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* sobre el total de aislamientos fue de 4,2%, si bien los porcentajes variaron enormemente según los centros: el mayor porcentaje de aislamientos (64,7%) correspondió al hospital Gregorio Marañón de Madrid. En el caso de *E. coli*, las cifras fueron significativamente menores, con una frecuencia de 1,3% del total de bacterias aisladas en UCI, correspondiendo, el mayor porcentaje, al Hospital Clínico de Zaragoza. Del total de aislados, el 46% de *E. coli* y el 66% de *K. pneumoniae* productores de BLEEs se aislaron en varones.

El rango de edad de los pacientes en los que se aisló *E. coli* productor de BLEEs fue de 0 a 93 años y la mediana de 58 años. En el caso de *K. pneumoniae*, el rango fue de 8 a 83 años y la mediana de un año. Excluyendo los casos en menores de un año la mediana de edad fue de 64 para *E. coli* y 53 años para *K. pneumoniae*.

El 51% de las muestras en las que se aisló *E. coli* productor de BLEEs fueron extrahospitalarias, mientras que el 93% de las muestras de *K. pneumoniae* productor de BLEEs fueron intrahospitalarias. Los servicios de los que provenían las muestras con *E. coli* productor de BLEEs fueron (figura 17): medicina (39,5%), cirugía (27%), UCI (15%),

pediatría (7,5%) y otros (11%). *E. coli* se aisló de (figura 18): orinas (66%), heridas (12%), sangre (11%), broncoaspirados (3%), catéteres (1%) y otras muestras (6%). Las muestras con *K pneumoniae* productor de BLEEs provenían de los siguientes servicios (figura 17): pediatría (35%), UCI (34%), cirugía (12%), medicina (6%) y otros (13%). *K. pneumoniae* se aisló de (figura 18): orinas (43%), sangre (16%), broncoaspirados (13%), heridas (10%), catéteres (10%) y otras muestras (8%).

En el caso de *E. coli* productor de BLEEs los datos obtenidos en este estudio indican que, en España, este microorganismo se aísla principalmente en muestras de orina (66%), procedente de personas en un amplio rango de edad (0-93 años) y, en el 51% de los casos, en pacientes no hospitalizados. Por el contrario, los datos de este estudio, en el cual el 93% de los aislamientos de *K. pneumoniae* productor de BLEEs proceden de muestras intrahospitalarias, indican que este microorganismo sigue siendo un problema principalmente nosocomial y que los servicios donde se encuentran principalmente son las UCIs, tanto de adultos como pediátricas.

Es de destacar la gran diferencia en las medianas de edad de los pacientes con aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs. El hecho de que la mediana para *K. pneumoniae* sea de un año se debe al gran número de aislamientos en unidades de neonatología y pediatría y que, durante el estudio, se produjeron brotes nosocomiales en estas unidades en varios de los hospitales participantes en el mismo. Las diferencias en los porcentajes de aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* que verdaderamente producían BLEEs se debe posiblemente a que los aislamientos de *E. coli* pueden tener CMIs elevadas a cefalosporinas de tercera generación por mecanismos diferentes a la producción de BLEEs, fundamentalmente hiperproducción de AmpC, lo que muy raramente ocurre en *K. pneumoniae*.

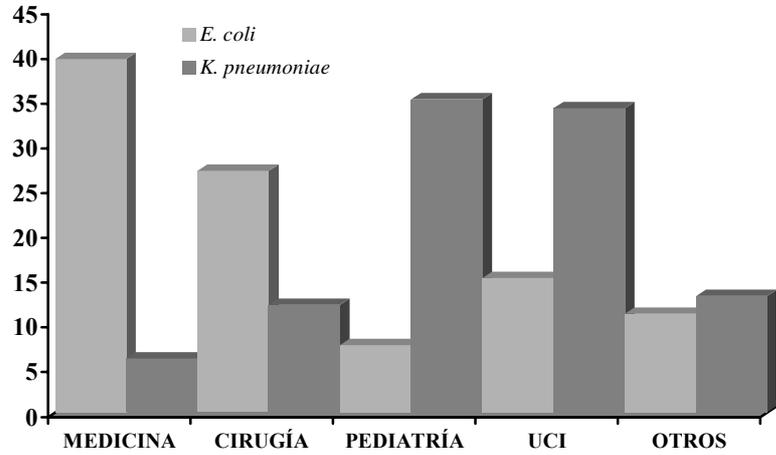


Figura 17: Distribución de aislados productores de BLEEs por servicios (Hernández *et al.*, 2003a)

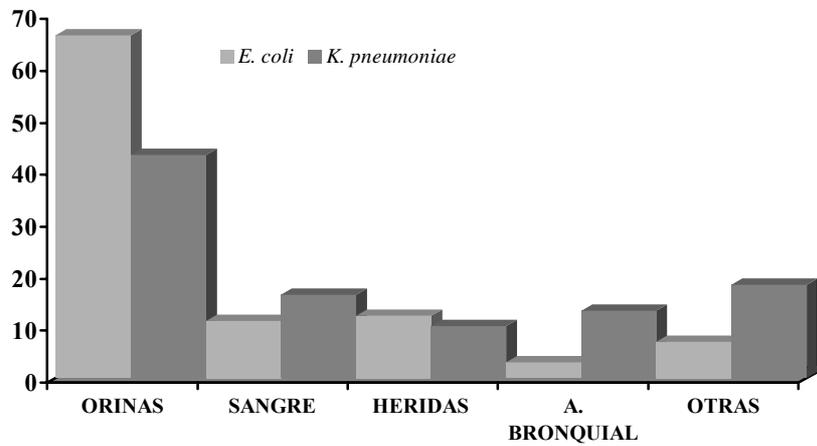


Figura 18: Distribución de aislados productores de BLEEs por muestras clínicas (Hernández *et al.*, 2003a)

En números absolutos, *E. coli* productor de BLEEs fue más frecuente que *K. pneumoniae* (170 frente a 70 aislados), tanto en

aislamientos intrahospitalarios como extrahospitalarios. Probablemente este hecho se deba al aumento en el número de aislamientos de *E. coli* productor de BLEEs en muestras de pacientes no hospitalizados, que supusieron más de la mitad (51%). Hasta hace poco, se consideraba que los microorganismos productores de BLEEs causantes de infecciones eran un problema casi exclusivamente nosocomial, que afectaba a pacientes ingresados con enfermedades debilitantes, tratamiento antimicrobiano de amplio espectro y estancia hospitalaria prolongada, especialmente en UCI y cirugía (Coque *et al.*, 2002a). Posiblemente el uso abusivo de los tratamientos con cefalosporinas orales a nivel extrahospitalario ha favorecido su aparición a nivel comunitario.

Los datos del trabajo del GEIH indican, durante el periodo estudiado, una prevalencia global en España de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs del 0,5% y el 2,7%, respectivamente, datos acordes con los de estudios multicéntricos publicados hasta ahora en países de nuestro entorno, como Francia (De Champs *et al.*, 2000) o Italia, (Spanu *et al.*, 2002) como puede observarse en las tablas 11 y 12.

Tabla 11: Distribución de aislamientos productores de BLEEs en enterobacterias (De Champs *et al.*, 2000)

Especies aisladas	Total de aislamientos	Número de aislamientos con BLEEs			
		Total (%)	TEM-24	TEM-3	Otras BLEEs
<i>E. coli</i>	1606	4 (0.2)	3	0	1 (TEM-52)
<i>P. mirabilis</i>	215	8 (3.7)	0	5	3 (TEM-21)
<i>K. pneumoniae</i>	138	13 (9.4)	1	11	1 (SHV-5)
<i>E. aerogenes</i>	86	46 (53.5)	36	7	3 (SHV-4)
<i>Salmonella spp.</i>	32	1 (3.1)	0	0	1 (TEM-4)
<i>E. cloacae</i>	30	2 (6.7)	0	1	1 (CTX-M-3)
<i>C. koseri</i>	30	5 (16.7)	0	5	0
Otras*	369	0 (0.0)	0	0	0
Total	2506	79 (3.2)	40	29	10

* *C. freundii*, *Enterobacter spp.*, *Hafnia alvei*, *K. oxytoca*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Y. enterocolitica*.

Tabla 12: Distribución de aislamientos productores de BLEEs en enterobacterias (Spanu *et al.*, 2002)

Especies aisladas	Total de aislamientos	Número de aislamientos con BLEEs				
		Número (%) de BLEEs	TEM	SHV	TEM y SHV	no-TEM/no-SHV
<i>E. coli</i>	4604	55 (1.2)	11 (20)	28 (52)	9 (17)	6 (11)
<i>K. pneumoniae</i>	946	189 (20.0)	32 (17)	104 (55)	34 (18)	18 (10)
<i>K. oxytoca</i>	166	25 (15.1)	9 (36)	10 (40)	1 (4)	5 (20)
<i>P. mirabilis</i>	805	131 (16.3)	127 (98)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
<i>P. vulgaris</i>	52	1 (1.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>P. stuartii</i>	96	27 (28.1)	22 (88)	0 (0)	3 (12)	0 (0)
<i>M. morgani</i>	191	9 (4.7)	7 (78)	1 (11)	0 (0)	1 (11)
<i>E. aerogenes</i>	151	31 (20.5)	11 (35)	14 (45)	1 (3)	5 (16)
<i>E. cloacae</i>	418	12 (2.9)	3 (25)	3 (25)	6 (50)	0 (0)
<i>S. marcescens</i>	224	11 (4.9)	7 (64)	4 (36)	0 (0)	0 (0)
<i>C. freundii</i>	256	12 (4.7)	1 (11)	7 (78)	1(11)	0 (0)
<i>C. koseri</i>	49	6 (12.12)	4 (67)	2 (33)	0 (0)	0 (0)
Otras especies	57	0 (0.0)				
Total	8015	509 (6.3)	234 (47)	173 (35)	55 (11)	38 (8)

1.9.4. Asociación de resistencias con otros antibióticos

Además de su codificación plasmídica, las BLEEs forman parte frecuentemente de transposones o integrones, lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a cotrimoxazol, aminoglucósidos, tetraciclinas u otros (Lautenbach *et al.*, 2001a).

Algunos autores han insistido en el posible papel de antibióticos distintos de las cefalosporinas en la aparición y diseminación de estos microorganismos. Se ha observado una asociación frecuente entre la presencia de BLEEs y la resistencia a fluorquinolonas en aislados de *K. pneumoniae*, a pesar de que la codificación de la resistencia se ubica en el caso de las BLEEs en un plásmido y en el de las quinolonas en el cromosoma (Paterson *et al.*, 2000b). Martínez-Martínez ya demostró la transferencia de resistencia a fluorquinolonas a través de plásmidos en

cepas de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Algunos estudios demuestran que hasta un 55% de los aislados productores de BLEEs son resistentes a fluorquinolonas.

Es importante identificar cuáles son los factores de riesgo asociados a la resistencia a fluorquinolonas en microorganismos poseedores de BLEEs porque así se podría preservar la utilidad de estos antibióticos en el uso de infecciones producidas por estas enzimas y reducir la dependencia a carbapenemas y limitar la aparición de microorganismos resistentes a estos últimos (Lautenbach *et al.*, 2001b). Según este mismo estudio, la resistencia a fluorquinolonas en *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs es más frecuente entre los aislados de pacientes que han recibido fluorquinolonas en los 30 días previos a la infección y también entre los pacientes que proceden de una residencia de larga estancia. Se desprende también de este estudio que la resistencia a aminoglucósidos está significativamente asociada con la resistencia a quinolonas en microorganismos productores de BLEEs, lo cual puede ser debido a que el uso de aminoglucósidos puede causar alteración de la permeabilidad de membrana y eso puede ayudar a la resistencia a fluorquinolonas. La relación entre la procedencia del paciente de una residencia de larga estancia y la presencia de microorganismos productores de BLEEs con resistencia asociada a quinolonas se puede explicar por la transferencia horizontal de estos microorganismos entre estas personas (Strausbaugh *et al.*, 1996).

Los estudios del GEIH en España y el estudio internacional SENTRY ofrecen cifras de resistencia asociada a otros antibióticos en aislamientos productores de BLEEs como muestran las tablas 13 y 14, respectivamente.

Tabla 13: CMI de los aislados productores de BLEEs para gentamicina, amikacina y ciprofloxacino (Hernández *et al.*, 2003a)

Especie y tipo de BLEE	Gentamicina		Amikacina		Ciprofloxacino	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>P. mirabilis</i>						
TEM	>256	>256	4	128	16	>32
<i>P. stuartii</i>						
TEM	4	64	16	64	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i>						
TEM	1	64	2	32	≤ 0.125	>32
SHV	2	16	2	32	≤ 0.125	2
TEM y SHV	2	32	4	32	≤ 0.125	>32
no-TEM/no-SHV	4	32	1	4	≤ 0.125	4
<i>E. coli</i>						
TEM	4	>256	2	8	0.25	>32
SHV	2	16	2	32	≤ 0.125	16
<i>E. aerogenes</i>						
TEM	1	16	64	64	>32	>32
SHV	2	64	8	16	2	>32

Tabla 14: Otras resistencias en aislados productores de BLEEs (Winokur *et al*, 2001)

Organismo, país o región (aislamientos con fenotipo BLEE)	Porcentaje de resistencia en los aislados					
	Tobramicina	Gentamicina	Amikacina	Tetraciclina	TMP-SMZ	Ciprofloxacino
<i>K. pneumoniae</i>						
Canadá (n=18)	16.7	16.7	5.6	61.1	5.6	22.2
Europa (n=214)	80.8	65.0	54.2	49.5	6.4	24.3
Latinoamérica (n=407)	83.5	66.3	66.1	52.0	12.1	23.1
Estados Unidos (n=153)	54.2	49.0	11.1	44.4	17.0	34.6
Sudeste asiático (n=138)	72.5	58.7	37.7	55.1	25.4	44.2
<i>E. coli</i>						
Canadá (n=51)	13.7	15.7	5.9	45.1	5.9	13.7
Europa (n=202)	32.2	25.7	10.9	61.4	8.9	34.2
Latinoamérica (n=173)	68.8	57.8	48.0	70.5	19.7	52.6
Estados Unidos (n=166)	21.7	21.1	7.8	48.8	6.0	19.3
Sudeste asiático (n=87)	69.0	75.9	11.5	77.0	26.4	65.5
<i>P. mirabilis</i>						
Canadá (n=3)	33.3	77.7	33.3	100.0	0.0	77.7
Europa (n=49)	59.2	61.2	24.5	93.9	8.2	61.2
Latinoamérica (n=44)	84.1	90.9	47.7	97.7	18.2	79.5
Estados Unidos (n=29)	24.1	34.5	3.4	100.0	6.9	34.5
Sudeste asiático (n=2)	50.0	100.0	0.0	100.0	0.0	50.0
<i>Salmonella spp.</i>						
Canadá (n=0)	-	-	-	-	-	-
Europa (n=1)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Latinoamérica (n=3)	66.7	66.7	33.3	33.3	66.7	0.0
Estados Unidos (n=0)	-	-	-	-	-	-
Sudeste asiático (n=3)	33.3	33.3	0.0	100.0	66.7	66.7

TMP-SMZ: Trimetoprim-sulfametoxazol.

1.9.5. Factores clínicos asociados a la presencia de BLEEs

Las formas clínicas de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEEs varían según el contexto epidemiológico. Las infecciones de carácter endémico y las aparecidas fuera del entorno de las UCIs se localizan preferentemente en el tracto urinario (Lucet *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 1998). En el curso del brote epidémico nosocomial por *K. pneumoniae* en el hospital de Bellvitge pudieron observarse diferencias significativas en la presencia de las muestras clínicas de los pacientes según estuvieran en UCIs o no: en las UCIs predominaron notablemente la bacteriemia originada en el catéter vascular y la infección del tracto respiratorio, mientras que en las plantas de hospitalización fueron prevalentes la ITU y la infección de localización quirúrgica (tabla 15) (Peña *et al.*, 1998). Así en las UCIs, algunos aislados podrían mostrar una particular tendencia a originar bacteriemias en el catéter intravascular (Peña *et al.*, 2001a). Globalmente, un 40-60% de los pacientes afectados en UCIs son únicamente portadores rectales. Entre los pacientes que desarrollan muestras clínicas positivas, más del 60% tienen auténticas infecciones y en la mayoría puede detectarse previamente el estado de portador rectal. La mortalidad cruda de este grupo de pacientes con infección suele ser elevada, superior al 30% (Lucet *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 1998).

Tabla 15: Procedencia de muestras clínicas positivas para *K. pneumoniae* productor de BLEEs en el curso de un brote epidémico nosocomial (Peña *et al.*, 1998)

Ingreso en:	Localización de la infección				
	Bacteriemia	Catéter	Tracto respiratorio	ITU	Herida quirúrgica
UCIs	40%	36%	26%	23%	18%
No UCIs	16%	0%	3%	55%	34%

1.9.6. Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEEs

Las BLEEs confieren resistencia a todas las penicilinas, incluyendo las amino, carboxi y ureidopenicilinas, y a todas las cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación, con la excepción de cefamicinas. Los únicos betalactámicos que mantienen actividad frente a las enterobacterias productoras de estas enzimas son, además de cefamicinas, como cefoxitina, las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas y carbapenemas.

Las cefamicinas son frecuentemente activas y podrían ser usadas, pero estos antibióticos desarrollan fácilmente resistencia por alteraciones de la permeabilidad, por lo que no se recomiendan. Hay pocos estudios acerca de la posibilidad de uso de las cefamicinas como tratamiento de estas infecciones. En aquellos casos en los que se ha usado cefoxitina, la infección vuelve a aparecer, pero con aislados resistentes a cefoxitina, es decir, se seleccionan mutantes resistentes de permeabilidad (Pangon *et al.*, 1989; Martínez-Martínez *et al.*, 1996). Es una posibilidad cuando no existe ninguna otra alternativa.

En cuanto al tratamiento con cefepime, una cefalosporina de cuarta generación, en los casos en los que se ha usado se ha producido fallo terapéutico (Paterson *et al.*, 2001b).

Otra opción terapéutica es el uso de combinaciones de penicilinas con inhibidores de betalactamasas: su uso dependerá de las CMIs que presente el microorganismo a tratar, ya que se han descrito casos de resistencia por hiperproducción de BLEEs y por producción conjunta de una BLEE y una betalactamasa tipo TEM-1. El papel de los betalactámicos asociados a inhibidores de las betalactamasas (piperacilina-tazobactam o amoxicilina-ácido clavulánico) ha sido objeto

de controversia. Un estudio multicéntrico realizado en Italia sugiere que la actividad *in vitro* de amoxicilina-ácido clavulánico y de piperacilina-tazobactam son comparables y muy superiores a la de amoxicilina-sulbactam frente a *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEEs, con un porcentaje muy elevado de los aislados analizados en el rango de la sensibilidad (Spanu *et al.*, 2002). Por el contrario, otro importante estudio de mayor ámbito sugiere que la producción de BLEEs reduce de forma notable la efectividad de estas combinaciones (Johnson *et al.*, 2002). Su eficacia es menor que la de los carbapenémicos si no se utilizan a dosis muy elevadas (Rice *et al.*, 1991). Se ha comprobado su ineficacia clínica en aquellos casos producidos por aislados que muestran resistencia *in vitro* (Rice *et al.*, 1996a). En un extenso brote epidémico nosocomial producido por un clon de *K. pneumoniae*, el 55% de los aislamientos fueron resistentes a piperacilina-tazobactam y el 35% a amoxicilina-ácido clavulánico, siendo, por tanto, variable la expresión fenotípica. La prudencia aconseja no utilizar estos antibióticos empíricamente hasta no conocer el resultado del antibiograma y reservar su empleo, en todo caso, para las infecciones no graves con sensibilidad *in vitro* comprobada.

La combinación de una cefalosporina de tercera generación con un inhibidor de betalactamasas se ha utilizado con éxito en algunos casos para el tratamiento de sepsis causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEEs. Sin embargo, el uso de cefalosporinas de tercera generación en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEEs está desaconsejado aún cuando las CMIs de estos antibióticos se incluyan dentro del intervalo de sensibilidad, ya que se han descrito fracasos terapéuticos. El índice de éstos es más elevado en pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* productor de BLEEs tratados con oximino-cefalosporinas con CMIs incluidas en el rango de sensibilidad, como muestra la tabla 16 (Paterson *et al.*, 2001b). En este trabajo se recoge la experiencia de 32 pacientes con infecciones graves

producidas por *K. pneumoniae* productor de BLEEs que habían recibido tratamiento con cefalosporinas de amplio espectro. Todos los pacientes experimentaron un fracaso terapéutico cuando las CMI de las cefalosporinas estaban en el rango de sensibilidad intermedia, pero, más importante, el 50% de los pacientes para los que las CMI de las cefalosporinas estaban dentro del rango de sensibilidad, experimentaron también un fracaso terapéutico.

Esto genera necesidad de una correcta detección de las BLEEs por parte de los laboratorios de Microbiología Clínica y señala que las cefalosporinas de amplio espectro son un tratamiento inadecuado para las infecciones graves producidas por bacilos gramnegativos productores de BLEEs.

Tabla 16: Evolución de infecciones graves por *K. pneumoniae* productor de BLEEs en pacientes tratados con cefalosporinas (Paterson *et al.*, 2001b)

CMI (µg/ml)	Fallo clínico	Mortalidad
8	6/6 (100%)	2/6 (33%)
4	2/3 (67%)	0/3 (0%)
2	1/3 (33%)	0/3 (0%)
≤ 1	3/11 (27%)	2 /11 (18%)

Los carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem) son los antibióticos betalactámicos más activos frente a enterobacterias productoras de BLEEs (Johnson *et al.*, 2002). Estos antibióticos son muy resistentes a la hidrólisis por estas betalactamasas. Aún así, el uso de antibióticos carbapenémicos debe ser moderado puesto que se ha descrito aumento de la resistencia a estos antibióticos en otras especies bacterianas como *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en aquellos hospitales donde se ha usado extensamente para el tratamiento de infecciones, como el hospital de Bellvitge (Corbella *et al.*, 2000). Estos hallazgos nos

alertan de la necesidad del uso racional de los antibióticos carbapenémicos para prevenir la aparición de nuevos microorganismos multirresistentes.

Aunque los carbapenémicos son los antibióticos de elección, hay que decir que el uso abusivo de estos ha producido la aparición de casos de infecciones en pacientes ingresados en unidades de críticos, producidas por aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEEs, y de betalactamasas plasmídicas de clase C, resistentes a los mismos (Ahmad *et al.*, 1999). Además, Martínez-Martínez *et al.* (1999) ha demostrado, en aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de BLEEs o de enzimas tipo AmpC mediadas por plásmidos, que la ausencia de determinadas porinas contribuye a disminuir la sensibilidad a carbapenemas.

En cuanto al uso de antibióticos no betalactámicos para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEEs, es preciso tener en cuenta la frecuente coexistencia de otros determinantes genéticos que confieren resistencia a otros antimicrobianos, como aminoglucósidos o cotrimoxazol. En muchos casos la resistencia se transfiere conjuntamente con el gen responsable de la BLEE en el mismo transposón, integrón o plásmido.

Cuando los microorganismos productores de BLEEs son sensibles a fluorquinolonas, éstos son antibióticos útiles en su tratamiento (Karas *et al.*, 1996). Sin embargo, hay estudios que demuestran que hasta un 55% de estos aislados son resistentes a las mismas (Lautenbach *et al.*, 2001b).

Los estudios del GEIH en España y el estudio internacional SENTRY también ofrecen resultados de sensibilidad a distintos antibióticos en aislados productores de BLEEs como muestran las tablas 17 y 18, respectivamente.

1. Introducción

Tabla 17: Sensibilidad de aislados productores de BLEEs a distintos antimicrobianos (Hernández *et al.*, 2003a)

BLEE	% de sensibilidad							
	Imipenem	Cefoxitina	Amoxicilina-clavulánico	Piperacilina-tazobactam	Ampicilina-sulbactam	Gentamicina	Amikacina	Ciprofloxacino
TEM	99.6	79	82	95	69	45	68	32
SHV	100	79	88	88	59	66	86	85
TEM y SHV	100	75	78	84	47	71	69	76
no-TEM/no-SHV	100	76	97	89	39	55	95	71

Tabla 18: Resultados de sensibilidad a distintos antibióticos estudiados para los aislados productores de BLEEs (Winokur *et al.*, 2001)

Organismo, antibiótico testado	Canadá			Europa			Latinoamérica			Estados Unidos			Sudeste asiático		
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% sens.	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% sens.	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% sens.	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% sens.	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% sens.
<i>K. pneumoniae</i>															
Imipenem	0.5	2	100.0	0.25	1	100.0	0.25	1	99.5	0.25	0.5	99.3	0.25	1	99.3
Cefepime	0.5	4	94.4	4	>16	63.6	16	>16	49.6	1	16	87.6	2	>16	76.7
Ceftidima	2	>16	72.2	>16	>16	14.5	>16	>16	27.0	>16	>16	39.9	>16	>16	22.5
Aztreonam	4	>16	55.6	>16	>16	16.4	>16	>16	20.9	>16	>16	43.8	>16	>16	18.1
Ceftriaxona	1	>32	72.2	>32	>32	23.8	>32	>32	17.9	8	32	59.5	32	>32	17.4
Cefoxitina	16	>32	38.9	4	16	84.6	8	>32	71.0	8	>32	51.6	16	>32	43.5
Ciprofloxacino	0.25	>2	77.8	0.25	>2	75.7	0.25	>2	76.9	1	>2	65.4	1	>2	55.8
Tobramicina	1	>16	83.3	16	>16	19.2	16	>16	17.9	8	>16	45.8	16	>16	27.5
Gentamicina	1	>16	83.3	16	>16	35.0	16	>16	33.7	4	>16	51.0	16	>16	41.3
Amikacina	2	4	94.4	16	32	70.6	16	>32	60.9	2	16	92.2	8	32	84.1
<i>E. coli</i>															
Imipenem	0.25	0.5	100.0	0.25	1	100.0	0.25	0.5	99.4	0.25	0.5	100.0	0.25	0.5	100.0
Cefepime	0.25	8	94.1	0.5	>16	83.2	4	>16	59.0	0.25	4	94.6	2	>16	71.3
Ceftidima	4	>16	80.4	4	>16	63.4	16	>16	46.2	4	>16	70.5	4	>16	59.8
Aztreonam	2	16	86.3	4	>16	59.9	>16	>16	32.9	4	>16	69.9	8	>16	57.5
Ceftriaxona	1	32	82.4	4	>32	66.8	>32	>32	28.9	1	32	78.9	16	>32	42.5
Cefoxitina	16	>32	39.2	16	>32	47.5	8	>32	54.9	16	>32	37.3	32	>32	25.3
Ciprofloxacino	0.03	>2	86.3	0.25	>2	65.8	>2	>2	47.4	0.12	>2	80.7	>2	>2	34.5
Tobramicina	2	8	86.3	2	>16	67.8	>16	>16	31.2	2	16	78.3	8	>16	31.0
Gentamicina	1	>8	84.3	1	>16	74.3	16	>16	42.2	1	>8	78.9	8	>16	24.1
Amikacina	4	8	96.1	4	32	89.1	8	>32	69.9	4	8	95.2	2	32	86.5
<i>P. mirabilis</i>															
Imipenem				2	4	95.9	2	4	100.0	2	4	96.6			
Cefepime				4	>16	65.3	>16	>16	22.7	2	>16	82.8			
Ceftidima				8	>16	55.1	2	16	84.1	8	>16	62.1			
Aztreonam				1	>16	79.6	2	>16	68.2	8	>16	58.6			
Ceftriaxona				16	>32	42.9	>32	>32	18.2	1	>32	72.4			
Cefoxitina				8	>32	53.1	8	16	88.6	4	>32	79.3			
Ciprofloxacino				2	>2	38.8	>2	>2	11.4	0.12	>2	75.5			
Tobramicina				8	16	40.8	16	>16	15.9	2	16	75.9			
Gentamicina				16	>16	38.8	>16	>16	9.1	4	>16	65.5			
Amikacina				4	>32	81.6	8	>32	68.2	4	8	96.6			

1.9.7. Prevención y control

Las medidas de prevención y control de las infecciones por microorganismos productores de BLEEs están en consonancia con los factores de riesgo y circunstancias epidemiológicas que favorecen el desarrollo y diseminación de los mismos. En algunas ocasiones las bacterias patógenas multirresistentes se presentan en forma epidémica afectando de forma rápida a los pacientes que ingresan, mientras que en otras se seleccionan después de muchos días de estancia y tras diferentes tratamientos antibióticos. Algunas de estas bacterias están presentes en los pacientes en el momento del ingreso, mientras que otras se adquieren durante la estancia en el servicio. Asimismo, existen bacterias multirresistentes que se presentan en forma de colonización.

Los factores que se han asociado con el desarrollo de multirresistencia son numerosos y entre ellos destacan, como ya hemos visto, la utilización previa de antibióticos, la estancia prolongada en UCI, la intubación traqueal, la presencia de catéteres venosos, el sondaje vesical, las reintervenciones quirúrgicas, la edad avanzada, la ventilación mecánica y la proximidad con otros pacientes colonizados o infectados (Meyers *et al.*, 1993). Por otro lado, la inmunosupresión, los pacientes que reciben quimioterapia anticáncer y aquellos pacientes que están ingresados en unidades de cuidados intensivos parecen tener un riesgo particular a la infección por bacterias gramnegativas productoras de BLEEs (Siu *et al.*, 1999). El principal mecanismo de transmisión son las manos del personal sanitario, que facilitan la diseminación durante las múltiples maniobras que se realizan a diario para el tratamiento de estos pacientes.

La observación de un agrupamiento de casos o de un brote epidémico requiere la puesta en marcha de un sistema de aislamiento de

los pacientes y de un conjunto de medidas preventivas para evitar la diseminación del microorganismo entre el resto de pacientes ingresados. Estas medidas son conocidas como aislamiento de contacto (Peña *et al.*, 1998; Paterson y Yu, 1999; Lautenbach *et al.*, 2001a). La eficacia de estas medidas depende de la rapidez con la que se indica el aislamiento que, a su vez, depende de la rápida identificación de las bacterias, así como del adecuado cumplimiento de las medidas instauradas (Álvarez-Lerma *et al.*, 2002). Algunas de estas medidas son:

- Ubicación del paciente: Habitación individual con lavamanos. La puerta puede permanecer abierta.
- Uso de guantes (no estériles) durante la manipulación del paciente o del material contaminado. Lavado de manos higiénico antes de entrar en la habitación, lavado de manos con antisépticos antes de salir de la habitación.
- Necesario el uso de bata para todo personal o visitante que esté en contacto directo con el paciente o con superficies u objetos potencialmente contaminados. Quitarse la bata antes de salir de la habitación.
- Necesario el uso de mascarilla durante los procedimientos que puedan generar salpicaduras o nebulizaciones de sangre, fluidos corporales, secreciones y excreciones.
- El material clínico reutilizable (esfingomanómetros, fonendoscopios, termómetro, etc.) y el material para la higiene del paciente, son de uso exclusivo. Al alta del paciente este material debe limpiarse, desinfectarse y/o esterilizarse. El material de un solo uso debe eliminarse.
- Los residuos sanitarios se gestionarán siguiendo la normativa legal vigente, el Decreto 27/1999, de gestión de residuos sanitarios.

- Limitar el traslado del paciente fuera de la habitación a las situaciones estrictamente necesarias. Avisar al servicio receptor sobre el requerimiento de medidas de aislamiento.
- Autorizar el menor número posible de visitantes e informarles sobre las medidas de aislamiento a adoptar.
- El material de limpieza será exclusivo para la habitación en aislamiento. El personal de limpieza seguirá las precauciones de este tipo de aislamiento. La limpieza de la habitación se realizará, como mínimo, dos veces al día. Se limpiarán y desinfectarán todas las superficies con una asociación de aldehídos al 1%.
- Para la desinfección final al alta del paciente se retirarán todos los objetos reutilizables y de un solo uso, se aplicará una asociación de aldehídos al 1% en todas las superficies de la habitación y se cerrará la habitación durante 2 horas posteriores a la limpieza.

El otro nivel de intervención tiene que ver con la política de utilización de antimicrobianos. La presión antibiótica selectiva, sobretudo con cefalosporinas, se ha señalado como factor desencadenante de brotes epidémicos producidos por *K. pneumoniae* productor de BLEEs y del mantenimiento de situaciones de endemia elevada (Peña *et al.*, 1998). Sin embargo, en ambientes en los que se detecta endémicamente la presencia de bacilos gramnegativos productores de BLEEs, el papel selectivo de las cefalosporinas puede tener menor importancia, siendo más relevante la presión selectiva antibiótica global (Asensio *et al.*, 2000) o la que ejercen otros grupos de antibióticos como las quinolonas.

En este sentido es muy interesante el artículo publicado por Bermejo sobre un estudio de casos y controles en el hospital de Rosario. Observaron que los factores de riesgo independientemente relacionados con la aparición de infección por *K. pneumoniae* productor de BLEEs

fueron la adquisición nosocomial y el uso previo de ciprofloxacino cuando se administró en el mismo ingreso en que se obtuvo el aislamiento (Bermejo *et al.*, 2003).

Obviamente, habrá que evitar en lo posible la utilización de cefalosporinas en la comunidad y también los picos de consumo en los centros hospitalarios, ya que ello se ha relacionado claramente con la aparición de brotes nosocomiales (Paterson y Yu, 1999).

Estas medidas no son necesarias en los casos detectados esporádicamente o de naturaleza policlonal. Así, ante la aparición de varios casos es útil proceder al estudio genotípico de los aislados para determinar su relación epidemiológica y en consecuencia la puesta en marcha de estas medidas (Decré *et al.*, 1998).

La necesidad de implantar medidas adicionales al refuerzo de las medidas de barrera ante la detección de un brote epidémico por microorganismos productores de BLEEs ha sido cuestionada, ya que algunos autores han controlado estos brotes aplicando esta única medida (Lucet *et al.*, 1996). No obstante, la mayoría de los brotes nosocomiales han sido controlados incorporando a las medidas de intervención una restricción en el consumo de cefalosporinas (Peña *et al.*, 1998; Rahal *et al.*, 1998). Aunque en estos estudios la aplicación simultánea de las medidas epidemiológicas no permite extraer conclusiones estrictas sobre la aportación de cada una de ellas, existen pocas dudas respecto a la importancia de la restricción del consumo de oximiino-cefalosporinas (Peña *et al.*, 1998). Ello es especialmente significativo en el caso de brotes extensos, delimitados a unas áreas determinadas como las UCIs, asociados a un consumo previo elevado de tales antibióticos. La eficacia de las medidas de barrera para evitar la diseminación se ve incrementada al disminuir la presión antibiótica selectiva.

La detección precoz de casos es un aspecto decisivo para frenar la diseminación de las cepas epidémicas, por lo que se recomienda poner en

marcha un sistema de vigilancia prospectiva de portadores (frotis rectal, cutáneo y faríngeo), especialmente en UCIs.

Un aspecto adicional a tener en cuenta en la lucha epidemiológica frente a estas infecciones es el papel desempeñado por las residencias geriátricas o centros de larga estancia (Wiener *et al.*, 1999). En España no existe ningún dato al respecto, aunque probablemente la situación no sea muy diferente de lo descrito en otros países.

La eficacia de todas estas medidas epidemiológicas para controlar estos brotes epidémicos es muy variable y depende del contexto concreto y las características epidemiológicas del brote. En algunos casos tiene que recurrirse a la utilización de una descontaminación intestinal selectiva para disminuir el reservorio de los pacientes y amplificar así la eficacia de las otras medidas (Meyers *et al.*, 1993). Otros autores, sin embargo, sólo han tenido que cambiar la política antibiótica para conseguir controlar estas infecciones, cambiando el uso de ceftazidima por piperacilina-tazobactam (Rice *et al.*, 1996b; Paterson *et al.*, 2000a). Otros autores afirman que la restricción del uso de ceftazidima sólo no es suficiente para controlar repetidas infecciones por microorganismos productores de BLEEs (Rahal *et al.*, 1998).

1.9.8. Métodos fenotípicos de detección de la presencia de BLEEs

Hay dos importantes razones para detectar en los laboratorios microorganismos productores de BLEEs, por un lado, la existencia de fracasos terapéuticos cuando se han usado cefalosporinas para el tratamiento de infecciones graves producidas por éstos, incluso cuando el organismo es aparentemente sensible a esas cefalosporinas usadas, y por otro, porque la presencia de los mismos supone un serio problema de

control de infección; y, sin embargo, una rápida intervención es muy eficaz en la desaparición del brote.

Las BLEEs representan uno de los mecanismos de resistencia más difíciles de detectar por los laboratorios de Microbiología Clínica. Debido a las diferencias en los perfiles de sustrato de las diferentes BLEEs y al efecto inóculo con las pruebas standard de sensibilidad, los aislados productores pueden aparecer como falsamente sensibles a muchas de las cefalosporinas (Paterson y Yu, 1999). Es común encontrar resultados ilógicos o inconsistentes cuando microorganismos productores de BLEEs son estudiados por ensayos de sensibilidad antimicrobiana. Por ejemplo, un aislamiento que produce una enzima TEM o SHV de espectro extendido puede aparecer como resistente o intermedio a ceftazidima pero sensible a cefotaxima y aztreonam; y sin embargo, algunas betalactamasas de espectro extendido pueden aparecer como sensibles a ceftazidima pero resistentes a cefotaxima. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ha establecido unas normas para la detección de enzimas tipo BLEE en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, basadas en unos puntos de corte que indican la disminución de sensibilidad a los fármacos habitualmente hidrolizados por estas enzimas, y ha establecido un método de confirmación basado en el hecho de la inhibición de estas enzimas por ácido clavulánico.

Las técnicas fenotípicas de detección emplean un inhibidor de betalactamasas, usualmente ácido clavulánico, en combinación con una oximiino-cefalosporina, como ceftazidima o cefotaxima. En estos métodos el ácido clavulánico inhibe a la BLEE, reduciendo el nivel de resistencia a la cefalosporina.

1.9.8.1. Métodos de difusión con disco

Son procedimientos basados en colocar discos de papel de filtro que contienen una cantidad conocida de antibiótico en la superficie de una placa de medio de cultivo previamente inoculada con el microorganismo problema. Habitualmente los discos tienen 6 mm de diámetro y se pueden colocar tantos como antibióticos se quieran estudiar, respetando siempre un número de discos por placa que permita leer los halos de inhibición sin que interfieran unos con otros. Cuando el disco entra en contacto con el medio de cultivo absorbe agua de éste e inmediatamente el antibiótico comienza a difundir de forma radial, formando un gradiente de concentración en el que ésta es, en cada punto, inversamente proporcional a la distancia hasta el borde del disco. En aquellas zonas donde la concentración alcance un valor suficiente, el microorganismo previamente inoculado no podrá crecer, y tras un periodo de incubación adecuado aparecerá un halo de inhibición de crecimiento alrededor de los discos. El diámetro del halo de inhibición indica el grado de sensibilidad del microorganismo al correspondiente antibiótico.

Este método no permite establecer la CMI al menos de forma directa. El NCCLS ha establecido los puntos de corte en milímetros de los halos de inhibición de los antibióticos habitualmente usados en clínica que permiten establecer las categorías clínicas de sensible, intermedio y resistente.

Las ventajas del método de difusión con discos son su sencillez, flexibilidad y bajo coste, razones que han asegurado su permanencia durante años en los laboratorios. Si el método se estandariza correctamente su fiabilidad es muy elevada. Por otra parte, los halos de inhibición se pueden medir con menos de 0,5 mm de error y con ± 2 mm de reproductibilidad.

Algunas de las pruebas para detectar BLEEs usan métodos de difusión con disco. Uno de los primeros métodos descritos fue el de la doble difusión con disco descrito por Jarlier *et al.* (1988) como se aprecia en la figura 19A. Se realiza mediante la difusión en agar utilizando una placa de Mueller-Hinton inoculada con una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0.5 de McFarland. Sobre ella se colocan discos con carga estándar (30 µg) de cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam dispuestos a una distancia de 30 mm de un disco central de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg) como fuente de ácido clavulánico. Se considera que hay presencia de una BLEE cuando se observa un halo reducido para cada uno de las cefalosporinas o aztreonam (diámetros iguales o inferiores a 27, 22, 25 y 27 mm respectivamente), junto con sinergia o ampliación del halo de inhibición en alguna de las cefalosporinas o de aztreonam en la zona cercana al ácido clavulánico.



Figura 19A: Resultado de la doble difusión con disco, según la metodología propuesta por Jarlier *et al.* (1988), para un aislado productor de BLEEs

Este es un método fiable para detectar BLEEs, sin embargo, se ha sugerido que la sensibilidad de la prueba aumenta reduciendo la distancia entre discos a 20 mm (Tzelepi *et al.*, 2000). También se ha sugerido el uso de cefpodoxima en la técnica de doble difusión con disco (Coudron

et al., 1997; Thomson y Sanders, 1997). Una alternativa puede ser la adición de 4 µg/ml de ácido clavulánico en la placa de Mueller-Hinton para potenciar la zona de inhibición de crecimiento de los discos que contengan las cefalosprinas con respecto a placas que no lleven ácido clavulánico (Ho *et al.*, 1998). Un método similar es el empleo de 20 µg de sulbactam junto con discos de oxiiimino-cefalosporinas. Un incremento de 5 mm en la zona de inhibición de la cefalosporina cuando hay sulbactam respecto a cuando no lo hay se considera un resultado positivo. Aunque un alto número de BLEEs son detectadas por este método, un número significativo de aislados no lo son, porque cepas productoras de AmpC también muestran incremento del diámetro de la zona de inhibición con la adición de sulbactam (Jacoby y Han, 1996).

El NCCLS (NCCLS, 2003a) recomienda el método de difusión con discos, en placas de Mueller-Hinton inoculadas con aislados al 0.5 de McFarland, de cefpodoxima (10µg), cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1µg), ceftazidima (30µg), ceftazidima más ácido clavulánico (30/10µg), cefotaxima (30µg) y cefotaxima más ácido clavulánico (30/10µg). La presencia de BLEEs se sospecha cuando se obtienen halos de inhibición, para los discos de cefpodoxima, ceftazidima o cefotaxima, iguales o inferiores a 17, 22 y 27 mm, respectivamente. La confirmación se realiza mediante la demostración de sinergia: se requieren incrementos de 5 mm o más del halo de inhibición con los discos que contienen la cefalosporina y ácido clavulánico, respecto de la cefalosporina sola (figura 19B).

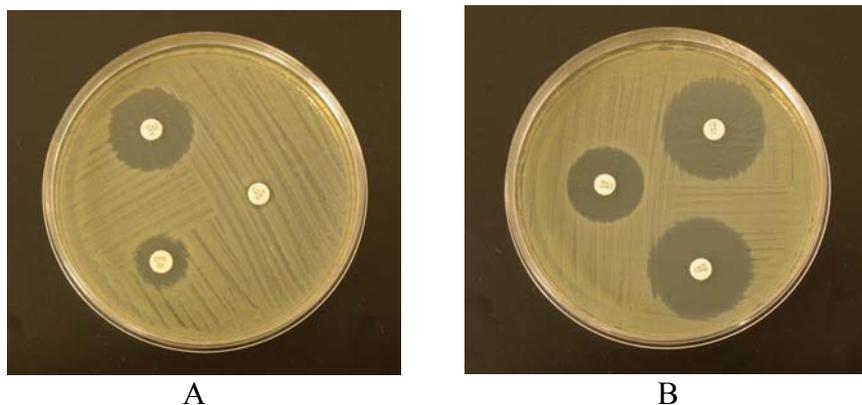


Figura 19B: Comparación de diámetros entre discos que contienen sólo a la cefalosporina (A) y los que contienen cefalosporina más ácido clavulánico (B) en un aislado productor de BLEEs

1.9.8.2. Prueba de Epsilon (E-test)

Se basa en el mismo fundamento de la difusión con disco, pero en este caso se utilizan tiras de plástico no poroso de 5 cm de largo y 5 mm de ancho en lugar de discos. La tira contiene un gradiente de concentraciones de un antibiótico, una de las superficies de la tira tiene marcadas las distintas concentraciones del gradiente. Tras aplicar la tira a una placa previamente inoculada e incubar ésta adecuadamente, la intersección de la elipse de crecimiento del microorganismo con la tira permite una determinación directa de la CMI. Infinidad de estudios han demostrado que para la mayoría de los microorganismos de interés clínico los valores de CMI obtenidos con este método son similares (en ± 1 dilución) a los que se obtienen con los métodos convencionales de dilución (Baker *et al.*, 1991).

Las tiras de E-test diseñadas para la detección de microorganismos productores de BLEEs se encuentran divididas en dos gradientes: una mitad consta de una concentración decreciente de ceftazidima desde 32 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,50 $\mu\text{g/ml}$; la otra mitad de la tira contiene ceftazidima en concentraciones decrecientes desde 4 $\mu\text{g/ml}$

hasta 0,064 µg/ml más 4 µg/ml de ácido clavulánico en concentración fija. Se considera positiva la sinergia con ácido clavulánico cuando se observa una disminución de tres o más diluciones de la CMI de ceftazidima cuando se añade ácido clavulánico. Cuando el aislado sospechoso de producir BLEEs tiene poca acción sobre ceftazidima, y más sobre cefotaxima es más útil el uso de E-test de cefotaxima en concentración decreciente de 16 hasta 0,25 µg/ml y la otra mitad con cefotaxima en concentración decreciente desde 1 hasta 0,016 µg/ml más 4 µg/ml de ácido clavulánico en concentración fija, y considerando positiva la sinergia con ácido clavulánico cuando se observa una disminución de tres o más diluciones de la CMI de cefotaxima cuando se añade ácido clavulánico (figura 19C).



Figura 19C: Resultado del E-test de cefotaxima (CT) y cefotaxima más ácido clavulánico (CTL) en un aislado productor de una BLEE tipo CTX-M9

1.9.8.3. Métodos automatizados

Actualmente es muy común en los laboratorios de Microbiología Clínica el uso de métodos automatizados comerciales de microdilución

en caldo, integrados en sistemas semiautomáticos de incubación, lectura e interpretación de resultados. En la mayoría de los casos estos sistemas preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado, que es inoculado, y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo, se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Los valores de CMI reales de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros

Dos de estos métodos automatizados que son capaces de diferenciar aislados productores de BLEEs son VITEK 2 (bioMérieux, Francia) y WIDER (Francisco Soria Melguizo, S.A., España).

1.9.9. Métodos bioquímicos y moleculares para la caracterización de BLEEs

Además de la detección de la presencia de una BLEE en un aislado clínico de una enterobacteria, puede ser importante la caracterización molecular de la misma, identificando el tipo de BLEE del que se trata (TEM, SHV, CTX-M...), e, incluso, ante la presencia de un brote, determinar la relación de clonalidad entre los distintos aislamientos obtenidos. Para ello en los laboratorios de Microbiología se pueden desarrollar varias técnicas de identificación bioquímica y molecular basadas, unas en características propias de la betalactamasa como proteína, otras en la detección de los genes responsables de su codificación plasmídica, y en el estudio de clonalidad.

Por tanto, estos métodos se aplican una vez confirmada la presencia de la BLEE en el aislado correspondiente y sirven para caracterizar dicha enzima.

Los métodos bioquímicos incluyen el isoelectroenfoque, el análisis del perfil de substrato, la cinética enzimática y la determinación de los IC₅₀ para diferentes inhibidores de betalactamasas.

Entre los métodos moleculares destacan las sondas de DNA, las técnicas de amplificación y la secuenciación.

1.9.9.1. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) permite conocer el punto isoeléctrico (pI) de la proteína y era de gran utilidad cuando existían pocas BLEEs descritas. En la actualidad se utiliza poco debido a la descripción de diferentes BLEEs que comparten idéntico pI. Sin embargo, es muy útil si se combina con el análisis del fenotipo de sensibilidad ya que puede orientar hacia el tipo de BLEE para un análisis posterior del perfil de substrato o el estudio molecular.

En las tablas 3 a 8 se han recogido los valores de pI conocidos para las distintas BLEEs tipo CTX-M, OXA, SHV, TEM y otras.

1.9.9.2. Perfil de substrato

Se determina por medio de un espectrofotómetro la tasa de hidrólisis (V_{máx}) relativa de diferentes substratos betalactámicos, generalmente a una concentración elevada (1 mM), en comparación con un substrato estándar (bencilpenicilina, cefaloridina o nitrocefín).

1.9.9.3. Cinética enzimática

Consiste en definir el mecanismo de actuación del enzima mediante el estudio cinético de la constante de afinidad (K_m) y la eficiencia relativa de hidrólisis ($V_{m\acute{a}x}/K_m$)

1.9.9.4. Determinación de los IC_{50}

Es la concentración de inhibidor de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam) que reduce la actividad hidrolítica de la BLEE cuando se compara con un control.

1.9.9.5. Sondas de DNA

Permiten realizar cribados en colecciones amplias de aislados, sobretodo si se combina con técnicas de hibridación directa sobre colonia. Tienen el inconveniente de precisar diferentes sondas dependiendo de la sospecha del tipo o grupo de BLEE. Por este motivo la detección es solo presuntiva, puede ser positiva en los casos en los que el aislado presente más de una betalactamasa e incluso en situaciones en las que no exista una BLEE. Ejemplos de ello sería el resultado positivo con una sonda TEM en una cepa de *E. coli* que presenta una betalactamasa de amplio espectro TEM-1 además de la BLEE o el resultado positivo con una sonda SHV en *K. pneumoniae* ya que la práctica totalidad producen una SHV-1.

**1.9.9.6. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos:
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Por su fácil realización son las que más éxito han tenido como técnicas de caracterización molecular. Aunque tienen los mismos inconvenientes que las sondas de DNA, a diferencia de éstas, permite la posterior secuenciación del producto de PCR.

1.9.9.7. Electroforesis en campo pulsado

La principal utilidad de este procedimiento reside en la posibilidad de realizar un estudio de clonalidad.

2. OBJETIVOS

La aparición de las betalactamasas de espectro extendido ha sido uno de los principales problemas de resistencia a los antibióticos betalactámicos durante las dos últimas décadas.

La codificación plasmídica de este tipo de resistencia otorga a estas enzimas algunas características importantes como la facilidad de transmisión por conjugación entre diversas especies bacterianas o la asociación de resistencia a otros grupos de antibióticos, por lo que nos encontramos con microorganismos multirresistentes. Por tanto, las betalactamasas de espectro extendido constituyen un problema sanitario de gran trascendencia clínica, ya que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por microorganismos productores de estas enzimas son muy limitadas.

Para evitar fracasos terapéuticos es necesario que los laboratorios de Microbiología Clínica estén capacitados para detectar estas enzimas. El National Committee for Clinical Laboratory Standards ha establecido las normas para la detección *in vitro* de estas betalactamasas en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, basadas en unos puntos de corte que indican la disminución de sensibilidad a los fármacos hidrolizados por estas enzimas y una confirmación basada en el hecho de la inhibición del enzima por el ácido clavulánico. Se han evaluado distintos métodos para la detección de betalactamasas de espectro extendido: método de aproximación de discos, prueba de Epsilon y sistemas de interpretación automatizada del antibiograma como VITEK o WIDER, pero no se han comparado entre sí los distintos métodos con los mismos aislados clínicos. Su análisis global podría modificar las conclusiones individuales que hasta la fecha se han publicado con los diferentes sistemas por separado.

Además, es posible que la información sobre la presencia de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productores de betalactamasas de espectro extendido en España esté distorsionada

debido al uso frecuente de sistemas automatizados para su detección, que difieren del método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Por tanto, cada vez es más importante conocer la distribución y el tipo de betalactamasas de espectro extendido presentes en nuestro medio, para así poder utilizar el mejor procedimiento diagnóstico. Así mismo es importante determinar la posible diseminación clonal de los aislados productores de estas betalactamasas, fundamentalmente en el medio hospitalario.

Por todo lo anteriormente expuesto nos hemos planteado los siguientes objetivos en nuestro trabajo:

1. Detectar en nuestro medio la presencia de microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido en las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, mediante el método de difusión con discos aconsejado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards.
2. Determinar las características moleculares que definen estas enzimas en nuestro medio.
3. Conocer la distribución demográfica de estos aislados, tanto a nivel hospitalario como extrahospitalario.
4. Realizar un estudio de clonalidad entre los aislados productores de betalactamasas de espectro extendido procedentes, en un periodo concreto de tiempo, de distintos servicios hospitalarios.

5. Comparar diferentes procedimientos de detección de betalactamasas de espectro extendido (difusión con disco, prueba de Epsilon, VITEK 2 y WIDER) con el método de referencia recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards, con el fin de determinar la capacidad de cada uno de ellos para detectar la presencia de betalactamasas de espectro extendido en aislados clínicos de *Escherichia coli*. Esto nos podría permitir conocer y localizar el método de laboratorio más útil en el trabajo diario de un hospital.

6. Estudiar, en nuestros aislados clínicos productores de betalactamasas de espectro extendido, la asociación existente entre la presencia de la betalactamasa y las resistencias a otros antibióticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de los aislados clínicos

Para la realización de este estudio se recogieron un total de 469 aislados bacterianos, de las especies *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, en el servicio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada en el periodo comprendido entre Marzo de 2000 a Noviembre de 2002, y que formaron parte del conjunto de muestras que diariamente se procesan en este laboratorio procedentes tanto de servicios hospitalarios como de Centros de Atención Primaria, pertenecientes a la zona hospitalaria sur de Granada, atendidos en este hospital.

Este proceso de recogida se realizó en dos momentos y con metodología diferente en cada uno de ellos. Desde Marzo de 2000 a Septiembre de 2002 (primer periodo) obtuvimos un total de 415 aislamientos, y en los meses de Octubre y Noviembre de 2002 (segundo periodo), 54 aislados más.

Durante el primer periodo los aislados se obtuvieron de forma aleatoria. Cada día, al azar, se seleccionó una colonia con morfología compatible con enterobacteria, crecida en medio de agar McConkey (bioMérieux) y no identificada previamente. Posteriormente, cada enterobacteria fue identificada mediante pruebas bioquímicas (Murray *et al.*, 2003) usando para ello la galería Api20E (bioMérieux). Se seleccionaron sólo aquellas enterobacterias cuya identificación de especie fue *E. coli*, *K. pneumoniae* o *K. oxytoca*. Cualquier otro resultado de especie fue rechazado. Se obtuvieron así 415 aislados (349 *E. coli*, 46 *K. pneumoniae* y 20 *K. oxytoca*). A todas estas bacterias se les realizó un método fenotípico de difusión con disco para detectar la presencia de BLEEs (método que describiremos más adelante y que denominaremos método A). En función de los resultados obtenidos por el método A, las bacterias se clasificaron en dos grupos, aislados productores de BLEEs

(65 *E. coli*, 6 *K. pneumoniae* y ninguna *K. oxytoca*) y aislados no productores de BLEEs (284 *E. coli*, 40 *K. pneumoniae* y 20 *K. oxytoca*). Una vez clasificados los aislamientos en estos dos grupos los aislados fueron congelados a -20° C hasta que se procedió a completar el estudio fenotípico de la presencia de BLEEs mediante otros métodos que describiremos más adelante.

En el segundo periodo se realizó una recogida sistemática y prospectiva de todas las enterobacterias identificadas en el laboratorio. Se obtuvieron así 744 enterobacterias (357 *E. coli*, 132 *K. pneumoniae*, 43 *K. oxytoca* y 212 enterobacterias pertenecientes a otras especies) correspondientes a 744 sujetos distintos de los que se recibieron muestras en el laboratorio. En este caso la identificación de especie bacteriana se realizó por los procedimientos habituales del laboratorio (método automatizado WIDER). Tras rechazar aquellas especies que no eran objeto de nuestro estudio, en el resto se determinó la presencia de BLEEs mediante el método A y se clasificaron en dos grupos, productoras de BLEEs (50 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* y 2 *K. oxytoca*) y no productoras de BLEEs (307 *E. coli*, 130 *K. pneumoniae* y 41 *K. oxytoca*). Sólo los aislados que fueron productores de BLEEs se conservaron a -20° C hasta que se completó el estudio fenotípico con el resto de métodos que describiremos más adelante.

Por tanto, según lo anteriormente expuesto, el estudio fenotípico completo se realizó en 399 *E. coli*, 48 *K. pneumoniae* y 22 *K. oxytoca*, obteniéndose 125 aislados productores de BLEEs (115 *E. coli*, 8 *K. pneumoniae* y 2 *K. oxytoca*). En este último grupo se realizó análisis bioquímico y molecular del tipo de BLEE presente y en 10 de los aislados intrahospitalarios obtenidos en los meses de Octubre y Noviembre de 2002 se realizó también estudio de clonalidad.

Finalmente, la prevalencia de BLEEs se investigó entre todos los aislados obtenidos en Octubre y Noviembre de 2002.

Se utilizaron como cepas control de todos los métodos fenotípicos realizados cada día las cepas de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *E. coli* ATCC 25922 (Rasheed *et al.*, 2000).

3.2. Detección fenotípica de la presencia de BLEEs

Las técnicas fenotípicas que habitualmente se realizan en los laboratorios de Microbiología Clínica con la finalidad de detectar microorganismos productores de BLEEs, emplean un inhibidor de betalactamasas, usualmente el ácido clavulánico, en combinación con una cefalosporina, como cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima o ceftriaxona o con aztreonam. En estos métodos el ácido clavulánico inhibe a la BLEE, reduciendo el nivel de resistencia a la cefalosporina.

El NCCLS ha establecido cuáles deben ser las normas para la detección de betalactamasas de espectro extendido en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, basadas en unos puntos de corte que indican la disminución de sensibilidad a los fármacos habitualmente hidrolizados por estas enzimas (cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam) y una confirmación basada en la inhibición de las mismas por ácido clavulánico. Como se recoge en las tablas 19 y 20, estas directrices señalan que la producción de BLEEs en estas especies debe sospecharse cuando la CMI de cefpodoxima es ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ o la CMI de ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima o aztreonam es ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ (NCCLS, 2003b); o bien cuando los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de discos de cefpodoxima (10 μg), ceftriaxona (30 μg), ceftazidima (30 μg), cefotaxima (30 μg) o aztreonam (30 μg), sean iguales o inferiores a 17, 25, 22, 27, y 27 mm, respectivamente (NCCLS, 2003a).

Tabla 19: Puntos de corte de CMI en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* productores de BLEEs (NCCLS, 2003b)

Antibiótico	Sospecha de BLEE
Aztreonam	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$
Cefotaxima	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$
Cefpodoxima	$\geq 8 \mu\text{g/ml}$
Ceftazidima	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$
Ceftriaxona	$\geq 2 \mu\text{g/ml}$

Tabla 20: Puntos de corte del halo de inhibición de crecimiento para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* productores de BLEEs en la difusión con disco (NCCLS, 2003a)

Antibiótico	Disco	Sospecha de BLEE
Aztreonam	30 μg	$\leq 27 \text{ mm}$
Cefotaxima	30 μg	$\leq 27 \text{ mm}$
Cefpodoxima	10 μg	$\leq 17 \text{ mm}$
Ceftazidima	30 μg	$\leq 22 \text{ mm}$
Ceftriaxona	30 μg	$\leq 25 \text{ mm}$

Por otra parte, en los laboratorios de Microbiología Clínica está bastante extendido el uso de sistemas automatizados para realizar la identificación y el estudio de sensibilidad de los diferentes microorganismos aislados. Estos sistemas poseen la capacidad de ofrecer al microbiólogo no sólo un estudio *in vitro* del microorganismo, sino también, a través de programas expertos, una interpretación de los resultados obtenidos y una modificación, en su caso, del resultado obtenido *in vitro* consecuencia de mecanismos de resistencia inferidos. Dos de estos métodos automatizados que son capaces de diferenciar aislados productores de BLEEs son VITEK 2 (bioMérieux) y WIDER (Francisco Soria Melguizo, S.A.).

3.2.1. Métodos de difusión con disco

Se realizaron dos procedimientos de difusión con disco para detectar BLEEs en nuestros aislados clínicos.

Por un lado se siguieron las directrices del NCCLS (2003a) siguiendo una metodología previamente descrita (Carter *et al.*, 2000; Steward *et al.*, 2001) y al que hemos denominado método A.

Además, en todos los aislados se realizó otro método de difusión con disco basado en las directrices de Jarlier *et al.* (1988) y las modificaciones propuestas a este método sobre reducción de la distancia entre discos de 30 mm a 20-25 mm para incrementar la posibilidad de observar un efecto sinérgico en caso de que exista hiperproducción del enzima o mutantes de permeabilidad (Tzelepi *et al.*, 2000) y sobre introducción de cefpodoxima en lugar de ceftriaxona, por ser una cefalosporina más lábil a estas enzimas (Coudron *et al.*, 1997). Ambas modificaciones, por tanto, con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la prueba. A éste lo denominamos método B.

Método A: Se realizó la difusión en placas de agar Mueller-Hinton inoculadas con una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0.5 de McFarland. Sobre ellas se colocaron discos de cefpodoxima (CPD) (10 µg) (Oxoid, Reino Unido), cefpodoxima más ácido clavulánico (CD01) (10/1 µg), ceftazidima (CAZ) (30 µg), ceftazidima más ácido clavulánico (CD02) (30/10 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg) y cefotaxima más ácido clavulánico (CD03) (30/10 µg) y fueron incubadas al aire durante 24 horas a 37°C. La presencia de una BLEE se sospechó cuando se obtuvieron halos de inhibición, para los discos de CPD, CAZ o CTX, iguales o inferiores a 17, 22 y 27 mm, respectivamente. La confirmación se realizó mediante la demostración de la sinergia entre la cefalosporina y el ácido clavulánico: se requirieron incrementos ≥ 5 mm del diámetro del

halo de inhibición del crecimiento con los discos que contienen la cefalosporina y ácido clavulánico, respecto de los que contienen la cefalosporina sola.

Éste fue el método considerado de referencia entre los métodos fenotípicos, por ajustarse, desde el punto de vista metodológico, a las directrices del NCCLS. Los resultados obtenidos por este método nos llevaron a clasificar a los aislados en dos grupos, aislados productores de BLEEs, y aislados no productores de BLEEs, como se ha descrito en el apartado 3.1.

Método B: Se realizó la difusión en placas de agar Mueller-Hinton (bioMérieux) inoculadas con una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0.5 de McFarland. Sobre ellas se colocaron discos con carga estándar (30 µg) de cefotaxima (CTX) (Oxoid), ceftazidima (CAZ), y aztreonam (ATM) y discos de cefpodoxima (10 µg) (CPD) dispuestos a una distancia de 20 mm de un disco central de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg) (AMC) (Becton Dickinson, Estados Unidos) como fuente de ácido clavulánico. Fueron incubadas al aire durante 24 horas a 37°C. Se consideró presencia de una BLEE cuando se observó un halo reducido para cada uno de los antibióticos estudiados (diámetros iguales o inferiores a 27, 22, 27 y 17 mm, respectivamente), junto con una sinergia o ampliación del halo de inhibición en alguna de las cefalosporinas o del aztreonam en la zona cercana al ácido clavulánico. No se valoró la presencia de sinergia cuando los diámetros de inhibición del crecimiento fueron superiores a los límites señalados.

En aislamientos de *E. coli* o *K. pneumoniae* con hiperproducción de betalactamasa no inducible AmpC, generalmente de tipo plasmídico, según el grado de hiperproducción de la enzima, los inhibidores de betalactamasas, las cefalosporinas (incluyendo cefoxitina) y aztreonam, pueden ser resistentes. Esta situación puede dar lugar a falsos negativos

en la detección de betalactamasas de espectro extendido cuando la betalactamasa AmpC está presente conjuntamente con una BLEE en el mismo aislado. En estos casos es necesario recurrir a las cefalosporinas de cuarta generación como cefepime, menos afectadas por la betalactamasa hiperproducida, para observar la sinergia. La resistencia a las cefalosporinas de tercera o a aztreonam y la ausencia de sinergia, pero con presencia de sinergia entre cefepime y ácido clavulánico, es indicativo en estos casos de la existencia de una BLEE (García-Rodríguez *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 2001).

Por otro lado, la existencia en *Enterobacteriaceae* de alteraciones de la permeabilidad, puede disminuir la capacidad de las cefalosporinas de tercera generación de acceder a la bacteria y el efecto sinérgico con ácido clavulánico, de forma que, si coexisten en el mismo aislado, la producción de BLEEs y mecanismos de impermeabilidad, pueden producirse falsos negativos en la detección de betalactamasas de espectro extendido. Cefoxitina es un buen marcador de déficit de porinas en estos casos, ya que, siendo *in vitro* sensible a las BLEEs, se mostrará resistente en caso de impermeabilidad de la pared bacteriana. Sin embargo, la resistencia a cefoxitina no sólo puede indicar la existencia de alteraciones de permeabilidad sino que también se mostrará resistente cuando exista una betalactamasa AmpC (Hanson, 2003).

Por tanto, para detectar la presencia de BLEEs solas o en combinación con la presencia de betalactamasa AmpC o de mecanismos de impermeabilidad en los aislados, paralelamente a las dos pruebas de difusión anteriores, se realizó un procedimiento de difusión con disco para cada uno de los aislados en agar Mueller-Hinton inoculado con una suspensión ajustada al patrón 0.5 de McFarland y para discos con carga estándar (30 µg) de cefepime (FEP) y cefoxitina (FOX) (Oxoid).

Se valoró el comportamiento de estos dos antibióticos de la siguiente forma:

- Si en el método A ó B existía un fenotipo compatible con la producción de BLEEs, cefepime mostraba sinergia con ácido clavulánico y cefoxitina era sensible (≥ 18 mm), se consideró que el aislado sólo era productor de BLEEs.
- Si en el método A ó B el aislado se mostraba resistente y sin sinergia con ácido clavulánico, cefepime no presentaba sinergia con ácido clavulánico y cefoxitina era resistente o sensible, no era un aislado productor de BLEEs.
- Si en el método A ó B existía un fenotipo compatible con la producción de BLEEs, cefepime mostraba sinergia con ácido clavulánico y cefoxitina era resistente (< 18 mm), se consideró que el aislado, además de productor de BLEEs, poseía una alteración de la permeabilidad o una producción de betalactamasa AmpC.
- Si en el método A ó B el aislado se mostraba resistente y sin sinergia con ácido clavulánico, cefepime presentaba sinergia con ácido clavulánico y cefoxitina era resistente (< 18 mm), se consideró que el aislado, además de productor de BLEEs, poseía una alteración de la permeabilidad o una producción de betalactamasa AmpC.

3.2.2. Prueba de Epsilon (E-test)

Se siguieron las directrices del fabricante con tiras de papel impregnadas con antibiótico (IZASA S.A, España). Para el estudio del comportamiento de los aislados respecto a ceftazidima se usaron tiras en las que una mitad consta de una concentración decreciente de ceftazidima desde 32 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (TZ) y la otra contiene desde 4 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,064 $\mu\text{g/ml}$ de ceftazidima con 4 $\mu\text{g/ml}$ de ácido clavulánico en

concentración fija (TZL). En el caso del estudio del comportamiento respecto a cefotaxima se emplearon tiras compuestas en una mitad con una concentración decreciente de cefotaxima desde 16 µg/ml hasta 0,25 µg/ml (CT) y la otra mitad con concentraciones desde 1 µg/ml hasta 0,016 µg/ml, con 4 µg/ml de ácido clavulánico en concentración fija (CTL) (Cormican *et al.*, 1996; Leverstein van-Hall *et al.*, 2002).

Se realizó la siembra de los aislados en agar Mueller-Hinton desde el inóculo inicial estandarizado al 0.5 de McFarland. Las tiras de E-test fueron colocadas en las placas e incubadas éstas al aire durante 24 horas a 37°C. La CMI fue interpretada como el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento con el borde de la tira.

Se consideró positiva la sinergia con ácido clavulánico y presencia de una BLEE cuando hubo una disminución de la CMI de ceftazidima y/o cefotaxima ≥ 8 veces en presencia de ácido clavulánico. Se consideró negativa la sinergia con ácido clavulánico y se descartó la presencia de una BLEE cuando la disminución de la CMI de ceftazidima y cefotaxima en presencia de ácido clavulánico fue inferior a 8 veces.

En aquellos aislados en los que las CMIs fueron superiores o inferiores a los límites superiores o inferiores, respectivamente, para cada pareja de E-test, no se valoró el resultado y se consideró indeterminado (ND).

En aquellos aislados en los que las CMIs de CT, TZ, CTL y TZL fueron superiores a los límites superiores de cada tira, y por tanto, se consideraron aislados resistentes a las cefalosporinas y a la combinación de éstas con ácido clavulánico y de resultado indeterminado (ND) para la detección de BLEEs, no se puede descartar la presencia de las enzimas, pues, por ejemplo, CMIs de CT = 64 µg/ml y CTL = 8 µg/ml, son compatibles con la presencia de BLEEs pero están fuera del rango de detección. Por eso, en estos casos, se realizó un método de E-test de

cefepime (PM) y cefepime con ácido clavulánico (PML) dirigido a detectar la presencia de estas betalactamasas enmascarada por la posible asociación con una enzima AmpC (esta situación puede dar lugar a un falso negativo en la detección de betalactamasas de espectro extendido cuando la betalactamasa AmpC está también presente). Se emplearon tiras compuestas en una mitad con una concentración decreciente de cefepime desde 16 µg/ml hasta 0,25 µg/ml (PM) y la otra mitad con concentraciones desde 4 µg/ml hasta 0,064 µg/ml, con 4 µg/ml de ácido clavulánico en concentración fija (PML). Se consideró positiva la sinergia con ácido clavulánico y presencia de una BLEE cuando hubo una disminución de la CMI de cefepime ≥ 8 veces en presencia de ácido clavulánico (Bolmström *et al.*, 2002).

3.2.3. Métodos automatizados

3.2.3.1. Sistema VITEK 2

El VITEK 2 (figura 20) es un sistema automatizado capaz, en poco tiempo, de realizar la identificación y el estudio de sensibilidad de bacterias aerobias y levaduras, a través del análisis de una batería de pruebas bioquímicas y de la cinética de crecimiento bacteriana en presencia de antibióticos, en las tarjetas donde son inoculadas. Su sistema experto (Advanced Expert System o AES) está compuesto por una amplia base de datos que contiene información acerca de unos 2.000 fenotipos, unas 20.000 distribuciones de CMIs para diferentes combinaciones de antibióticos y microorganismos, y prevalencias de mecanismos de resistencia en diferentes especies (Sanders *et al.*, 2000). Así, el sistema experto AES puede realizar una interpretación del fenotipo de resistencia a través de la lectura de las CMIs obtenidas para

cada identificación bacteriana. La CMI encontrada para un aislamiento y cada antibiótico ensayado por el VITEK 2 se compara con todos los patrones de la base de datos obteniéndose un resultado que será el fenotipo más ajustado de los comparados.

Cuando existen combinaciones inapropiadas entre el fenotipo de resistencia y la especie, o el mecanismo que se infiere supone la aparición de resistencia frente a antibióticos sensibles *in vitro*, el microbiólogo es alertado por el sistema, que modifica la CMI del antibiótico.

En todos los casos el sistema VITEK 2 AES emite un informe indicando la CMI *in vitro* para cada antibiótico ensayado, la categoría clínica para cada antibiótico obtenida en función de la CMI *in vitro* (S, I o R), la categoría clínica tras la interpretación basada en el fenotipo detectado y por último infiere el mecanismo de resistencia detectado para cada grupo de antibióticos (Leverstein-van Hall *et al.*, 2002; Livermore *et al.*, 2002).

Para el estudio de sensibilidad de nuestros aislados clínicos por el sistema VITEK 2, éstos fueron inoculados en las tarjetas AST-N020 siguiendo las instrucciones del fabricante, con inóculos estandarizados al 0.5 de McFarland para cada aislamiento. La identificación de especie para cada aislado no fue obtenida por el sistema VITEK 2 sino introducida en éste por el investigador una vez conocida por las pruebas bioquímicas realizadas en la galería Api20E. Las tarjetas fueron introducidas en el sistema y los resultados de sensibilidad se obtuvieron tras 24 horas, aceptando en su caso, las recomendaciones del sistema AES para la validación del antibiograma correspondiente.

Los antibióticos que fueron ensayados en cada aislamiento, las concentraciones que se estudiaron y los rangos de CMI que ofrece el sistema VITEK 2, se recogen en la tabla 21.

Tabla 21: Composición de la tarjeta AST-N020 de VITEK 2 para el estudio de sensibilidad de los microorganismos gramnegativos (antibióticos ensayados *in vitro*)

Antibiótico	Código	Concentraciones (en µg/ml)	Rango de CMI detectado (en µg/ml)	
			≤	≥
Ampicilina	AM	4, 8, 32	2	32
Amoxicilina/ác. clavulánico	AMC	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Piperacilina	PIP	4, 16, 64	4	128
Piperacilina/ tazobactam	TZP	4/4, 16/4, 128/4	4/4	128/4
Cefalotina	CF	2, 8, 32	2	64
Cefuroxima	CXM	2, 8, 32	1	64
Cefoxitina	FOX	8, 16, 32	4	64
Cefotaxima	CTX	1, 4, 16, 32	1	64
Cefpodoxima	CPD	0.5, 1, 4	0.25	8
Ceftazidima	CAZ	1, 2, 8, 32	1	64
Cefepime	FEP	2, 8, 16, 32	1	64
Meropenem	MEM	0.5, 4, 16	0.25	16
Amikacina	AN	8, 16, 64	2	64
Gentamicina	GM	4, 16, 32	1	16
Tobramicina	TM	8, 16, 64	1	16
Ciprofloxacino	CIP	0.5, 2, 4	0.25	4
Norfloxacino	NOR	1, 8, 32	0.5	16
Ofloxacino	OFL	0.5, 1, 4	0.25	8
Nitrofurantoína	FT	16, 32, 64	16	512
Trimetoprim/ sulfametoxazol	SXT	0.5/9.5, 2/38, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)

Para cada aislado y cada antibiótico ensayado se obtuvo un informe con el resultado de CMI *in vitro*, las modificaciones de la CMI propuestas por el sistema según el fenotipo detectado, la categoría clínica para cada antibiótico y el fenotipo de resistencia de cada aislamiento para los distintos grupos de antibióticos.



Figura 20: Sistema VITEK 2.

3.2.3.2. Sistema WIDER

El sistema WIDER (figura 21) dispone de una cámara fotográfica que obtiene una imagen de los paneles de microdilución usados para la identificación y el estudio de sensibilidad de bacterias. Después de la digitalización de la imagen, el sistema WIDER genera automáticamente la identificación de la bacteria y su perfil de sensibilidad, que dependen del análisis del crecimiento y de los cambios de color en los pocillos de identificación, y de la interpretación de la presencia de crecimiento a diferentes concentraciones de antibióticos en los pocillos de sensibilidad, respectivamente.

Este sistema está básicamente formado por un módulo de lectura y un software de análisis, que, de forma automática, detecta el tipo de panel, asigna la identificación más probable como consecuencia del crecimiento y los cambios de color en los pocillos destinados a la identificación (comparando cada perfil de identificación con los perfiles de su base de datos) y además permite determinar la CMI como la concentración más baja con ausencia de crecimiento tras analizar el crecimiento del microorganismo en los pocillos con diferentes concentraciones de antibiótico. El sistema puede proponer al usuario una

modificación de las categorías clínicas detectadas *in vitro* en función del fenotipo inferido tras el análisis de los resultados por el software.

El sistema Wider ha sido adaptado para leer los paneles de microdilución de MicroScan (Dade-MicroScan, West Sacramento, California) (Cantón *et al.*, 2000).

Los antibióticos que fueron ensayados en cada aislamiento y las concentraciones que se estudiaron, se recogen en la tabla 22.

Tabla 22: Composición del panel MIC/ID GRAMNEGATIVOS REV.1 del sistema WIDER

Antibiótico	Código	Concentraciones (en µg/ml)
Amoxicilina	AMX	4, 8, 16
Amoxicilina-ác. clavulánico	A/C	4/2, 8/4, 16/8
Ticarcilina	TC	16, 32, 64
Piperacilina-tazobactam	P/T	16/4, 32/4, 64/4
Cefalotina	CF	8
Cefuroxima	CFX	4, 8, 16
Cefoxitina	CX	8, 16
Cefotaxima	CTX	1, 2, 4, 8
Ceftazidima	TAZ	1, 2, 4, 8, 16
Ceftazidima-ác. clavulánico	TZ/C	1/4, 8/4
Cefepime	CFP	1, 2, 4, 8, 16
Imipenem	IMI	1, 2, 4, 8
Meropenem	MER	1, 2, 4, 8
Amikacina	AK	4, 8, 16
Gentamicina	GM	2, 4, 8
Tobramicina	TO	2, 4, 8
Ciprofloxacino	CIP	0.12, 1, 2, 4
Ácido nalidíxico	NA	4, 16
Nitrofurantoína	FD	64
Trimetoprim-sulfametoxazol	T/S	2/38, 4/76
Fosfomicina	FOS	8, 16, 32



Figura 21: Sistema WIDER.

En nuestro estudio los paneles del sistema WIDER fueron inoculados con el sistema de inoculación Prompt, siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente fueron incubados durante 24 horas a 37° C. La lectura de los paneles se realizó tras las 24 horas de incubación. La identificación de especie para cada aislado no fue obtenida por el sistema sino introducida en éste por el investigador una vez conocida por las pruebas bioquímicas realizadas en la galería Api20E.

El sistema WIDER emitió un informe con la identificación de la especie bacteriana, la CMI obtenida in vitro, la categoría clínica correspondiente a dicha CMI, la categoría clínica modificada, en su caso, y el fenotipo o fenotipos de resistencia inferidos.

Según el fabricante, para la detección de BLEEs, en todas las enterobacterias, emplea la información aportada por los pocillos de amoxicilina (AMX) de 4 a 16 µg/ml, amoxicilina más ácido clavulánico (A/C) de 4/2 y 16/8 µg/ml, TAZ de 1 a 16 µg/ml, TZ/C de 8/4 y 1/4 µg/ml, CTX de 1 a 8 µg/ml y CX de 8 y 16 µg/ml. La presencia de BLEEs es sugerida por el fabricante cuando el antibiograma es interpretado como AMX resistente, A/C no resistente, TAZ no sensible y CX sensible siendo, además, no sensible para CTX o la CMI para TZ/C es $\leq 1/4$ µg/ml.

3.3. Métodos bioquímicos y moleculares para la caracterización de BLEEs

3.3.1. Isoelectroenfoque

El uso del isoelectroenfoque para caracterizar betalactamasas fue descrito por primera vez por Matthew *et al.* (1975). Es una técnica basada en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Moléculas anfotéricas, como las proteínas, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. La región del ánodo es alcalina y la del cátodo es ácida. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoelectroico dentro del rango. A bajo pH (alta concentración de hidrogeniones) los grupos carboxilos de las proteínas tienden a estar sin carga ($-\text{COOH}$) y los grupos básicos conteniendo nitrógeno, fuertemente cargados ($-\text{NH}_3^+$), dando a la mayoría de la proteína una carga neta positiva. A alto pH los grupos carboxilos están negativamente cargados ($-\text{COO}^-$) y los grupos básicos tienden a estar sin carga ($-\text{NH}_2$), dando a la mayoría de la proteína una carga neta negativa. A su pH isoelectroico una proteína no tiene carga, puesto que las cargas positivas y negativas se compensan, y, además, no se mueve dentro del campo eléctrico. Por lo tanto, las sustancias que se encuentran inicialmente en regiones de pH inferior a su punto isoelectroico estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el ánodo, mientras que aquellas que se encuentren en medios con pH más elevados que su pI tendrán carga negativa y migrarán hacia el cátodo. La migración les conducirá a una región donde el pH coincidirá con su pI, tendrán una carga neta nula y se detendrán.

El gradiente de pH estable entre los electrodos se consigue usando una mezcla en gel de poliacrilamida de anfolitos de bajo peso molecular

cuyos pK cubren un rango preestablecido de pH. Los anfolitos suelen ser ácidos poliamino policarboxílicos alifáticos sintéticos y son comercializados en mezclas que cubren determinados rangos de pH. El gel se preenfoca, es decir, se le aplica corriente antes de añadir la muestra para que los anfolitos se muevan y generen el gradiente estable de pH.

Seguimos un procedimiento previamente descrito (Cantón y Oliver, 2000). Para obtener las betalactamasas en los aislados de nuestro estudio éstos fueron sometidos a un primer proceso de sonicación (ruptura de las bacterias por ultrasonidos, que permite no desnaturalizar las proteínas y así obtener las betalactamasas). Para realizar el posterior procedimiento de isoelectroenfoque se usaron como controles de pI conocidos extractos ya sonicados de bacterias productoras de BLEEs proporcionadas por los doctores Rafael Cantón y María Teresa Coque del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid: pI 8.2 (SHV-5), pI 8.1 (CTX-M9), pI 7.6 (SHV-1), pI 6.5 (TEM-24), pI 5.4 (TEM-1).

3.3.1.1. Sonicación

Se sembraron las muestras en agar-sangre y se incubaron al aire 24 horas a 37° C. En diferentes tubos Falcon (uno por muestra) se vertieron 20-30 ml de caldo LB (Luria-Bertani) (1% de triptona, 1% de NaCl, 0,5% de extracto de levadura) y se sembraron con 4-5 colonias de la bacteria correspondiente crecida en agar-sangre. Los tubos se incubaron a 37°C entre 6 y 8 horas para favorecer el crecimiento bacteriano.

Pasado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 6 minutos a 4°C, y se decantó el sobrenadante. En cada tubo se añadieron 10 ml de agua destilada y se agitó con vórtex para resuspender de nuevo el sedimento. Se volvieron a centrifugar los tubos

en las mismas condiciones, tras lo cual se volvió a decantar el agua destilada del sobrenadante. Se añadió después 1 ml de agua destilada por muestra y se agitó de nuevo con vórtex para resuspender. El contenido que quedó en cada tubo (1 ml) se vertió en un eppendorf y se conservaron a -20°C .

Posteriormente se realizó la sonicación. Para ello se descongelaron las muestras y se colocaron en un recipiente con hielo con el fin de mantener una temperatura baja durante el proceso, evitando la desnaturalización proteica. Cada muestra se sonicó durante unos 60 segundos con 2 segundos de pulso y 60% de potencia. Cada muestra recibió tantos ciclos como fue necesario hasta que se obtuvo un extracto transparente, tras lo cual se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se vertió en un nuevo eppendorf que se congeló a -20°C .

3.3.1.2. Isoelectroenfoque

Se descongelaron las muestras y los controles de pI conocidos y se colocaron en un baño de hielo. En la platina de la unidad Phast System Separation-Control Unit (Amersham biosciences, Estados Unidos) (figura 22) se colocaron los geles de poliacrilamida (PhastGel IEF 3-9, Amersham biosciences) teniendo en cuenta que en cada gel sólo pudieron colocarse 7-8 muestras, incluyendo los controles de pI conocido. Se realizó un preenfoco de los geles. Mientras se realizó el preenfoco se envolvió con parafilm el Phast Gel Sample Well Stamp (Amersham biosciences) y sobre éste, coincidiendo con cada pocillo, se pusieron 6 μl de muestra o control correspondiente y sobre ellas se colocó el Phast Gel Sample Applicator (Amersham biosciences) que absorbió la muestra por capilaridad, y se colocó en la posición inferior de la platina (zona del

cátodo). Tras realizar el preenfoco, automáticamente comenzó el proceso por el que las proteínas migran hasta su punto isoeléctrico.

Cuando finalizó el proceso se retiraron los peines y los geles. Sobre cada gel se añadieron 100 μ l de Nitrocefin (Becton Dickinson) y se extendió. Se pudieron leer los resultados en forma de banda de color rojo (viraje de color amarillo-naranja a rojo intenso consecuencia de la hidrólisis de esta cefalosporina cromogénica por la betalactamasa) que corresponde a un determinado pI, que se pudo determinar en función de los pI conocidos de los controles (figura 25, ver más adelante).



Figura 22: Phast System Separation-Control Unit

3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) (Mullis *et al.*, 1986) es una técnica que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico mediante síntesis enzimática *in vitro* a partir de mínimas cantidades de material de partida. La técnica copia la doble cadena de ADN consiguiendo, por repetición del proceso, una amplificación exponencial del material genético. Usa dos oligonucleótidos sintéticos (complementarios a los extremos de la secuencia diana y en sentido antiparalelo uno respecto a otro) como

cebadores o iniciadores (primers) de una reacción de replicación catalizada por una DNA polimerasa termoestable. La amplificación es el resultado de la repetición de una serie de ciclos compuestos de tres fases: desnaturalización (ruptura, mediante la aplicación de temperatura elevada seguida de un enfriamiento rápido, de los puentes de hidrógeno que mantienen la doble cadena de ADN dando lugar a dos cadenas sencillas sobre las cuales pueda actuar la DNA polimerasa), hibridación (se hace descender la temperatura para que los primers puedan unirse específicamente a las secuencias complementarias en el ADN diana) y elongación (la Taq-DNA polimerasa utiliza los dNTP presentes en el medio para sintetizar la cadena complementaria a partir del cebador hibridado con su secuencia diana en sentido 5' a 3'). Antes de comenzar los ciclos se programa una fase de desnaturalización inicial larga con el fin de asegurar que todo el ADN (fragmento diana y primers) quede en forma monocatenaria, y después del último ciclo de PCR se suele realizar una elongación final prolongada con el fin de terminar todas las elongaciones parciales en curso.

Las nuevas cadenas de ADN, producidas en cada ciclo, sirven de molde en el ciclo siguiente, por lo que la repetición de un ciclo de PCR produce una amplificación exponencial del material de partida igual a 2^n , siendo "n" el número de ciclos realizados.

Una vez finalizada la PCR la detección del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. El gel se tiñe con bromuro de etidio, que se une al ADN de cadena doble de forma inespecífica y se visualiza con luz ultravioleta.

En aquellos aislados que confirmaron la presencia de BLEEs por los procedimientos fenotípicos (método A) se realizó PCR para determinar la presencia de los genes *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M10} o

*bla*_{TEM} y se realizó aquel procedimiento de PCR que podría confirmar la presencia de la BLEE detectada por isoelectroenfoque. Teniendo en cuenta los datos expuestos en las tablas 3, 6 y 8, las BLEEs tipo SHV poseen puntos isoeléctricos 7,0; 7,5; 7,6; 7,8; 8,0; 8,2; las BLEEs tipo CTX-M poseen puntos isoeléctricos 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,1; 8,4; 8,8; 8,9 y las BLEEs tipo TEM poseen puntos isoeléctricos 5,2; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,3; 6,5

Como controles positivos se usaron bacterias productoras de BLEEs (CTX-M9, CTX-M10, SHV-5 y TEM-24) proporcionadas por los doctores Rafael Cantón y María Teresa Coque del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Como control negativo se usó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

3.3.2.1. Extracción del ADN bacteriano

Las muestras y controles se sembraron en agar-sangre e incubaron al aire 24 horas a 37° C. Se puso 1 ml de agua destilada en cada eppendorf (uno por muestra), y en cada uno de ellos se resuspendieron varias colonias de la muestra o controles correspondientes. Los eppendorf se pusieron 15 minutos en un baño a 100° C y posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 15000 r.p.m.

3.3.2.2. Amplificación del ADN bacteriano

Se utilizó una mezcla de PCR con buffer (1x), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (200 μM), primers (0,5 μM) y Taq polimerasa (2 U) (Roche, Alemania) en un volumen final de 15 μl.

Los primers usados para cada determinación (Tib Molbiol, Alemania) se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: Primers usados para la detección por PCR de los genes responsables de la producción de BLEEs en nuestras muestras.

Gen	Primers	
<i>bla_{SHV}</i> (Coque <i>et al.</i> , 2002a)	SHV-3FT	5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC-3'
	SHV-5FT	5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'
<i>bla_{CTX-M9}</i> (Cantón <i>et al.</i> , 2002)	CTX-F	5'-GTGACAAAGAGAGTGCAACGG-3'
	CTX-R	5'-ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC3'
<i>bla_{CTX-M10}</i> (Cantón <i>et al.</i> , 2002)	CTX-M-F8	5'-CCGCGCTACACTTTGTGGC-3'
	CTX-M-R3	5'-TTACAAACCGTTGGTGACG-3'
<i>bla_{TEM}</i> (Rasheed <i>et al.</i> , 1997)	BLA-1	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'
	BLA 2	5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA-3'

Las condiciones empleadas en el termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) aparecen en la tabla 24:

Tabla 24: Condiciones de temperatura para cada una de las PCR realizadas

PCR <i>bla_{SHV}</i>	PCR <i>bla_{CTX-M9}</i>	PCR <i>bla_{CTX-M10}</i>	PCR <i>bla_{TEM}</i>
94°C 12 min.	94°C 12 min.	94°C 12 min.	94°C 12 min.
*94°C 1 min.	*94°C 1 min.	*94°C 1 min.	*94°C 30 seg.
56°C 1 min.	62°C 1 min.	59°C 1 min.	55°C 1 min.
72°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 2 min.	72°C 1 min. 30 seg.
72°C 10 min.	72°C 10 min.	72°C 10 min.	72°C 10 min.

min.: minutos, seg.:segundos.

* 35 ciclos

3.3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron geles de agarosa al 0,7% en un tampón de Tris-Borato-EDTA 0,5x (Tris 0,1 M; ácido bórico 0,08 M; EDTA 0,1 mM) con bromuro de etidio y en ellos se depositaron las muestras, tras lo cual el gel se sometió a electroforesis a 90 V durante 30 minutos y se visualizó mediante luz ultravioleta.

3.3.3. Electroforesis en gel por campo pulsado

La electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE, pulsed field gel electrophoresis) (Tenover *et al.*, 1995) separa moléculas de ADN en geles de agarosa al someterlas a campos eléctricos que se alternan en dos direcciones. Para la electroforesis en gel por campo pulsado los aislamientos bacterianos se hacen crecer en un medio apropiado, preferiblemente líquido, y luego se combinan con agarosa fundida y se colocan en pequeños moldes. El resultado son bloques de agarosa que contienen las bacterias completas. Las bacterias de los bloques se someten a lisis *in situ* y luego el ADN libre e inmovilizado en el gel de agarosa se corta con una enzima de restricción que tenga baja frecuencia de corte en el genoma estudiado. Cuando el primer campo eléctrico se aplica al gel las moléculas se alargan en la dirección del campo y migran en el gel. El primer campo eléctrico se suprime y un segundo campo, formando algún ángulo con el primero, se activa. El ADN debe cambiar su conformación y reorientarse antes de que pueda migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación es muy sensible al tamaño de la molécula, moléculas más grandes tardan más tiempo en realinearse después de cambiar el campo, que moléculas más pequeñas. El tiempo que se mantiene activo cada campo se denomina pulso y su duración es una función del tamaño de las moléculas que se desean separar.

3.3.3.1. Preparación del ADN bacteriano

Este procedimiento se realizó en 10 aislados de *E. coli*, productores de BLEEs, de origen intrahospitalario, obtenidos en el periodo comprendido entre Octubre y Noviembre de 2002 y cuyas principales características son las siguientes:

Aislado 218: Procedente de UVI, productor de SHV.

Aislado 224: Procedente de Lactantes, productor de SHV.

Aislado 227: Procedente de Cirugía B, productor de SHV.

Aislado 235: Procedente de Cirugía B, productor de CTX-M9.

Aislado 246: Procedente de Cirugía B, productor de CTX-M9.

Aislado 248: Procedente de Oncología, productor de CTX-M9.

Aislado 255: Procedente de Traumatología, productor de SHV.

Aislado 258: Procedente de Lactantes, productor de CTX-M9.

Aislado 260: Procedente de Médica II, productor de CTX-M9.

Aislado 261: Procedente de Cirugía B, productor de SHV.

Se realizaron cultivos en agar-sangre de los 10 aislados y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente una única colonia se subcultivó en medio BHI (bioMérieux) y se dejó crecer durante 14-18 horas a 37°C. Las bacterias del cultivo se recolectaron por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 2 ml de buffer PIV (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,6)

Este contenido se mezcló con un volumen igual (500 µl) de agarosa al 1,7% y se distribuyó en moldes, dejándose gelificar a 4°C durante 10 minutos. Los bloques de agarosa resultantes se colocaron en tubos que contenían 4 ml de buffer de lisis (EC) (1M NaCl; 6mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM EDTA pH 7,0-7,5; 0,5% N-lauril sarcocinato de sodio; 0,2% Deoxycolato; 0,5% Brij-58; RNAasa 20 µg/ml y lisozima 1 mg/ml) y posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se decantó la solución EC y a continuación se desproteinizaron los bloques en solución ESP (1% N-lauril sarcocinato de sodio; 500 mM EDTA pH 8,0-9,0; Proteinasa K 50 µg/ml). Se mantuvieron a 50°C durante 24 h.

Para remover los restos celulares y la proteinasa K los bloques se lavaron 3 veces con TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA pH 8,0) durante 30 minutos a 37°C. Después se almacenaron a 4°C en TE hasta la realización del campo pulsado.

3.3.3.2. Digestión con enzimas de restricción

La digestión del DNA bacteriano se realizó con la enzima de restricción *XbaI* (MBI Fermentas, Estados Unidos). Para realizar la digestión, los bloques se lavaron con agua destilada durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente al lavado, y extraída el agua destilada, se añadió a los bloques de agarosa el buffer de la enzima de restricción y se mantuvieron a 37°C durante toda la noche. El proceso se repitió al día siguiente. Después se eliminó la solución de digestión y se puso TE a 37°C durante 1 hora.

3.3.3.3. Electroforesis en campo pulsado

El gel para la electroforesis en campo pulsado fue preparado con agarosa al 1,2% en TBE 0,5x (Tris 0,1 M; Acido Bórico 0,08 M; EDTA 0,1 mM)

La electroforesis se corrió durante 22 horas con un pulso inicial de 2 segundos y un pulso final de 54 segundos (CHEF Mapper de BioRad, Estados Unidos). El voltaje fue de 6v/cm, buffer de corrido TBE 0,5x, refrigeración a 14°C.

3.4. Métodos estadísticos de análisis de los resultados

- Se utilizó la prueba exacta de Fisher para tablas $r \times s$, que queda en tablas 2×2 en la prueba exacta clásica de Fisher, para comparar entre sí el grupo de aislados productores de BLEEs con el grupo de aislados no productores, y también el grupo de aislados productores de enzimas CTX-M9 con el grupo de aislados productores de SHV, en cuanto a las siguientes variables:

1. Variables demográficas:

- 1.1. Especie bacteriana aislada (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*).
- 1.2. Sexo del paciente del que procede la muestra (mujer o varón).
- 1.3. Procedencia de la muestra (intrahospitalaria o extrahospitalaria).
- 1.4. Tipo de muestra (orina, exudado quirúrgico, secreción genital, escara/úlceras, sonda vesical y otras).

2. Variables de sensibilidad antibiótica:

- 2.1. Distribución de CMIs obtenidas mediante los sistemas automatizados VITEK 2 y WIDER para cada uno de los antibióticos ensayados (betalactámicos y no betalactámicos).
- 2.2. Categorías clínicas obtenidas mediante los sistemas automatizados VITEK 2 y WIDER para cada uno de los antibióticos ensayados (betalactámicos y no betalactámicos).

En todos los casos se consideró como hipótesis nula (H_0) la ausencia de diferencias entre los grupos comparados en cuanto a la variable analizada, e hipótesis alternativa (H_1) la existencia de diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la variable analizada.

- Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las distribuciones de las CMI de los E-test en los dos grupos de aislados productores de BLEEs (CTX-M9 y SHV), resolviendo los valores extremos tomando la unidad inmediatamente inferior, si era un extremo inferior, y la inmediatamente superior si era un extremo superior.

Se consideró hipótesis nula (H_0) la ausencia de diferencias entre los dos grupos de aislados productores de BLEEs en cuanto a la variable analizada, e hipótesis alternativa (H_1) la existencia de diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto a la variable analizada.

- Se utilizó la prueba de Clopper-Pearson para una proporción para establecer los intervalos de confianza al 95% de los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los diferentes métodos de detección de BLEEs.

4. RESULTADOS

A los 469 aislados clínicos que constituyen el objeto de nuestro estudio (399 *E. coli*, 48 *K. pneumoniae* y 22 *K. oxytoca*) se le realizaron los diferentes métodos fenotípicos descritos previamente en el apartado Material y Métodos (método A, método B, E-test, VITEK 2 y WIDER) con la finalidad de identificar en ellos la producción de BLEEs. Se determinó que un aislamiento poseía una BLEE cuando cumplía los criterios ya descritos para el método A (apartado 3.2.1.), que hemos considerado como método de referencia para el estudio fenotípico. Se obtuvieron 125 aislados positivos, con un fenotipo compatible con la presencia de una BLEE (115 *E. coli*, 8 *K. pneumoniae* y 2 *K. oxytoca*) (figura 23) y 344 aislamientos negativos (284 *E. coli*, 40 *K. pneumoniae* y 20 *K. oxytoca*) (figura 24).

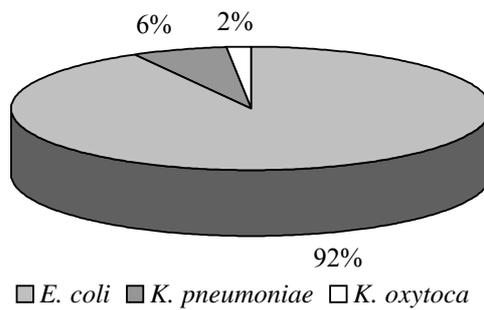


Figura 23: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs según la especie

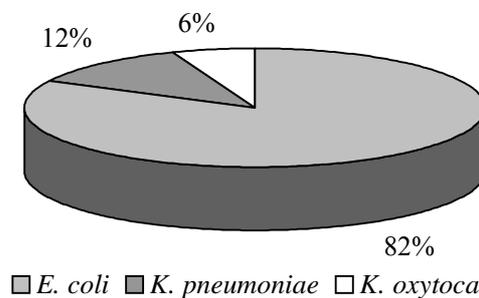


Figura 24: Clasificación de los 344 aislados no productores de BLEEs según la especie

4.1. Descripción fenotípica y caracterización bioquímica y molecular de los aislados productores de BLEEs

En la tabla 25 mostramos los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano obtenidos para los métodos A y B en los 125 aislados productores de BLEEs, así como, en su caso, la presencia de sinergia del disco de la cefalosporina o el aztreonam con el disco de amoxicilina más ácido clavulánico en el método B, para cada aislado clínico y la especie bacteriana correspondiente.

En la tabla 26 aparecen los resultados de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) expresados en $\mu\text{g/ml}$ obtenidos para los dos procedimientos de E-test realizados, junto al cociente obtenido entre las CMIs de la cefalosporina sola (TZ y CT) y en asociación con ácido clavulánico (TZL y CTL), para cada aislado clínico productor de BLEE y la especie bacteriana correspondiente. Cabe destacar que en todos los aislamientos se obtuvo un cociente entre CMIs de la cefalosporina sola y de la cefalosporina con ácido clavulánico ≥ 8 (≥ 3 diluciones) en al menos uno de los dos E-test. El resultado ND obtenido en algunos de estos cocientes fue debido en todos los casos a que los valores de CMI para el E-test de la cefalosporina sola y en asociación con ácido clavulánico fueron inferiores a los límites inferiores de detección de CMI de los E-test.

En la tabla 27 se detallan los valores de CMI obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los distintos antibióticos betalactámicos ensayados por el mismo, y en la tabla 28 se indican los valores de CMI para los antibióticos no betalactámicos, ambos en el grupo de aislamientos clínicos productores de BLEEs.

En la tabla 29 se detallan los valores de CMI obtenidos mediante el sistema WIDER para los distintos antibióticos betalactámicos

ensayados por el mismo en el grupo de aislamientos clínicos productores de BLEEs.

A los 125 aislados que confirmaron la presencia de BLEEs por el método A se les realizó identificación de la betalactamasa hallada por isoelectroenfoque (figura 25) y determinación del gen responsable de su producción por PCR (figura 26). Estos resultados para cada aislado y su especie bacteriana se muestran en la tabla 30. Como se puede apreciar, se identificaron betalactamasas con pI 8.2 compatible con SHV (que se confirmó por PCR), 8.1 compatible con CTX-M9 (que se confirmó por PCR), 5.4 compatible en *E. coli* con TEM-1 y 7.6 compatible en *K. pneumoniae* con SHV-1. No se obtuvieron puntos isoeléctricos compatibles con enzimas tipo TEM-BLEE y no se confirmó presencia de ninguna enzima CTX-M10 (pI 8.1).

Tabla 25: Resultados obtenidos para los métodos fenotípicos A y B en los 125 aislados productores de BLEEs

Aislado	Especie	Diámetro del halo (en mm)						ATM
		CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	
1	<i>E. coli</i>	32	36	10 (S)	24	6 (S)	20	26 (S)
16	<i>E. coli</i>	12 (S)	28	21 (S)	34	10 (S)	26	14 (S)
19	<i>K. pneumoniae</i>	18 (S)	28	17 (S)	32	6 (S)	22	30
25	<i>E. coli</i>	21 (S)	30	14 (S)	30	6 (S)	17	25 (S)
26	<i>E. coli</i>	27	30	17 (S)	28	6 (S)	18	27 (S)
27	<i>E. coli</i>	26	30	19 (S)	30	6 (S)	20	28
31	<i>K. pneumoniae</i>	20 (S)	30	24 (S)	34	12 (S)	30	30
41	<i>E. coli</i>	23	28	18 (S)	30	6 (S)	20	24 (S)
42	<i>E. coli</i>	19 (S)	28	16 (S)	26	6 (S)	20	30
46	<i>E. coli</i>	15 (S)	30	8 (S)	30	6 (S)	20	17 (S)
47	<i>E. coli</i>	24	30	13 (S)	30	6 (S)	19	23 (S)
48	<i>K. pneumoniae</i>	20 (S)	30	12 (S)	30	6 (S)	20	20 (S)
51	<i>E. coli</i>	28	30	20 (S)	30	6 (S)	21	27 (S)
54	<i>E. coli</i>	18 (S)	32	14 (S)	32	6 (S)	22	20 (S)
56	<i>E. coli</i>	30	30	20 (S)	32	6 (S)	22	30
58	<i>E. coli</i>	28	30	22 (S)	28	6 (S)	22	30
62	<i>E. coli</i>	26	32	20 (S)	32	12 (S)	26	26 (S)
63	<i>E. coli</i>	28	30	16 (S)	28	6 (S)	20	26 (S)
65	<i>E. coli</i>	24	28	18 (S)	28	6 (S)	20	24 (S)
101	<i>E. coli</i>	6 (S)	30	14 (S)	34	6 (S)	26	6 (S)
102	<i>E. coli</i>	6 (S)	28	10 (S)	34	6 (S)	23	6 (S)
112	<i>E. coli</i>	26	34	10 (S)	34	6 (S)	24	24 (S)
115	<i>E. coli</i>	26	30	15 (S)	30	6 (S)	22	25 (S)
118	<i>E. coli</i>	6 (S)	29	14 (S)	34	6 (S)	23	6 (S)
121	<i>E. coli</i>	10 (S)	28	20 (S)	34	6 (S)	24	10 (S)
122	<i>E. coli</i>	27	30	19 (S)	32	6 (S)	23	27 (S)
124	<i>E. coli</i>	26	32	19 (S)	32	6 (S)	23	26 (S)
132	<i>E. coli</i>	25	30	12 (S)	32	6 (S)	21	25 (S)
134	<i>E. coli</i>	16 (S)	30	24 (S)	34	14 (S)	28	16 (S)
135	<i>E. coli</i>	18 (S)	23	12 (S)	24	6 (S)	20	16 (S)
136	<i>E. coli</i>	24	30	16 (S)	34	6 (S)	24	24 (S)
137	<i>E. coli</i>	26	32	18 (S)	32	6 (S)	23	26 (S)
138	<i>E. coli</i>	21 (S)	30	12 (S)	30	6 (S)	22	22 (S)
139	<i>E. coli</i>	26	29	16 (S)	29	6 (S)	18	26 (S)
140	<i>E. coli</i>	30	30	20 (S)	34	12 (S)	26	30
141	<i>E. coli</i>	26	32	14 (S)	32	10 (S)	24	26 (S)
145	<i>E. coli</i>	22 (S)	31	14 (S)	31	6 (S)	21	24 (S)
149	<i>E. coli</i>	26	30	14 (S)	29	6 (S)	19	26 (S)
150	<i>E. coli</i>	14 (S)	30	22 (S)	36	14 (S)	29	16 (S)
151	<i>E. coli</i>	24	30	16 (S)	30	6 (S)	20	12 (S)
153	<i>E. coli</i>	24	32	14 (S)	32	6 (S)	18	22 (S)

4. Resultados

Aislado	Especie	Diámetro del halo (en mm)						
		CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	ATM
159	<i>E. coli</i>	28	30	16 (S)	30	6 (S)	16	26 (S)
161	<i>E. coli</i>	26	30	17 (S)	30	6 (S)	20	25 (S)
162	<i>E. coli</i>	8 (S)	26	20 (S)	31	6 (S)	24	8 (S)
163	<i>E. coli</i>	22 (S)	32	12 (S)	32	6 (S)	22	24 (S)
165	<i>E. coli</i>	24	25	16 (S)	25	6 (S)	16	24
169	<i>E. coli</i>	23	36	15 (S)	36	6 (S)	16	12 (S)
170	<i>E. coli</i>	15 (S)	24	8 (S)	24	6 (S)	13	14 (S)
171	<i>E. coli</i>	22 (S)	30	17 (S)	27	6 (S)	18	20 (S)
175	<i>K. pneumoniae</i>	10 (S)	25	14 (S)	30	6 (S)	23	20 (S)
177	<i>E. coli</i>	14 (S)	30	20 (S)	28	6 (S)	21	18 (S)
178	<i>E. coli</i>	20 (S)	30	16 (S)	34	12 (S)	24	16 (S)
179	<i>E. coli</i>	6 (S)	27	14 (S)	32	6 (S)	22	6 (S)
180	<i>E. coli</i>	14 (S)	24	22 (S)	28	10 (S)	20	20 (S)
181	<i>E. coli</i>	14 (S)	28	20 (S)	30	12 (S)	24	16 (S)
183	<i>E. coli</i>	10 (S)	30	22 (S)	34	10 (S)	26	14 (S)
184	<i>K. pneumoniae</i>	22 (S)	28	20 (S)	32	10 (S)	26	26 (S)
185	<i>E. coli</i>	30	34	14 (S)	34	6 (S)	23	26 (S)
186	<i>E. coli</i>	32	34	12 (S)	32	6 (S)	23	24 (S)
187	<i>E. coli</i>	30	34	18 (S)	34	6 (S)	25	26
189	<i>E. coli</i>	12 (S)	30	6 (S)	30	6 (S)	18	12 (S)
190	<i>E. coli</i>	18 (S)	34	14 (S)	34	6 (S)	26	16 (S)
191	<i>E. coli</i>	23	26	12 (S)	24	6 (S)	21	20 (S)
192	<i>E. coli</i>	24	34	20 (S)	30	6 (S)	22	26 (S)
193	<i>E. coli</i>	28	36	20 (S)	30	10 (S)	26	26
195	<i>E. coli</i>	26	28	20 (S)	30	6 (S)	23	30
196	<i>E. coli</i>	14 (S)	30	26 (S)	34	10 (S)	26	18 (S)
197	<i>K. pneumoniae</i>	22 (S)	34	22 (S)	34	17 (S)	30	15
198	<i>E. coli</i>	20 (S)	32	8 (S)	32	6 (S)	17	16 (S)
200	<i>E. coli</i>	20 (S)	26	14 (S)	25	6 (S)	15	10 (S)
204	<i>E. coli</i>	21 (S)	32	14 (S)	32	6 (S)	22	24 (S)
207	<i>E. coli</i>	26	30	18 (S)	32	6 (S)	24	24 (S)
208	<i>E. coli</i>	14 (S)	25	20 (S)	27	6 (S)	24	16 (S)
210	<i>E. coli</i>	24	26	18 (S)	28	6 (S)	19	26 (S)
211	<i>E. coli</i>	26	32	14 (S)	32	6 (S)	22	24
214	<i>E. coli</i>	12 (S)	27	22 (S)	28	6 (S)	24	16 (S)
215	<i>K. oxytoca</i>	18 (S)	30	19 (S)	32	6 (S)	23	16 (S)
217	<i>E. coli</i>	14 (S)	24	18 (S)	27	6 (S)	25	16 (S)
218	<i>E. coli</i>	10 (S)	27	16 (S)	30	6 (S)	20	10 (S)
219	<i>E. coli</i>	12 (S)	25	18 (S)	27	6 (S)	21	10 (S)
220	<i>E. coli</i>	14 (S)	32	20 (S)	34	13 (S)	28	16 (S)
221	<i>E. coli</i>	24	27	18 (S)	27	6 (S)	20	24 (S)
223	<i>K. pneumoniae</i>	20 (S)	30	19 (S)	36	6 (S)	26	24 (S)
224	<i>E. coli</i>	13 (S)	26	10 (S)	26	6 (S)	16	18 (S)

Betalactamasas de espectro extendido

Aislado	Especie	Diámetro del halo (en mm)						
		CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	ATM
226	<i>E. coli</i>	6 (S)	23	16 (S)	28	6 (S)	22	8 (S)
227	<i>E. coli</i>	10 (S)	20	16 (S)	26	6 (S)	19	32
228	<i>E. coli</i>	10 (S)	25	20 (S)	30	11 (S)	24	14 (S)
229	<i>E. coli</i>	10 (S)	27	20 (S)	29	6 (S)	23	14 (S)
230	<i>E. coli</i>	12 (S)	25	17 (S)	27	6 (S)	18	24
231	<i>E. coli</i>	16 (S)	24	24 (S)	27	6 (S)	20	30
232	<i>E. coli</i>	25	34	18 (S)	35	6 (S)	18	24 (S)
233	<i>E. coli</i>	22 (S)	32	14 (S)	32	6 (S)	23	20 (S)
235	<i>E. coli</i>	24	30	14 (S)	28	6 (S)	17	22 (S)
237	<i>E. coli</i>	28	30	20 (S)	30	6 (S)	21	10 (S)
240	<i>E. coli</i>	30	32	18 (S)	32	6 (S)	21	26
242	<i>E. coli</i>	16 (S)	26	20 (S)	30	6 (S)	23	14 (S)
245	<i>E. coli</i>	24	26	14 (S)	28	6 (S)	18	24
246	<i>E. coli</i>	29	30	22 (S)	30	6 (S)	20	24 (S)
248	<i>E. coli</i>	23	26	10 (S)	26	6 (S)	16	26
249	<i>E. coli</i>	16 (S)	30	20 (S)	30	13 (S)	25	16 (S)
252	<i>K. pneumoniae</i>	16 (S)	22	11 (S)	26	6 (S)	24	20 (S)
253	<i>E. coli</i>	28	30	16 (S)	28	6 (S)	18	26
254	<i>E. coli</i>	20 (S)	25	14 (S)	24	6 (S)	14	20 (S)
255	<i>E. coli</i>	16 (S)	30	22 (S)	30	12 (S)	26	16 (S)
258	<i>E. coli</i>	24	28	16 (S)	26	6 (S)	17	26
260	<i>E. coli</i>	20 (S)	35	12 (S)	35	6 (S)	24	28
261	<i>E. coli</i>	10 (S)	25	16 (S)	27	6 (S)	17	10 (S)
265	<i>E. coli</i>	14 (S)	26	20 (S)	30	10 (S)	24	14 (S)
266	<i>E. coli</i>	14 (S)	27	20 (S)	32	6 (S)	22	14 (S)
267	<i>E. coli</i>	14 (S)	28	20 (S)	34	13 (S)	26	14 (S)
268	<i>E. coli</i>	16 (S)	24	20 (S)	27	11 (S)	25	14 (S)
269	<i>E. coli</i>	24	28	12 (S)	27	6 (S)	20	20 (S)
270	<i>E. coli</i>	24	28	8 (S)	27	6 (S)	20	20 (S)
272	<i>E. coli</i>	12 (S)	25	12 (S)	28	6 (S)	23	14 (S)
273	<i>E. coli</i>	22 (S)	28	12 (S)	28	6 (S)	18	20 (S)
274	<i>E. coli</i>	26	29	14 (S)	30	6 (S)	21	20 (S)
276	<i>E. coli</i>	12 (S)	26	20 (S)	30	6 (S)	22	14 (S)
277	<i>E. coli</i>	14 (S)	23	0 (S)	24	6 (S)	20	12 (S)
280	<i>E. coli</i>	14 (S)	30	20 (S)	26	6 (S)	21	10 (S)
282	<i>E. coli</i>	23	23	6 (S)	24	6 (S)	21	20 (S)
283	<i>K. oxytoca</i>	10 (S)	26	8 (S)	26	6 (S)	16	20 (S)
284	<i>E. coli</i>	25	25	10 (S)	23	6 (S)	17	20 (S)
285	<i>E. coli</i>	11 (S)	26	6 (S)	25	6 (S)	17	16 (S)
288	<i>E. coli</i>	8 (S)	26	10 (S)	30	6 (S)	20	18 (S)
290	<i>E. coli</i>	24	26	14 (S)	26	6 (S)	15	22 (S)

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CD02: Cefotaxidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg), ATM: Aztreonam (30 µg)

(S): Sinergia en la zona cercana al disco de amoxicilina más ácido clavulánico de la cefalosporina o el aztreonam en el método B

4. Resultados

Tabla 26: Resultados obtenidos para los métodos de E-test en los 125 aislados productores de BLEEs (CMI en µg/ml)

Aislado	Especie	CMI TZ	CMI TZL	CMI CT	CMI CTL	RATIO TZ/TZL	RATIO CT/CTL
1	<i>E. coli</i>	1	0,38	>16	0,032	2,6	>500
16	<i>E. coli</i>	>32	0,25	0,5	0,032	>128	15,6
19	<i>K. pneumoniae</i>	2	0,25	2	0,023	8	87
25	<i>E. coli</i>	<0,50	0,064	>16	0,094	<7,8	>170
26	<i>E. coli</i>	0,5	0,094	>16	0,094	5,3	>170
27	<i>E. coli</i>	<0,50	<0,064	2	0,016	ND	125
31	<i>K. pneumoniae</i>	1,5	0,19	0,38	0,023	7,9	16,5
41	<i>E. coli</i>	1	0,094	>16	0,023	10,6	>696
42	<i>E. coli</i>	<0,50	0,125	12	0,047	<4	255
46	<i>E. coli</i>	>32	0,25	>16	0,094	>128	>170
47	<i>E. coli</i>	1,5	0,064	>16	0,064	23,4	>250
48	<i>K. pneumoniae</i>	8	0,064	>16	0,023	125	>696
51	<i>E. coli</i>	0,75	0,064	>16	0,016	11,7	>1000
54	<i>E. coli</i>	4	0,064	>16	0,016	62,5	>1000
56	<i>E. coli</i>	0,75	0,064	>16	0,032	11,7	>500
58	<i>E. coli</i>	<0,50	<0,064	12	<0,016	ND	>750
62	<i>E. coli</i>	<0,50	0,064	>16	0,032	<7,8	>500
63	<i>E. coli</i>	1	<0,064	>16	0,016	>15,6	>1000
65	<i>E. coli</i>	1,5	0,38	>16	0,047	3,9	>340
101	<i>E. coli</i>	>32	0,125	>16	0,023	>256	>695
102	<i>E. coli</i>	>32	0,19	>16	0,032	>168	>500
112	<i>E. coli</i>	1	<0,064	>16	0,016	>15,63	>1000
115	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,032	<5,3	>500
118	<i>E. coli</i>	>32	0,125	>16	0,023	>256	>695
121	<i>E. coli</i>	>32	0,19	>16	0,023	>168	>695
122	<i>E. coli</i>	0,75	0,125	3	0,032	6	93,75
124	<i>E. coli</i>	0,75	0,094	>16	0,016	7,9	>1000
132	<i>E. coli</i>	<0,50	0,064	>16	0,032	<7,8	>500
134	<i>E. coli</i>	3	0,064	0,5	0,016	46,9	31,25
135	<i>E. coli</i>	4	0,125	>16	0,047	32	>340
136	<i>E. coli</i>	<0,50	0,064	>16	0,032	<7,8	>500
137	<i>E. coli</i>	0,75	0,125	>16	0,19	6	>84,2
138	<i>E. coli</i>	0,75	0,125	>16	0,125	6	>128
139	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,094	3,9	>170
140	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,094	<5,3	>170
141	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,094	<5,3	>170
145	<i>E. coli</i>	<0,50	0,125	>16	0,094	<4	>170
149	<i>E. coli</i>	0,5	0,094	>16	0,094	5,3	>170
150	<i>E. coli</i>	12	0,094	1	0,064	127,7	15,6
151	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,125	3,9	>128
153	<i>E. coli</i>	0,75	0,25	>16	0,38	3	>42

Betalactamasas de espectro extendido

Aislado	Especie	CMI TZ	CMI TZL	CMI CT	CMI CTL	RATIO TZ/TZL	RATIO CT/CTL
159	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,38	3,9	>42
161	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,19	3,9	>84,2
162	<i>E. coli</i>	>32	0,19	>16	0,094	>168	>170
163	<i>E. coli</i>	1	0,25	>16	0,125	4	>128
165	<i>E. coli</i>	0,5	0,19	>16	0,023	2,6	>695
169	<i>E. coli</i>	0,75	0,25	>16	0,064	3	>250
170	<i>E. coli</i>	4	0,19	>16	0,094	21,1	>170
171	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,094	3,9	>170
175	<i>K. pneumoniae</i>	8	0,064	2	0,023	125	87
177	<i>E. coli</i>	6	0,19	1	0,125	31,6	8
178	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,125	3,9	>128
179	<i>E. coli</i>	>32	0,19	>16	0,064	>168	>250
180	<i>E. coli</i>	8	0,125	1	0,094	64	10,6
181	<i>E. coli</i>	8	0,125	1,5	0,094	64	16
183	<i>E. coli</i>	8	0,094	1,5	0,064	85,1	23,4
184	<i>K. pneumoniae</i>	1,5	0,094	3	0,032	15,9	93,7
185	<i>E. coli</i>	<0,50	<0,064	>16	0,047	ND	>340,4
186	<i>E. coli</i>	<0,50	<0,064	>16	0,023	ND	>695,6
187	<i>E. coli</i>	<0,50	<0,064	6	0,016	ND	375
189	<i>E. coli</i>	16	0,125	>16	0,125	128	>128
190	<i>E. coli</i>	3	0,094	>16	0,094	31,9	>170
191	<i>E. coli</i>	0,75	0,094	>16	0,047	7,9	340
192	<i>E. coli</i>	0,5	0,125	>16	0,094	4	>170
193	<i>E. coli</i>	0,5	0,064	>16	0,023	7,8	>695,6
195	<i>E. coli</i>	1	<0,064	>16	0,032	>15,6	>500
196	<i>E. coli</i>	6	0,064	1	0,032	93	31,25
197	<i>K. pneumoniae</i>	0,5	0,064	1	0,016	7,8	62,5
198	<i>E. coli</i>	2	0,125	>16	0,094	16	>170
200	<i>E. coli</i>	1	0,19	>16	0,032	5,3	>500
204	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,064	3,9	>250
207	<i>E. coli</i>	0,75	0,125	>16	0,016	6	>1000
208	<i>E. coli</i>	12	0,094	1	0,023	128	43,5
210	<i>E. coli</i>	0,5	0,064	>16	0,032	7,8	>500
211	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,023	<5,3	>695,6
214	<i>E. coli</i>	12	0,064	1	0,016	187,5	62,5
215	<i>K. oxytoca</i>	1	0,064	4	0,032	15,6	125
217	<i>E. coli</i>	12	0,094	2	0,032	128	62,5
218	<i>E. coli</i>	>32	0,125	>16	0,094	>256	>170
219	<i>E. coli</i>	>32	0,125	>16	0,032	>256	>500
220	<i>E. coli</i>	8	<0,064	4	0,032	>125	125
221	<i>E. coli</i>	<0,50	0,19	>16	0,023	<2,6	>695,6
223	<i>K. pneumoniae</i>	0,75	0,125	4	0,032	<5,3	125
224	<i>E. coli</i>	16	0,125	>16	0,125	128	>128

4. Resultados

Aislado	Especie	CMI TZ	CMI TZL	CMI CT	CMI CTL	RATIO TZ/TZL	RATIO CT/CTL
226	<i>E. coli</i>	>32	0,25	>16	0,016	>128	>1000
227	<i>E. coli</i>	>32	0,19	>16	0,047	>168	>340
228	<i>E. coli</i>	>32	0,19	1	0,032	>168	31,25
229	<i>E. coli</i>	>32	0,19	1	0,023	>168	43,5
230	<i>E. coli</i>	0,5	0,064	6	<0,016	7,8	>375
231	<i>E. coli</i>	12	0,125	2	0,125	96	16
232	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,023	2,6	>695,6
233	<i>E. coli</i>	1	0,19	>16	0,016	5,3	>1000
235	<i>E. coli</i>	0,75	0,19	>16	0,047	3,9	>340
237	<i>E. coli</i>	6	0,25	>16	0,25	24	>64
240	<i>E. coli</i>	<0,50	0,064	>16	0,023	<7,8	>695,6
242	<i>E. coli</i>	>32	0,094	>16	0,032	>340	>500
245	<i>E. coli</i>	0,75	0,25	>16	0,047	3	>340
246	<i>E. coli</i>	<0,50	0,125	>16	0,047	<4	>340
248	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,023	<5,3	>695,6
249	<i>E. coli</i>	16	0,064	1	0,016	250	62,5
252	<i>K. pneumoniae</i>	16	0,19	>16	0,023	84	>695,6
253	<i>E. coli</i>	<0,50	<0,064	>16	0,023	ND	>695,6
254	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,023	<5,3	>695,6
255	<i>E. coli</i>	12	0,064	1	0,023	187,5	43,5
258	<i>E. coli</i>	0,5	0,094	>16	0,016	5,3	>1000
260	<i>E. coli</i>	1	<0,064	>16	0,032	>15,6	>500
261	<i>E. coli</i>	>32	0,25	>16	0,032	>128	>500
265	<i>E. coli</i>	>32	0,19	1	0,016	>168	62,5
266	<i>E. coli</i>	>32	0,19	1	0,023	>168	43,5
267	<i>E. coli</i>	>32	0,125	1	<0,016	>256	>62,5
268	<i>E. coli</i>	>32	0,125	3	0,032	>256	93,75
269	<i>E. coli</i>	0,5	0,125	>16	0,032	4	>500
270	<i>E. coli</i>	1,5	0,38	>16	0,094	3,9	>170
272	<i>E. coli</i>	16	<0,064	1	<0,016	>250	>62,5
273	<i>E. coli</i>	<0,50	0,19	>16	<0,016	<2,6	>1000
274	<i>E. coli</i>	<0,50	0,094	>16	0,047	<5,3	>340
276	<i>E. coli</i>	>32	0,094	1,5	<0,016	>340	93,75
277	<i>E. coli</i>	>32	0,094	>16	0,016	>340	>1000
280	<i>E. coli</i>	>32	<0,064	1,5	<0,016	>500	93,75
282	<i>E. coli</i>	0,5	0,094	>16	0,016	5,3	>1000
283	<i>K. oxytoca</i>	1	0,094	>16	0,023	10,6	>695,6
284	<i>E. coli</i>	0,5	0,094	>16	0,016	5,3	>1000
285	<i>E. coli</i>	1	0,125	>16	0,016	8	>1000
288	<i>E. coli</i>	6	0,064	2	0,016	93	125
290	<i>E. coli</i>	0,75	0,094	>16	0,016	8	>1000

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

TZ: Cefotaxima, TZL: Cefotaxima más ácido clavulánico, CT: Cefotaxima, CTL: Cefotaxima más ácido clavulánico

RATIO TZ/TZL o CT/CTL: Cociente entre las CMIs de la cefalosporina sola (TZ o CT) y las CMIs de la cefalosporina más ácido clavulánico (TZL o CTL)

ND: Resultado Indeterminado (CMIs inferiores a los límites inferiores)

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 27: CMI (en µg/ml) obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos en los 125 aislados productores de BLEEs

Aislado	AM	AMC	PIP*	TZP	CF	CXM	FOX	CTX	CPD	CAZ*	FEP	MEM
1	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	32	≥ 64	4	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
16	≥ 32	4	64	8	≥ 64	32	8	≤ 1	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
19	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	4	≤ 1	≤ 0,25
25	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
26	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
27	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	4	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
31	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	8	≤ 4	2	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
41	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
42	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
46	≥ 32	16	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	32	≥ 64	≥ 8	16	8	≤ 0,25
47	≥ 32	4	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	32	≥ 64	≥ 8	2	2	≤ 0,25
48	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	8	2	≤ 0,25
51	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
54	≥ 32	16	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	4	2	≤ 0,25
56	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
58	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	4	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
62	≥ 32	≥ 32	≥ 128	64	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
63	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
65	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
101	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≥ 64	2	≤ 0,25
102	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≥ 64	≥ 64	≤ 0,25
112	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	32	≤ 0,25
115	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
118	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	16	≥ 8	≥ 64	2	≤ 0,25
121	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	32	≤ 4	32	≥ 8	≥ 64	≤ 1	≤ 0,25
122	≥ 32	8	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
124	≥ 32	8	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
132	≥ 32	8	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
134	≥ 32	≤ 2	32	≤ 4	≥ 64	8	≤ 4	≤ 1	≥ 8	8	≤ 1	≤ 0,25
135	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≥ 8	16	2	≤ 0,25
136	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
137	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
138	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
139	≥ 32	≥ 32	≥ 128	64	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
140	≥ 32	8	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	4	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
141	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	32	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
145	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
149	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
150	≥ 32	≤ 2	32	≤ 4	≥ 64	8	≤ 4	2	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
151	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
153	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	≥ 64	≥ 8	2	2	≤ 0,25

4. Resultados

Aislado	AM	AMC	PIP*	TZP	CF	CXM	FOX	CTX	CPD*	CAZ*	FEP	MEM
159	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
161	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
162	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≥ 64	≤ 1	≤ 0,25
163	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
165	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
169	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	32	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
170	≥ 32	16	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	8	≥ 64	≥ 8	16	32	≤ 0,25
171	≥ 32	≤ 2	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	4	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
175	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	16	2	≤ 0,25
177	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	2	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
178	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
179	≥ 32	8	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	16	32	≥ 8	≥ 64	4	≤ 0,25
180	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
181	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	2	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
183	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	32	8	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
184	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	4	≤ 1	≤ 0,25
185	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	32	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	32	≤ 0,25
186	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
187	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
189	≥ 32	16	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	16	≥ 64	≥ 8	16	8	≤ 0,25
190	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≤ 0,25 - ≥ 2	2	≤ 1	≤ 0,25
191	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
192	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
193	≥ 32	≤ 2	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
195	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
196	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	32	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
197	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	4	≤ 4	2	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
198	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	32	≥ 64	≥ 8	4	≥ 64	≤ 0,25
200	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
204	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
207	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
208	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	32	8	2	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
210	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
211	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
214	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	8	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
215	≥ 32	≤ 2	8 - ≥ 32	≤ 4	≥ 64	8	≤ 4	≤ 1	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
217	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
218	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≥ 64	2	≤ 0,25
219	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	≥ 64	≥ 8	≥ 64	≤ 1	≤ 0,25
220	≥ 32	≤ 2	16	≤ 4	≥ 64	4	≤ 4	≤ 1	4	4	≤ 1	≤ 0,25
221	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
223	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	32	≤ 4	4	≥ 8	4	≤ 1	≤ 0,25
224	≥ 32	16	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	16	≥ 64	≥ 8	16	8	≤ 0,25

Betalactamasas de espectro extendido

Aislado	AM	AMC	PIP*	TZP	CF	CXM	FOX	CTX	CPD	CAZ*	FEP	MEM
226	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≥ 64	≤ 1	≤ 0,25
227	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≥ 64	2	≤ 0,25
228	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
229	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	2	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
230	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	4	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
231	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	32	8	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
232	≥ 32	16	≥ 128	32	≥ 64	≥ 64	16	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
233	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
235	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
237	≥ 32	8	≥ 128	8	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 8	4	16	≤ 0,25
240	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
242	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	16	8	8	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
245	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	16	16	≥ 8	2	2	≤ 0,25
246	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	2	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
248	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
249	≥ 32	16	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	8	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
252	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	16	2	≤ 0,25
253	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
254	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
255	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	16	16	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
258	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	16	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
260	≥ 32	4	32	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
261	≥ 32	16	≥ 128	≤ 4	≥ 64	16	8	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
265	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	32	≤ 4	4	≥ 8	32	≤ 1	≤ 0,25
266	≥ 32	8	64	≤ 4	≥ 64	32	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
267	≥ 32	≤ 2	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	8	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
268	≥ 32	8	≥ 128	≤ 4	≥ 64	32	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
269	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
270	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	≥ 64	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	2	≤ 0,25
272	≥ 32	≤ 2	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
273	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	8	≥ 64	≥ 8	2	2	≤ 0,25
274	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	32	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
276	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	32	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
277	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	16	8	≤ 0,25
280	≥ 32	≤ 2	32	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
282	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
283	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	≥ 64	≥ 8	16	8	≤ 0,25
284	≥ 32	4	≥ 128	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
285	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25
288	≥ 32	≤ 2	16	≤ 4	≥ 64	16	≤ 4	4	≥ 8	16	≤ 1	≤ 0,25
290	≥ 32	4	64	≤ 4	≥ 64	≥ 64	≤ 4	8	≥ 8	≤ 1 - ≥ 2	≤ 1	≤ 0,25

AM: Ampicilina, AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico; PIP: Piperacilina; TZP: Piperacilina-tazobactam, CF: Cefalotina, CXM: Cefuroxima, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CPD: Cefpodoxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, MEM: Meropenem

*Antibióticos en los que se modificó la CMI *in vitro* (en primer término) tras la interpretación del resultado obtenido

Tabla 28: CMI (en $\mu\text{g/ml}$) obtenidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos en los 125 aislados productores de BLEEs

Aislado	AN	GM	TM	CIP	NOR	OFL	FT	SXT
1	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
16	16	8	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
19	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	32	≤ 20
25	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
26	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
27	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	32	≥ 320
31	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	128	≤ 20
41	≤ 2	4	2	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
42	≤ 2	≥ 16	2	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
46	4	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
47	≤ 2	≤ 1	≤ 1	2	8	4	128	≤ 20
48	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	32	≤ 20
51	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	2	2	≤ 16	≤ 20
54	8	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
56	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	≤ 16	≥ 320
58	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	8	≥ 8	≤ 16	≥ 320
62	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	2	2	≤ 16	≥ 320
63	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
65	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
101	≤ 2	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
102	≤ 2	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
112	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	≤ 16	≤ 20
115	≤ 2	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
118	≤ 2	8	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
121	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	32	≥ 320
122	≤ 2	≥ 16	2	2	2	≥ 8	64	≤ 20
124	≤ 2	≤ 1	≤ 1	2	4	4	64	≥ 320
132	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	128	≥ 320
134	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	≤ 16	≤ 20
135	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
136	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
137	≤ 2	≥ 16	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
138	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	2	4	32	≥ 320
139	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
140	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	8	≥ 8	≤ 16	≥ 320
141	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	8	≥ 8	≤ 16	≥ 320
145	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
149	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	≤ 16	≤ 20
150	≤ 2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	≤ 16	≤ 20
151	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
153	≤ 2	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320

Betalactamasas de espectro extendido

Aislado	AN	GM	TM	CIP	NOR	OFL	FT	SXT
159	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
161	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
162	≤ 2	≥ 16	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	32	≥ 320
163	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≤ 20
165	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	2	2	32	≤ 20
169	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	1	2	32	≤ 20
170	≤ 2	≥ 16	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
171	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	1	64	≥ 320
175	≤ 2	≥ 16	≥ 16	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	64	≤ 20
177	≤ 2	4	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
178	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
179	≤ 2	≥ 16	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
180	≤ 2	4	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
181	≤ 2	4	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
183	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
184	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	64	≤ 20
185	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	128	≤ 20
186	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	2	2	≤ 16	≥ 320
187	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	1	2	64	≥ 320
189	8	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	256	≤ 20
190	≤ 2	≤ 1	≤ 1	2	2	4	≤ 16	≥ 320
191	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
192	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
193	≤ 2	≤ 1	≤ 1	0,5	1	1	≤ 16	≥ 320
195	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
196	≤ 2	8	8	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
197	≤ 2	≥ 16	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	32	≤ 20
198	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	2	2	128	≥ 320
200	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
204	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
207	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
208	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
210	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≥ 320
211	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≤ 20
214	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≤ 20
215	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	32	≤ 20
217	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
218	≤ 2	≥ 16	8	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≤ 20
219	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
220	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	1	1	≤ 16	≥ 320
221	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
223	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	32	≤ 20
224	8	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320

4. Resultados

Aislado	AN	GM	TM	CIP	NOR	OFL	FT	SXT
226	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
227	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
228	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
229	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
230	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
231	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≤ 20
232	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
233	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
235	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	2	2	≤ 16	≤ 20
237	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
240	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	8	≥ 8	256	≥ 320
242	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	2	2	64	≤ 20
245	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
246	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	32	≥ 320
248	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
249	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
252	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	64	≥ 320
253	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
254	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
255	≤ 2	≥ 16	2	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
258	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
260	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	128	≥ 320
261	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≤ 20
265	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
266	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
267	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	8	≥ 8	128	40
268	≤ 2	≤ 1	≤ 1	1	2	2	128	≥ 320
269	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≥ 320
270	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
272	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≥ 320
273	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≤ 20
274	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
276	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
277	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
280	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	128	≤ 20
282	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
283	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	≤ 16	≤ 20
284	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320
285	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	32	≥ 320
288	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,25	≤ 16	≤ 20
290	≤ 2	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 8	64	≥ 320

AN: Amikacina, GM: Gentamicina, TM: Tobramicina, CIP: Ciprofloxacino, NOR: Norfloxacino, OFL: Ofloxacino, FT: Nitrofurantoina, SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol

Tabla 29: CMI_s (en µg/ml) obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los 125 aislados productores de BLEEs

Aislado	AMX	A/C	P/T	CF	CFX	CX	CTX	TAZ	TZ/C	CFP	MER
1	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	>8/4	>16	1
16	>16	16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	<1
19	>16	16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	4	<1/4	>16	<1
25	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
26	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
27	>16	16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	16	<1/4	>16	<1
31	>16	>16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	>8/4	>16	>8
41	>16	8/4	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	<1
42	>16	16/8	64/4	>8	>16	16	>8	2	<1/4	>16	<1
46	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
47	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	8	>8	4	<1/4	>16	<1
48	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
51	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	16	>8	2	<1/4	>16	<1
54	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	<1/4	2	<1
56	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	>16	>8	1	<1/4	>16	<1
58	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	>16	>8	<1	<1/4	>16	<1
62	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	<1	<1/4	>16	<1
63	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	<1/4	>16	<1
65	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	>16	>8	16	<1/4	>16	<1
101	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
102	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
112	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	8	<1/4	>16	<1
115	>16	16/8	64/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
118	>16	16/8	>64/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
121	>16	8/4	>64/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
122	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	2	<1/4	>16	<1
124	>16	8/4	>64/4	>8	>16	16	>8	16	<1/4	>16	<1
132	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	16	<1/4	>16	<1
134	>16	8/4	>64/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
135	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	1	<1/4	>16	<1
136	>16	8/4	>64/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
137	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
138	>16	>16/8	64/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
139	>16	16/8	64/4	>8	>16	16	>8	2	<1/4	>16	<1
140	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	<1	<1/4	>16	<1
141	>16	>16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	<1/4	4	<1
145	>16	16/8	>64/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
149	>16	>16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	16	<1/4	>16	<1
150	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
151	>16	8/4	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	<1
153	>16	>16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1

4. Resultados

Aislado	AMX	A/C	P/T	CF	CFX	CX	CTX	TAZ	TZ/C	CFP	MER
159	>16	8/4	64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
161	>16	8/4	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	<1
162	>16	16/8	>64/4	>8	>16	16	>8	>16	8/4	>16	<1
163	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
165	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	<1/4	>16	<1
169	>16	>16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	<1
170	>16	>16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	1
171	>16	16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
175	>16	16/8	<16/4	>8	>16	16	>8	>16	8/4	>16	1
177	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
178	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
179	>16	8/4	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
180	>16	>16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
181	>16	>16/8	>64/4	>8	>16	>16	>8	>16	8/4	>16	<1
183	>16	8/4	>64/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
184	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	8	<1/4	>16	<1
185	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
186	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
187	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
189	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	>16	<1/4	>16	<1
190	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	4	<1/4	4	<1
191	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	2	<1/4	>16	<1
192	>16	16/8	32/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
193	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
195	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
196	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
197	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
198	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	8	<1/4	>16	<1
200	>16	8/4	32/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
204	>16	>16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	8/4	>16	<1
207	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
208	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	4	<1
210	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
211	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
214	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	8	<1
215	>16	<4/2	>64/4	>8	16	>16	>8	<1	<1/4	<1	<1
217	>16	<4/2	<16/4	>8	16	<8	8	>16	<1/4	<1	<1
218	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
219	>16	16/8	>64/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
220	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
221	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	16	<1
223	>16	8/4	<16/4	>8	>16	16	>8	<1	<1/4	>16	<1
224	>16	<4/2	<16/4	>8	16	<8	>8	>16	<1/4	4	<1

Betalactamasas de espectro extendido

Aislado	AMX	A/C	P/T	CF	CFX	CX	CTX	TAZ	TZ/C	CFP	MER
226	>16	8/4	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	<1/4	>16	<1
227	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
228	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	8	<1
229	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	8	<1
230	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
231	>16	>16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	>16	>8/4	2	<1
232	>16	16/8	>64/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
233	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	8	<1
235	>16	8/4	64/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
237	>16	>16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	<1	8/4	2	1
240	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
242	>16	8/4	<16/4	>8	8	<8	>8	16	<1/4	<1	<1
245	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
246	<4	<4/2	>64/4	>8	<4	>16	>8	8	<1/4	8	<1
248	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	4	<1
249	>16	16/8	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	16	<1
252	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	4	<1/4	16	<1
253	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
254	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	16	<1/4	>16	<1
255	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
258	>16	<4/2	>64/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
260	>16	>16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	8/4	>16	<1
261	>16	16/8	64/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
265	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
266	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	16	<1
267	>16	<4/2	<16/4	>8	16	<8	8	>16	<1/4	<1	<1
268	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	2	<1
269	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
270	>16	8/4	>64/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
272	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	2	<1
273	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
274	>16	16/8	<16/4	>8	>16	>16	>8	8	8/4	>16	<1
276	>16	16/8	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
277	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	>16	<1
280	>16	<4/2	<16/4	>8	16	<8	4	>16	<1/4	<1	<1
282	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
283	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	<1	<1/4	>16	<1
284	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1
285	>16	16/8	32/4	>8	>16	<8	>8	16	<1/4	>16	<1
288	>16	<4/2	<16/4	>8	>16	<8	>8	>16	<1/4	8	<1
290	>16	8/4	<16/4	>8	>16	<8	>8	2	<1/4	>16	<1

AMX: Amoxicilina, A/C: Amoxicilina-ácido clavulánico; P/T: Piperacilina-tazobactam, CF: Cefalotina, CFX: Cefuroxima, CX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, TAZ: Ceftazidima, TZ/C: Ceftazidima-ácido clavulánico, CFP: Cefepime, MER: Meropenem

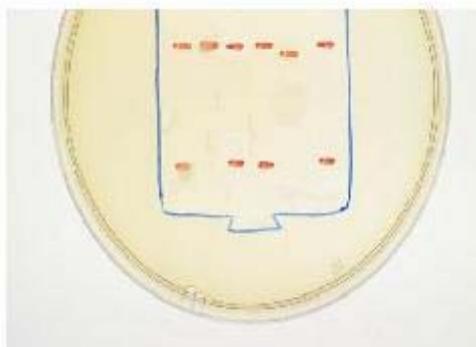
Tabla 30: Punto isoeléctrico (determinado por isoelectroenfoque) y gen plasmídico presente (determinado por PCR) en los 125 aislados productores de BLEEs

Aislado	Especie	pI	PCR
1	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
16	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
19	<i>K. pneumoniae</i>	8.2 + 7.6	SHV
25	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
26	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
27	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
31	<i>K. pneumoniae</i>	8.2 + 7.6	SHV
41	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
42	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
46	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
47	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
48	<i>K. pneumoniae</i>	8.2 + 7.6	SHV
51	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
54	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
56	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
58	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
62	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
63	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
65	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
101	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
102	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
112	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
115	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
118	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
121	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
122	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
124	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
132	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
134	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
135	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
136	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
137	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
138	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
139	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
140	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
141	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
145	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
149	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
150	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
151	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
153	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9

Betalactamasas de espectro extendido

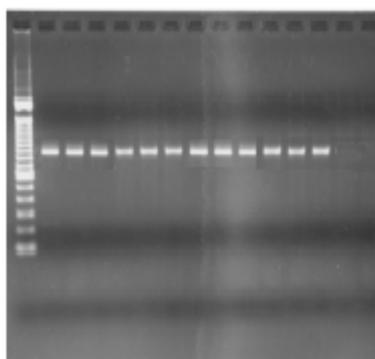
Aislado	Especie	pI	PCR
159	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
161	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
162	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
163	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
165	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
169	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
170	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
171	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
175	<i>K. pneumoniae</i>	8.2	SHV
177	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
178	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
179	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
180	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
181	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
183	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
184	<i>K. pneumoniae</i>	8.2 + 7.6	SHV
185	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
186	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
187	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
189	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
190	<i>E. coli</i>	8,2 + 5,4	SHV
191	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
192	<i>E. coli</i>	8,1	CTX-M9
193	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
195	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
196	<i>E. coli</i>	8,2 + 5,4	SHV
197	<i>K. pneumoniae</i>	8,2 + 7,6	SHV
198	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
200	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
204	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
207	<i>E. coli</i>	8,1	CTX-M9
208	<i>E. coli</i>	8,2 + 5,4	SHV
210	<i>E. coli</i>	8,1 + 5,4	CTX-M9
211	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
214	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
215	<i>K. oxytoca</i>	8.2	SHV
217	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
218	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
219	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
220	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
221	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
223	<i>K. pneumoniae</i>	8.2 + 7.6	SHV
224	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV

Aislado	Especie	pI	PCR
226	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
227	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
228	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
229	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
230	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
231	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
232	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
233	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
235	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
237	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
240	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
242	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
245	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
246	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
248	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
249	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
252	<i>K. pneumoniae</i>	8.2 + 7.6	SHV
253	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
254	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
255	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
258	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
260	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
261	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
265	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
266	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
267	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
268	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
269	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
270	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9
272	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
273	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
274	<i>E. coli</i>	8.1	CTX-M9
276	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
277	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
280	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
282	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
283	<i>K. oxytoca</i>	8.2	SHV
284	<i>E. coli</i>	8.2	SHV
285	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
288	<i>E. coli</i>	8.2 + 5.4	SHV
290	<i>E. coli</i>	8.1 + 5.4	CTX-M9



Línea 1: Aislado de control, con pI 8.2 y 5.4
Línea 2: Aislado perteneciente al estudio, con pI 8.2
Líneas 3, 4 y 7: Aislados pertenecientes al estudio, con pI 8.2 y 5.4
Línea 5: Aislado control, con pI 8.1
Línea 6: Blanco

Figura 25: Resultados de la técnica de isoelectroenfoque



Línea 1: Control de peso molecular (DNA molecular weight III de Boehringer Mannheim Laboratories, Alemania)
Línea 2: Control positivo *bla*_{CTX-M9}
Líneas 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12, y 13: Aislados pertenecientes al estudio
Línea 14: Control negativo (*E.coli* ATCC 25922)
Línea 15: Blanco

Figura 26: Resultados de PCR

En las figuras 27 y 28 se observa el comportamiento de los aislados productores de BLEEs mediante los métodos fenotípicos A, B y E-test.

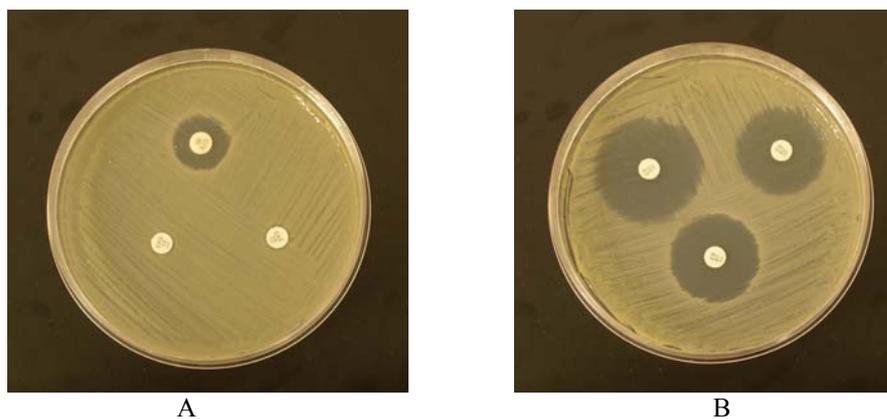


Figura 27: Comportamiento según el método de referencia (A: discos con la cefalosporina sola, B: discos con la cefalosporina más ácido clavulánico)

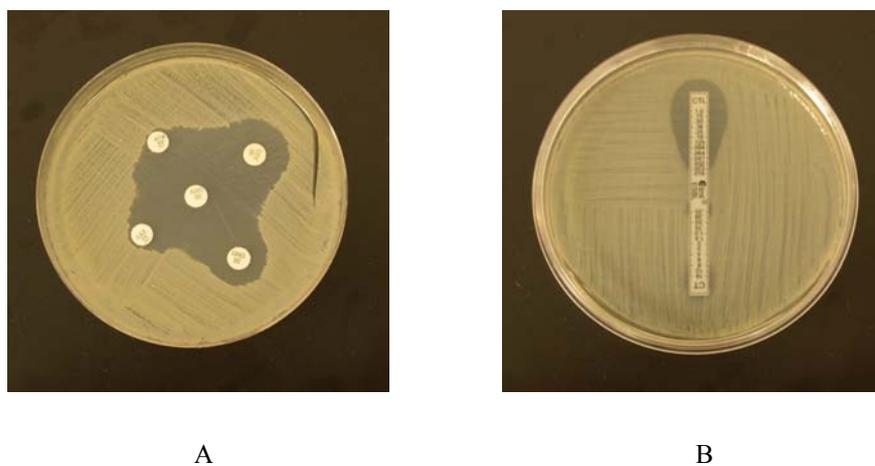


Figura 28: Comportamiento según el método B (A) y E-test (B)

En la tablas 31 y 32 y en las figuras 29 a 31, se resumen los resultados obtenidos en las técnicas de isoelectroenfoque y PCR para los 125 aislados productores de BLEEs.

Tabla 31: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs según especie y punto isoeléctrico de la betalactamasa presente

	pI				
	8.1	8.1 + 5.4	8.2	8.2 + 5.4	8.2 + 7.6
<i>E. coli</i>	23	44	9	39	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	1	0	7
<i>K. oxytoca</i>	0	0	2	0	0

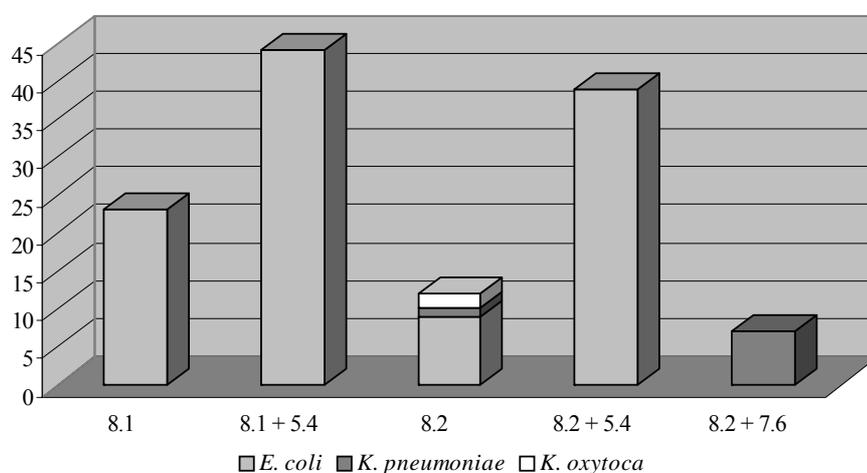


Figura 29: Distribución de los puntos isoeléctricos encontrados según la especie

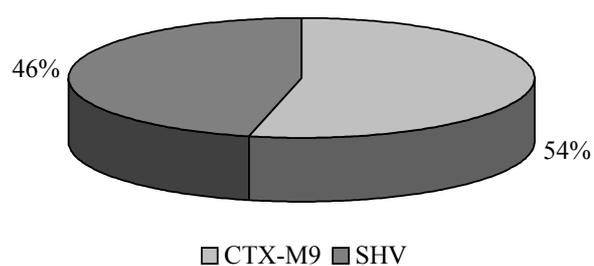


Figura 30: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs por la betalactamasa encontrada

Tabla 32: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs por especie y betalactamasa encontrada

	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>
CTX-M9	67	0	0
SHV	48	8	2

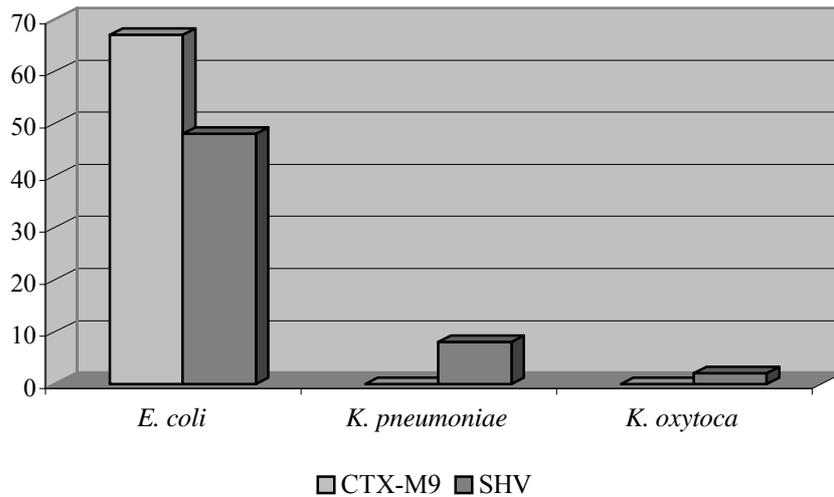


Figura 31: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs por especie y betalactamasa encontrada

Como puede observarse en las tablas y figuras anteriores, existe un claro predominio entre los aislados clínicos, tanto productores como no productores de BLEEs de la especie *E. coli*, frente a *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, hecho que está en relación, como veremos más adelante, con el tipo de muestra clínica predominante en este estudio.

Podemos constatar un predominio de la betalactamasa CTX-M9 frente a SHV (figura 30). Destacamos la presencia de enzimas CTX-M9 sólo en *E. coli*, mientras que enzimas SHV aparecen en las tres especies (tabla 32). En *E. coli* encontramos ambos tipos de BLEEs, y en *Klebsiella* spp. sólo hallamos enzimas SHV (figura 31).

4.2. Características demográficas de los aislados

Las características demográficas referentes al sexo, tipo de muestra de la que se obtuvo el aislado y el servicio que solicitó el análisis de la muestra correspondiente, quedan resumidas de la siguiente forma:

En las figuras 32 y 33 se refleja la distribución por sexos en los dos grupos analizados, pudiéndose apreciar que no existen diferencias a este respecto entre ambos. Hay que señalar el predominio, en los dos grupos, de muestras procedentes de mujeres, hecho que está en relación también al predominio de determinadas muestras clínicas, como veremos.

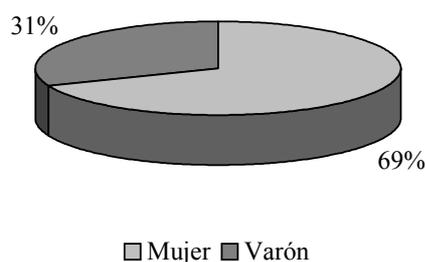


Figura 32: Distribución por sexos de los 125 aislados productores de BLEEs

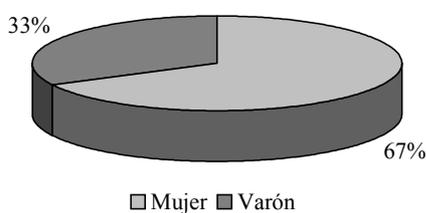


Figura 33: Distribución por sexos de los 344 aislados no productores de BLEEs

Las muestras clínicas de las que se obtuvieron los distintos aislados, tanto productores como no productores de BLEEs, aparecen en las tablas 33 y 34, así como en las figuras 34 y 35, respectivamente.

Tabla 33: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs por tipo de muestra

Orina	Exudado quirúrgico	Secreción genital	Sonda vesical	Otros
108	9	3	2	3

Otros: Incluye 1 catéter, 1 esputo y 1 líquido ascítico

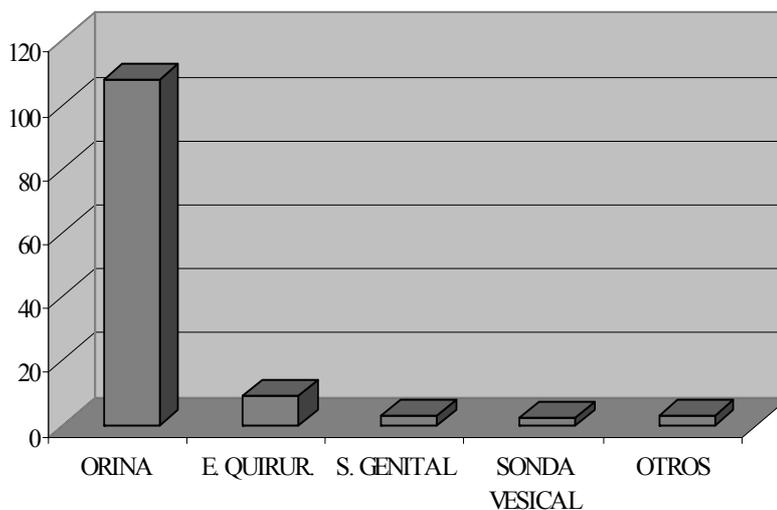


Figura 34: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs por tipo de muestra

Tabla 34: Clasificación de los 344 aislados no productores de BLEEs por tipo de muestra

Orina	Exudado quirúrgico	Secreción genital	Escara/úlceras
316	16	4	8

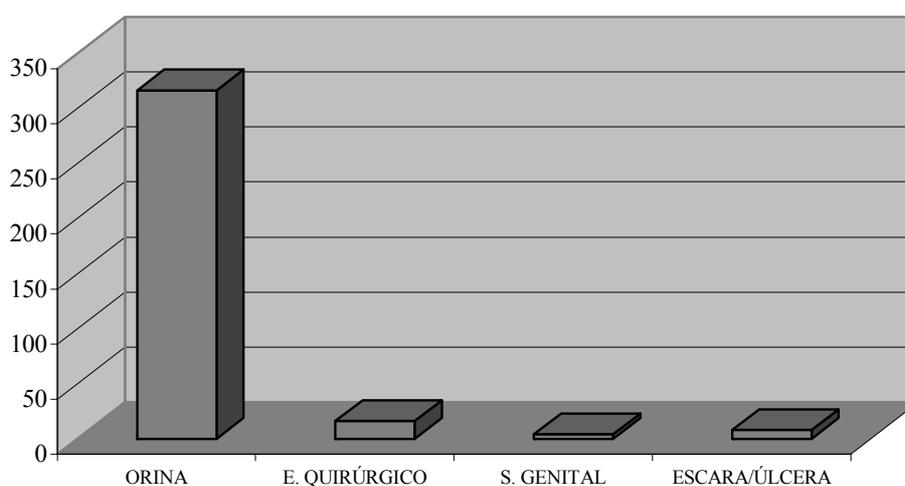


Figura 35: Clasificación de los 344 aislados no productores de BLEEs por tipo de muestra

En ambos grupos la muestra clínica predominante, fuente de aislados para nuestro estudio, fue la orina. En líneas generales ésta es la muestra más frecuente en los laboratorios de Microbiología Clínica. La bacteria que más frecuentemente produce infección del tracto urinario es *E. coli*, y la ITU es más prevalente en mujeres que en varones. Estos postulados sostienen el hecho de que en nuestro estudio la muestra más frecuente sea la orina, la especie bacteriana más frecuente sea *E. coli* y el sexo femenino sea el más relevante.

Si analizamos la distribución de las muestras en los dos grupos en función del sexo (tablas 35 y 36 y figuras 36 y 37) podemos constatar, por tanto, el predominio del sexo femenino como fuente de aislados clínicos para nuestro estudio, que se produce a costa de la orina como muestra clínica más frecuente.

Tabla 35: Distribución por sexos de las diferentes muestras donde se encontraron aislados productores de BLEEs

	Orina	Exudado	Secreción genital	Sonda vesical	Otros
Varones	27	6	2	2	2
Mujeres	81	3	1	0	1

Otros: Incluye 1 catéter, 1 esputo y 1 líquido ascítico

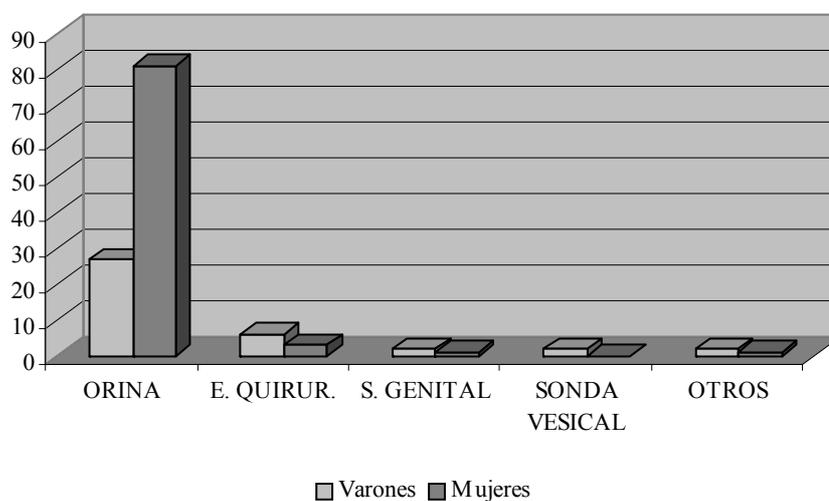


Figura 36: Distribución por sexos de las diferentes muestras donde se encontraron aislados productores de BLEEs

Tabla 36: Distribución por sexos de las diferentes muestras donde se encontraron aislados no productores de BLEEs

	Orina	Exudado quirúrgico	Secreción genital	Escara/úlceras
Varones	92	12	0	8
Mujeres	224	4	4	0

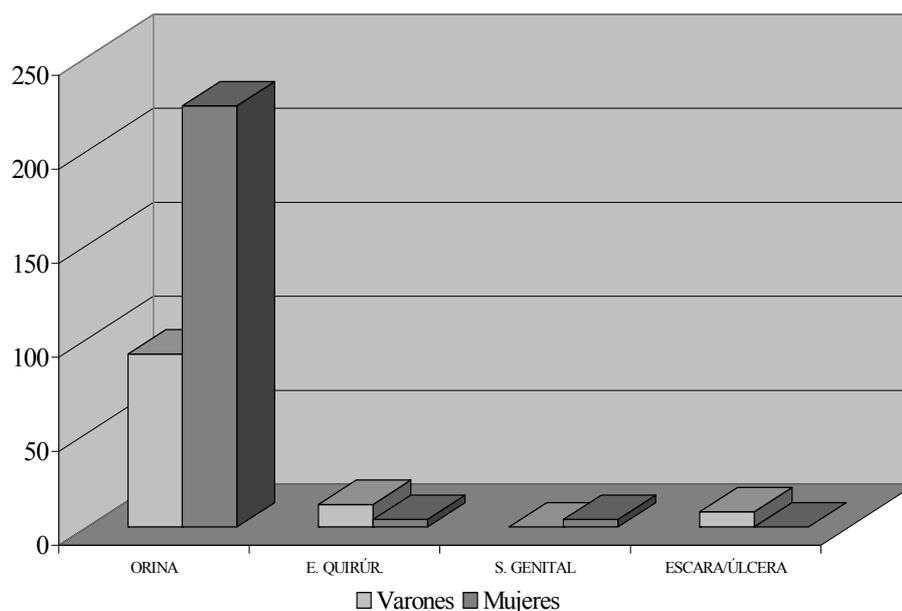


Figura 37: Distribución por sexos de las diferentes muestras donde se encontraron aislados no productores de BLEEs

Las muestras clínicas para este estudio se obtuvieron tanto del nivel extrahospitalario (procedentes de los Centros de Atención Primaria) como del nivel intrahospitalario (considerando como tales las muestras procedentes de pacientes ingresados más de 72 horas en cualquiera de los servicios médicos o quirúrgicos del Hospital “San Cecilio”). La distribución de los aislados por servicio solicitante del estudio de infección, así como su procedencia hospitalaria o comunitaria para los dos grupos de nuestro estudio se muestran en las tablas 37 y 38 y en las figuras 38 a 41.

Tabla 37: Clasificación de los 125 aislados productores de BLEEs según el servicio solicitante

Extrahospitalarias	Intrahospitalarias				
	Cirugía General	Medicina Interna	Pediatría	Traumatología	Otros
93	7	4	12	3	6

Otros: Incluye 1 Cardiología, 1 Nefrología, 1 Oncología, 1 UVI, 1 Urología, 1 Cirugía Vascular

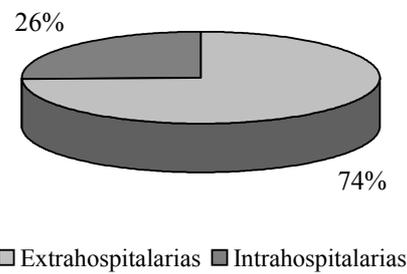


Figura 38: Clasificación de los aislados productores de BLEEs por el origen de las muestras

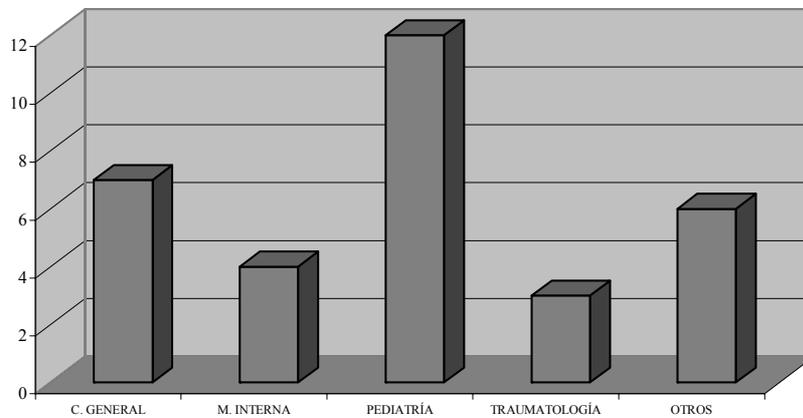
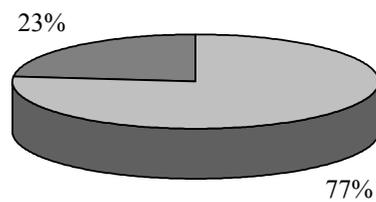


Figura 39: Distribución de los aislados productores de BLEEs de origen intrahospitalario por servicio solicitante

La distribución de los aislados procedentes del servicio de Pediatría fue: 2 de Preescolares, 4 de Lactantes, 4 de RNP y 2 de UCI.

Tabla 38: Clasificación de los 344 aislados no productores de BLEEs según el servicio solicitante

Extrahospitalarias	Intrahospitalarias				
	Cirugía General	Medicina Interna	Pediatría	Reanimación	Cirugía vascular
264	12	36	24	4	4



□ Extrahospitalarias ■ Intrahospitalarias

Figura 40: Clasificación de los aislados no productores de BLEEs por el origen de las muestras

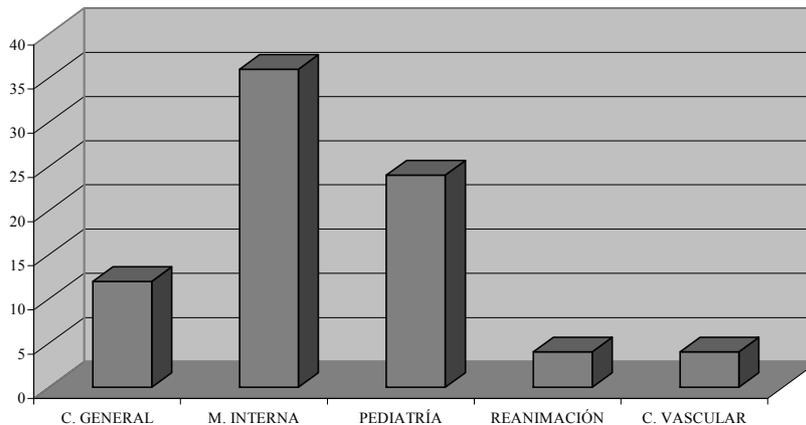


Figura 41: Distribución de los aislados no productores de BLEEs de origen intrahospitalario por servicio solicitante

La distribución de los aislados procedentes del servicio de Pediatría fue: 16 de Lactantes y 8 de RNP.

De nuevo, en las figuras 42 a 45 observamos mayor frecuencia de aislados entre mujeres que en varones, tanto en muestras extra como intrahospitalarias, sin diferencias para el sexo entre ambos grupos.

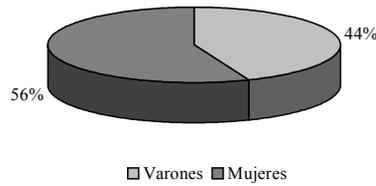


Figura 42: Distribución de aislados intrahospitalarios productores de BLEEs por sexos

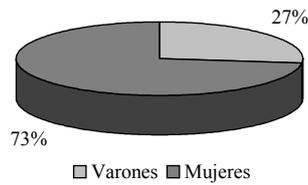


Figura 43: Distribución de aislados extrahospitalarios productores de BLEEs por sexos

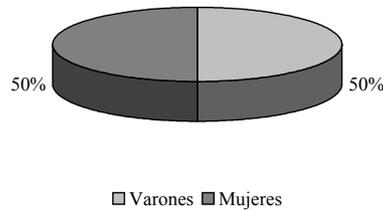


Figura 44: Distribución de aislados intrahospitalarios no productores de BLEEs por sexos

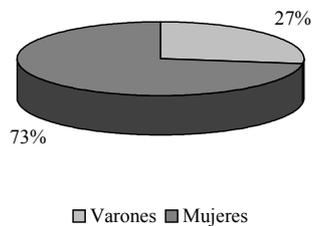


Figura 45: Distribución de aislados extrahospitalarios no productores de BLEEs por sexos

4.3. Resultados obtenidos mediante el método de referencia (método A)

En las tablas 39 a 42 se resumen los resultados obtenidos para el método de difusión con disco usado como método fenotípico de referencia en nuestro estudio (método A). Indicamos los resultados de media, desviación estándar y rango de los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos correspondientes, de todos los aislados productores de BLEEs, diferenciando los aislados que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una enzima SHV, y el grupo de aislados no productores de BLEEs.

Tabla 39: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de BLEEs para la difusión con disco (método A)

	CAZ	CD02	CTX	CD03	CPD	CD01
Media	19,8	28,8	16,1	29,9	7,0	21,5
Desviación estándar	6,78	3,18	4,35	3,13	2,30	3,38
Rango	6-32	20 - 36	6 - 26	23 - 36	6 - 17	13-30

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CD02: Cefotaxidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

Los 125 aislados productores de BLEEs presentaron medias de los diámetros de inhibición del crecimiento de las cefalosporinas solas (CAZ, CTX, CPD) por debajo de los límites que el NCCLS establece como puntos de corte para sospechar una BLEE (22, 27 y 17, respectivamente). Al mismo tiempo se aprecia que las medias de los diámetros de inhibición del crecimiento de los discos de las cefalosporinas más ácido clavulánico (CD02, CD03, CD01) están incrementadas más de 5 mm respecto al diámetro de inhibición del disco con la cefalosporina sola.

La mayor desviación estándar para CAZ, así como su amplio rango, con valores que superan el valor límite establecido por el NCCLS para este antibiótico nos indican que éste, analizado por sí sólo, no fue capaz de detectar la presencia de BLEEs en algunos de los aislados.

Tabla 40: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de CTX-M9 para la difusión con disco (método A)

	CAZ	CD02	CTX	CD03	CPD	CD01
Media	24,5	30	15,5	29,7	6,2	20,1
Desviación estándar	3,87	2,9	3,34	2,97	0,99	2,87
Rango	12-32	23 - 36	8 - 22	24 - 36	6 - 12	13 - 26

CAZ: Ceftazidima (30 µg), CD02: Ceftazidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

Los 67 aislados productores de CTX-M9 presentaron medias de los diámetros de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de CTX y CPD inferiores a los límites establecidos por el NCCLS, con un incremento considerable cuando se asoció la presencia de ácido clavulánico (CD03 y CD01). Como se puede apreciar, no ocurrió lo mismo para CAZ, para la que, aunque algunos valores del diámetro se encontraron dentro de los límites de validez, otros, sin embargo, fueron superiores a 22 mm, por lo que este antibiótico no fue capaz, por sí solo, de detectar la presencia de enzimas CTX-M9, hecho que está en consonancia con la menor capacidad de hidrólisis de ceftazidima por las enzimas CTX-M9.

Tabla 41: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de SHV para la difusión con disco (método A)

	CAZ	CD02	CTX	CD03	CPD	CD01
Media	14,3	27,4	16,8	30,2	7,9	23
Desviación estándar	5,13	2,94	5,20	3,29	2,95	3,3
Rango	6 - 27	20 - 34	6 - 26	23 - 36	6 - 17	16 - 30

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CD02: Cefotaxidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

Para los 58 aislados productores de SHV observamos que las medias de los diámetros de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de cefalosporinas solas son, en todos los casos, inferiores a los límites establecidos por el NCCLS, con un importante incremento en la media de los diámetros de inhibición en los discos que también contienen ácido clavulánico. Aunque para CAZ el valor promedio está dentro de los límites establecidos, como vemos por su rango, algunos aislados presentaron valores superiores a 22 mm.

Tabla 42: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados no productores de BLEEs para la difusión con disco (método A)

	CAZ	CD02	CTX	CD03	CPD	CD01
Media	27,7	30	32,2	33,3	25,1	25,4
Desviación estándar	2,98	3,23	3,42	3,48	5,7	5,78
Rango	20-35	23-36	25-40	26-40	6 - 34	6 - 34

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CD02: Cefotaxidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

Los aislados no productores de BLEEs se mostraron básicamente sensibles a las cefalosporinas, no encontrándose diferencias entre las medias de los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano entre los discos de cefalosporinas solas y los que contenían cefalosporinas más ácido clavulánico.

Los diámetros de inhibición del crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 700603 alrededor de los discos fueron (en mm) 10/22 para CAZ/CD02, 20/28 para CTX/CD03, 11/21 para CPD/CD01 en todos los ensayos; y para *E. coli* ATCC 25922 fueron (en mm) 28/28 para CAZ/CD02, 30/30 para CTX/CD03, 24/24 para CPD/CD01 en todos los ensayos.

4.4. Resultados obtenidos mediante el método B

En las tablas 43 a 46 se resumen los resultados obtenidos para el método B. Indicamos los resultados de media, desviación estándar y rango de los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos correspondientes, de todos los aislados productores de BLEEs, diferenciando los aislados que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una enzima SHV, y el grupo de aislados no productores de BLEEs.

Tabla 43: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de BLEEs para la difusión con disco (método B)

	CAZ	CTX	CPD	ATM
Media	19,8	16,1	7,0	20,1
Desviación estándar	6,78	4,35	2,30	6,36
Rango	6 - 32	6 - 26	6 - 17	6 - 32

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), ATM: Aztreonam (30 µg)

Tabla 44: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de CTX-M9 para la difusión con disco (método B)

	CAZ	CTX	CPD	ATM
Media	24,5	15,5	6,2	23,5
Desviación estándar	3,87	3,34	0,99	4,51
Rango	12 - 32	8 - 22	6 - 12	10 - 30

CAZ: Ceftazidima (30 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), ATM: Aztreonam (30 µg)

Tabla 45: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de SHV para la difusión con disco (método B)

	CAZ	CTX	CPD	ATM
Media	14,3	16,8	7,9	16,2
Desviación estándar	5,13	5,20	2,95	5,94
Rango	6 - 27	6 - 26	6 - 17	6 - 32

CAZ: Ceftazidima (30 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), ATM: Aztreonam (30 µg)

Tabla 46: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados no productores de BLEEs para la difusión con disco (método B)

	CAZ	CTX	CPD	ATM
Media	27,7	32,2	25,1	32,9
Desviación estándar	2,98	3,42	5,7	3,97
Rango	20 - 35	25 - 40	6 - 34	25 - 43

CAZ: Ceftazidima (30 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), ATM: Aztreonam (30 µg)

En la tabla 47 se puede observar qué aislados productores de BLEEs mostraron sinergia entre el disco de la cefalosporina sola o el aztreonam y el que contenía amoxicilina más ácido clavulánico.

Tabla 47: Distribución de los 125 aislados productores de BLEEs según los resultados obtenidos para el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano para cada antibiótico ensayado y la presencia o no de sinergia con el método B

Disco	Diámetro	Sinergia con clavulánico	CTX-M9	SHV
CAZ	≤ 22	SI	17	54
		NO	0	0
	> 22	No valoro	50	4
CTX	≤ 27	SI	67	58
		NO	0	0
	> 27	No valoro	0	0
CPD	≤ 17	SI	67	58
		NO	0	0
	> 17	No valoro	0	0
ATM	≤ 27	SI	50	53
		NO	7	4
	> 27	No valoro	10	1

CAZ: Ceftazidima (30 μ g), CTX: Cefotaxima (30 μ g), CPD: Cefpodoxima (10 μ g), ATM: Aztreonam (30 μ g)

Al igual que ocurría con el método A, CTX y CPD presentaron medias de los diámetros de inhibición del crecimiento por debajo de los límites establecidos por el NCCLS, junto a presencia de sinergia en la asociación con ácido clavulánico en todos los aislados productores de BLEEs. Lo mismo ocurrió para ATM, con un límite establecido por el NCCLS en ≤ 27 mm, aunque en algunos aislados se superó este valor, por lo que no se muestra útil, por sí solo, para detectar la presencia de una BLEE. Al igual que en el método A, CAZ presentó en algunos aislados que contenían BLEEs valores superiores a su valor límite, especialmente entre los aislamientos productores de CTX-M9, donde su media superó el valor límite establecido, por lo que no se muestra útil, por sí sola, para detectar la presencia de una BLEE.

En los aislados no productores de BLEEs ninguno de estos cuatro antibióticos presentó medias de diámetros de inhibición del crecimiento inferiores a los límites establecidos, y aunque algunos aislados sí presentaron diámetros inferiores, en ningún caso se mostró sinergia en la asociación con ácido clavulánico (tabla 46).

Los diámetros de inhibición del crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 700603 alrededor de los discos fueron (en mm) 10 para CAZ, 20 para CTX, 11 para CPD y 12 para ATM junto a sinergia con ácido clavulánico en todos los ensayos; y para *E. coli* ATCC 25922 fueron (en mm) 28 para CAZ, 30 para CTX, 24 para CPD y 32 para ATM en todos los ensayos.

4.5. Resultados del estudio con cefepime y cefoxitina

En las tablas 48 a 51 mostramos los resultados de media, desviación estándar y rango de los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos de cefepime (FEP) y cefoxitina (FOX), de todos los aislados productores de BLEEs, diferenciando los que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una enzima SHV, y el grupo de aislados no productores de BLEEs.

En la tabla 52 aparece la distribución de los aislados productores y no productores de BLEEs según el comportamiento *in vitro* respecto a cefepime y cefoxitina en los tres procedimientos que ensayaron estos antibióticos (difusión con disco, VITEK 2 y WIDER).

En la tabla 53 aparece el comportamiento que cefepime y cefoxitina mostraron en la interpretación de los resultados fenotípicos al valorarse conjuntamente con los métodos A y B.

Tabla 48: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de BLEEs para la difusión con disco con cefepime y cefoxitina

	FEP	FOX
Media	21,2	23,1
Desviación estándar	4,22	3,57
Rango	6 - 32	6 - 30

FEP: Cefepime (30 µg), FOX: Cefoxitina: (30 µg)

Tabla 49: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de CTX-M9 para la difusión con disco con cefepime y cefoxitina

	FEP	FOX
Media	19,8	22
Desviación estándar	3,55	4,82
Rango	6 - 26	6 - 30

FEP: Cefepime (30 µg), FOX: Cefoxitina: (30 µg)

Tabla 50: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados productores de SHV para la difusión con disco con cefepime y cefoxitina

	FEP	FOX
Media	22,9	23,7
Desviación estándar	4,3	2,49
Rango	14 - 32	16 - 30

FEP: Cefepime (30 µg), FOX: Cefoxitina: (30 µg)

Tabla 51: Media (en mm), desviación estándar y rango de los aislados no productores de BLEEs para la difusión con disco con cefepime y cefoxitina

	FEP	FOX
Media	32	22,9
Desviación estándar	3,27	4,98
Rango	24 - 40	8 - 32

FEP: Cefepime (30 µg), FOX: Cefoxitina: (30 µg)

Tabla 52: Distribución de los aislados clínicos productores y no productores de BLEEs según la categoría clínica obtenidos para cefepime y cefoxitina

	Método	Categoría clínica	Aislados productores de BLEEs	Aislados no productores de BLEEs
CEFEPIME	Difusión con disco	S (≥ 18)	108	344
		I (15-17)	7	0
		R (≤ 14)	10	0
	VITEK 2	S (≤ 8)	119	344
		I (16)	1	0
		R (≥ 32)	5	0
	WIDER	S (≤ 8)	21	308
		I (16)	4	16
		R (≥ 32)	100	20
CEFOXITINA	Difusión con disco	S (≥ 18)	118	284
		I (15-17)	2	24
		R (≤ 14)	5	36
	VITEK 2	S (≤ 8)	106	252
		I (16)	13	32
		R (≥ 32)	6	60
	WIDER	S (≤ 8)	62	68
		I (16)	19	84
		R (≥ 32)	44	192
Total			125	344

Tabla 53: Interpretación de los resultados obtenidos para cefepime y cefoxitina en la difusión con disco (diámetro del halo de inhibición en mm)

Cefepime	Cefoxitina	Número de aislados con fenotipo compatible con la presencia de BLEEs	
		Compatible	No compatible
≥ 18 (sensible)	≥ 18 (sensible)	105	284
	< 18 (resistente)	3	60
< 18 (resistente)	≥ 18 (sensible)	13	0
	< 18 (resistente)	4	0
Total de aislamientos ensayados		125	344

4.6. Resultados obtenidos mediante la prueba de Epsilon

La distribución, en números absolutos, de las CMIs obtenidas mediante E-test para ceftazidima (TZ/TZL) y cefotaxima (CT/CTL) en los aislados productores de BLEEs, diferenciando los productores de CTX-M9 de los de SHV, y los no productores de BLEEs, se muestran en las figuras 46 a 53. Podemos observar que las CMIs más elevadas para TZ ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$), aparecen básicamente en los aislados productores de SHV, encontrándose valores inferiores al punto de corte establecido por el NCCLS para ceftazidima fundamentalmente entre los productores de CTX-M9, como corresponde a una menor capacidad de hidrólisis de esta enzima por esta cefalosporina (figura 46). CT, sin embargo, presenta CMIs elevadas ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$) para los aislados productores tanto de CTX-M9 como de SHV, si bien las CMIs más bajas se dan dentro del grupo de productores de SHV (figura 50).

El análisis obtenido de las CMIs para las cefalosporinas asociadas con ácido clavulánico con el E-test (TZL y CTL) para los dos grupos de aislados productores de BLEEs nos muestra una clara disminución de los valores de CMIs de éstos respecto al E-test con la cefalosporina sola (TZ y CT, respectivamente), junto con una distribución más homogénea de CMIs en los dos grupos (figuras 48 y 52).

En los aislados no productores de BLEEs las CMIs de TZ y CT se mostraron fundamentalmente en valores por debajo del límite establecido por el NCCLS para el cribado de BLEEs, por lo que no tiene utilidad en estos casos valorar los resultados obtenidos para las asociaciones con ácido clavulánico. En los casos en los que la CMI de las cefalosporinas solas fueron iguales o superiores a este valor límite, no se apreció una reducción de la CMI en la asociación con ácido clavulánico ≥ 8 (≥ 3 diluciones) (figuras 47 y 51).

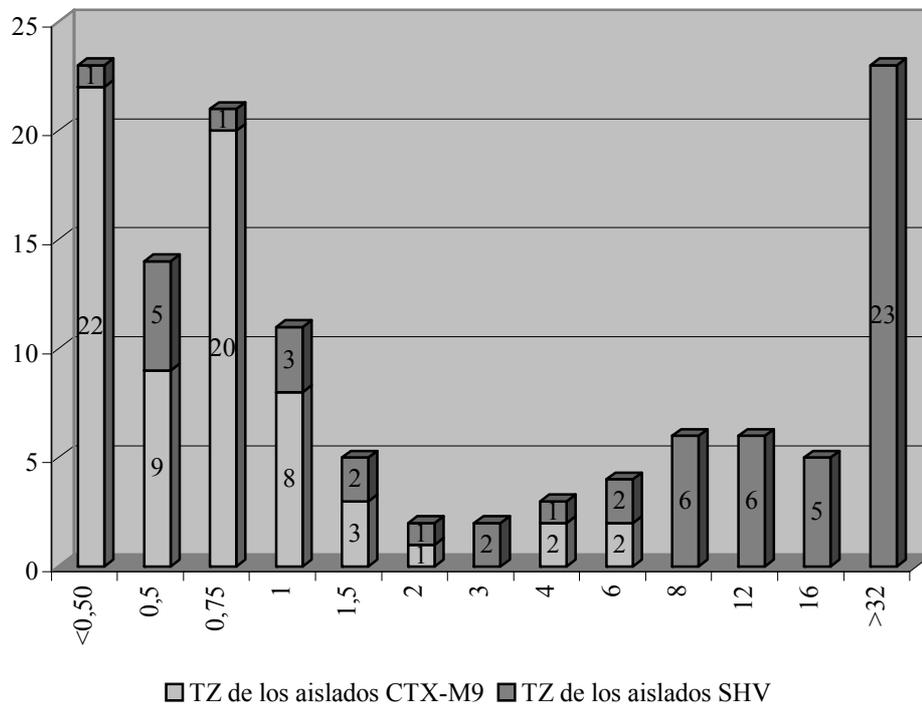


Figura 46: Distribución de CMIs de TZ mediante E-test de los aislados productores de BLEEs

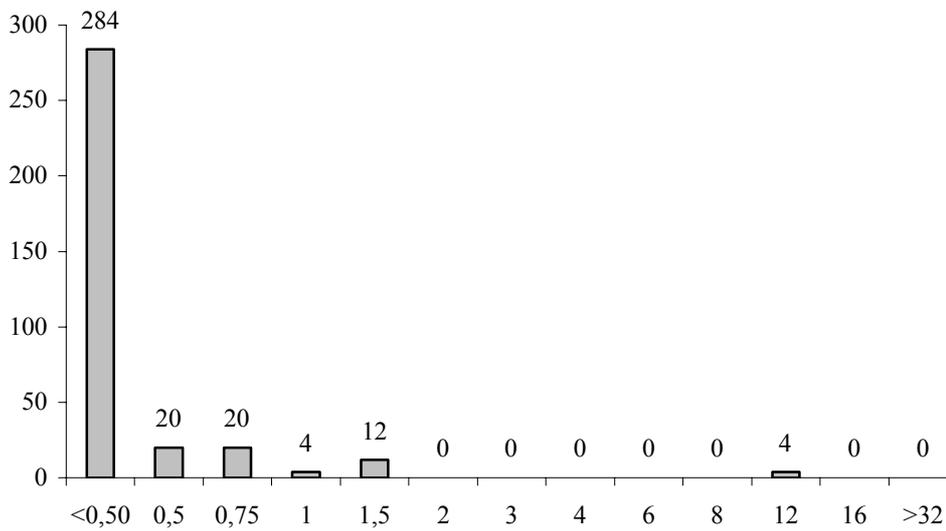


Figura 47: Distribución de CMIs de TZ mediante E-test de los aislados no productores de BLEEs

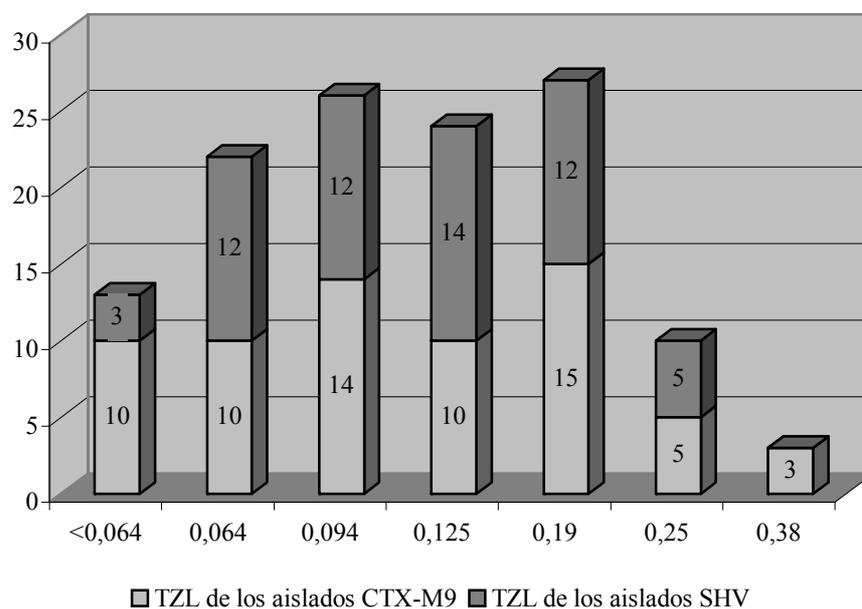


Figura 48: Distribución de CMIs de TZL mediante E-test de los aislados productores de BLEEs

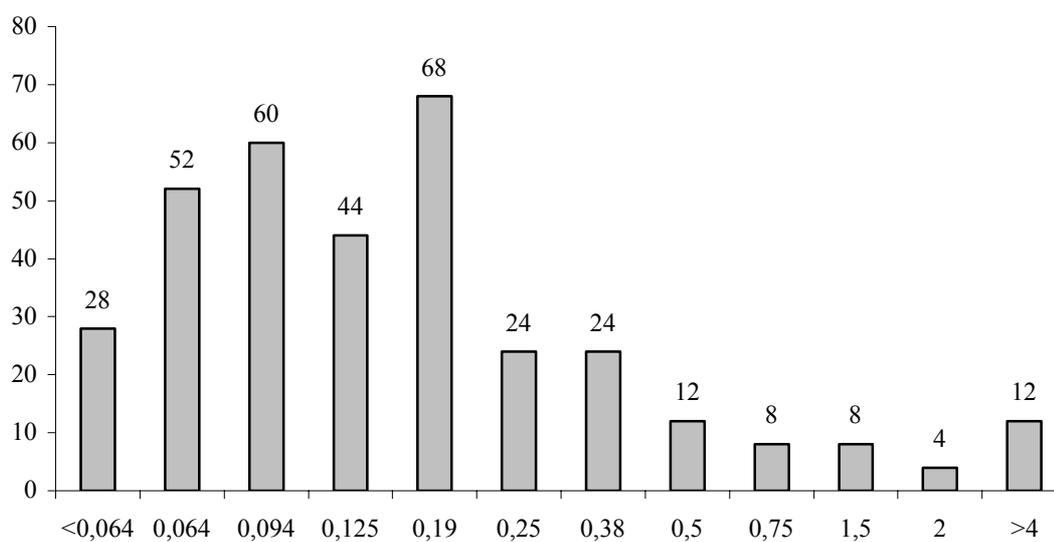


Figura 49: Distribución de CMIs de TZL mediante E-test de los aislados no productores de BLEEs

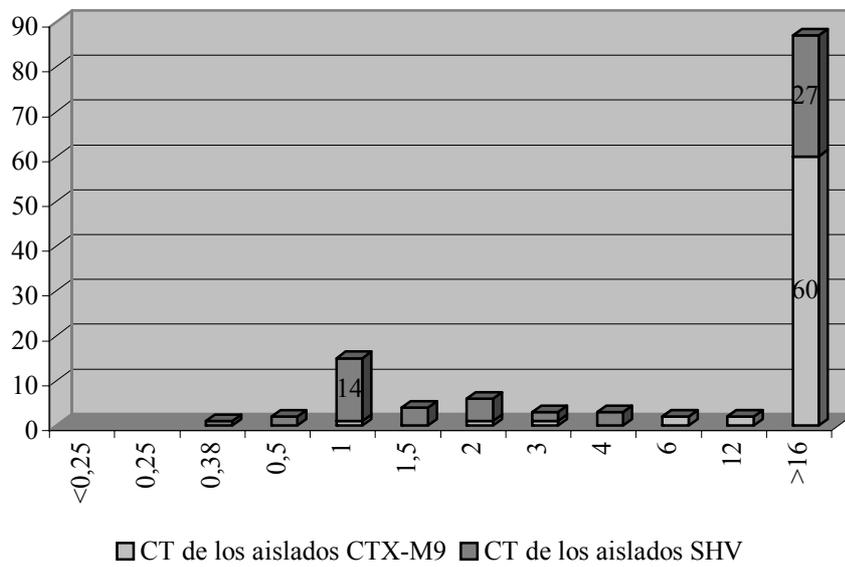


Figura 50: Distribución de CMIs de CT mediante E-test de los aislados productores de BLEEs

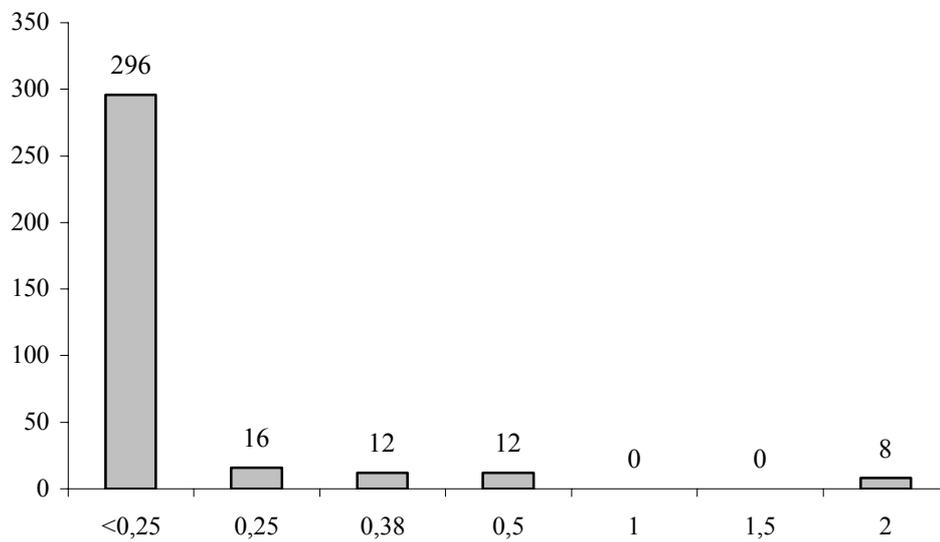


Figura 51: Distribución de CMIs de CT mediante E-test de los aislados no productores de BLEEs

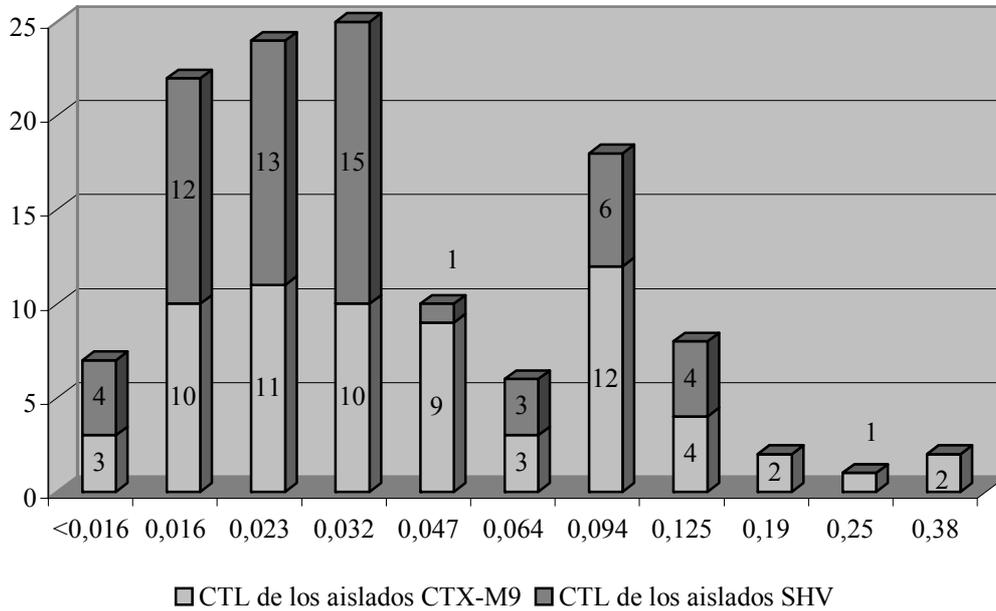


Figura 52: Distribución de CMIs de CTL mediante E-test de los aislados productores de BLEEs

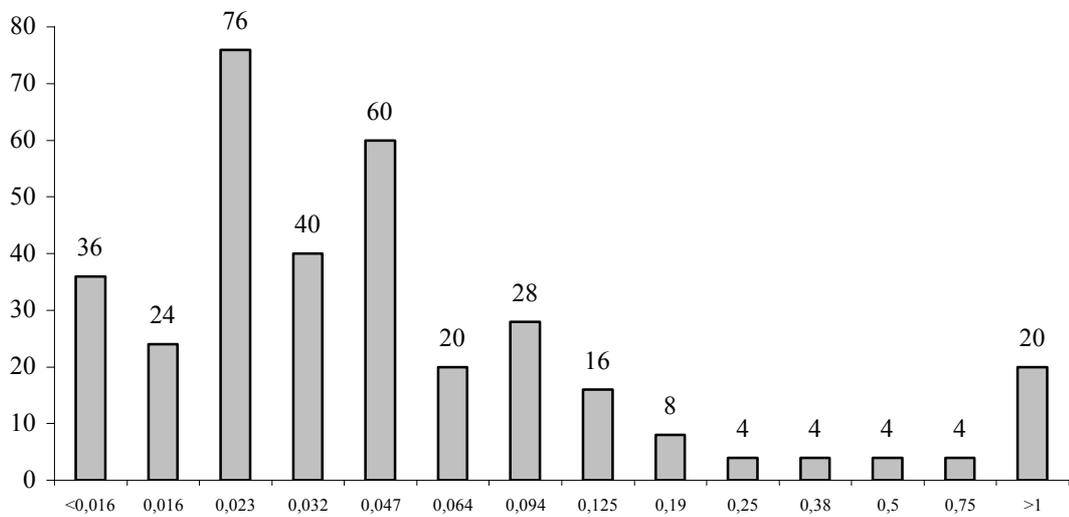


Figura 53: Distribución de CMIs de CTL mediante E-test de los aislados no productores de BLEEs

En la tabla 54 aparecen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos a partir de los E-test realizados en el conjunto de los 125 aislados clínicos productores de BLEEs.

En la tabla 55 mostramos los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos a partir de los E-test realizados en el conjunto de los 67 aislados clínicos productores de CTX-M9.

En la tabla 56 se recogen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos a partir de los E-test realizados en el conjunto de los 58 aislados clínicos productores de SHV.

En la tabla 57 se muestran los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos a partir de los E-test realizados en el conjunto de los 344 aislados clínicos no productores de BLEEs.

La distribución de los resultados de CMI para cada E-test, en porcentaje respecto al total de cada grupo, quedan reflejados en las figuras 54 a 69.

Al igual que ocurría con los métodos fenotípicos anteriores (método A y B) cabe destacar que en los aislados productores de BLEEs los valores de CMI obtenidos para ceftazidima (TZ) son inferiores al valor límite establecido por el NCCLS, hecho que ocurre a expensas fundamentalmente de una CMI baja para esta cefalosporina en los aislados productores de CTX-M9, no así para los aislados productores de SHV, con CMI superiores. Los valores de CMI para cefotaxima, sin embargo, son elevados para cualquiera de los dos grupos de aislados productores de BLEEs.

La cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603 presentó las siguientes CMIs: TZ > 32 µg/ml, TZL = 0,25 µg/ml, CT > 16 µg/ml y CTL = 0,25 µg/ml en todos los ensayos, mientras que *E. coli* ATCC 25922 presentó las CMIs: TZ < 0,50 µg/ml, TZL = 0,125 µg/ml, CT < 0,25 µg/ml y CTL = 0,064 µg/ml en todos los ensayos.

Tabla 54: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) mediante E-test para los aislados productores de BLEEs

	TZ	TZL	CT	CTL
CMI₅₀	1	0,125	>16	0,032
CMI₉₀	>32	0,25	>16	0,125

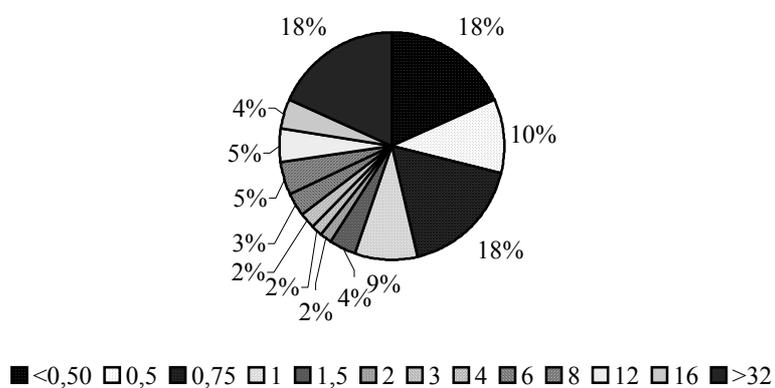


Figura 54: Distribución de CMIs de TZ mediante E-test para los aislados productores de BLEEs

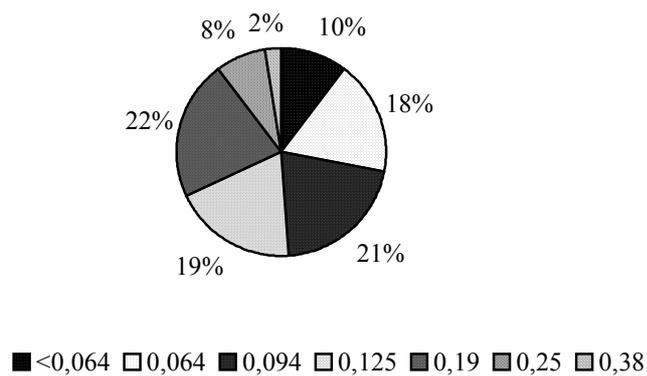
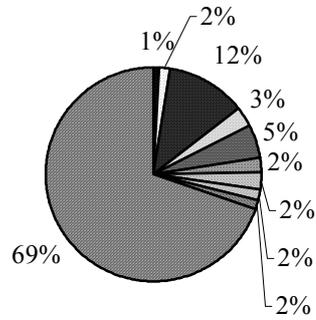
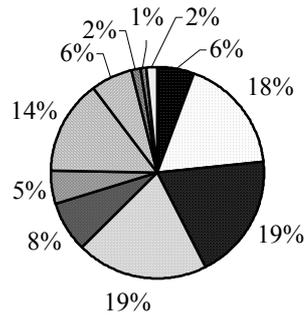


Figura 55: Distribución de CMIs de TZL mediante E-test para los aislados productores de BLEEs



■ 0,38 □ 0,5 ■ 1 □ 1,5 ■ 2 ■ 3 □ 4 □ 6 ■ 12 ■ >16

Figura 56: Distribución de CMIs de CT mediante E-test para los aislados productores de BLEEs



■ <0,016 □ 0,016 ■ 0,023 □ 0,032 ■ 0,047 □ 0,064 ■ 0,094
 □ 0,125 ■ 0,19 ■ 0,25 □ 0,38

Figura 57: Distribución de CMIs de CTL mediante E-test para los aislados productores de BLEEs

Tabla 55: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) mediante E-test para los aislados productores de CTX-M9

	TZ	TZL	CT	CTL
CMI₅₀	0,75	0,094	>16	0,032
CMI₉₀	1,5	0,25	>16	0,125

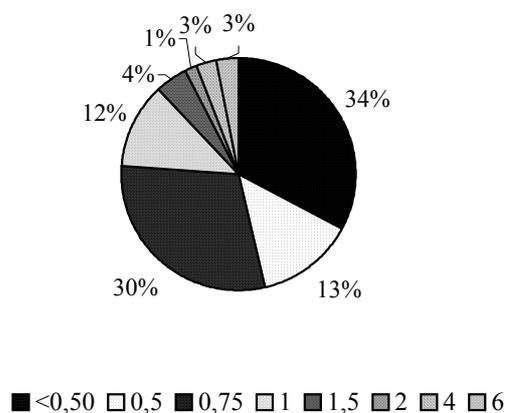


Figura 58: Distribución de CMI de TZ mediante E-test de los aislados productores de CTX-M9

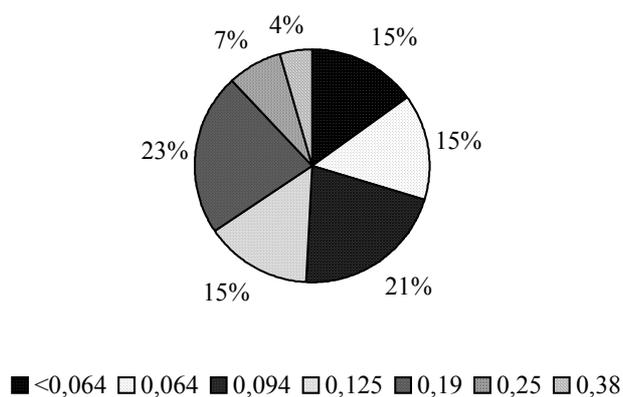


Figura 59: Distribución de CMI de TZL mediante E-test de los aislados productores de CTX-M9

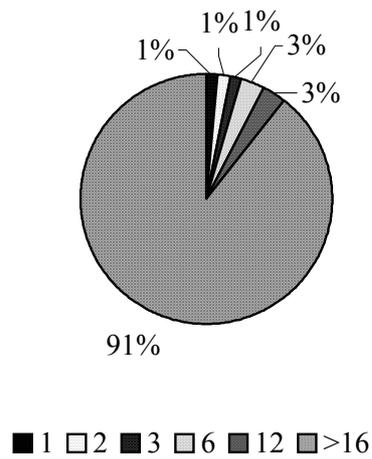


Figura 60: Distribución de CMIs de CT mediante E-test de los aislados productores de CTX-M9

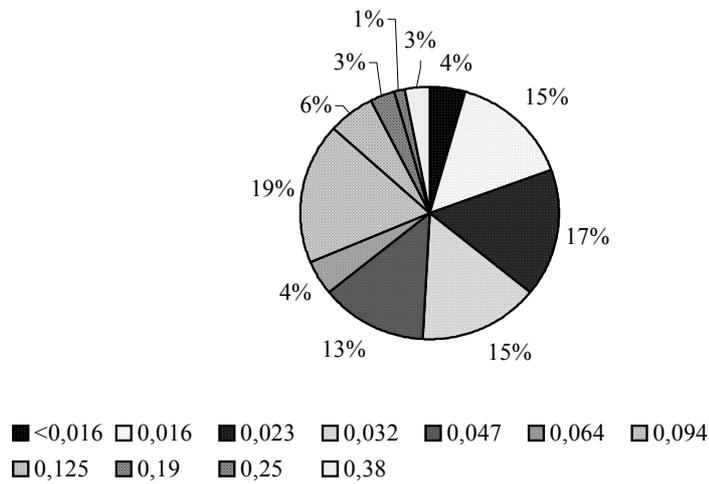


Figura 61: Distribución de CMIs de CTL mediante E-test de los aislados productores de CTX-M9

Tabla 56: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de E-test para los aislados productores de SHV

	TZ	TZL	CT	CTL
CMI₅₀	12	0,125	4	0,032
CMI₉₀	>32	0,25	>16	0,125

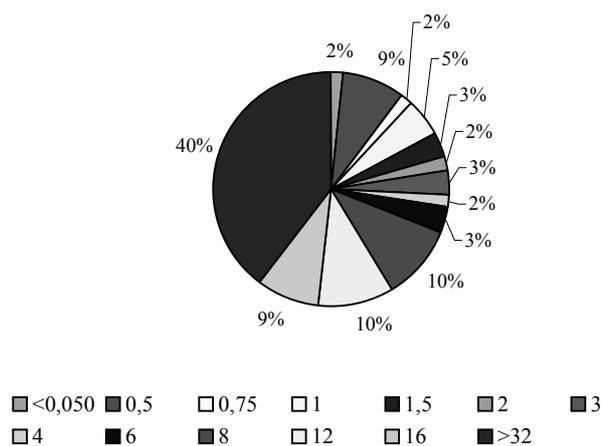


Figura 62: Distribución de CMIs de TZ mediante E-test de los aislados productores de SHV

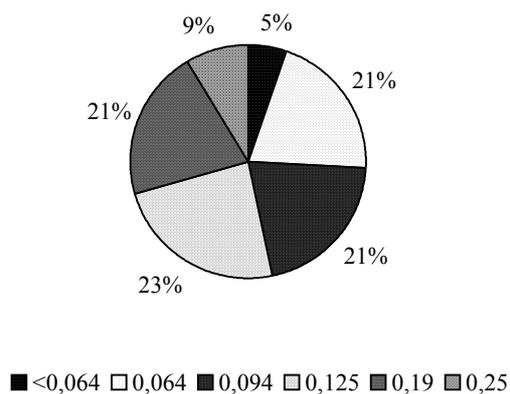


Figura 63: Distribución de CMIs de TZL mediante E-test de los aislados productores de SHV

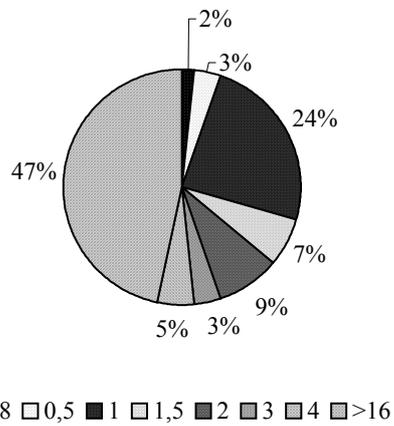


Figura 64: Distribución de CMIs de CT mediante E-test de los aislados productores de SHV

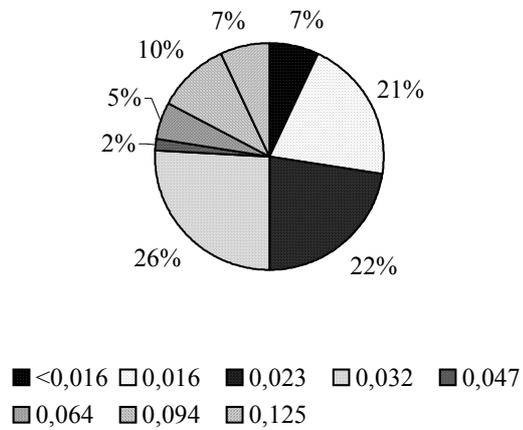


Figura 65: Distribución de CMIs de CTL mediante E-test de los aislados productores de SHV

Tabla 57: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de E-test para los aislados no productores de BLEEs

	TZ	TZL	CT	CTL
CMI ₅₀	<0,5	0,125	<0,25	0,032
CMI ₉₀	0,75	0,5	0,25	0,25

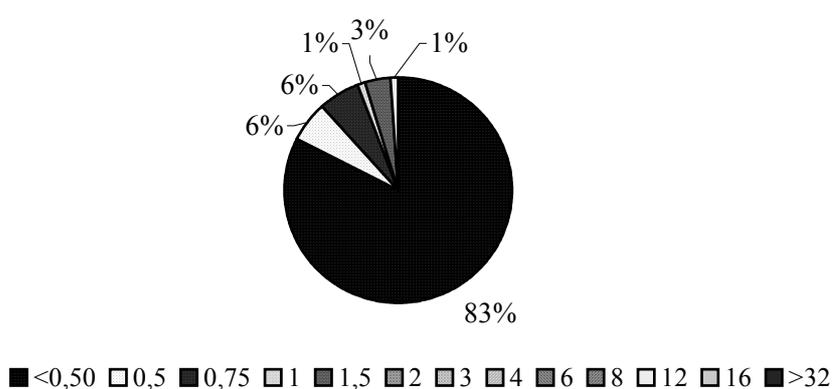


Figura 66: Distribución de CMIs de TZ mediante E-test para los aislados no productores de BLEEs

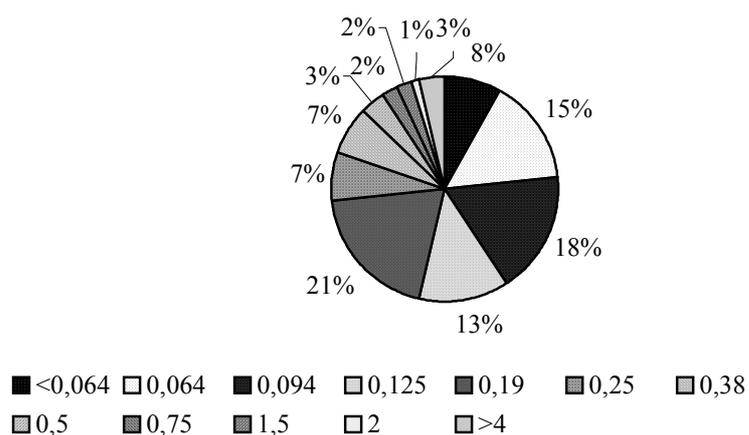
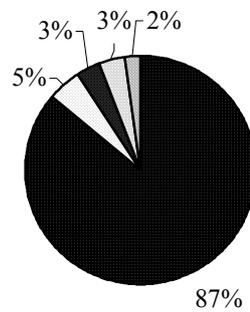
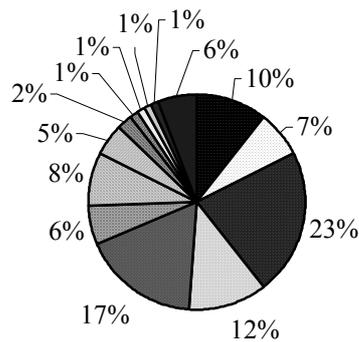


Figura 67: Distribución de CMIs de TZL mediante E-test para los aislados no productores de BLEEs



■ <0,25 □ 0,25 ■ 0,38 □ 0,5 ■ 1 ■ 1,5 □ 2

Figura 68: Distribución de CMIs de CT mediante E-test para los aislados no productores de BLEEs



■ <0,016 □ 0,016 ■ 0,023 □ 0,032 ■ 0,047 ■ 0,064 □ 0,094
 ■ 0,125 ■ 0,19 ■ 0,25 □ 0,38 □ 0,5 ■ 0,75 ■ >1

Figura 69: Distribución de CMIs de CTL mediante E-test para los aislados no productores de BLEEs

De los 125 aislados productores de BLEEs cumplieron criterios de detección de estas betalactamasas con el E-test TZ/TZL el 51%, no detectándose en el 49% de los casos (figura 70). Sin embargo, en el 100% de los aislados de este grupo se pudo detectar la presencia de una BLEE con el E-test CT/CTL (figura 71). En el 5% de estos aislados el E-test TZ/TZL se mostró con valores por debajo del límite inferior de detección y por tanto con resultado ND (figura 70). Éstos correspondieron con aislados que expresaban una enzima CTX-M9 y que presentaban también valores de ceftazidima sensible en los métodos fenotípicos anteriores (aislados 27, 58, 185, 186, 187 y 253).

Como ningún aislado presentó CMI's superiores a los límites superiores de detección de los E-test, no hubo indicación de realizar E-test PM/PML.

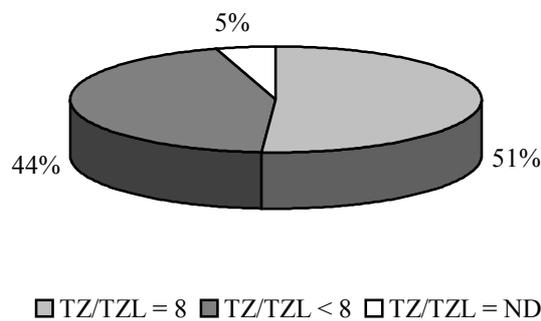


Figura 70: Distribución del cociente TZ/TZL en los aislados productores de BLEEs

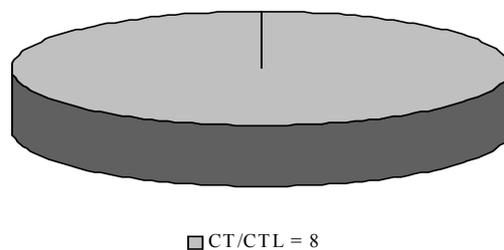


Figura 71: Distribución del cociente CT/CTL en los aislados productores de BLEEs

Como se ve en las figuras 72 y 73, en el grupo de aislamientos productores de CTX-M9 la mejor prueba de Epsilon para detectar la presencia de las mismas es el E-test CT/CTL, que detectó el 100% de los aislados, mientras que el E-test TZ/TZL sólo pudo detectar el 21%. El 9% de aislados que presentaron un resultado ND fueron aquellos que, como anteriormente se ha dicho, poseían una enzima CTX-M9 y expresaron sensibilidad a ceftazidima en todos los métodos fenotípicos.

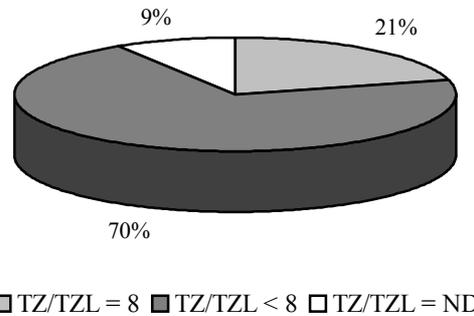


Figura 72: Distribución del cociente TZ/TZL en los aislados productores de CTX-M9

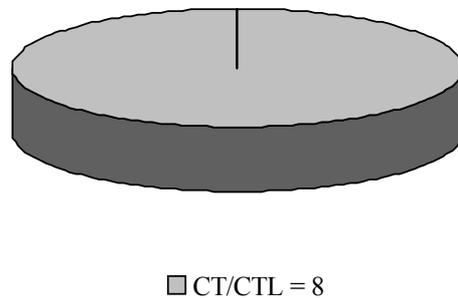


Figura 73: Distribución del cociente CT/CTL en los aislados productores de CTX-M9

Asimismo, en el grupo de aislados productores de SHV el E-test CT/CTL fue capaz de identificar la presencia de la enzima en el 100% de los casos, mientras que el E-test TZ/TZL lo hizo en el 86% de los aislados (figuras 74 y 75).

Estos resultados sobre la capacidad del E-test de ceftazidima para detectar la presencia de BLEEs en nuestros aislados es acorde con los resultados obtenidos para otros métodos fenotípicos previamente valorados en este estudio.

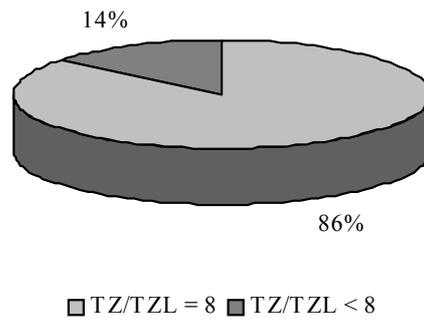


Figura 74: Distribución del cociente TZ/TZL en los aislados productores de SHV

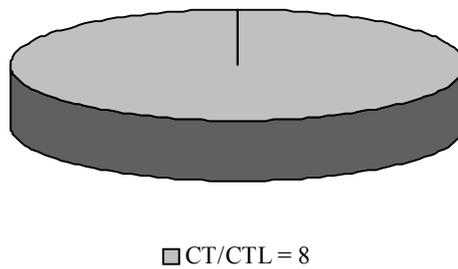


Figura 75: Distribución del cociente CT/CTL en los aislados productores de SHV

Entre los aislados no productores de BLEEs se puede observar que no existió ningún caso que cumpliera los criterios de detección de BLEEs por E-test (figuras 76 y 77). El 92% y el 90% de los aislados presentaron cocientes TZ/TZL y CT/CTL, respectivamente, inferiores a 8 (< 3 diluciones). En los respectivos porcentajes del 8% y 10% en los que el resultado fue ND se debió a que las CMIs para cada pareja de E-test fueron inferiores a los límites inferiores de detección de las tiras de E-test.

Como ningún aislado presentó CMIs superiores a los límites superiores de detección de los E-test, no hubo indicación de realizar E-test PM/PML.

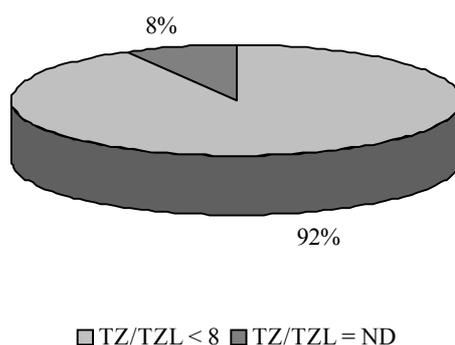


Figura 76: Distribución del cociente TZ/TZL en los aislados no productores de BLEEs

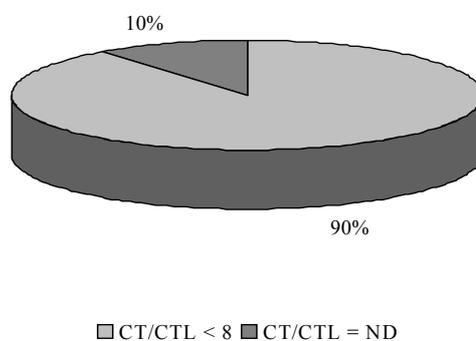


Figura 77: Distribución del cociente CT/CTL en los aislados no productores de BLEEs

4.7. Resultados obtenidos mediante VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos estudiados

En la tabla 58 aparecen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos en los 125 aislados clínicos productores de BLEEs según los valores obtenidos *in vitro*, previos a la modificación posterior sugerida, en su caso, por el sistema AES. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 78 a 89.

Esto mismo se muestra en la tabla 59 para los antibióticos betalactámicos en los 67 aislados clínicos productores de CTX-M9 según los valores obtenidos *in vitro*, previos a la modificación posterior sugerida, en su caso, por el sistema AES. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 90 a 101. Y en la tabla 60 se recogen los resultados para los antibióticos betalactámicos en los 58 aislados clínicos productores de SHV según los valores obtenidos *in vitro*, previos a la modificación posterior sugerida, en su caso, por el sistema AES. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 102 a 113.

En la tabla 61 se muestran los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos en los 344 aislados clínicos no productores de BLEEs según los valores obtenidos *in vitro*, previos a la modificación posterior sugerida, en su caso, por el sistema AES. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 114 a 125.

Tabla 58: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados productores de BLEEs (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AM	≥ 32	≥ 32
AMC	4/2	16/8
PIP	≥ 128	≥ 128
TZP	≤ 4/4	8/4
CF	≥ 64	≥ 64
CXM	≥ 64	≥ 64
FOX	≤ 4	16
CTX	8	≥ 64
CPD	≥ 8	≥ 8
CAZ	≤ 1	16
FEP	≤ 1	4
MEM	≤ 0,25	≤ 0,25

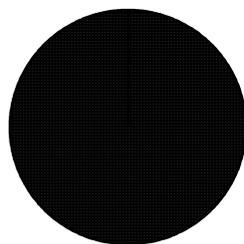
Una vez interpretado el resultado por el sistema AES, éste sugirió modificaciones para los siguientes antibióticos (tabla 27):

Piperacilina: Modificación en un aislado que pasa de CMI = 8 µg/ml a CMI >32 µg/ml. El aislado poseía una enzima SHV.

Cefpodoxima: Modificación en un aislado que pasa de CMI <0,25 µg/ml a CMI >2 µg/ml. El aislado poseía una enzima SHV.

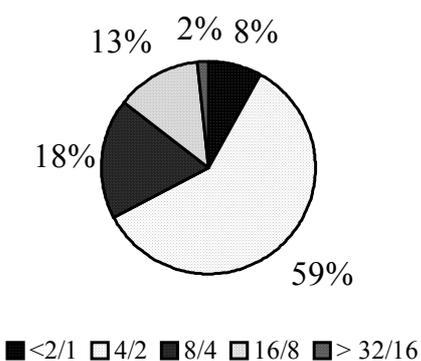
Ceftazidima: Modificación en 67 aislados que pasaron de CMI <1 µg/ml a CMI >2 µg/ml. 58 de estos aislados presentaron una enzima CTX-M9 y 9 aislados poseían una SHV.

Estas modificaciones provocaron cambios en la emisión del informe respecto a la categoría clínica definitiva de cada antibiótico, como veremos.



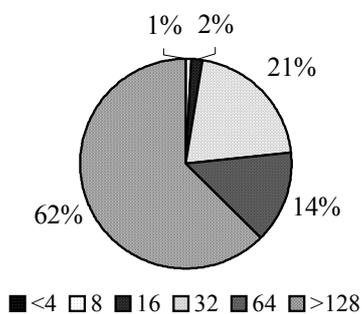
■ >32

Figura 78: Distribución de la CMI de ampicilina (AM) en los aislados productores de BLEEs



■ <2/1 □ 4/2 ■ 8/4 □ 16/8 ■ > 32/16

Figura 79: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) en los aislados productores de BLEEs



■ <4 □ 8 ■ 16 □ 32 ■ 64 ■ >128

Figura 80: Distribución de la CMI de piperacilina (PIP) en los aislados productores de BLEEs

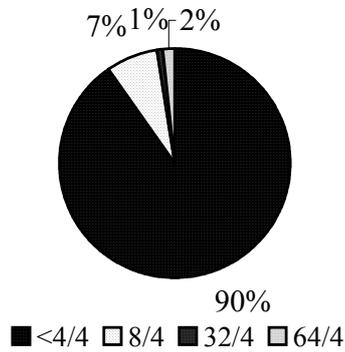


Figura 81: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (TZP) en los aislados productores de BLEEs

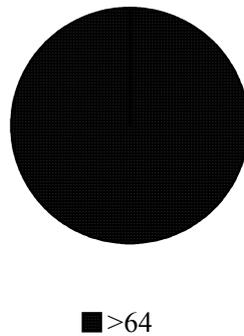


Figura 82: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados productores de BLEEs

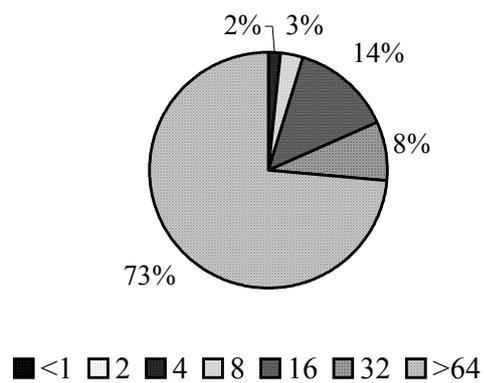


Figura 83: Distribución de la CMI de cefuroxima (CXM) en los aislados productores de BLEEs

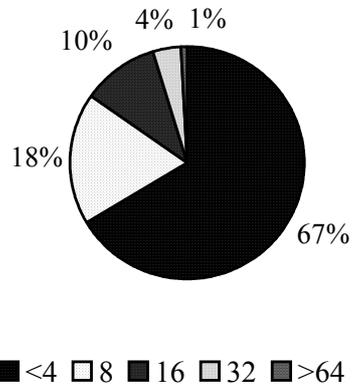


Figura 84: Distribución de la CMI de cefoxitina (FOX) en los aislados productores de BLEEs

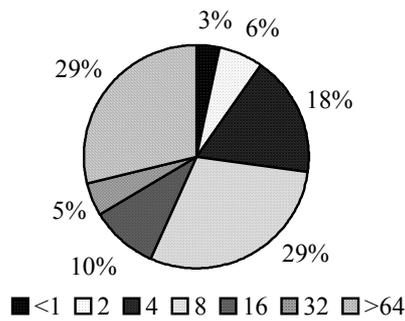


Figura 85: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados productores de BLEEs

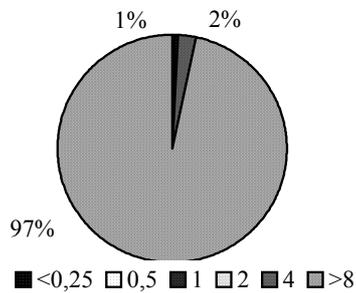


Figura 86: Distribución de la CMI de cefepodoxima (CPD) en los aislados productores de BLEEs

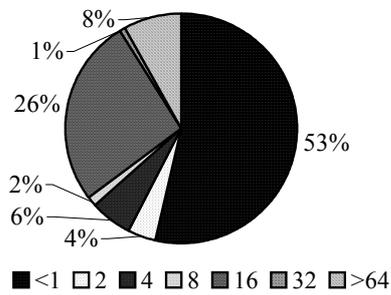


Figura 87: Distribución de la CMI de ceftazidima (CAZ) en los aislados productores de BLEEs

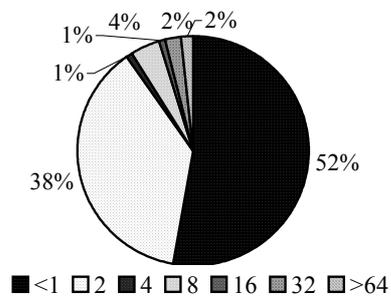


Figura 88: Distribución de la CMI de cefepime (FEP) en los aislados productores de BLEEs

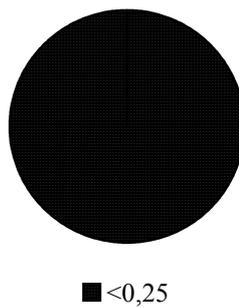
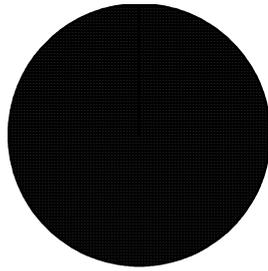


Figura 89: Distribución de la CMI de meropenem (MEM) en los aislados productores de BLEEs

Tabla 59: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados productores de CTX-M9 (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AM	≥ 32	≥ 32
AMC	4/2	16/8
PIP	≥ 128	≥ 128
TZP	≤ 4/4	≤ 4/4
CF	≥ 64	≥ 64
CXM	≥ 64	≥ 64
FOX	≤ 4	16
CTX	16	≥ 64
CPD	≥ 8	≥ 8
CAZ	≤ 1	2
FEP	2	2
MEM	≤ 0,25	≤ 0,25



■ >32

Figura 90: Distribución de la CMI de ampicilina (AM) en los aislados productores de CTX-M9

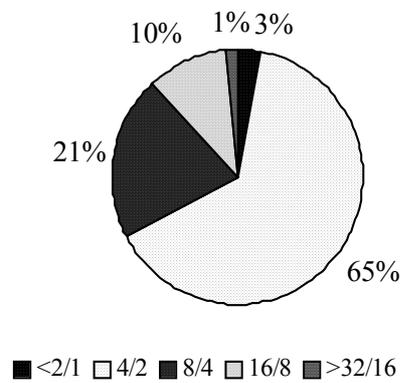


Figura 91: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) en los aislados productores de CTX-M9

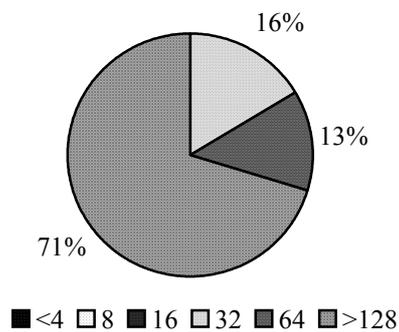


Figura 92: Distribución de la CMI de piperacilina (PIP) en los aislados productores de CTX-M9

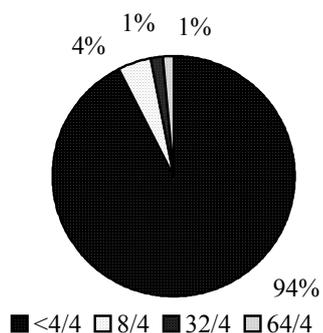


Figura 93: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (TZP) en los aislados productores de CTX-M9

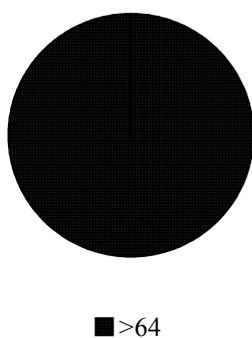


Figura 94: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados productores de CTX-M9

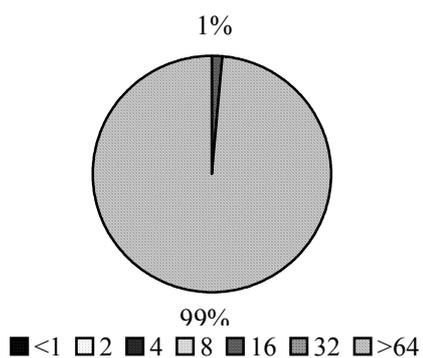


Figura 95: Distribución de la CMI de cefuroxima (CXM) en los aislados productores de CTX-M9

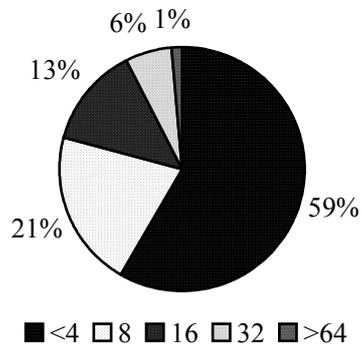


Figura 96: Distribución de la CMI de cefoxitina (FOX) en los aislados productores de CTX-M9

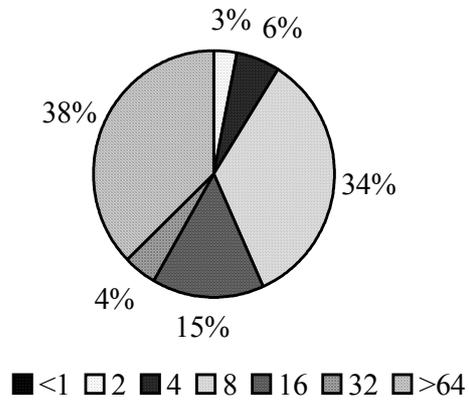


Figura 97: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados productores de CTX-M9

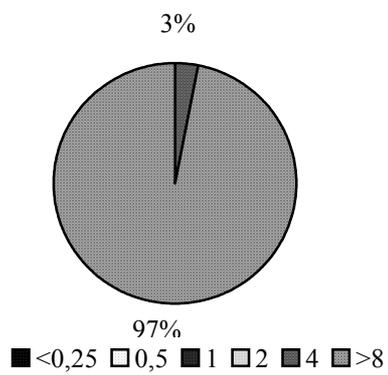


Figura 98: Distribución de la CMI de cefpodoxima (CPD) en los aislados productores de CTX-M9

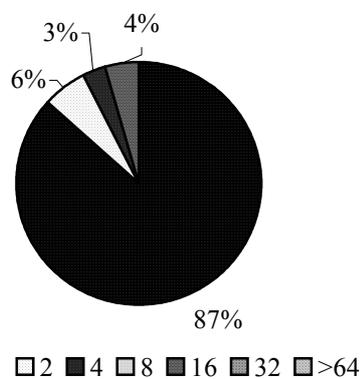


Figura 99: Distribución de la CMI de ceftazidima (CAZ) en los aislados productores de CTX-M9

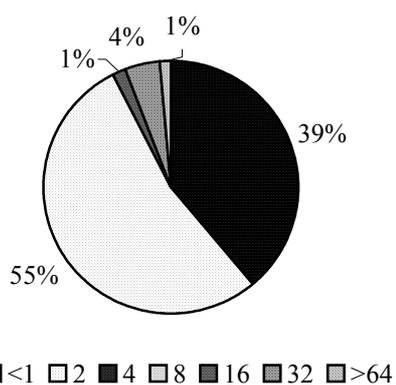


Figura 100: Distribución CMI de cefepime (FEP) en aislados productores de CTX-M9

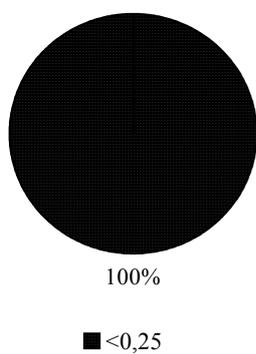


Figura 101: Distribución de CMI de meropenem (MEM) en los aislados productores de CTX-M9

Tabla 60: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados productores de SHV (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AM	≥ 32	≥ 32
AMC	4/2	16/8
PIP	≥ 128	≥ 128
TZP	≤ 4/4	8/4
CF	≥ 64	≥ 64
CXM	32	≥ 64
FOX	≤ 4	8
CTX	8	≥ 64
CPD	≥ 8	≥ 8
CAZ	16	≥ 64
FEP	≤ 1	8
MEM	≤ 0,25	≤ 0,25

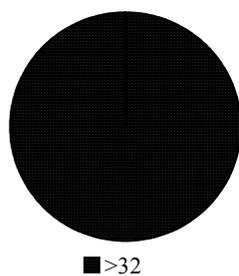


Figura 102: Distribución de la CMI de ampicilina (AM) en los aislados productores de SHV

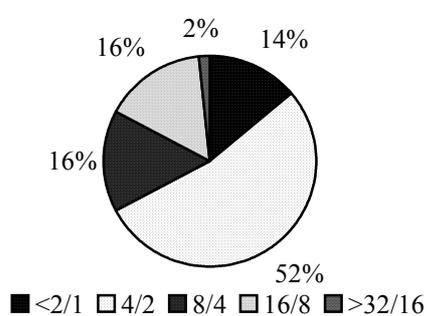


Figura 103: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) en los aislados productores de SHV

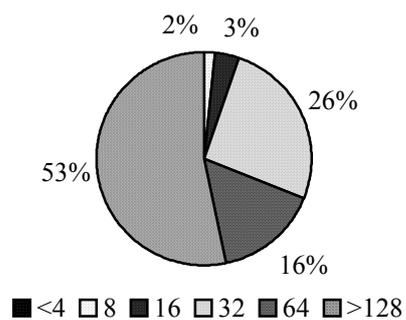


Figura 104: Distribución de la CMI de piperacilina (PIP) en los aislados productores de SHV

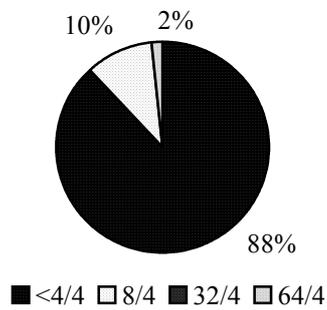


Figura 105: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (TZP) en los aislados productores de SHV

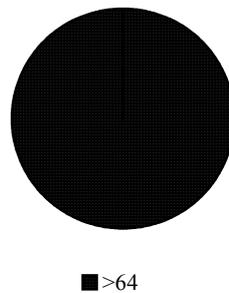


Figura 106: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados productores de SHV

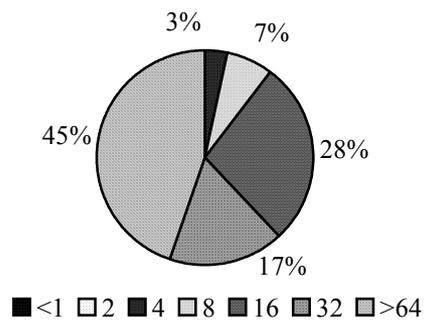


Figura 107: Distribución de la CMI de cefuroxima (CXM) en los aislados productores de SHV

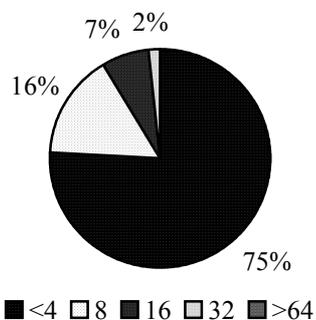


Figura 108: Distribución de la CMI de cefoxitina (FOX) en los aislados productores de SHV

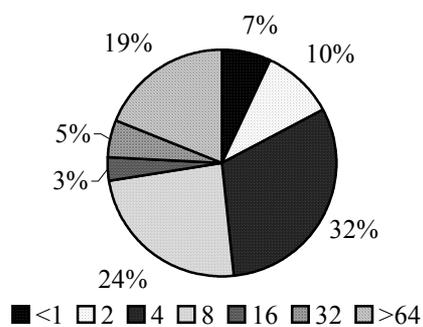


Figura 109: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados productores de SHV

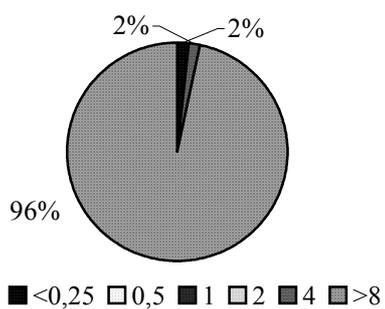


Figura 110: Distribución de la CMI de cefepodoxima (CPD) en los aislados productores de SHV

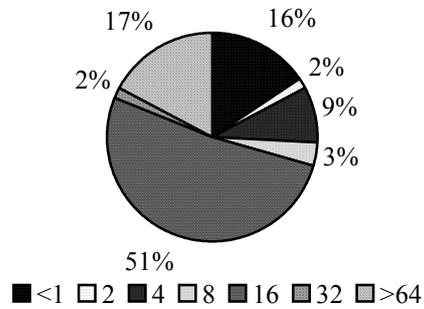


Figura 111: Distribución de la CMI de ceftazidima (CAZ) en los aislados productores de SHV

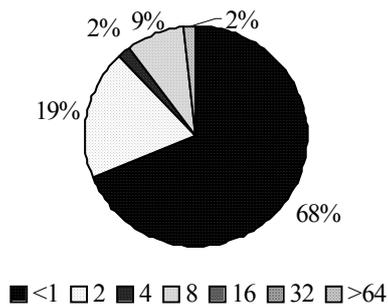


Figura 112: Distribución de la CMI de cefepime (FEP) en los aislados productores de SHV

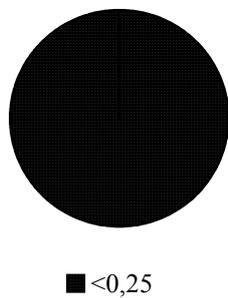


Figura 113: Distribución de la CMI de meropenem (MEM) en los aislados productores de SHV

Tabla 61: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados no productores de BLEEs (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AM	≥ 32	≥ 32
AMC	4/2	≥ 32/16
PIP	16	≥ 128
TZP	≤ 4/4	8/4
CF	16	≥ 64
CXM	4	32
FOX	≤ 4	32
CTX	≤ 1	≤ 1
CPD	≤ 0,25	2
CAZ	≤ 1	≤ 1
FEP	≤ 1	≤ 1
MEM	≤ 0,25	≤ 0,25

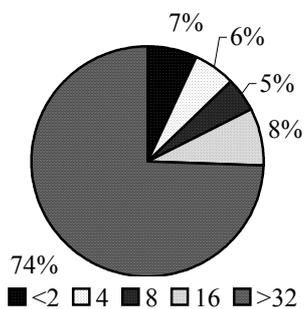


Figura 114: Distribución de la CMI de ampicilina (AM) en los aislados no productores de BLEEs

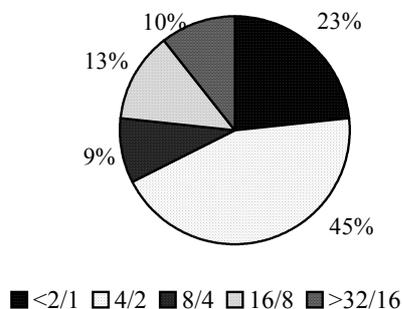


Figura 115: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) en los aislados no productores de BLEEs

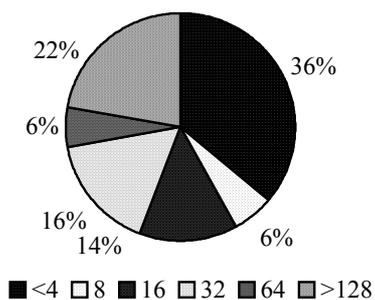


Figura 116: Distribución de la CMI de piperacilina (PIP) en los aislados no productores de BLEEs

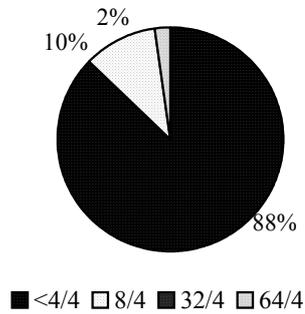


Figura 117: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (TZP) en los aislados no productores de BLEEs

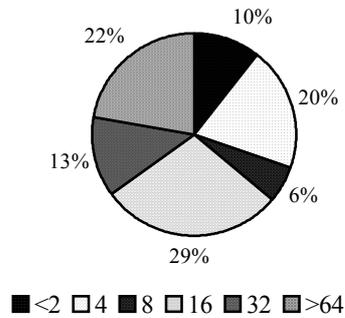


Figura 118: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados no productores de BLEEs

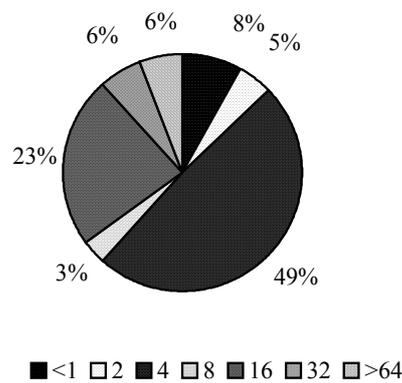


Figura 119: Distribución de la CMI de cefuroxima (CXM) en los aislados no productores de BLEEs

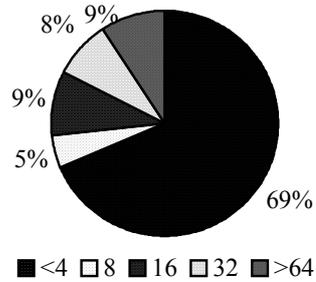


Figura 120: Distribución de la CMI de cefoxitina (FOX) en los aislados no productores de BLEEs

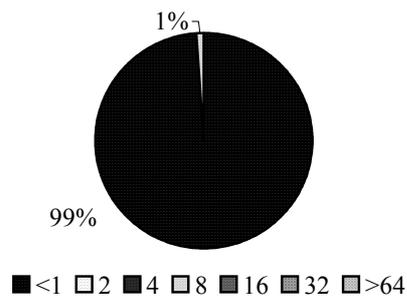


Figura 121: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados no productores de BLEEs

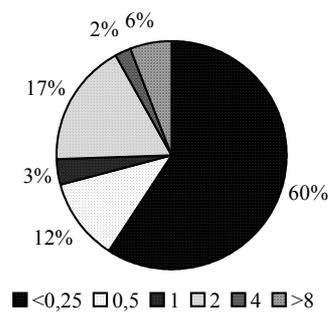


Figura 122: Distribución de la CMI de cefpodoxima (CPD) en los aislados no productores de BLEEs

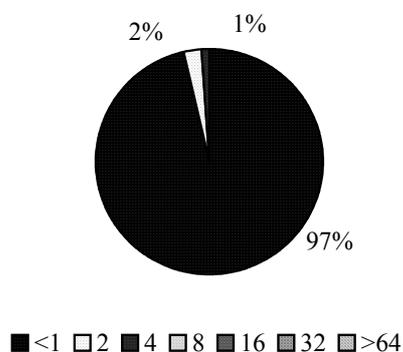


Figura 123: Distribución de la CMI de ceftazidima (CAZ) en los aislados no productores de BLEEs

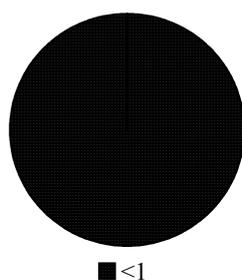


Figura 124: Distribución de la CMI de cefepime (FEP) en los aislados no productores de BLEEs

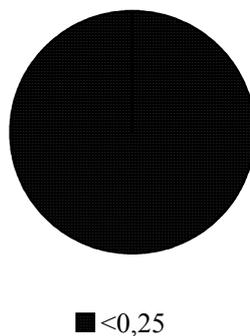


Figura 125: Distribución de la CMI de meropenem (MEM) en los aislados no productores de BLEEs

En las tablas 62, 64, 66 y 68 y figuras 126, 128, 130 y 132, se muestran las distribuciones de las categorías clínicas (S: sensible, I: intermedio y R: resistente) obtenidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos en los aislados productores de BLEEs, distinguiendo los que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una SHV, y de los aislados no productores de BLEEs, antes que el sistema experto AES realizara las modificaciones necesarias en las mismas una vez establecido el fenotipo de resistencia para estos antibióticos (BLEE o no BLEE) en cada aislado clínico.

En las tablas 63, 65, 67 y 69 y figuras 127, 129, 131 y 133, reflejamos las distribuciones de las categorías clínicas (S: sensible, I: intermedio y R: resistente) emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos en los aislados productores de BLEEs, distinguiendo los que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una SHV, y de los aislados no productores de BLEEs, después que el sistema experto AES realizó las modificaciones necesarias en las mismas una vez establecido el fenotipo de resistencia para estos antibióticos en cada aislado clínico.

Como puede observarse, los antibióticos betalactámicos ensayados por el sistema VITEK 2 que fueron modificados tras la interpretación del fenotipo obtenido en los aislados productores de BLEEs fueron piperacilina, cefuroxima, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima y cefepime. En todos los casos el sistema AES modificó aquellos aislados con categoría clínica sensible e informó estos antibióticos como resistentes limitando su uso clínico.

Tabla 62. Categorías clínicas obtenidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de BLEEs

	S	I	R
AM	0	0	125
AMC	107	16	2
PIP	3	44	78
TZP	122	3	0
CF	0	0	125
CXM	6	17	102
FOX	106	13	6
CTX	71	18	36
CPD	1	3	121
CAZ	81	33	11
FEP	119	1	5
MEM	125	0	0

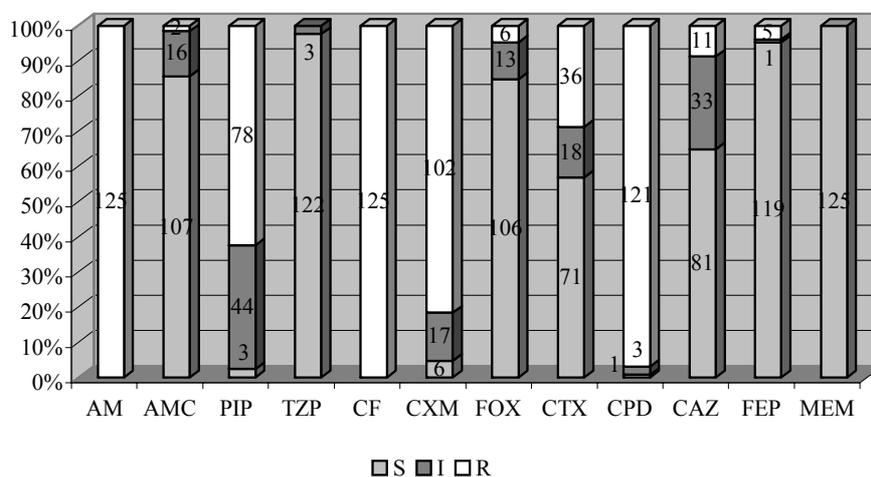


Figura 126: Distribución de los aislados productores de BLEEs según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 63: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de BLEEs

	S	I	R
AM	0	0	125
AMC	107	16	2
PIP	0	1	124
TZP	122	3	0
CF	0	0	125
CXM	0	0	125
FOX	106	13	6
CTX	0	0	125
CPD	0	0	125
CAZ	0	0	125
FEP	2	0	123
MEM	125	0	0

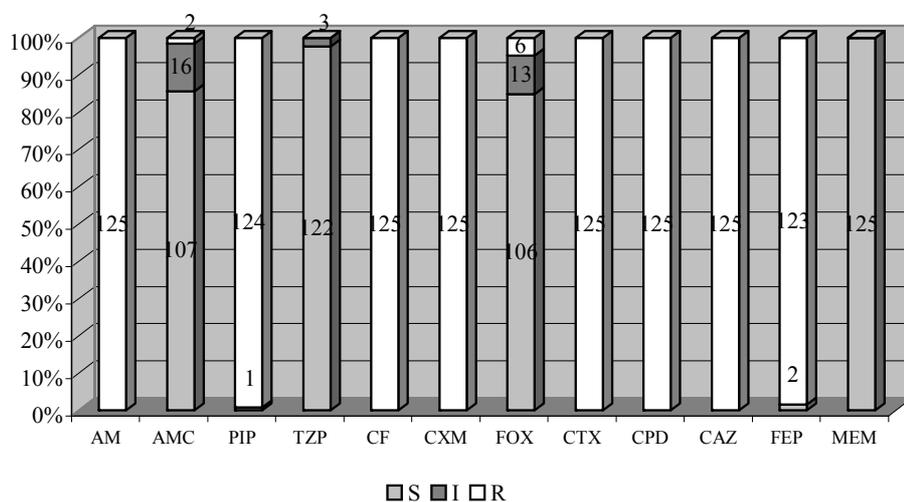


Figura 127: Distribución de los aislados productores de BLEEs según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 64: Categorías clínicas obtenidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de CTX-M9

	S	I	R
AM	0	0	67
AMC	59	7	1
PIP	0	20	47
TZP	65	2	0
CF	0	0	67
CXM	0	0	67
FOX	53	9	5
CTX	29	13	25
CPD	0	2	65
CAZ	64	3	0
FEP	62	1	4
MEM	67	0	0

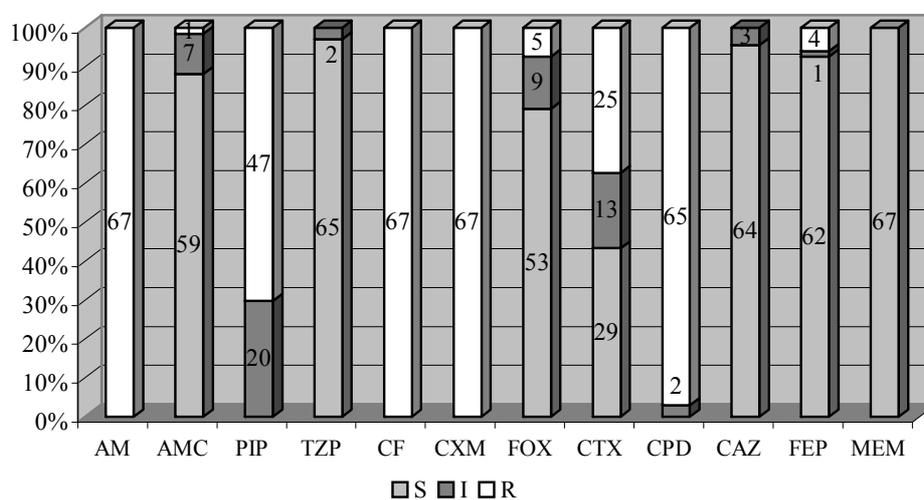


Figura 128: Distribución de los aislados productores de CTX-M9 según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 65: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de CTX-M9

	S	I	R
AM	0	0	67
AMC	59	7	1
PIP	0	0	67
TZP	65	2	0
CF	0	0	67
CXM	0	0	67
FOX	53	9	5
CTX	0	0	67
CPD	0	0	67
CAZ	0	0	67
FEP	1	0	66
MEM	67	0	0

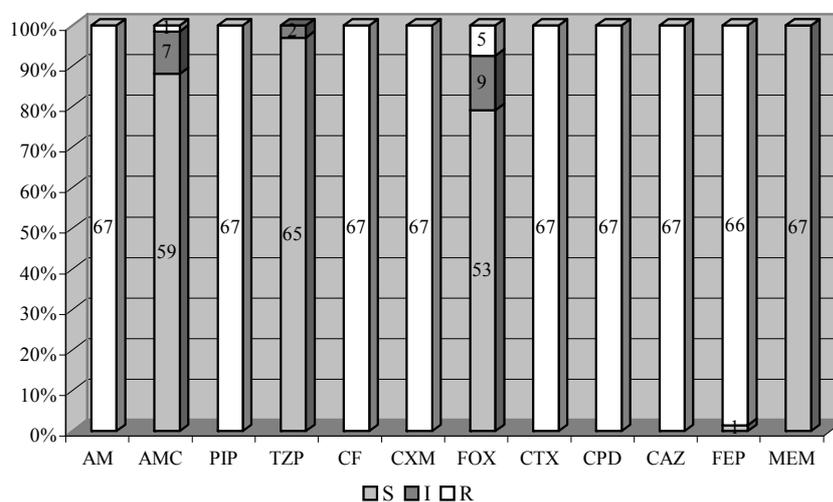


Figura 129: Distribución de los aislados productores de CTX-M9 según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 66: Categorías clínicas obtenidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de SHV

	S	I	R
AM	0	0	58
AMC	48	9	1
PIP	3	24	31
TZP	57	1	0
CF	0	0	58
CXM	6	16	36
FOX	53	4	1
CTX	42	5	11
CPD	1	1	56
CAZ	17	30	11
FEP	57	0	1
MEM	58	0	0

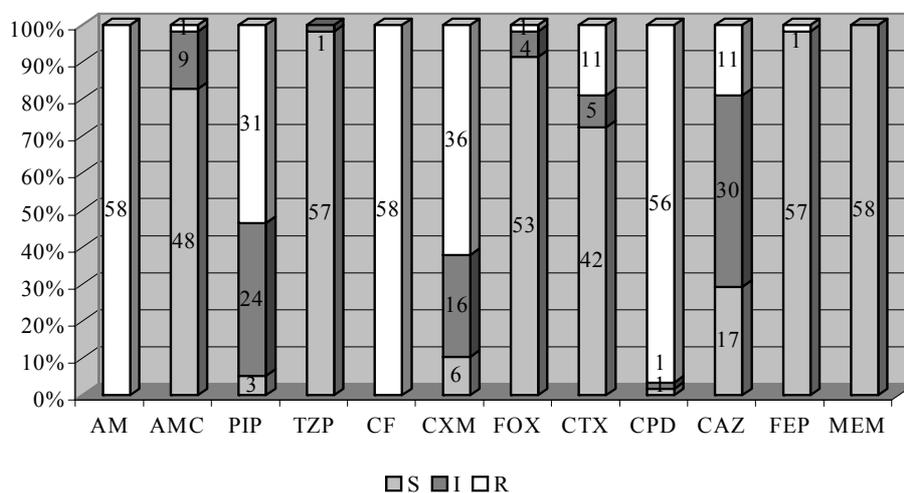


Figura 130: Distribución de los aislados productores de SHV según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 67: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de SHV

	S	I	R
AM	0	0	58
AMC	48	9	1
PIP	0	1	57
TZP	57	1	0
CF	0	0	58
CXM	0	0	58
FOX	53	4	1
CTX	0	0	58
CPD	0	0	58
CAZ	0	0	58
FEP	1	0	57
MEM	58	0	0

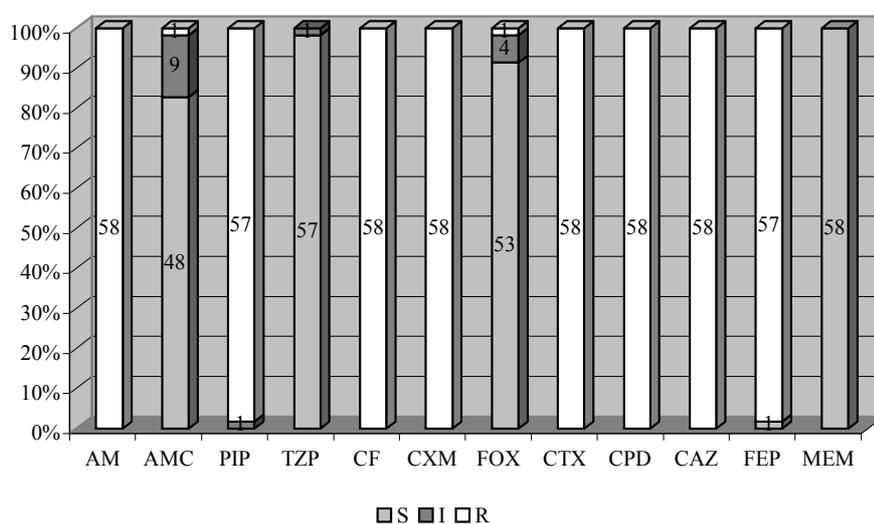


Figura 131: Distribución de los aislados productores de SHV según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 68: Categorías clínicas obtenidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados no productores de BLEEs

	S	I	R
AM	60	28	256
AMC	264	44	36
PIP	192	76	76
TZP	336	8	0
CF	124	100	120
CXM	224	80	40
FOX	252	32	60
CTX	344	0	0
CPD	316	8	20
CAZ	344	0	0
FEP	344	0	0
MEM	344	0	0

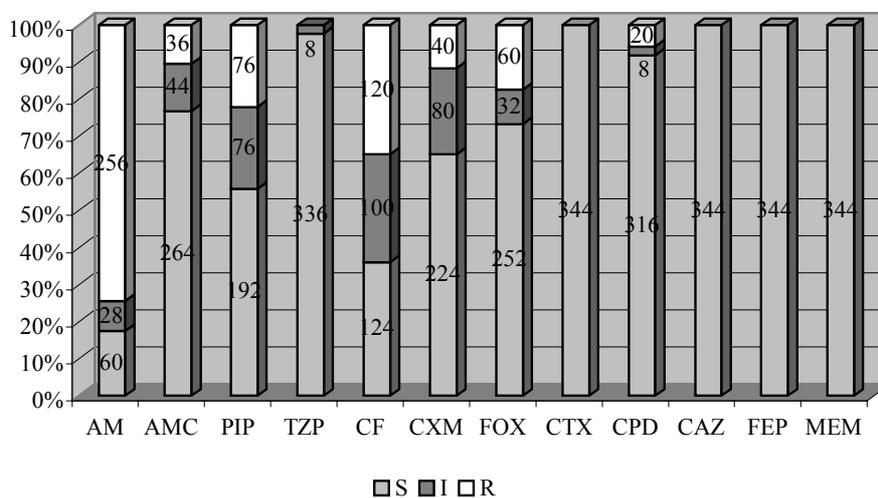


Figura 132: Distribución de los aislados no productores de BLEEs según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

Tabla 69: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico por el sistema AES (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados no productores de BLEEs

	S	I	R
AM	60	8	276
AMC	232	44	68
PIP	172	72	100
TZP	336	8	0
CF	124	100	120
CXM	224	68	52
FOX	252	32	60
CTX	332	0	12
CPD	312	8	24
CAZ	332	0	12
FEP	332	0	12
MEM	344	0	0

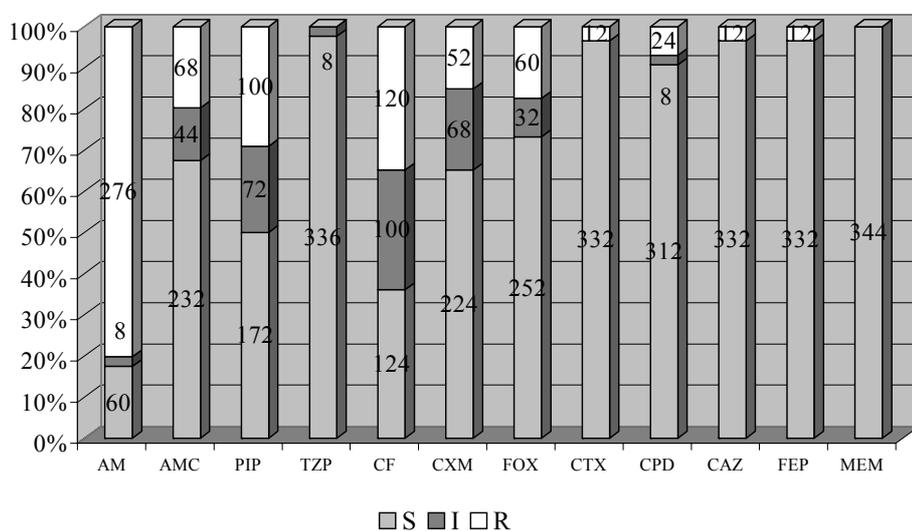


Figura 133: Distribución de los aislados no productores de BLEEs según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

La cepa de referencia *K. pneumoniae* (ATCC 700603) se mostró en todos los ensayos *in vitro* resistente a ampicilina, piperacilina, cefoxitina, cefpodoxima y ceftazidima, y sensible a amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefotaxima, cefepime y carbapenémicos (Rasheed *et al.*, 2000). *E. coli* ATCCC 25922 fue sensible a todos los antibióticos ensayados.

4.8. Resultados obtenidos mediante VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos estudiados

En la tabla 70 aparecen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos en los 125 aislados clínicos productores de BLEEs.

En la tabla 71 mostramos los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos en los 67 aislados clínicos productores de CTX-M9.

En la tabla 72 se recogen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos en los 58 aislados clínicos productores de SHV.

En la tabla 73 se muestran los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos en los 344 aislados clínicos no productores de BLEEs.

La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico, en porcentaje respecto al total de cada grupo, quedan reflejados en las figuras 134 a 165.

Tabla 70: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de los antibióticos no betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados productores de BLEEs (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AN	≤ 2	≤ 2
GM	≤ 1	≥ 16
TM	≤ 1	8
CIP	≥ 4	≥ 4
NOR	≥ 16	≥ 16
OFL	≥ 8	≥ 8
FT	32	64
SXT	≥ 320	≥ 320

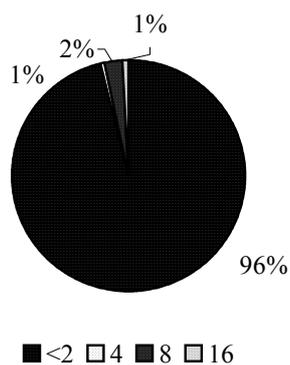


Figura 134: Distribución de la CMI de amikacina (AN) en los aislados productores de BLEEs

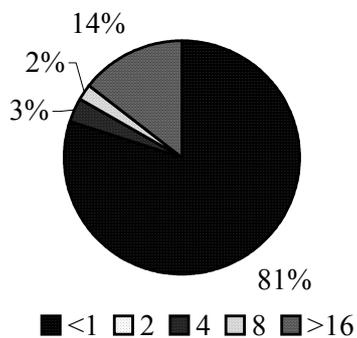


Figura 135: Distribución de la CMI de gentamicina (GM) en los aislados productores de BLEEs

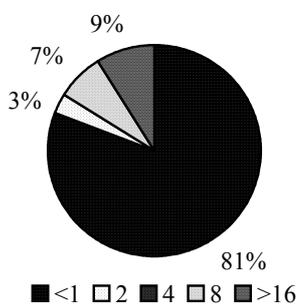


Figura 136: Distribución de la CMI de tobramicina (TM) en los aislados productores de BLEEs

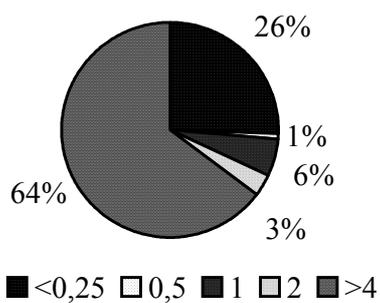


Figura 137: Distribución de la CMI de ciprofloxacino (CIP) en los aislados productores de BLEEs

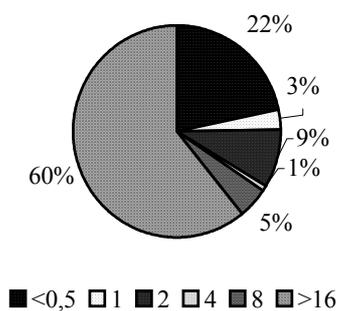


Figura 138: Distribución de la CMI de norfloxacino (NOR) en los aislados productores de BLEEs

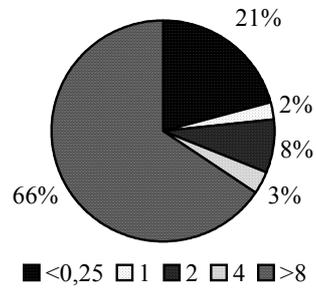


Figura 139: Distribución de la CMI de ofloxacino (OFL) en los aislados productores de BLEEs

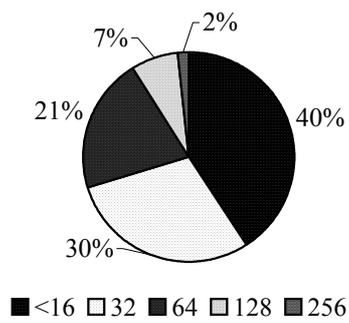


Figura 140: Distribución de la CMI de nitrofurantoína (FT) en los aislados productores de BLEEs

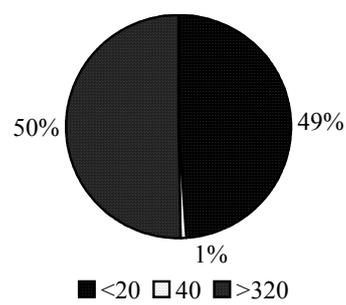
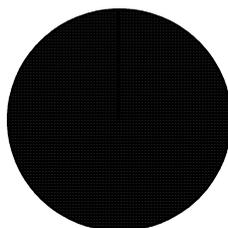


Figura 141: Distribución de la CMI de trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) en los aislados productores de BLEEs

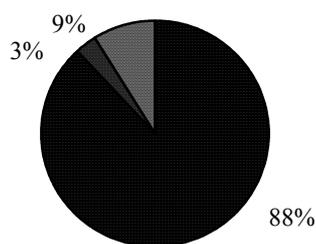
Tabla 71: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de los antibióticos no betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados productores de CTX-M9 (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AN	≤ 2	≤ 2
GM	≤ 1	4
TM	≤ 1	2
CIP	≥ 4	≥ 4
NOR	≥ 16	≥ 16
OFL	≥ 8	≥ 8
FT	≤ 16	64
SXT	≥ 320	≥ 320



■ <2

Figura 142: Distribución de la CMI de amikacina (AN) en los aislados productores de CTX-M9



■ <1 □ 2 ■ 4 □ 8 ■ >16

Figura 143: Distribución de la CMI de gentamicina (GM) en los aislados productores de CTX-M9

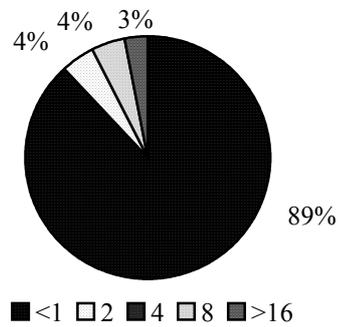


Figura 144: Distribución de la CMI de tobramicina (TM) en los aislados productores de CTX-M9

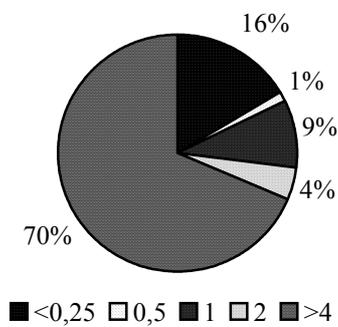


Figura 145: Distribución de la CMI de ciprofloxacino (CIP) en los aislados productores de CTX-M9

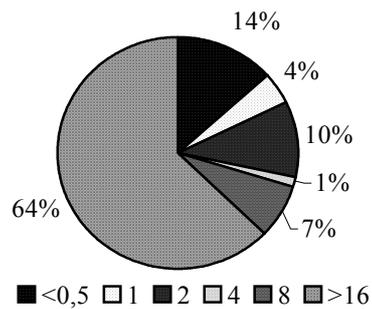


Figura 146: Distribución de la CMI de norfloxacino (NOR) en los aislados productores de CTX-M9

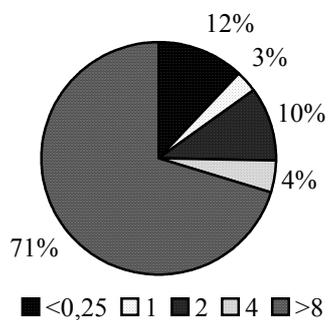


Figura 147: Distribución de la CMI de ofloxacino (OFL) en los aislados productores de CTX-M9

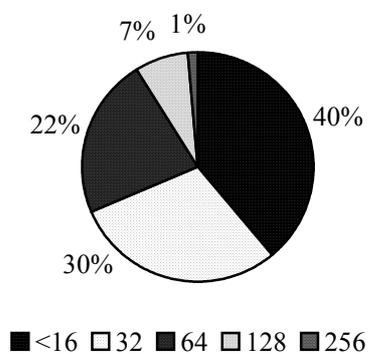


Figura 148: Distribución de la CMI de nitrofurantoina (FT) en los aislados productores de CTX-M9

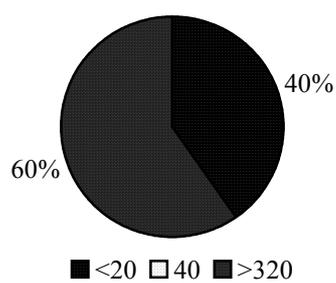


Figura 149: Distribución de la CMI de trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) en los aislados productores de CTX-M9

Tabla 72: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de los antibióticos no betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados productores de SHV (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AN	≤ 2	≤ 2
GM	≤ 1	≥ 16
TM	≤ 1	≥ 16
CIP	≥ 4	≥ 4
NOR	≥ 16	≥ 16
OFL	≥ 8	≥ 8
FT	32	64
SXT	≤ 20	≥ 320

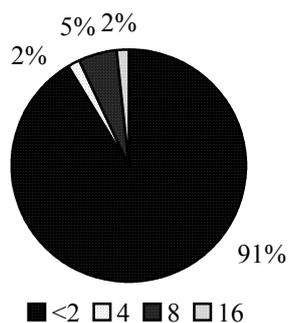


Figura 150: Distribución de la CMI de amikacina (AN) en los aislados productores de SHV

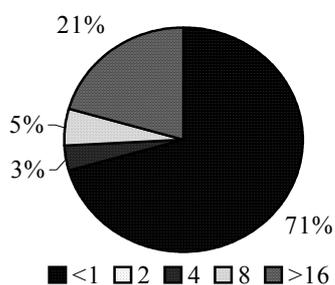


Figura 151: Distribución de la CMI de gentamicina (GM) en los aislados productores de SHV

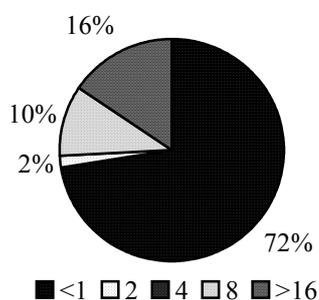


Figura 152: Distribución de la CMI de tobramicina (TM) en los aislados productores de SHV

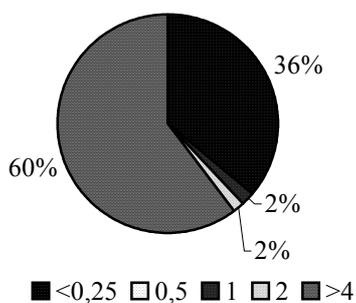


Figura 153: Distribución de la CMI de ciprofloxacino (CIP) en los aislados productores de SHV

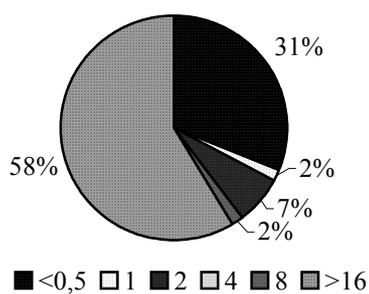


Figura 154: Distribución de la CMI de norfloxacino (NOR) en los aislados productores de SHV

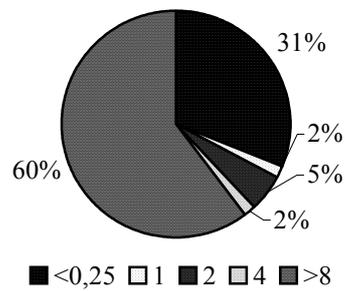


Figura 155: Distribución de la CMI de ofloxacino (OFL) en los aislados productores de SHV

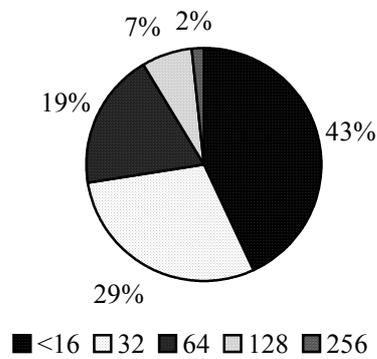


Figura 156: Distribución de la CMI de nitrofurantoína (FT) en los aislados productores de SHV

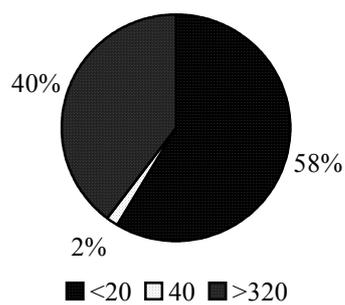


Figura 157: Distribución de la CMI de trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) en los aislados productores de SHV

Tabla 73: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de los antibióticos no betalactámicos mediante el sistema VITEK 2 para los aislados no productores de BLEEs (resultados *in vitro*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AN	≤ 2	4
GM	≤ 1	≥ 16
TM	≤ 1	8
CIP	1	≥ 4
NOR	2	≥ 16
OFL	2	≥ 8
FT	≤ 16	128
SXT	≤ 20	≥ 320

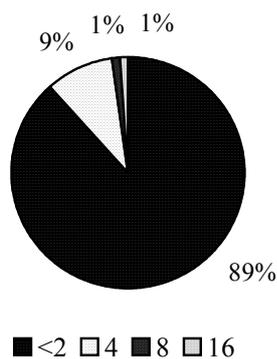


Figura 158: Distribución de la CMI de amikacina (AN) en los aislados no productores de BLEEs

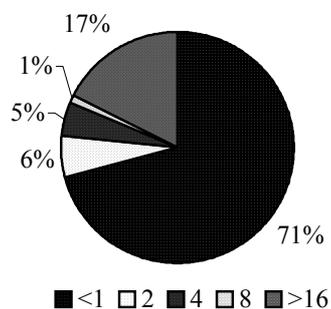


Figura 159: Distribución de la CMI de gentamicina (GM) en los aislados no productores de BLEEs

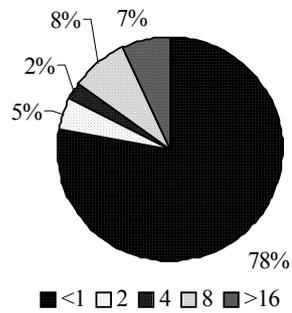


Figura 160: Distribución de la CMI de tobramicina (TM) en los aislados no productores de BLEEs

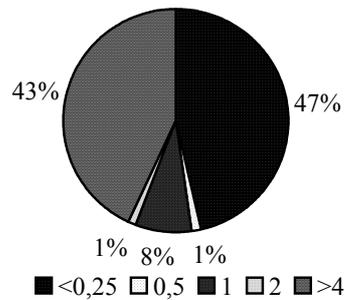


Figura 161: Distribución de la CMI de ciprofloxacino (CIP) en los aislados no productores de BLEEs

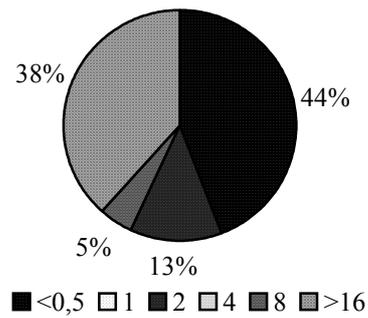


Figura 162: Distribución de la CMI de norfloxacino (NOR) en los aislados no productores de BLEEs

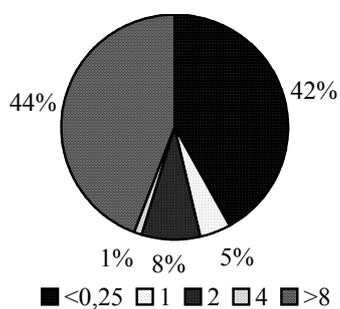


Figura 163: Distribución de la CMI de ofloxacino (OFL) en los aislados no productores de BLEEs

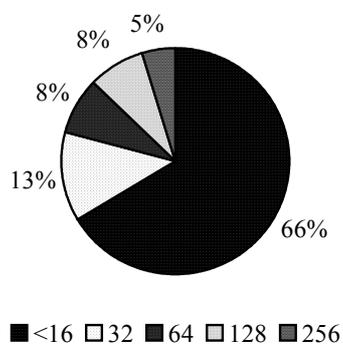


Figura 164: Distribución de la CMI de nitrofurantoina (FT) en los aislados no productores de BLEEs

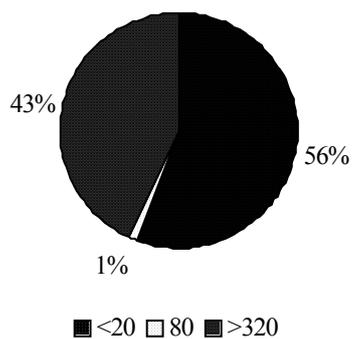


Figura 165: Distribución de la CMI de trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) en los aislados no productores de BLEEs

En las tablas 74 a 77 y figuras 166 a 169, se muestran las distribuciones de las categorías clínicas (S: sensible, I: intermedio y R: resistente) obtenidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos en los aislados productores de BLEEs, distinguiendo los que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una SHV, y de los aislados no productores de BLEEs, después que el sistema experto AES realizara las modificaciones necesarias en las mismas una vez establecido el fenotipo de resistencia para estos antibióticos en cada aislado clínico.

La cepa de referencia *K. pneumoniae* (ATCC 700603) se mostró en todos los ensayos *in vitro* intermedio a gentamicina, tobramicina y nitrofurantoína, y sensible a amikacina, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino y cotrimoxazol (Rasheed *et al.*, 2000). *E. coli* ATCCC 25922 fue sensible a todos los antibióticos ensayados.

Tabla 74: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos tras la interpretación del resultado (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de BLEEs

	S	I	R
AN	125	0	0
GM	104	3	18
TM	105	9	11
CIP	40	4	81
NOR	43	6	76
OFL	39	4	82
FT	88	26	11
SXT	62	0	63

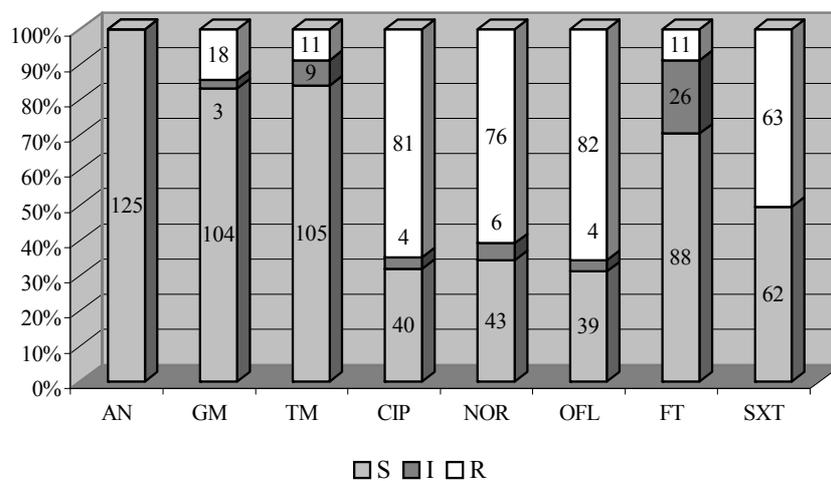


Figura 166: Distribución de los aislados productores de BLEEs según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos

Tabla 75: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos tras la interpretación del resultado (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de CTX-M9

	S	I	R
AN	67	0	0
GM	61	0	6
TM	62	3	2
CIP	18	3	46
NOR	20	5	42
OFL	17	3	47
FT	46	15	6
SXT	27	0	40

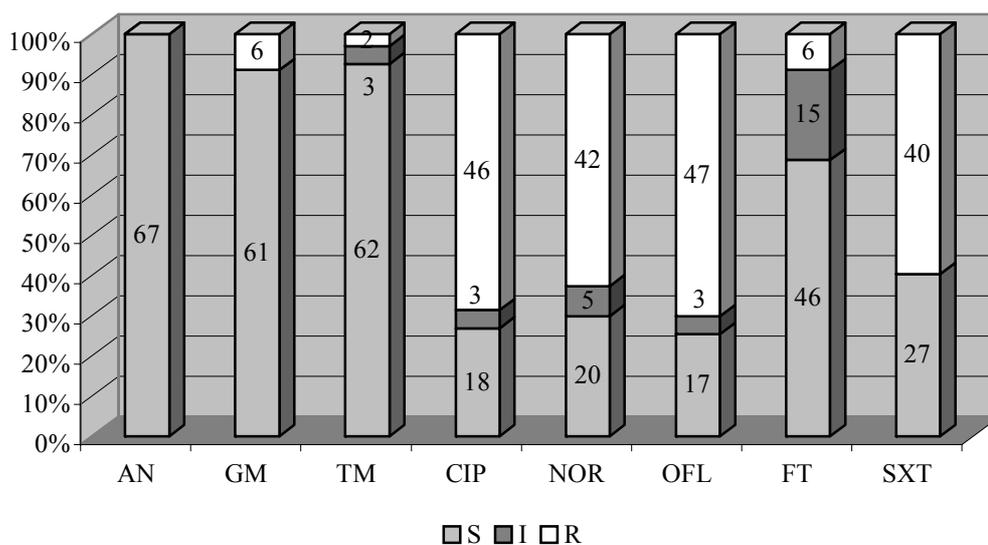


Figura 167: Distribución de los aislados productores de CTX-M9 según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos

Tabla 76: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos tras la interpretación del resultado (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados productores de SHV

	S	I	R
AN	58	0	0
GM	43	3	12
TM	43	6	9
CIP	22	1	35
NOR	23	1	34
OFL	22	1	35
FT	42	11	5
SXT	35	0	23

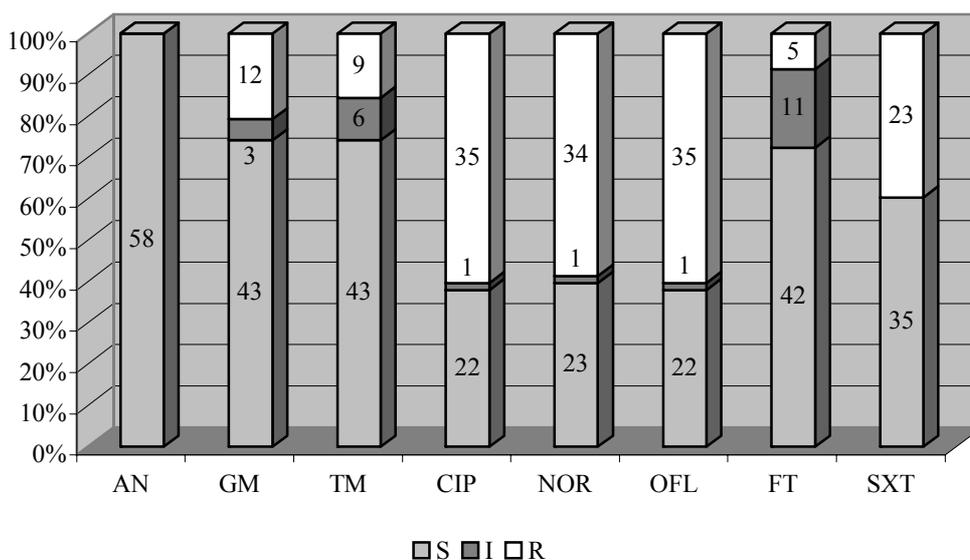


Figura 168: Distribución de los aislados productores de SHV según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos

Tabla 77: Categorías clínicas emitidas por el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos tras la interpretación del resultado (antibióticos ensayados, no inferidos) para los aislados no productores de BLEEs

	S	I	R
AN	344	0	0
GM	280	4	60
TM	292	28	24
CIP	192	4	148
NOR	196	16	132
OFL	184	8	152
FT	272	28	44
SXT	192	0	152

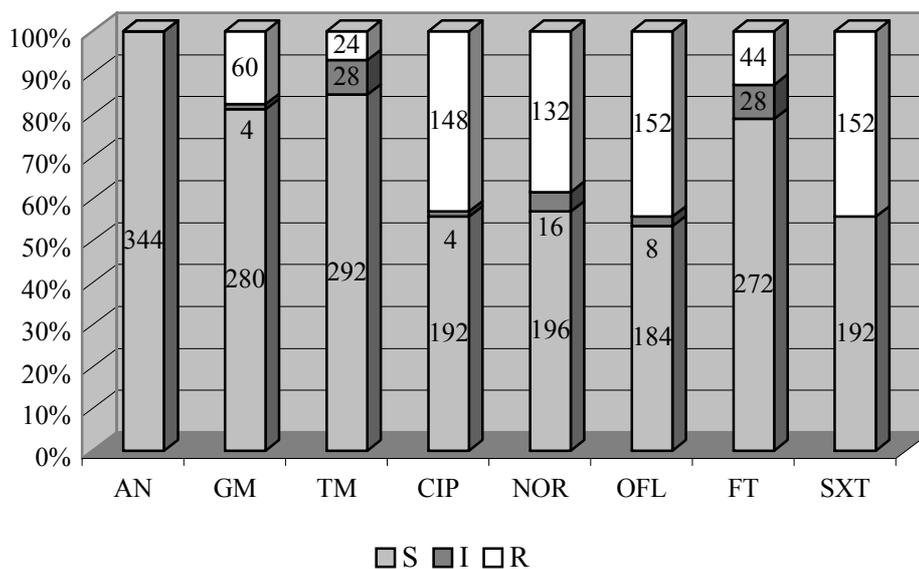


Figura 169: Distribución de los aislados no productores de BLEEs según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos

4.9. Resultados obtenidos mediante WIDER para los antibióticos betalactámicos estudiados

En la tabla 78 aparecen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los 125 aislados clínicos productores de BLEEs según los valores obtenidos *in vitro*. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 170 a 180.

En la tabla 79 se muestran los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los 67 aislados clínicos productores de CTX-M9 según los valores obtenidos *in vitro*. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 181 a 191.

En la tabla 80 mostramos los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los 58 aislados clínicos productores de SHV según los valores obtenidos *in vitro*. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 192 a 202.

En la tabla 81 se recogen los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los 344 aislados clínicos no productores de BLEEs según los valores obtenidos *in vitro*. La distribución de los resultados de CMI para cada antibiótico betalactámico, en porcentaje respecto al total de este grupo, quedan reflejados en las figuras 203 a 213.

Tabla 78: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema WIDER para los aislados productores de BLEEs

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AMX	> 16	> 16
A/C	8/4	> 16/8
P/T	< 16/4	> 64/4
CF	> 8	> 8
CFX	> 16	> 16
CX	16	> 16
CTX	> 8	> 8
TAZ	16	> 16
TZ/C	< 1/4	8/4
CFP	> 16	> 16
MER	< 1	< 1

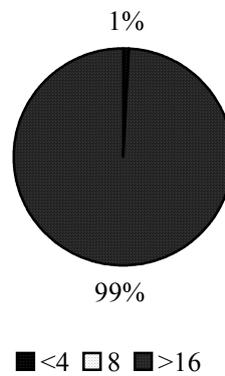


Figura 170: Distribución de la CMI de amoxicilina (AMX) en los aislados productores de BLEEs

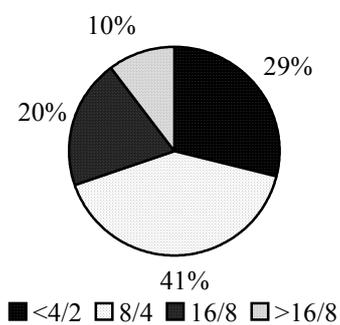


Figura 171: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (A/C) en los aislados productores de BLEEs

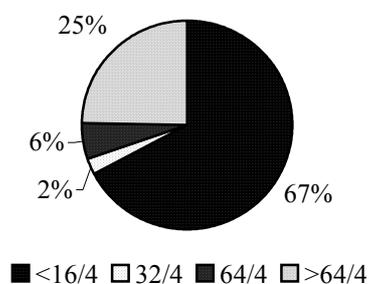


Figura 172: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (P/T) en los aislados productores de BLEEs

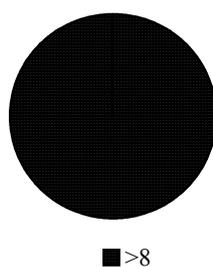


Figura 173: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados productores de BLEEs

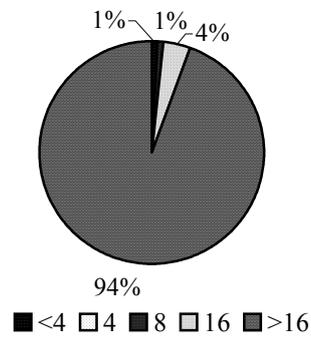


Figura 174: Distribución de la CMI de cefuroxima (CFX) en los aislados productores de BLEEs

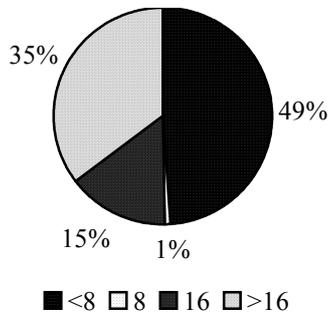


Figura 175: Distribución de la CMI de cefoxitina (CX) en los aislados productores de BLEEs

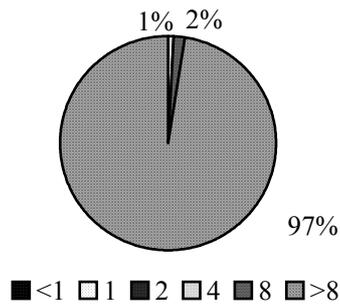


Figura 176: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados productores de BLEEs

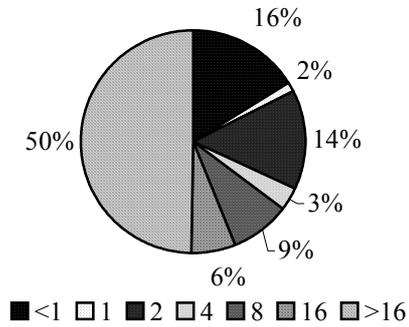


Figura 177: Distribución de la CMI de ceftazidima (TAZ) en los aislados productores de BLEEs

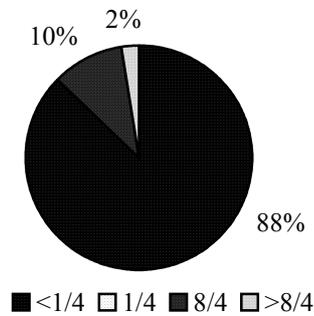


Figura 178: Distribución de la CMI de ceftazidima-ácido clavulánico (TZ/C) en los aislados productores de BLEEs

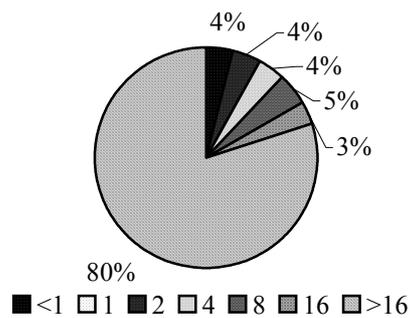


Figura 179: Distribución de la CMI de cefepime (CFP) en los aislados productores de BLEEs

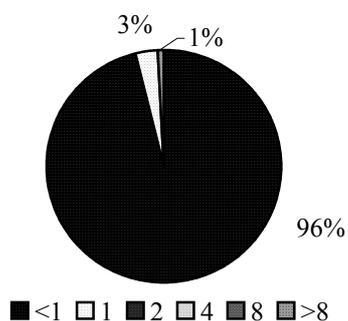


Figura 180: Distribución de la CMI de meropenem (MER) en los aislados productores de BLEEs

Tabla 79: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema WIDER para los aislados productores de CTX-M9

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AMX	> 16	> 16
A/C	8/4	> 16/8
P/T	< 16/4	> 64/4
CF	> 8	> 8
CFX	> 16	> 16
CX	16	> 16
CTX	> 8	> 8
TAZ	8	> 16
TZ/C	< 1/4	8/4
CFP	> 16	> 16
MER	< 1	< 1

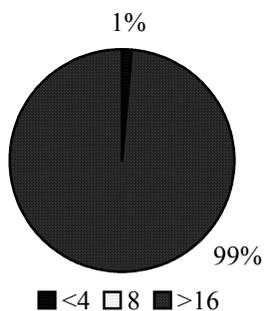


Figura 181: Distribución de la CMI de amoxicilina (AMX) en los aislados productores de CTX-M9

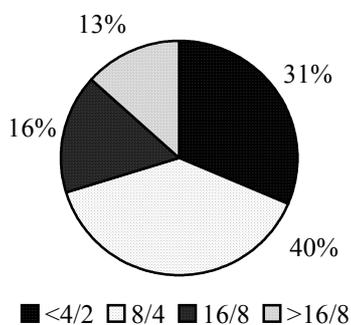


Figura 182: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (A/C) en los aislados productores de CTX-M9

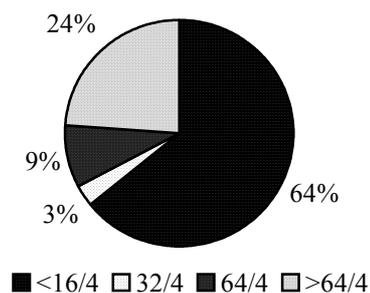


Figura 183: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (P/T) en los aislados productores de CTX-M9

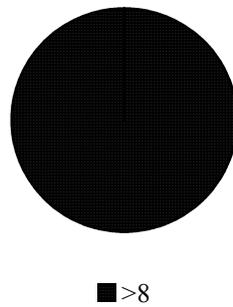


Figura 184: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados productores de CTX-M9

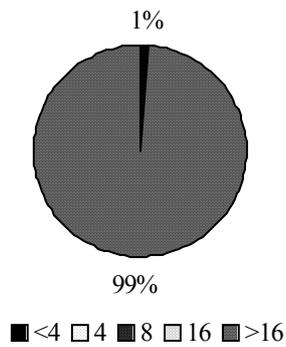


Figura 185: Distribución de la CMI de cefuroxima (CFX) en los aislados productores de CTX-M9

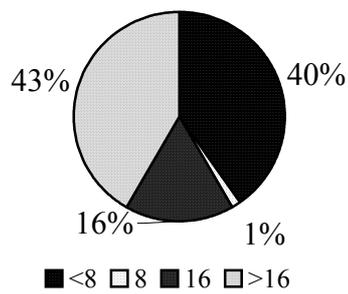


Figura 186: Distribución de la CMI de cefoxitina (CX) en los aislados productores de CTX-M9

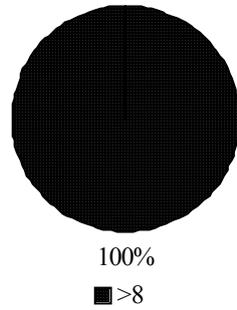


Figura 187: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados productores de CTX-M9

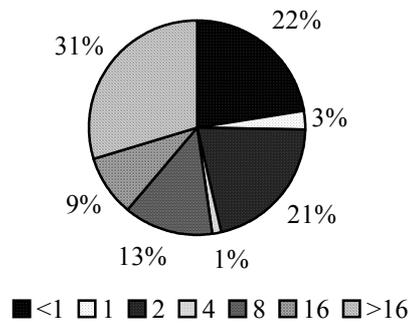


Figura 188: Distribución de la CMI de ceftazidima (TAZ) en los aislados productores de CTX-M9

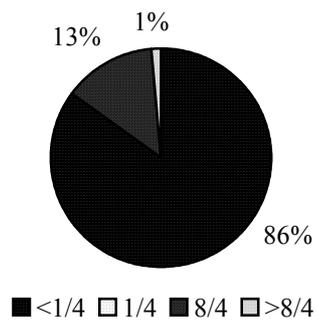


Figura 189: Distribución de la CMI de ceftazidima-ácido clavulánico (TZ/C) en los aislados productores de CTX-M9

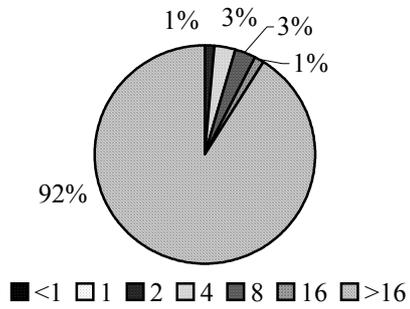


Figura 190: Distribución de la CMI de cefepime (CFP) en los aislados productores de CTX-M9

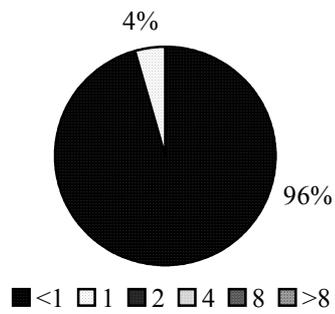
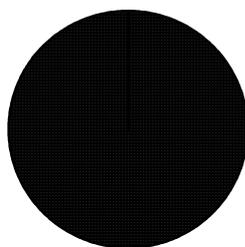


Figura 191: Distribución de la CMI de meropenem (MER) en los aislados productores de CTX-M9

Tabla 80: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema WIDER para los aislados productores de SHV

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AMX	> 16	> 16
A/C	8/4	16/8
P/T	< 16/4	> 64/4
CF	> 8	> 8
CFX	> 16	> 16
CX	< 8	> 16
CTX	> 8	> 8
TAZ	> 16	> 16
TZ/C	< 1/4	8/4
CFP	> 16	> 16
MER	< 1	< 1



■ >16

Figura 192: Distribución de la CMI de amoxicilina (AMX) en los aislados productores de SHV

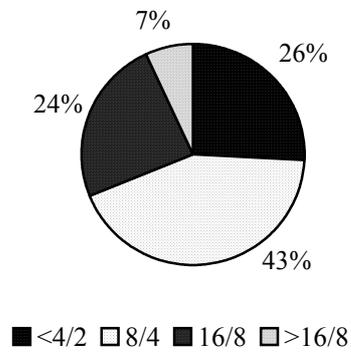


Figura 193: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (A/C) en los aislados productores de SHV

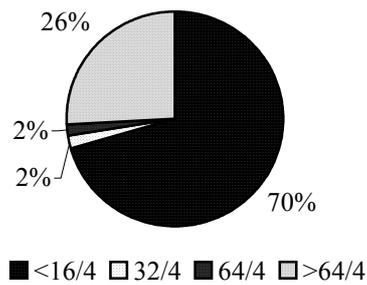


Figura 194: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (P/T) en los aislados productores de SHV

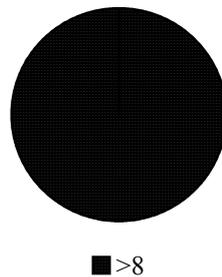


Figura 195: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados productores de SHV

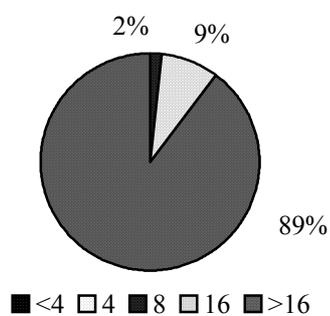


Figura 196: Distribución de la CMI de cefuroxima (CFX) en los aislados productores de SHV

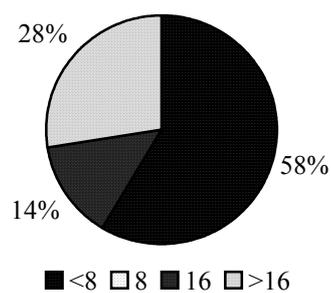


Figura 197: Distribución de la CMI de cefoxitina (CX) en los aislados productores de SHV

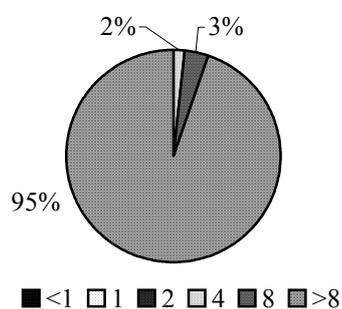


Figura 198: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados productores de SHV

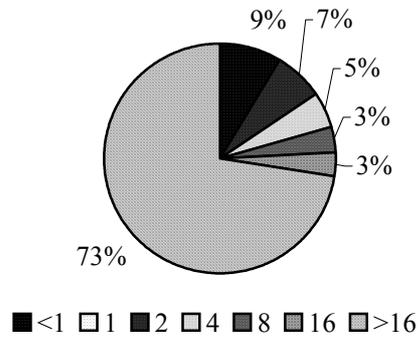


Figura 199: Distribución de la CMI de ceftazidima (TAZ) en los aislados productores de SHV

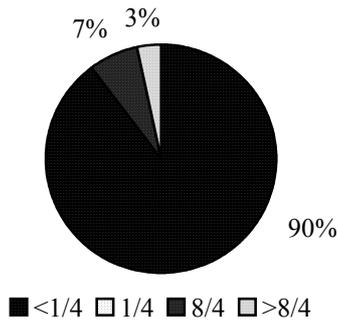


Figura 200: Distribución de la CMI de ceftazidima-ácido clavulánico (TZ/C) en los aislados productores de SHV

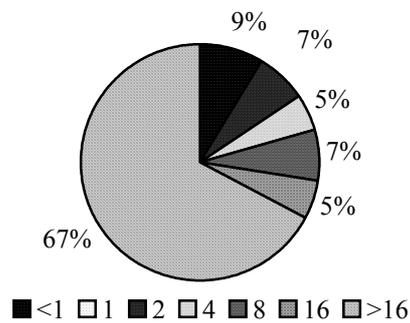


Figura 201: Distribución de la CMI de cefepime (CFP) en los aislados productores de SHV

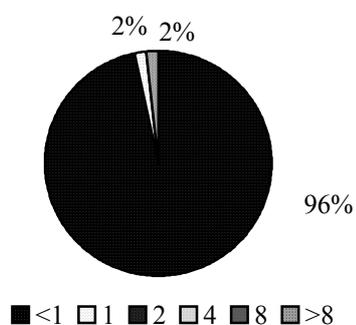


Figura 202: Distribución de la CMI de meropenem (MER) en los aislados productores de SHV

Tabla 81: CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) de antibióticos betalactámicos mediante el sistema WIDER para los aislados no productores de BLEEs

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
AMX	> 16	> 16
A/C	16/8	> 16/8
P/T	< 16/4	> 64/4
CF	> 8	> 8
CFX	8	> 16
CX	> 16	> 16
CTX	2	> 8
TAZ	4	> 16
TZ/C	< 1/4	8/4
CFP	1	16
MER	< 1	1

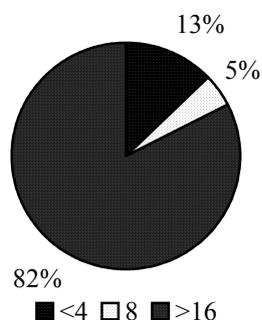


Figura 203: Distribución de la CMI de amoxicilina (AMX) en los aislados no productores de BLEEs

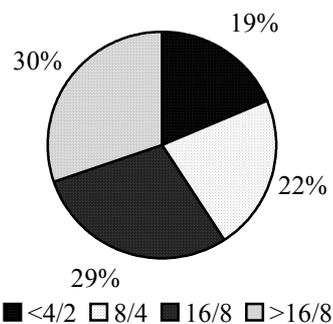


Figura 204: Distribución de la CMI de amoxicilina-ácido clavulánico (A/C) en los aislados no productores de BLEEs

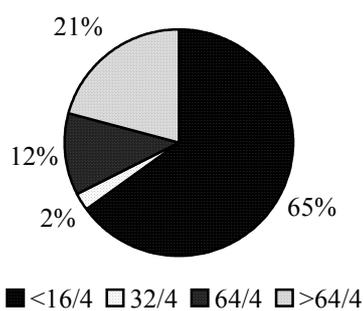


Figura 205: Distribución de la CMI de piperacilina-tazobactam (P/T) en los aislados no productores de BLEEs

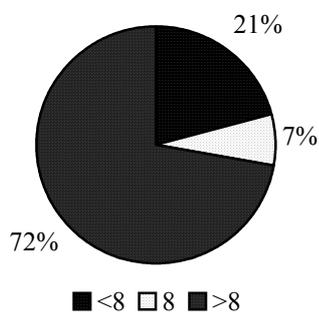


Figura 206: Distribución de la CMI de cefalotina (CF) en los aislados no productores de BLEEs

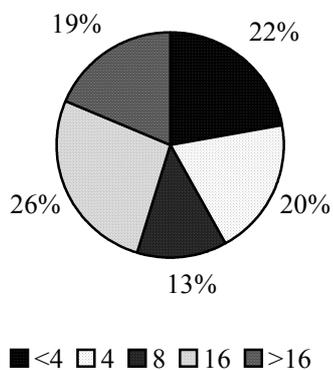


Figura 207: Distribución de la CMI de cefuroxima (CFX) en los aislados no productores de BLEEs

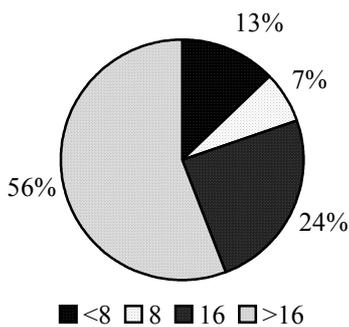


Figura 208: Distribución de la CMI de ceftiofina (CX) en los aislados no productores de BLEEs

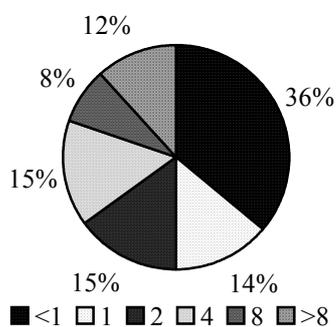


Figura 209: Distribución de la CMI de cefotaxima (CTX) en los aislados no productores de BLEEs

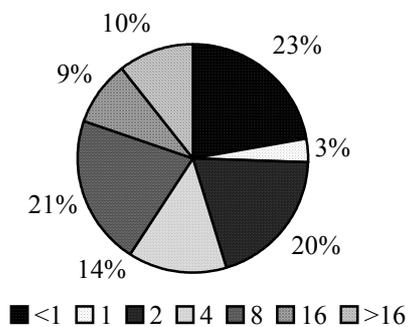


Figura 210: Distribución de la CMI de ceftazidima (TAZ) en los aislados no productores de BLEEs

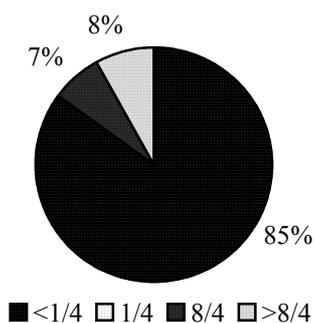


Figura 211: Distribución de la CMI de ceftazidima-ácido clavulánico (TZ/C) en los aislados no productores de BLEEs

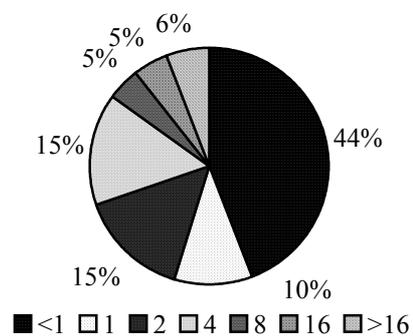


Figura 212: Distribución de la CMI de cefepime (CFP) en los aislados no productores de BLEEs

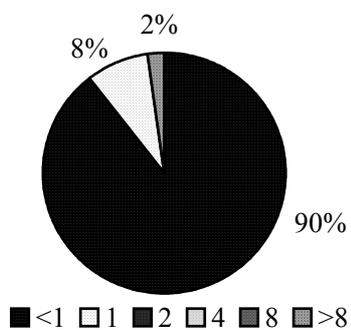


Figura 213: Distribución de la CMI de meropenem (MER) en los aislados no productores de BLEEs

En las tablas 82, 84, 86 y 88 y figuras 214, 216, 218 y 220, se muestran las distribuciones de las categorías clínicas (S: sensible, I: intermedio y R: resistente) obtenidas mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los aislados productores de BLEEs, distinguiendo los que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una SHV, y de los aislados no productores de BLEEs, antes que el sistema realizara las modificaciones necesarias en las mismas una vez establecido el fenotipo de resistencia para estos antibióticos (BLEE o no BLEE) en cada aislado clínico.

En las tablas 83, 85, 87 y 89 y figuras 215, 217, 219 y 221, se muestran las distribuciones de las categorías clínicas (S: sensible, I: intermedio y R: resistente) emitidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos en los aislados productores de BLEEs, distinguiendo los que poseyeron una enzima CTX-M9 de los que poseyeron una SHV, y de los aislados no productores de BLEEs, después que el sistema realizó las modificaciones necesarias en las mismas una vez establecido el fenotipo de resistencia para estos antibióticos (BLEE o no BLEE) en cada aislado clínico.

Como puede observarse, los antibióticos betalactámicos ensayados por el sistema WIDER que fueron modificados tras la interpretación del fenotipo obtenido en los aislados productores de BLEEs fueron cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima y cefepime. En todos los casos el sistema modificó aquellos aislados con categoría clínica sensible e informó estos antibióticos como resistentes limitando su uso clínico.

Tabla 82: Categorías clínicas obtenidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico en los aislados productores de BLEEs

	S	I	R
AMX	1	0	124
A/C	87	25	13
P/T	84	10	31
CF	0	0	125
CFX	1	6	118
CX	62	19	44
CTX	3	0	122
TAZ	55	8	62
CFP	21	4	100
MER	124	0	1

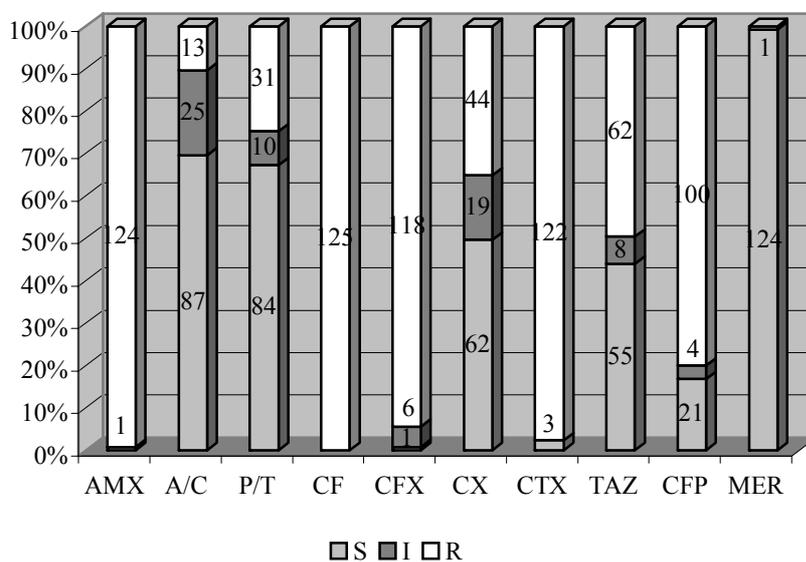


Figura 214: Distribución de los aislados productores de BLEEs según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 83: Categorías clínicas emitidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico en los aislados productores de BLEEs

	S	I	R
AMX	1	0	124
A/C	87	25	13
P/T	84	10	31
CF	0	0	125
CFX	1	1	123
CX	62	19	44
CTX	0	0	125
TAZ	23	0	102
CFP	7	0	118
MER	124	0	1

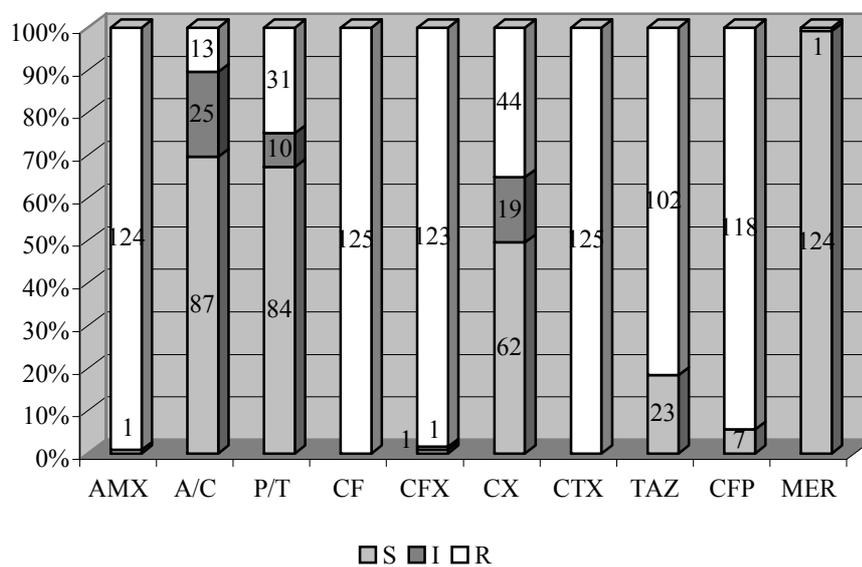


Figura 215: Distribución de los aislados productores de BLEEs según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 84: Categorías clínicas obtenidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico en los aislados productores de CTX-M9

	S	I	R
AMX	1	0	66
A/C	47	11	9
P/T	43	8	16
CF	0	0	67
CFX	1	0	66
CX	28	11	28
CTX	0	0	67
TAZ	41	6	20
CFP	5	1	61
MER	67	0	0

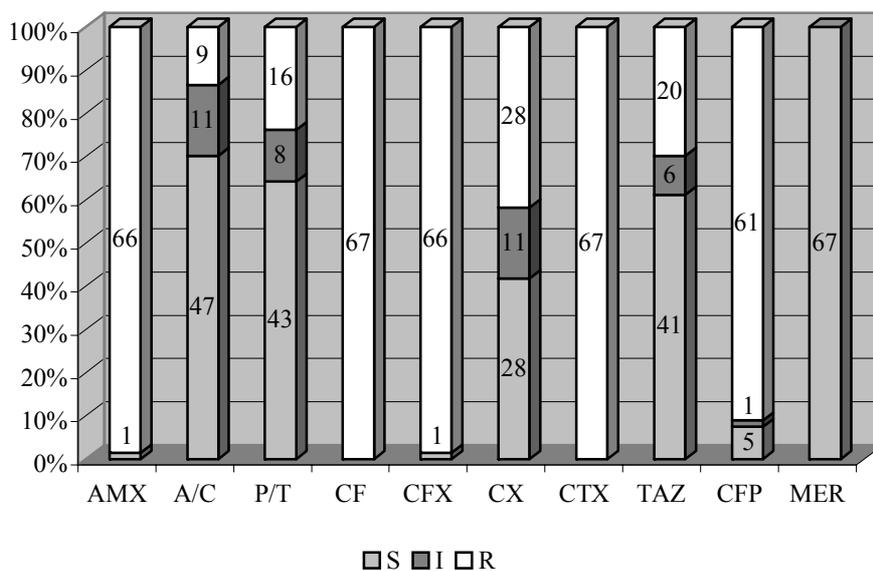


Figura 216: Distribución de los aislados productores de CTX-M9 según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 85: Categorías clínicas emitidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico en los aislados productores de CTX-M9

	S	I	R
AMX	1	0	66
A/C	47	11	9
P/T	43	8	16
CF	0	0	67
CFX	1	0	66
CX	28	11	28
CTX	0	0	67
TAZ	18	0	49
CFP	3	0	64
MER	67	0	0

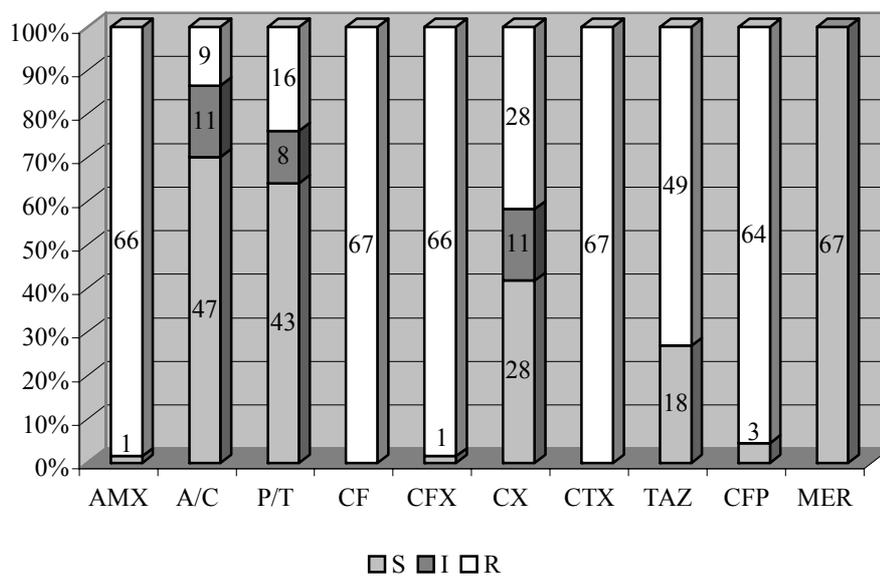


Figura 217: Distribución de los aislados productores de CTX-M9 según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 86: Categorías clínicas obtenidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico en los aislados productores de SHV

	S	I	R
AMX	0	0	58
A/C	40	14	4
P/T	41	2	15
CF	0	0	58
CFX	0	6	52
CX	34	8	16
CTX	3	0	55
TAZ	14	2	42
CFP	16	3	39
MER	57	0	1

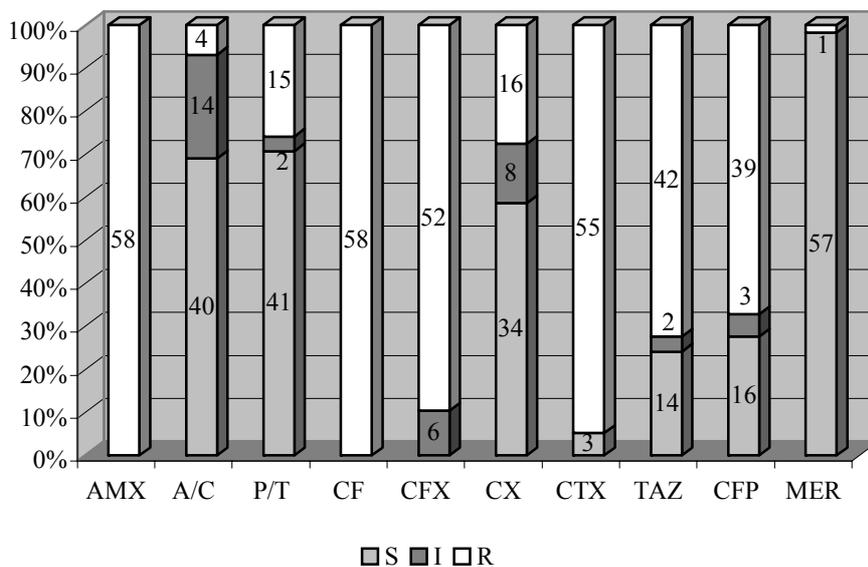


Figura 218: Distribución de los aislados productores de SHV según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 87: Categorías clínicas emitidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado fenotípico en los aislados productores de SHV

	S	I	R
AMX	0	0	58
A/C	40	14	4
P/T	41	2	15
CF	0	0	58
CFX	0	2	56
CX	34	8	16
CTX	0	0	58
TAZ	5	0	53
CFP	4	0	54
MER	57	0	1

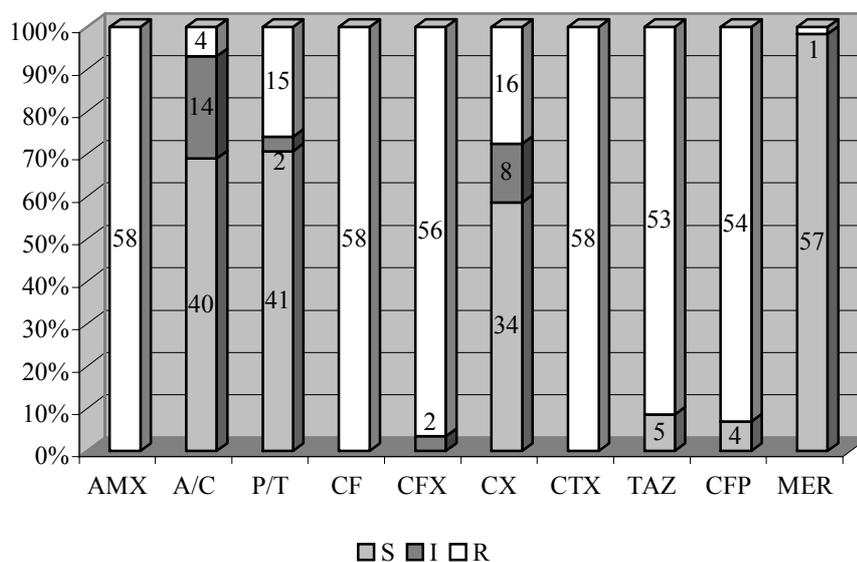


Figura 219: Distribución de los aislados productores de SHV según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 88: Categorías clínicas obtenidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos antes de la interpretación del resultado fenotípico en los aislados no productores de BLEEs

	S	I	R
AMX	60	0	284
A/C	140	100	104
P/T	224	48	72
CF	96	0	248
CFX	144	136	64
CX	68	84	192
CTX	304	0	40
TAZ	276	32	36
CFP	308	16	20
MER	336	0	8

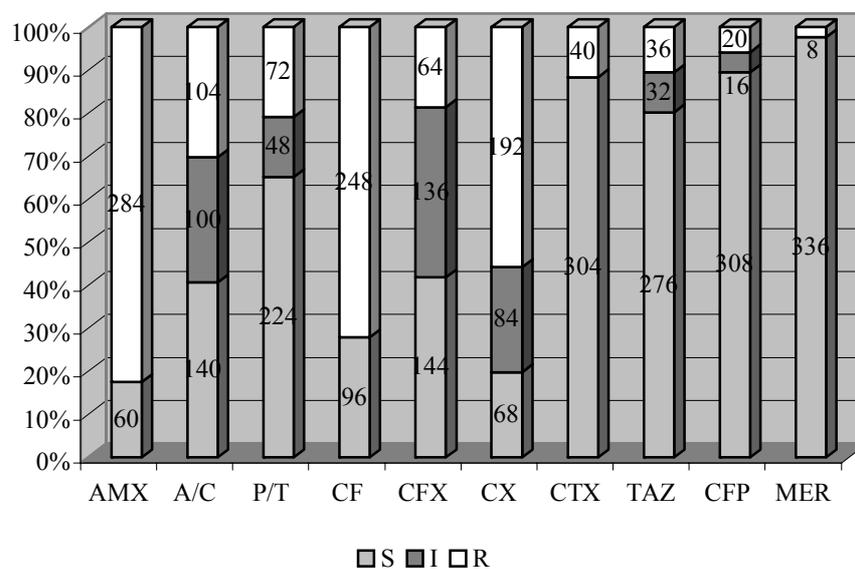


Figura 220: Distribución de los aislados no productores de BLEEs según las categorías clínicas obtenidas *in vitro* mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Tabla 89: Categorías clínicas emitidas por el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos tras la interpretación del resultado en los aislados no productores de BLEEs

	S	I	R
AMX	60	0	284
A/C	140	100	104
P/T	224	48	72
CF	92	0	252
CFX	120	116	108
CX	68	84	192
CTX	268	0	76
TAZ	260	28	56
CFP	280	8	56
MER	336	0	8

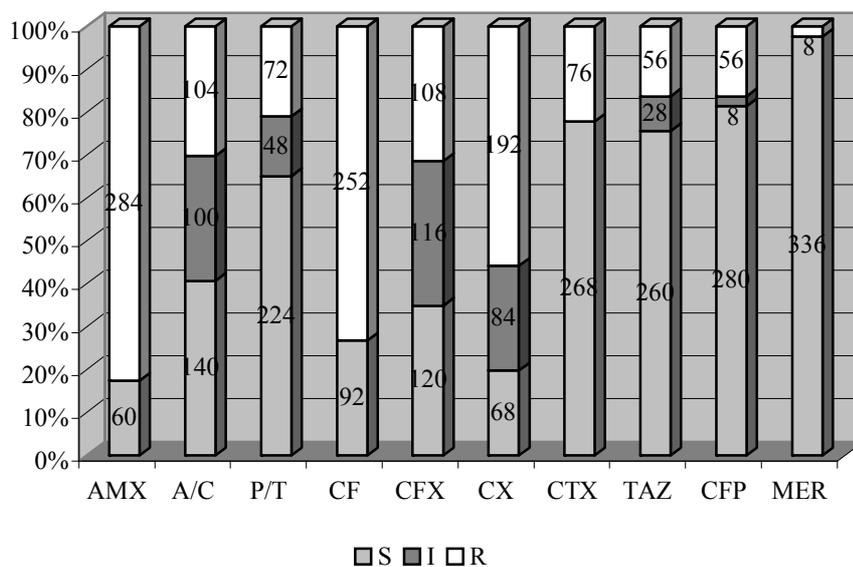


Figura 221: Distribución de los aislados no productores de BLEEs según las categorías clínicas emitidas mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

La cepa de referencia *K. pneumoniae* (ATCC 700603) se mostró en todos los ensayos *in vitro* resistente a ampicilina, cefoxitina y ceftazidima, y sensible a amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefotaxima, cefepime y carbapenémicos (Rasheed *et al.*, 2000). *E. coli* ATCC 25922 fue sensible a todos los antibióticos ensayados.

4.10. Evaluación de los diferentes métodos fenotípicos estudiados para la detección de BLEEs

En función de los resultados obtenidos podemos evaluar la capacidad de los distintos métodos de detección fenotípica de BLEEs (método B, E-test TZ/TZL, E-test CT/CTL, VITEK 2 y WIDER) en relación al método fenotípico que hemos considerado de referencia, el método A.

Para ello valoramos sólo los resultados obtenidos en los aislados de una única especie, *E. coli*, por los distintos procedimientos, ya que encontramos un número de muestra lo suficientemente amplia en esta especie para realizar dicha valoración, no así en las otras dos especies evaluadas en este estudio.

Así, en la tabla 90 mostramos, en números absolutos, los aislados clínicos que según cada método fenotípico poseen o no una BLEE en comparación con los resultados obtenidos por el método fenotípico de referencia.

En la tabla 91 se reflejan los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (con sus respectivos intervalos de confianza al 95% obtenidos mediante la prueba de Clopper-Pearson para una proporción) de cada método fenotípico valorado para la detección de BLEEs en nuestros aislados de

la especie *E. coli*, en relación al método fenotípico de referencia, el método A.

Tabla 90: Distribución de resultados obtenidos en la determinación de la presencia de BLEEs en *E. coli* por los métodos fenotípicos utilizados

Método fenotípico		BLEE		Total
		Positivo	Negativo	
VITEK 2	Positivo	115	12	127
	Negativo	0	272	272
WIDER	Positivo	95	44	139
	Negativo	20	240	260
TZ/TZL	Positivo	57	0	57
	Negativo	58	284	342
CT/CTL	Positivo	115	0	115
	Negativo	0	284	284
TZ/TZL y CT/CTL*	Positivo	115	0	115
	Negativo	0	284	284
MÉTODO B	Positivo	115	0	115
	Negativo	0	284	284

TZ/TZL: E-test de ceftazidima y ceftazidima más ácido clavulánico, CT/CTL: E-test de cefotaxima y cefotaxima más ácido clavulánico.

*Valoración de los dos E-test cuando se usan conjuntamente

Tabla 91: Resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos (intervalos de confianza al 95%) para los métodos fenotípicos utilizados, considerando como referencia el método A

Método	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
VITEK2	100% (97-100%)	95,8% (92,7-97,8%)	90,6% (84-95%)	100% (98,6-100%)
WIDER	82,6% (74,6-89%)	84,5% (79,7-88,5%)	68,3% (59,9-76%)	92,3% (88,4-95,3%)
TZ/TZL	49,6% (39,2-58,2%)	100% (98,8-100%)	100% (93,7-100%)	83% (78,6-86,9%)
CT/CTL	100% (97-100%)	100% (98,8-100%)	100% (96,8-100%)	100% (98,7-100%)
TZ/TZL y CT/CTL	100% (97-100%)	100% (98,8-100%)	100% (96,8-100%)	100% (98,7-100%)
MÉTODO B	100% (97-100%)	100% (98,8-100%)	100% (96,8-100%)	100% (98,7-100%)

TZ/TZL: E-test de ceftazidima y ceftazidima más ácido clavulánico, CT/CTL: E-test de cefotaxima y cefotaxima más ácido clavulánico.

VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

En la tabla 92 mostramos los 16 resultados falsos positivos por el sistema VITEK 2 (12 *E. coli* y 4 *K. oxytoca*), comparando los resultados obtenidos por el método de referencia (que determina que estos aislados no son productores de BLEEs) y las CMIs de cefotaxima, cefpodoxima y ceftazidima según el sistema VITEK 2. En estos 16 casos el sistema experto AES determinó que los aislados poseían una BLEE.

En la tabla 93 aparecen los 56 resultados falsos positivos por el sistema WIDER (44 *E. coli*, 8 *K. pneumoniae* y 4 *K. oxytoca*), comparando los resultados obtenidos por el método de referencia (que determina que estos aislados no son productores de BLEEs) y las CMIs de cefotaxima, ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico según el sistema WIDER. En estos 56 casos el sistema determinó que los aislados poseían una BLEE.

Se puede observar que los aislados 3, 40, 160, 225, 263, 264, 322 y 391 fueron considerados como positivos por los dos sistemas automatizados.

En la tabla 94 se reflejan los 23 resultados falsos negativos por el sistema WIDER (20 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* y 1 *K. oxytoca*), comparando los resultados obtenidos por el método de referencia (que determina que estos aislados son productores de BLEEs) y las CMIs de cefotaxima, ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico según el sistema WIDER. En estos 23 casos el sistema determinó que los aislados no poseían una BLEE.

En la tabla 95 se recogen los 62 resultados falsos negativos por el E-test de ceftazidima (59 *E. coli* y 3 *K. pneumoniae*), comparando los resultados obtenidos por el método de referencia (que determina que estos aislados son productores de BLEEs) y las CMIs de TZ y TZL. En estos 61 casos los cocientes (TZ/TZL) fueron inferiores a 8 o indeterminados (ND).

4. Resultados

Tabla 92: Comparación de los resultados obtenidos por el método A (diámetro en mm) y el sistema VITEK 2 (CMI en µg/ml) para los 16 aislados falsos positivos por éste último.

Aislado	Especie	CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	VITEK 2		
								CTX	CPD	CAZ
3	<i>K. oxytoca</i>	32	32	29	30	28	29	≤ 1	≤ 0,25	≤ 1
40	<i>E. coli</i>	27	26	29	30	24	27	≤ 1	2	≤ 1 - ≥ 2
64	<i>E. coli</i>	23	26	27	27	6	6	≤ 1	≥ 8	2
116	<i>E. coli</i>	23	25	27	28	6	6	≤ 1	≥ 8	2
147	<i>E. coli</i>	24	24	28	28	6	6	≤ 1	≥ 8	2
157	<i>E. coli</i>	23	23	26	26	6	6	≤ 1	≥ 8	2
160	<i>K. oxytoca</i>	25	27	28	30	22	22	≤ 1	≤ 0,25	≤ 1
205	<i>E. coli</i>	27	28	30	30	6	6	≤ 1	≥ 8	2
225	<i>E. coli</i>	30	34	30	30	23	27	≤ 1	2	≤ 1 - ≥ 2
263	<i>K. oxytoca</i>	30	30	32	34	30	30	≤ 1	≤ 0,25	≤ 1
264	<i>E. coli</i>	28	30	30	30	23	27	≤ 1	2	≤ 1 - ≥ 2
304	<i>E. coli</i>	28	30	31	30	6	6	≤ 1	≥ 8	2
322	<i>E. coli</i>	23	24	30	30	21	21	≤ 1	2	≤ 1 - ≥ 2
353	<i>E. coli</i>	25	25	26	26	6	6	≤ 1	≥ 8	2
372	<i>E. coli</i>	26	25	28	26	6	6	≤ 1	≥ 8	2
391	<i>K. oxytoca</i>	26	30	29	34	25	25	≤ 1	≤ 0,25	≤ 1

CAZ: Ceftazidima (30 µg), CD02: Ceftazidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD : Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 93: Comparación de los resultados obtenidos por el método A (diámetro en mm) y el sistema WIDER (CMI en µg/ml) para los 56 aislados falsos positivos por éste último.

Aislado	Especie	CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	WIDER		
								CTX	TAZ	TZ/C
3	<i>K. oxytoca</i>	32	32	29	30	28	29	<1	>16	<1/4
6	<i>K. pneumoniae</i>	27	27	30	30	24	25	>8	<1	<1/4
14	<i>E. coli</i>	27	27	30	30	25	25	<1	<1	<1/4
20	<i>E. coli</i>	32	32	36	36	25	25	<1	16	<1/4
23	<i>E. coli</i>	32	32	36	36	25	25	<1	16	<1/4
29	<i>E. coli</i>	26	30	28	30	23	23	<1	>16	<1/4
33	<i>K. pneumoniae</i>	27	27	30	30	24	25	>8	<1	<1/4
35	<i>E. coli</i>	30	32	34	34	27	27	<1	16	<1/4
40	<i>E. coli</i>	27	26	29	30	24	27	>8	<1	<1/4
45	<i>K. pneumoniae</i>	29	31	36	38	30	30	>8	<1	<1/4
53	<i>E. coli</i>	27	27	30	30	25	25	<1	<1	<1/4
59	<i>E. coli</i>	26	26	30	30	22	22	<1	16	<1/4
108	<i>E. coli</i>	26	28	30	32	27	29	4	16	<1/4
131	<i>E. coli</i>	26	28	30	32	27	29	4	16	<1/4
142	<i>E. coli</i>	32	32	36	36	25	25	<1	16	<1/4
144	<i>E. coli</i>	26	30	28	30	23	23	<1	>16	<1/4
152	<i>E. coli</i>	26	28	30	32	27	29	4	16	<1/4
155	<i>E. coli</i>	26	26	30	30	22	22	<1	16	<1/4
160	<i>K. oxytoca</i>	25	27	28	30	22	22	<1	>16	<1/4
173	<i>K. pneumoniae</i>	27	27	30	30	24	25	>8	<1	<1/4
176	<i>E. coli</i>	25	25	28	28	24	24	<1	16	<1/4
188	<i>E. coli</i>	30	30	30	30	22	24	>8	>16	<1/4
212	<i>E. coli</i>	30	32	34	34	27	27	<1	16	<1/4
222	<i>E. coli</i>	26	27	30	30	23	24	<1	>16	<1/4
225	<i>E. coli</i>	30	34	30	30	23	27	>8	<1	<1/4
234	<i>E. coli</i>	30	32	34	34	27	27	<1	16	<1/4
238	<i>E. coli</i>	26	26	28	28	23	23	<1	>16	<1/4
241	<i>E. coli</i>	26	30	28	30	23	23	<1	>16	<1/4
251	<i>E. coli</i>	25	25	28	28	24	24	<1	16	<1/4
259	<i>E. coli</i>	26	26	30	30	22	22	<1	16	<1/4
262	<i>E. coli</i>	26	27	30	30	23	24	<1	>16	<1/4
263	<i>K. oxytoca</i>	30	30	32	34	30	30	<1	>16	<1/4
264	<i>E. coli</i>	28	30	30	30	23	27	>8	<1	<1/4
271	<i>E. coli</i>	30	30	30	30	22	24	>8	>16	<1/4
286	<i>K. pneumoniae</i>	29	31	36	38	30	30	>8	<1	<1/4
287	<i>E. coli</i>	26	26	28	28	23	23	<1	>16	<1/4
289	<i>E. coli</i>	27	27	30	30	25	25	<1	<1	<1/4
291	<i>E. coli</i>	32	32	36	36	25	25	<1	16	<1/4
307	<i>K. pneumoniae</i>	29	31	36	38	30	30	>8	<1	<1/4

4. Resultados

Aislado	Especie	CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	WIDER		
								CTX	TAZ	TZ/C
315	<i>E. coli</i>	26	30	28	30	23	23	<1	>16	<1/4
319	<i>K. pneumoniae</i>	27	27	30	30	24	25	>8	<1	<1/4
322	<i>E. coli</i>	23	24	30	30	21	21	>8	<1	<1/4
326	<i>K. pneumoniae</i>	29	31	36	38	30	30	>8	<1	<1/4
334	<i>E. coli</i>	25	25	28	28	24	24	<1	16	<1/4
338	<i>E. coli</i>	26	26	28	28	23	23	<1	>16	<1/4
342	<i>E. coli</i>	26	28	30	32	27	29	4	16	<1/4
359	<i>E. coli</i>	25	25	28	28	24	24	<1	16	<1/4
362	<i>E. coli</i>	26	26	30	30	22	22	<1	16	<1/4
367	<i>E. coli</i>	30	32	34	34	27	27	<1	16	<1/4
370	<i>E. coli</i>	27	27	30	30	25	25	<1	<1	<1/4
378	<i>E. coli</i>	26	27	30	30	23	24	<1	>16	<1/4
383	<i>E. coli</i>	30	30	30	30	22	24	>8	>16	<1/4
385	<i>E. coli</i>	26	26	28	28	23	23	<1	>16	<1/4
391	<i>K. oxytoca</i>	26	30	29	34	25	25	<1	>16	<1/4
394	<i>E. coli</i>	26	27	30	30	23	24	<1	>16	<1/4
397	<i>E. coli</i>	30	30	30	30	22	24	>8	>16	<1/4

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CD02: Cefotaxidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD : Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 94: Comparación de los resultados obtenidos por el método A (diámetro en mm) y el sistema WIDER (CMI en µg/ml) para los 23 aislados falsos negativos por éste último.

Aislado	Especie	Tipo de BLEE	CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	WIDER		
									CTX	TAZ	TZ/C
19	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	18	28	17	32	6	22	>8	4	<1/4
42	<i>E. coli</i>	CTX-M9	19	28	16	26	6	20	>8	2	<1/4
51	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	20	30	6	21	>8	2	<1/4
54	<i>E. coli</i>	SHV	18	32	14	32	6	22	>8	8	<1/4
56	<i>E. coli</i>	CTX-M9	30	30	20	32	6	22	>8	1	<1/4
58	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	22	28	6	22	>8	<1	<1/4
62	<i>E. coli</i>	SHV	26	32	20	32	12	26	>8	<1	<1/4
63	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	16	28	6	20	>8	8	<1/4
112	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	34	10	34	6	24	>8	8	<1/4
122	<i>E. coli</i>	CTX-M9	27	30	19	32	6	23	>8	2	<1/4
138	<i>E. coli</i>	CTX-M9	21	30	12	30	6	22	>8	2	<1/4
139	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	29	16	29	6	18	>8	2	<1/4
140	<i>E. coli</i>	CTX-M9	30	30	20	34	12	26	>8	<1	<1/4
141	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	32	14	32	10	24	>8	8	<1/4
165	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	25	16	25	6	16	>8	8	<1/4
191	<i>E. coli</i>	CTX-M9	23	26	12	24	6	21	>8	2	<1/4
204	<i>E. coli</i>	CTX-M9	21	32	14	32	6	22	>8	8	8/4
215	<i>K. oxytoca</i>	SHV	18	30	19	32	6	23	>8	<1	<1/4
223	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	20	30	19	36	6	26	>8	<1	<1/4
237	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	20	30	6	21	>8	<1	8/4
246	<i>E. coli</i>	CTX-M9	29	30	22	30	6	20	>8	8	<1/4
260	<i>E. coli</i>	CTX-M9	20	35	12	35	6	24	>8	8	8/4
274	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	29	14	30	6	21	>8	8	8/4

CAZ: Cefotaxidima (30 µg), CD02: Cefotaxidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD : Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg)

4. Resultados

Tabla 95: Comparación de los resultados obtenidos por el método A (diámetro en mm) y el E-test de ceftazidima (CMI en µg/ml) para los 61 aislados falsos negativos por éste último.

Aislado	Especie	Tipo de BLEE	CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	E-test TZ/TZL		
									TZ	TZL	RATIO TZ/TZL
1	<i>E. coli</i>	CTX-M9	32	36	10	24	6	20	1	0,38	2,6
25	<i>E. coli</i>	CTX-M9	21	30	14	30	6	17	<0,50	0,064	<7,8
26	<i>E. coli</i>	CTX-M9	27	30	17	28	6	18	0,5	0,094	5,3
27	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	30	19	30	6	20	<0,50	<0,064	ND
31	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	20	30	24	34	12	30	1,5	0,19	7,9
42	<i>E. coli</i>	CTX-M9	19	28	16	26	6	20	<0,50	0,125	<4
58	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	22	28	6	22	<0,50	<0,064	ND
62	<i>E. coli</i>	SHV	26	32	20	32	12	26	<0,5	0,064	<7,8
65	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	28	18	28	6	20	1,5	0,38	3,9
115	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	30	15	30	6	22	<0,50	0,094	<5,3
122	<i>E. coli</i>	CTX-M9	27	30	19	32	6	23	0,75	0,125	6
124	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	32	19	32	6	23	0,75	0,094	7,9
132	<i>E. coli</i>	CTX-M9	25	30	12	32	6	21	<0,50	0,064	<7,8
136	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	30	16	34	6	24	<0,50	0,064	<7,8
137	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	32	18	32	6	23	0,75	0,125	6
138	<i>E. coli</i>	CTX-M9	21	30	12	30	6	22	0,75	0,125	6
139	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	29	16	29	6	18	0,75	0,19	3,9
140	<i>E. coli</i>	CTX-M9	30	30	20	34	12	26	<0,50	0,094	<5,3
141	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	32	14	32	10	24	<<10	0,094	<5,3
145	<i>E. coli</i>	CTX-M9	22	31	14	31	6	21	<0,50	0,125	<4
149	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	30	14	29	6	19	0,5	0,094	5,3
151	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	30	16	30	6	20	0,75	0,19	3,9
153	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	32	14	32	6	18	0,75	0,25	3
159	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	16	30	6	16	0,75	0,19	3,9
161	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	30	17	30	6	20	0,75	0,19	3,9
163	<i>E. coli</i>	CTX-M9	22	32	12	32	6	22	1	0,25	4
165	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	25	16	25	6	16	0,5	0,19	2,6
169	<i>E. coli</i>	CTX-M9	23	36	15	36	6	16	0,75	0,25	3
171	<i>E. coli</i>	CTX-M9	22	30	17	27	6	18	0,75	0,19	3,9
178	<i>E. coli</i>	SHV	20	30	16	34	12	24	0,75	0,19	3,9
185	<i>E. coli</i>	CTX-M9	30	34	14	34	6	23	<0,50	<0,064	ND
186	<i>E. coli</i>	CTX-M9	32	34	12	32	6	23	<0,50	<0,064	ND
187	<i>E. coli</i>	CTX-M9	30	34	18	34	6	25	<0,50	<0,064	ND
191	<i>E. coli</i>	CTX-M9	23	26	12	24	6	21	0,75	0,094	7,9
192	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	34	20	30	6	22	0,5	0,125	4
193	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	36	20	30	10	26	0,5	0,064	7,8
197	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	22	34	22	34	17	30	0,5	0,064	7,8
200	<i>E. coli</i>	CTX-M9	20	26	14	25	6	15	1	0,19	5,3
204	<i>E. coli</i>	CTX-M9	21	32	14	32	6	22	0,75	0,19	3,9
207	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	30	18	32	6	24	0,75	0,125	6
210	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	26	18	28	6	19	0,5	0,064	7,8

Betalactamasas de espectro extendido

Aislado	Especie	Tipo de BLEE	CAZ	CD 02	CTX	CD 03	CPD	CD 01	E-test TZ/TZL		
									TZ	TZL	RATIO TZ/TZL
211	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	32	14	32	6	22	<0,50	0,094	<5,3
221	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	27	18	27	6	20	<0,50	0,19	<2,6
223	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	20	30	19	36	6	26	0,75	0,125	<5,3
230	<i>E. coli</i>	CTX-M9	12	25	17	27	6	18	0,5	0,064	7,8
232	<i>E. coli</i>	CTX-M9	25	34	18	35	6	18	0,75	0,19	2,6
233	<i>E. coli</i>	CTX-M9	22	32	14	32	6	23	1	0,19	5,3
235	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	30	14	28	6	17	0,75	0,19	3,9
240	<i>E. coli</i>	CTX-M9	30	32	18	32	6	21	<0,50	0,064	<7,8
245	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	26	14	28	6	18	0,75	0,25	3
246	<i>E. coli</i>	CTX-M9	29	30	22	30	6	20	<0,50	0,125	<4
248	<i>E. coli</i>	CTX-M9	23	26	10	26	6	16	<0,50	0,094	<5,3
253	<i>E. coli</i>	CTX-M9	28	30	16	28	6	18	<0,50	<0,064	ND
254	<i>E. coli</i>	CTX-M9	20	25	14	24	6	14	<0,50	0,094	<5,3
258	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	28	16	26	6	17	0,5	0,094	5,3
269	<i>E. coli</i>	SHV	24	28	12	27	6	20	0,5	0,125	4
270	<i>E. coli</i>	CTX-M9	24	28	8	27	6	20	1,5	0,38	3,9
273	<i>E. coli</i>	CTX-M9	22	28	12	28	6	18	<0,50	0,19	<2,6
274	<i>E. coli</i>	CTX-M9	26	29	14	30	6	21	<0,50	0,094	<5,3
282	<i>E. coli</i>	SHV	23	23	6	24	6	21	0,5	0,094	5,3
284	<i>E. coli</i>	SHV	25	25	10	23	6	17	0,5	0,094	5,3

CAZ: Ceftazidima (30 µg), CD02: Ceftazidima más ácido clavulánico (30/10 µg), CTX: Cefotaxima (30 µg), CD03: Cefotaxima más ácido clavulánico (30/10 µg), CPD: Cefpodoxima (10 µg), CD01: Cefpodoxima más ácido clavulánico (10/1 µg), TZ: Ceftazidima, TZL: Ceftazidima más ácido clavulánico
RATIO TZ/TZL: Cociente entre la CMI de ceftazidima y la CMI de ceftazidima-ácido clavulánico
ND: Resultado Indeterminado (CMIs inferiores a los límites inferiores)

4.11. Resultados del estudio de prevalencia

Por último, durante los meses de Octubre y Noviembre de 2002, y de forma consecutiva, se aislaron 744 enterobacterias (357 *E. coli*, 132 *K. pneumoniae*, 43 *K. oxytoca* y 212 de otras especies) de 744 sujetos distintos cuyas muestras fueron analizadas en el servicio de Microbiología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada. Todas ellas se identificaron por el sistema automatizado WIDER y se analizó la producción de BLEEs mediante el método A.

Con el método de referencia hubo 50 aislados clínicos de *E. coli*, 2 de *K. pneumoniae* y 2 de *K. oxytoca* que confirmaron la presencia de BLEEs, que, respecto al total de cada especie, representan el 14% de *E. coli*, 1,5% de *K. pneumoniae* y 4,6% de *K. oxytoca*. El 10,2% de los aislados de estas especies producían una BLEE.

Centrándonos en estas cepas, destacó el predominio de *E. coli* (92,6% de los aislados productores de BLEEs), y como origen las muestras extrahospitalarias (40; 80%), siendo 39 orinas (97,5%) y 1 secreción uretral (2,5%). En las muestras hospitalarias (10; 20%) se redujeron los aislamientos de *E. coli* en las de orina (6; 60%) y se incrementaron en las de secreciones de heridas (3; 30%) y de vulva (1; 10%). De entre los aislados sólo hubo 4 *Klebsiella* spp. (7,4% de los aislados productores de BLEEs), 3 en muestras de orinas extrahospitalarias (75%, 2 *K. oxytoca* y 1 *K. pneumoniae*), y 1 aislado de *K. pneumoniae* (25%) en una muestra de orina intrahospitalaria. Globalmente, el 66,7% de los aislados procedieron de mujeres.

4.12. Resultados del estudio de clonalidad mediante electroforesis en campo pulsado

En la figura 222 (A y B) se observan los distintos patrones de electroforesis en campo pulsado obtenidos en los 10 aislamientos de *E. coli* de origen intrahospitalario aislados en el periodo Octubre- Noviembre de 2002.

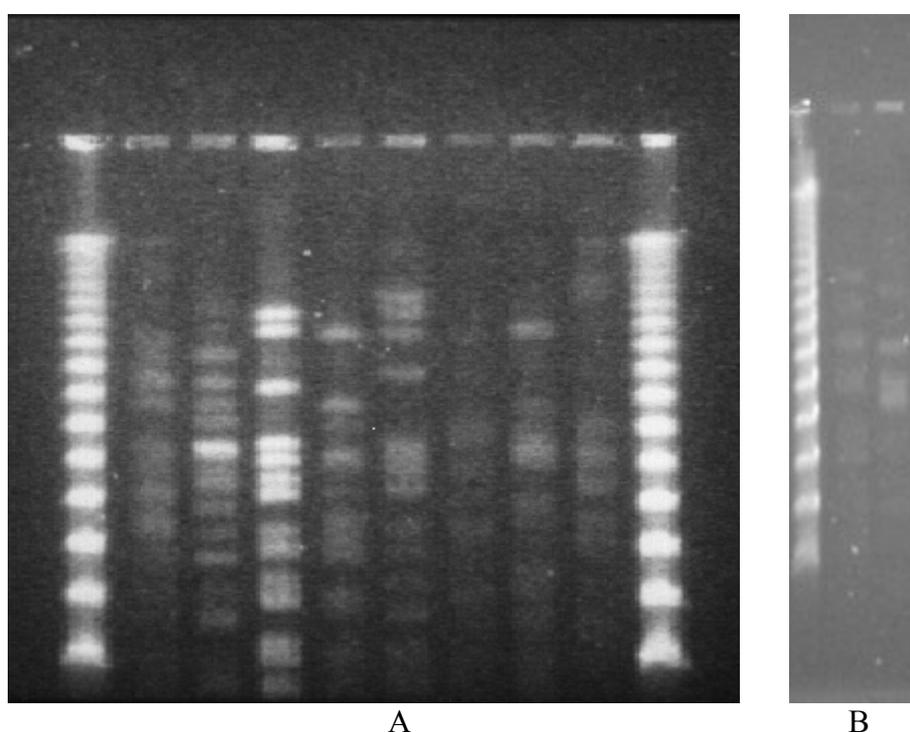


Figura 222 A: Resultados de la electroforesis en campo pulsado
Líneas 1 y 12: Patrón de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs,EEUU)
Líneas 2 a 11: Aislados 218, 235, 261, 246, 248, 255, 258 y 260, respectivamente

Figura 222 B: Resultados de la electroforesis en campo pulsado
Línea 1: Patrón de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs)
Líneas 2 y 3: Aislados 224 y 227, respectivamente

Se puede observar que existe una gran variabilidad genética, detectándose 10 patrones distintos entre los 10 aislados hospitalarios estudiados. Se puede descartar, por tanto, la existencia de una relación clonal entre ellos.

4.13. Resultados del análisis estadístico inferencial

4.13.1. Variables demográficas

En la tabla 96 se resumen los resultados obtenidos tras la aplicación de la prueba exacta de Fisher para comparar los distintos grupos de estudio en función de las diferentes variables demográficas analizadas.

Tabla 96: Comparación entre los distintos grupos de estudio, en función de las variables especie bacteriana, sexo, procedencia y tipo de muestra

	Ausencia (n=344)	Presencia (n=125)	<i>p</i>	CTX-M9 (n=67)	SHV (n=58)	<i>p</i>
<i>E. coli</i>	284 (82,6%)	115 (92%)		67 (100%)	48 (82,8%)	
<i>K. pneumoniae</i>	40 (11,6%)	8 (6,4%)	0,029	0	8 (13,8%)	<0,001
<i>K. oxytoca</i>	20 (5,8%)	2 (1,6%)		0	2 (3,4%)	
Mujer	232 (67,4%)	86 (68,8%)	0,824	50 (74,6%)	36 (62,1%)	0,175
Varón	112 (32,6%)	39 (31,2%)		17 (25,4%)	22 (37,9%)	
Intrahospitalarias	80 (23,3%)	32 (25,6%)	0,625	18 (26,9%)	14 (24,1%)	0,838
Extrahospitalarias	264 (76,7%)	93 (74,4%)		49 (73,1%)	44 (75,9%)	
Orina	316 (91,8%)	108 (86,4%)		58 (86,5%)	50 (86,3%)	
Exudado quirúrgico	16 (4,7%)	9 (7,2%)		6 (9%)	3 (5,2%)	
Secreción genital	4 (1,2%)	3 (2,4%)	0,002	1 (1,5%)	2 (3,4%)	0,814
Escara/úlceras	8 (2,3%)	0		0	0	
Sonda vesical	0	2 (1,6%)		1 (1,5%)	1 (1,7%)	
Otros	0	3 (2,4%)		1 (1,5%)	2 (3,4%)	

Al comparar entre sí los grupos de aislados productores y no productores de BLEEs podemos observar que la distribución fue igual en ambos grupos respecto al sexo ($p=0,824$) y procedencia de las muestras ($p=0,625$); sin embargo, hubo diferencias significativas entre ambos

grupos al ser comparados respecto a la distribución de especies bacterianas ($p=0,029$) y tipo de muestra ($p=0,002$).

Asimismo, los aislamientos en el grupo de productores de enzimas CTX-M9 se distribuyeron de igual forma que en el grupo de aislados productores de enzimas SHV en cuanto a las variables sexo ($p=0,175$), procedencia de la muestra ($p=0,838$) y tipo de muestra ($p=0,814$); pero la distribución fue significativamente diferente en cuanto a especie ($p<0,001$), puesto que sólo en el grupo de aislados productores de SHV encontramos *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

4.13.2. Distribuciones de CMIs obtenidas mediante E-test en los aislados productores de BLEEs

Tras realizar la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo que:

Comparadas las distribuciones de TZ en los dos grupos de aislados productores de BLEEs observamos que hay diferencias significativas entre ellas ($p<0,001$), significación que proviene del hecho de que el tipo SHV tiende a dar valores mayores de TZ que el tipo CTX-M9.

Para TZL no hay diferencias significativas entre las distribuciones, ($p=0,812$), por lo que no podemos decir que, en este caso, la distribución de un grupo esté por encima de la distribución del otro.

Comparadas las distribuciones de CT en los dos tipos de aislados se obtiene que hay diferencias significativas entre ellas ($p<0,001$), significación que proviene del hecho de que el tipo CTX-M9 tiende a dar valores mayores de CT que el tipo SHV.

Para CTL se obtiene que hay diferencias significativas entre ellas, ($p=0,027$), significación que proviene del hecho de que el tipo CTX-M9 tiende a dar valores mayores de CTL que el tipo SHV.

4.13.3. Antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2

En las tablas 97 a 102 se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de la prueba exacta de Fisher, para comparar los distintos grupos de estudio, en cuanto a la actividad (en términos de CMIs y categorías clínicas) de los diferentes antibióticos betalactámicos estudiados por el sistema VITEK 2.

Tabla 97: Relación entre la presencia de BLEEs y la distribución de las CMIs de amoxicilina-ácido clavulánico obtenida mediante el sistema VITEK 2

	<2/1	4/2	8/4	16/8	>32/16	<i>p</i>
Presencia	10 (8%)	74 (59,2%)	23 (18,4%)	16 (12,8%)	2 (1,6%)	<i><0,001</i>
Ausencia	80 (23,3%)	152 (44,2%)	32 (9,3%)	44 (12,8%)	36 (10,5%)	
CTX-M9	2 (3%)	43 (64,2%)	14 (20,9%)	7 (10,4%)	1 (1,5%)	<i>0,170</i>
SHV	8 (13,8%)	31 (53,4%)	9 (15,5%)	9 (15,5%)	1 (1,7%)	

Tabla 98: Relación entre la presencia de BLEEs y la distribución de las CMIs de piperacilina-tazobactam obtenida mediante el sistema VITEK 2

	<4/4	8/4	32/4	64/4	<i>p</i>
Presencia	113 (90,4%)	9 (7,2%)	1 (0,8%)	2 (1,6%)	<i>0,265</i>
Ausencia	300 (87,2%)	36 (10,5%)	0	8 (2,3%)	
CTX-M9	62 (92,5%)	3 (4,5%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	<i>0,649</i>
SHV	51 (87,9%)	6 (10,3%)	0	1 (1,7%)	

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 99: Relación entre los aislados productores o no de BLEEs y la distribución de las CMI's de los diferentes antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2

Antibiótico	BLEE	<0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>128	p	
Ampicilina	Presencia	0			0		0	0	125 (100%)			<0,001	
	Ausencia	24 (7%)			20 (5,8%)		16 (4,7%)	28 (8,1%)	256 (74,4%)				
Piperacilina	Presencia	0			0		1 (0,8%)	2 (1,6%)	26 (20,8%)	18 (14,4%)	78 (62,4%)		<0,001
	Ausencia	124 (36%)			20 (5,8%)		48 (14%)	56 (16,3%)	20 (5,8%)	76 (22,1%)			
Cefalotina	Presencia	0			0		0	0	125 (100%)			<0,001	
	Ausencia	36 (10,5%)			68 (19,8%)		20 (5,8%)	100 (29,1%)	44 (12,8%)	76 (22,1%)			
Cefuroxima	Presencia	0			0	2 (1,6%)	4 (3,2%)	17 (13,6%)	10 (8%)	92 (73,6%)		<0,001	
	Ausencia	28 (8,1%)			16 (4,7%)	168 (48,8%)	12 (3,5%)	80 (23,3%)	20 (5,8%)	20 (5,8%)			
Cefoxitina	Presencia	83 (66,4%)			0		23 (18,4%)	13 (10,4%)	5 (4%)	1 (0,8%)		<0,001	
	Ausencia	236 (68,6%)			0		16 (4,7%)	32 (9,3%)	28 (8,1%)	32 (9,3%)			
Cefotaxima	Presencia	4 (3,2%)			8 (6,4%)	22 (17,6%)	37 (29,6%)	12 (9,6%)	6 (4,8%)	36 (28,8%)		<0,001	
	Ausencia	340 (98,8%)			0	0	4 (1,2%)	0	0	0			
Cefpodoxima	Presencia	1 (0,8%)	0	0	0	3 (2,4%)	121 (96,8%)			20 (5,8%)		<0,001	
	Ausencia	206 (59,9%)	8 (2,3%)	42 (12,2%)	60 (17,4%)	8 (2,3%)	0			10 (8%)			
Ceftazidima	Presencia	67 (53,6%)			5 (4%)	7 (5,6%)	2 (1,6)	33 (26,4%)	1 (0,8%)	10 (8%)		<0,001	
	Ausencia	332 (96,5%)			8 (2,3%)	4 (1,2%)	0	0	0	0			
Cefepime	Presencia	66 (52,8%)			47 (37,6%)	1 (0,8%)	5 (4%)	1 (0,8%)	3 (2,4%)	2 (1,6%)		<0,001	
	Ausencia	344 (100%)			0	0	0	0	0	0			
Meropenem	Presencia	125 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,000	
	Ausencia	344 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

4. Resultados

Tabla 100: Relación entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV y la distribución de las CMIs de los diferentes antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2

Antibiótico	BLEE	<0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>128	P	
Ampicilina	CTX-M9	0	0	0	0	0	0	0	67 (100%)			1,000	
	SHV	0	0	0	0	0	0	0	58 (100%)				
Piperacilina	CTX-M9	0	0	0	0	0	0	0	11 (16,4%)	9 (13,4%)	47 (70,1%)	0,139	
	SHV	0	0	0	0	0	1 (1,7%)	2 (3,4%)	15 (25,9%)	9 (15,5%)	31 (53,4%)		
Cefalotina	CTX-M9	0	0	0	0	0	0	0	0	67 (100%)		1,000	
	SHV	0	0	0	0	0	0	0	0	58 (100%)			
Cefuroxima	CTX-M9	0	0	0	0	0	0	1 (1,5%)	0	66 (98,5%)		<0,001	
	SHV	0	0	0	0	2 (3,4%)	4 (6,9%)	16 (27,6%)	10 (17,2%)	26 (44,8%)			
Cefoxitina	CTX-M9	39 (58,2%)				14 (29,9%)	9 (13,4%)	4 (6%)	1 (1,5%)	0			0,222
	SHV	44 (75,9%)				9 (15,5%)	4 (6,9%)	1 (1,7%)	0	0			
Cefotaxima	CTX-M9	0			2 (3%)	4 (6%)	23 (34,3%)	10 (14,9%)	3 (4,5%)	25 (37,3%)		<0,001	
	SHV	4 (6,9%)			6 (10,3%)	18 (31%)	14 (24,1%)	2 (3,4%)	3 (5,2%)	11 (19%)			
Cefpodoxima	CTX-M9	0	0	0	0	2 (3%)	65 (97%)					0,785	
	SHV	1 (1,7%)	0	0	0	1 (1,7%)	56 (96,6%)						
Ceftazidima	CTX-M9	58 (86,6%)			4 (6%)	2 (3%)	0	3 (4,5%)	0	0		<0,001	
	SHV	9 (15,5%)			1 (1,7%)	5 (8,6%)	2 (3,4%)	30 (51,7%)	1 (1,7%)	10 (17,2%)			
Cefepime	CTX-M9	26 (38,8%)			36 (53,7%)	0	0	1 (1,5%)	3 (4,5%)	1 (1,5%)		<0,001	
	SHV	40 (69%)			11 (19%)	1 (1,7%)	5 (8,6%)	0	0	1 (1,7%)			
Meropenem	CTX-M9	67 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,000	
	SHV	58 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 101: Relación entre los aislados productores o no de BLEEs y la sensibilidad a los diferentes antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2 (resistente equivale a cualquier grado de resistencia: I ó R)

Antibióticos	Presencia de BLEEs (n=125)		Ausencia de BLEEs (n=344)		p
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	
Ampicilina	0	125 (100%)	60 (17,4%)	284 (82,6%)	<0,001
Amoxicilina-ác. clavulánico	107 (85,6%)	18 (14,4%)	264 (76,7%)	80 (23,3%)	0,040
Piperacilina	3 (2,4%)	122 (97,6%)	192 (55,8%)	152 (44,2%)	<0,001
Piperacilina-tazobactam	122 (97,6%)	3 (2,4%)	336 (97,7%)	8 (2,3%)	1,000
Cefalotina	0	125 (100%)	124 (36%)	220 (64%)	<0,001
Cefuroxima	6 (4,8%)	119 (95,2%)	224 (65,1%)	120 (34,9%)	<0,001
Cefoxitina	106 (84,8%)	19 (15,2%)	252 (73,3%)	92 (26,7%)	0,010
Cefotaxima	71 (56,8%)	54 (43,2%)	344 (100%)	0	<0,001
Cefpodoxima	1 (0,8%)	124 (99,2%)	316 (91,9%)	28 (8,1%)	<0,001
Ceftazidima	81 (64,8%)	44 (35,2%)	344 (100%)	0	<0,001
Cefepime	119 (95,2%)	6 (4,8%)	344 (100%)	0	<0,001
Meropenem	125 (100%)	0	344 (100%)	0	1,000

Tabla 102: Relación entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV y la sensibilidad a los diferentes antibióticos betalactámicos ensayados mediante el sistema VITEK 2 (resistente equivale a cualquier grado de resistencia: I ó R)

Antibiótico	CTX-M9 (n=67)		SHV (n=58)		p
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	
Ampicilina	0	67 (100%)	0	58 (100%)	1,000
Amoxicilina-ác. clavulánico	59 (88,1%)	8 (11,9%)	48 (82,8%)	10 (17,2%)	0,451
Piperacilina	0	67 (100%)	3 (5,2%)	55 (94,8%)	0,097
Piperacilina-tazobactam	65 (97%)	2 (3%)	57 (98,3%)	1 (1,7%)	1,000
Cefalotina	0	67 (100%)	0	58 (100%)	1,000
Cefuroxima	0	67 (100%)	6 (10,3%)	52 (89,7%)	0,009
Cefoxitina	53 (79,1%)	14 (20,9%)	53 (91,4%)	5 (8,6%)	0,080
Cefotaxima	29 (43,3%)	38 (56,7%)	42 (72,4%)	16 (27,6%)	0,001
Cefpodoxima	0	67 (100%)	1 (1,7%)	57 (98,3%)	0,464
Ceftazidima	64 (95,5%)	3 (4,5%)	17 (29,3%)	41 (70,7%)	<0,001
Cefepime	62 (92,5%)	5 (7,5%)	57 (98,3%)	1 (1,7%)	0,215
Meropenem	67 (100%)	0	58 (100%)	0	1,000

Según los resultados obtenidos se puede observar que:

1. El grupo de aislados productores de BLEEs y el de no productores presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad obtenida para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p < 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima y cefepime.

Ampicilina, piperacilina, cefalotina, cefuroxima, y cefpodoxima presentaron menor actividad (mayor porcentaje de resistencias y mayor proporción de CMIs elevadas) entre los aislados

productores de BLEEs vs. los no productores. Lo mismo ocurrió con cefotaxima, ceftazidima y cefepime, para los que no hubo aislados resistentes en el grupo de no productores de BLEEs.

Amoxicilina-ácido clavulánico y cefoxitina presentaron, al contrario que las anteriores, menor actividad en los aislados no productores de BLEEs.

2. El grupo de aislados productores de BLEEs y el de no productores no presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad obtenida para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p > 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): piperacilina-tazobactam y meropenem. En los dos grupos predominaron los aislados sensibles a estos antibióticos.
3. El grupo de aislados productores de enzimas CTX-M9 y el de SHV presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad obtenida para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p < 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima.

Cefuroxima y cefotaxima presentaron menor actividad en los aislados productores de CTX-M9 que en los productores de SHV. Sin embargo, ceftazidima presentó menor actividad en los aislados productores de SHV que en los productores de CTX-M9.

4. Los aislados productores de enzimas CTX-M9 y de SHV no presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad observada para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p > 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina-tazobactam, cefalotina, cefoxitina, cefpodoxima y meropenem.

Ampicilina, piperacilina, cefalotina y cefpodoxima se mostraron poco activos en ambos grupos de aislados; mientras que amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina y meropenem se mostraron muy activos en ambos grupos.

5. Hubo diferencias significativas entre los grupos de aislados productores de CTX-M9 y el de SHV en la distribución de las CMIs de cefepime ($p < 0,001$), pero no las hubo cuando se analizaron por categorías clínicas ($p = 0,215$). Cefepime mostró más actividad (mayor porcentaje de CMIs bajas) en el grupo de aislados productores de SHV.

4.13.4. Antibióticos no betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2

En las tablas 103 a 108 aparecen los resultados obtenidos, de la aplicación de la prueba exacta de Fisher, al comparar los distintos grupos de estudio en cuanto a la actividad (en términos de CMIs y categorías clínicas) de los diferentes antibióticos no betalactámicos ensayados mediante el sistema VITEK 2.

Betalactamasas de espectro extendido

Tabla 103: Relación entre los aislados productores o no de BLEEs y la distribución de CMIs de los diferentes antibióticos no betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2

Antibiótico	BLEE	<0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	P	
Amikacina	Presencia	120 (96%)				1 (0,8%)	3 (2,4%)	1 (0,8%)	0	0,010	
	Ausencia	304 (88,4%)				32 (9,3%)	4 (1,2%)	4 (1,2%)	0		
Gentamicina	Presencia	100 (80%)			0	4 (3,2%)	3 (2,4%)	18 (14,4%)		0,035	
	Ausencia	244 (70,9%)			20 (5,8%)	16 (4,7%)	4 (1,2%)	60 (17,4%)			
Tobramicina	Presencia	101 (80,8%)			4 (3,2%)	0	9 (7,2%)	11 (8,8%)		0,416	
	Ausencia	268 (77,9%)			16 (4,7%)	8 (2,3%)	28 (8,1%)	24 (7%)			
Ciprofloxacino	Presencia	32 (25,6%)	1 (0,8%)	7 (5,6%)	4 (3,2%)	81 (64,8%)				<0,001	
	Ausencia	160 (46,5%)	4 (1,2%)	28 (8,1%)	4 (1,2%)	148 (43%)					
Norfloxacino	Presencia	27 (21,6%)		4 (3,2%)	11 (8,8%)	1 (0,8%)	6 (4,8%)	76 (60,8%)		<0,001	
	Ausencia	152 (44,2%)		0	44 (12,8%)	0	16 (4,7%)	132 (38,4%)			
Ofloxacino	Presencia	26 (20,8%)	0	3 (2,4%)	10 (8%)	4 (3,2%)	82 (65,6%)				<0,001
	Ausencia	144 (41,9%)	0	16 (4,7%)	28 (8,1%)	4 (1,2%)	152 (44,2%)				

Tabla 104: Relación entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV, en función de la distribución de CMIs de los antibióticos no betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2

Antibiótico	BLEE	<0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	P	
Amikacina	CTX-M9	67 (100%)				0	0	0	0	0,020	
	SHV	53 (91,4%)				1 (1,7%)	3 (5,2%)	1 (1,7%)	0		
Gentamicina	CTX-M9	59 (88,1%)			0	2 (3%)	0	6 (9%)		0,038	
	SHV	41 (70,7%)			0	2 (3,4%)	3 (5,2%)	12 (20,7%)			
Tobramicina	CTX-M9	59 (88,1%)			3 (4,5%)	0	3 (4,5%)	2 (3%)		0,026	
	SHV	42 (72,4%)			1 (1,7%)	0	6 (10,3%)	9 (15,5%)			
Ciprofloxacino	CTX-M9	11 (16,4%)	1 (1,5%)	6 (9%)	3 (4,5%)	46 (68,7%)				0,027	
	SHV	21 (36,2%)	0	1 (1,7%)	1 (1,7%)	35 (60,3%)					
Norfloxacino	CTX-M9	9 (13,4%)		3 (4,5%)	7 (10,4%)	1 (1,5%)	5 (7,5%)	42 (62,7%)		0,097	
	SHV	18 (31%)		1 (1,7%)	4 (6,9%)	0	1 (1,7%)	34 (58,6%)			
Ofloxacino	CTX-M9	8 (11,9%)	0	2 (3%)	7 (10,4%)	3 (4,5%)	47 (70,1%)				0,081
	SHV	18 (31%)	0	1 (1,7%)	3 (5,2%)	1 (1,7%)	35 (60,3%)				

4. Resultados

Tabla 105: Relación entre los grupos de estudio en cuanto a la distribución de las CMIs de nitrofurantoína obtenida mediante el sistema VITEK 2

	≤16	32	64	128	256	<i>p</i>
Presencia	51 (40,8%)	37 (29,6%)	26 (20,8%)	9 (7,2%)	2 (1,6%)	<i><0,001</i>
Ausencia	228 (66,3%)	44 (12,8%)	28 (8,1%)	28 (8,1%)	16 (4,7%)	
CTX-M9	26 (38,8%)	20 (29,9%)	15 (22,4%)	5 (7,5%)	1 (1,5%)	<i>0,978</i>
SHV	25 (43,1%)	17 (29,3%)	11 (19%)	4 (6,9%)	1 (1,7%)	

Tabla 106: Relación entre los grupos de estudio en cuanto a la distribución de las CMIs de cotrimoxazol obtenida mediante el sistema VITEK 2

	<20	40	80	>320	<i>p</i>
Presencia	61 (48,8%)	1 (0,8%)	0	63 (50,4%)	<i>0,078</i>
Ausencia	192 (55,8%)	0	4 (1,2%)	148 (43%)	
CTX-M9	27 (40,3%)	0	0	40 (59,7%)	<i>0,038</i>
SHV	34 (58,6%)	1 (1,7%)	0	23 (39,7%)	

Tabla 107: Relación entre los aislados productores o no de BLEEs y la sensibilidad a los antibióticos no betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2 (resistente equivale a cualquier grado de resistencia: I ó R)

Antibiótico	Presencia de BLEE (<i>n=125</i>)		Ausencia de BLEE (<i>n=344</i>)		<i>p</i>
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	
Amikacina	125 (100%)	0	344 (100%)	0	<i>1,000</i>
Gentamicina	104 (83,2%)	21 (16,8%)	280 (81,4%)	64 (18,6%)	<i>0,687</i>
Tobramicina	105 (84%)	20 (16%)	292 (84,9%)	52 (15,1%)	<i>0,885</i>
Ciprofloxacino	40 (32%)	85 (68%)	192 (55,8%)	152 (44,2%)	<i><0,001</i>
Norfloxacino	43 (34,4%)	82 (65,6%)	196 (57%)	148 (43%)	<i><0,001</i>
Ofloxacino	39 (31,2%)	86 (68,8%)	184 (53,5%)	160 (46,5%)	<i><0,001</i>
Nitrofurantoína	88 (70,4%)	37 (29,6%)	272 (79,1%)	72 (20,9%)	<i>0,063</i>
Cotrimoxazol	62 (49,6%)	63 (50,4%)	192 (55,8%)	152 (44,2%)	<i>0,250</i>

Tabla 108: Relación entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV y la sensibilidad a los antibióticos no betalactámicos estudiados mediante el sistema VITEK 2 (resistente equivale a cualquier grado de resistencia: I ó R)

Antibiótico	CTX-M9 (n=67)		SHV (n=58)		p
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	
Amikacina	67 (100%)	0	58 (100%)	0	1,000
Gentamicina	61 (91%)	6 (9%)	43 (74,1%)	15 (25,9%)	0,016
Tobramicina	62 (92,5%)	5 (7,5%)	43 (74,1%)	15 (25,9%)	0,007
Ciprofloxacino	18 (26,9%)	49 (73,1%)	22 (37,9%)	36 (62,1%)	0,249
Norfloxacino	20 (29,9%)	47 (70,1%)	23 (39,7%)	35 (60,3%)	0,264
Ofloxacino	17 (25,4%)	50 (74,6%)	22 (37,9%)	36 (62,1%)	0,175
Nitrofurantoína	46 (68,7%)	21 (31,3%)	42 (72,4%)	16 (27,6%)	0,697
Cotrimoxazol	27 (40,3%)	40 (59,7%)	35 (60,3%)	23 (39,7%)	0,032

Según los resultados obtenidos se puede observar que:

1. Los aislados productores y no productores de BLEEs presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad observada para las quinolonas ensayadas (ciprofloxacino, norfloxacino y ofloxacino), en todos ellos $p < 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica.

Las quinolonas presentaron menor actividad (mayor porcentaje de resistencias y mayor proporción de CMIs elevadas) sobre los aislados productores de BLEEs que en los no productores.

2. Los aislados productores de BLEEs y los no productores no presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad obtenida para tobramicina y cotrimoxazol (en todos ellos $p > 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica). En los dos grupos predominaron los

aislados sensibles a tobramicina y se repartieron equitativamente respecto a la sensibilidad a cotrimoxazol.

3. Hubo diferencias significativas entre los aislados productores de BLEEs y los no productores, en cuanto a la distribución de las CMIs de amikacina ($p=0,010$), gentamicina ($p=0,035$) y nitrofurantoína ($p<0,001$), pero no las hubo cuando se analizaron las categorías clínicas en ambos grupos para estos antibióticos ($p=1,000$; $p=0,687$ y $p=0,063$, respectivamente). Amikacina y gentamicina mostraron un mayor porcentaje de CMIs bajas en el grupo de aislados productores de BLEEs, mientras que nitrofurantoína las presentó en el grupo de aislados no productores de BLEEs.
4. Los aislados productores de enzimas CTX-M9 y de SHV presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad a gentamicina, tobramicina y cotrimoxazol (en todos ellos $p<0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica).

Cotrimoxazol presentó menor actividad en los aislados productores de CTX-M9. Sin embargo, gentamicina y tobramicina presentaron menor actividad en los aislados productores de SHV.

5. Los aislados productores de enzimas CTX-M9 y de SHV no presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad mostrada a norfloxacino, ofloxacino y nitrofurantoína (en todos ellos $p>0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica).

Los tres antibióticos se mostraron poco activos en ambos grupos de aislados.

6. Hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV en la distribución de las CMIs de amikacina ($p=0,020$) y ciprofloxacino ($p=0,027$), pero no las hubo cuando se analizaron las categorías clínicas en ambos grupos para estos

antibióticos ($p=1,000$ y $p=0,249$, respectivamente). Amikacina mostró un mayor porcentaje de CMIs bajas en los aislados productores de CTX-M9, mientras que ciprofloxacino las presentó en el grupo de aislados SHV.

4.13.5. Antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER

En las tablas 109 a 115 aparecen los resultados obtenidos tras la aplicación de la prueba exacta de Fisher, al comparar los grupos de estudio en función de la actividad (en términos de CMIs y categorías clínicas) de los diferentes antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER.

Tabla 109: Relación entre los aislados productores o no de BLEEs y la distribución de las CMIs de los antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER

Antibiótico	BLEE	<1	1	2	4	8	16	>16	p
Amoxicilina	Presencia		1 (0,8%)		0	0	0	124 (99,2%)	<0,001
	Ausencia		44 (12,8%)		0	16 (4,7%)	0	284 (82,6%)	
Cefalotina	Presencia		0			0	125 (100%)		<0,001
	Ausencia		72 (20,9%)			24 (7%)	248 (72,1%)		
Cefuroxima	Presencia		1 (0,8%)		0	1 (0,8%)	5 (4%)	118 (94,4%)	<0,001
	Ausencia		76 (22,1%)		68 (19,8%)	44 (12,8%)	92 (26,7%)	64 (18,6%)	
Cefoxitina	Presencia		61 (48,8%)			1 (0,8%)	19 (15,2%)	44 (35,2%)	<0,001
	Ausencia		44 (12,8%)			24 (7%)	84 (24,4%)	192 (55,8%)	
Cefotaxima	Presencia	0	0	0	1 (0,8%)	2 (1,6%)	122 (97,6%)		<0,001
	Ausencia	124 (36%)	48 (14%)	52 (15,1%)	52 (15,1%)	28 (8,1%)	40 (11,6%)		
Ceftazidima	Presencia	20 (16%)	2 (1,6%)	18 (14,4%)	4 (3,2%)	11 (8,8%)	8 (6,4%)	62 (49,6%)	<0,001
	Ausencia	76 (22,1%)	12 (3,5%)	68 (19,8%)	48 (14%)	72 (20,9%)	32 (9,3%)	36 (10,5%)	
Cefepime	Presencia	5 (4%)	0	5 (4%)	5 (4%)	6 (4,8%)	4 (3,2%)	100 (80%)	<0,001
	Ausencia	152 (44,2%)	36 (10,5%)	52 (15,1%)	52 (15,1%)	16 (4,7%)	16 (4,7%)	20 (5,8%)	
Meropenem	Presencia	120 (96%)	4 (3,2%)	0	0	0	1 (0,8%)		0,090
	Ausencia	308 (89,5%)	28 (8,1%)	0	0	0	8 (2,3%)		

4. Resultados

Tabla 110: Relación entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV y la distribución de las CMI de los antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER

Antibiótico	BLEE	<1	1	2	4	8	16	>16	p
Amoxicilina	CTX-M9		1 (1,5%)		0	0	0	66 (98,5%)	1,000
	SHV		0		0	0	0	58 (100%)	
Cefalotina	CTX-M9	0	0	0	0	0	67 (100%)		1,000
	SHV	0	0	0	0	0	58 (100%)		
Cefuroxima	CTX-M9		1 (1,5%)		0	0	0	66 (98,5%)	0,013
	SHV		0		0	1 (1,7%)	5 (8,6%)	52 (89,7%)	
Cefoxitina	CTX-M9		27 (40,3%)			1 (1,5%)	11 (16,4%)	28 (41,8%)	0,149
	SHV		34 (58,6%)			0	8 (13,8%)	16 (27,6%)	
Cefotaxima	CTX-M9	0	0	0	0	0	67 (100%)		0,097
	SHV	0	0	0	1 (1,7%)	2 (3,4%)	55 (94,8%)		
Ceftazidima	CTX-M9	15 (22,4%)	2 (3%)	14 (20,9%)	1 (1,5%)	9 (13,4%)	6 (9%)	20 (29,9%)	<0,001
	SHV	5 (8,6%)	0	4 (6,9%)	3 (5,2%)	2 (3,4%)	2 (3,4%)	42 (72,4%)	
Cefepime	CTX-M9	0	0	1 (1,5%)	2 (3%)	2 (3%)	1 (1,5%)	61 (91%)	0,014
	SHV	5 (8,6%)	0	4 (6,9%)	3 (5,2%)	4 (6,9%)	3 (5,2%)	39 (67,2%)	
Meropenem	CTX-M9	64 (95,5%)	3 (4,5%)	0	0	0	0		0,471
	SHV	56 (96,6%)	1 (1,7%)	0	0	0	1 (1,7%)		

Tabla 111: Relación entre los grupos de estudio y la distribución de las CMIs de amoxicilina-ácido clavulánico obtenida mediante el sistema WIDER

	<4/2	8/4	16/8	>16/8	<i>p</i>
Presencia	36 (28,8%)	51 (40,8%)	25 (20%)	13 (10,4%)	<i><0,001</i>
Ausencia	64 (18,6%)	76 (22,1%)	100 (29,1%)	104 (30,2%)	
CTX-M9	21 (31,3%)	26 (38,8%)	11 (16,4%)	9 (13,4%)	<i>0,455</i>
SHV	15 (25,9%)	25 (43,1%)	14 (24,1%)	4 (6,9%)	

Tabla 112: Relación entre los grupos de estudio y la distribución de las CMIs de piperacilina-tazobactam obtenida mediante el sistema WIDER

	<16/4	32/4	64/4	>64/4	<i>p</i>
Presencia	84 (67,2%)	3 (2,4%)	7 (5,6%)	31 (24,8%)	<i>0,267</i>
Ausencia	224 (65,1%)	8 (2,3%)	40 (11,6%)	72 (20,9%)	
CTX-M9	43 (64,2%)	2 (3%)	6 (9%)	16 (23,9%)	<i>0,395</i>
SHV	41 (70,7%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	15 (25,9%)	

Tabla 113: Relación entre los grupos de estudio y la distribución de las CMIs de ceftazidima-ácido clavulánico obtenida mediante el sistema WIDER

	<1/4	8/4	>8/4	<i>p</i>
Presencia	109 (87,2%)	13 (10,4%)	3 (2,4%)	<i>0,045</i>
Ausencia	292 (84,9%)	24 (7%)	28 (8,1%)	
CTX-M9	57 (85,1%)	9 (13,4%)	1 (1,5%)	<i>0,436</i>
SHV	52 (89,7%)	4 (6,9%)	2 (3,4%)	

4. Resultados

Tabla 114: Relación entre los aislados productores o no de BLEEs y la sensibilidad a los antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER (resistente equivale a cualquier grado de resistencia: I ó R)

Antibiótico	Presencia de BLEE (n=125)		Ausencia de BLEE (n=344)		p
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	
Amoxicilina	1 (0,8%)	124 (99,2%)	60 (17,4%)	284 (82,6%)	<0,001
Amoxicilina- ác. clavulánico	87 (69,6%)	38 (30,4%)	140 (40,7%)	204 (59,3%)	<0,001
Piperacilina- tazobactam	84 (67,2%)	41 (32,8%)	224 (65,1%)	120 (34,9%)	0,742
Cefalotina	0	125 (100%)	96 (27,9%)	248 (72,1%)	<0,001
Cefuroxima	1 (0,8%)	124 (99,2%)	144 (41,9%)	200 (58,1%)	<0,001
Cefoxitina	62 (49,6%)	63 (50,4%)	68 (19,8%)	276 (80,2%)	<0,001
Cefotaxima	3 (2,4%)	122 (97,6%)	304 (88,4%)	40 (11,6%)	<0,001
Ceftazidima	55 (44%)	70 (56%)	276 (80,2%)	68 (19,8%)	<0,001
Cefepime	21 (16,8%)	104 (83,2%)	308 (89,5%)	36 (10,5%)	<0,001
Meropenem	124 (99,2%)	1 (0,8%)	336 (97,7%)	8 (2,3%)	0,456

Tabla 115: Relación entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV y la sensibilidad a los diferentes antibióticos betalactámicos estudiados mediante el sistema WIDER (resistente equivale a cualquier grado de resistencia: I ó R)

Antibiótico	CTX-M9 (n=67)		SHV (n=58)		p
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	
Amoxicilina	1 (1,5%)	66 (98,5%)	0	58 (100%)	1,000
Amoxicilina-ác. clavulánico	47 (70,1%)	20 (29,9%)	40 (69%)	18 (31%)	1,000
Piperacilina- tazobactam	43 (64,2%)	24 (35,8%)	41 (70,7%)	17 (29,3%)	0,453
Cefalotina	0	67 (100%)	0	58 (100%)	1,000
Cefuroxima	1 (1,5%)	66 (98,5%)	0	58 (100%)	1,000
Cefoxitina	28 (41,8%)	39 (58,2%)	34 (58,6%)	24 (41,4%)	0,074
Cefotaxima	0	67 (100%)	3 (5,2%)	55 (94,8%)	0,097
Ceftazidima	41 (61,2%)	26 (38,8%)	14 (24,1%)	44 (75,9%)	<0,001
Cefepime	5 (7,5%)	62 (92,5%)	16 (27,6%)	42 (72,4%)	0,004
Meropenem	67 (100%)	0	57 (98,3%)	1 (1,7%)	0,464

Según los resultados obtenidos se puede observar que:

1. Los aislados productores de BLEEs y los no productores presentaron entre sí diferencias significativas en la sensibilidad obtenida para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p < 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y cefepime.

Amoxicilina, cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima y cefepime tuvieron menor actividad (mayor porcentaje de resistencias y mayor proporción de CMIs elevadas) sobre los aislados productores de BLEEs, que en los no productores.

Amoxicilina-ácido clavulánico y cefoxitina tuvieron, al contrario que las anteriores, menor actividad sobre los aislados no productores de BLEEs.

2. Los aislados productores de BLEEs y los no productores no presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad mostrada para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p > 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): piperacilina-tazobactam y meropenem. En los dos grupos predominaron los aislados sensibles a estos antibióticos.
3. Los aislados productores de enzimas CTX-M9 y de SHV presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad obtenida para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p < 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): ceftazidima y cefepime.

Ceftazidima presentó menor actividad en los aislados productores de SHV que en los productores de CTX-M9. Sin embargo, cefepime presentó menor actividad en los aislados productores de CTX-M9 que en los productores de SHV.

4. Los aislados productores de enzimas CTX-M9 y de SHV no presentaron entre sí diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad obtenida para los siguientes antibióticos betalactámicos (en todos ellos $p > 0,05$, tanto para la distribución de sensibilidad según las CMIs, como por categoría clínica): amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima y meropenem.

Amoxicilina, cefalotina, cefoxitina y cefotaxima se mostraron poco activos sobre ambos grupos de aislados, mientras que amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, y meropenem se mostraron activos.

Hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y de SHV en la distribución de las CMIs de cefuroxima ($p < 0,013$), pero no las hubo cuando se analizaron las categorías clínicas para este antibiótico ($p = 1,000$). Cefuroxima mostró un mayor porcentaje de CMIs altas en el grupo de aislados productores de CTX-M9.

5. DISCUSIÓN

Las cefalosporinas de tercera generación y, especialmente, cefotaxima y ceftazidima, han sido utilizadas ampliamente en el tratamiento de infecciones comunitarias y nosocomiales (Amyes y Miles, 1998), siendo de los antibióticos más empleados para el tratamiento de infecciones respiratorias, urinarias, abdominales, del sistema nervioso central y bacteriemias de diferentes orígenes. Se han introducido nuevos antibióticos (cefalosporinas de cuarta generación, nuevas quinolonas, carbapenémicos) que presentan un mayor espectro antibacteriano y que incluyen indicaciones coincidentes con las reconocidas para las cefalosporinas de tercera generación; sin embargo, estos antibióticos siguen siendo de primera elección en muchas situaciones clínicas.

En un estudio realizado sobre 624 pacientes en 44 servicios de Medicina Intensiva (UCI) en España (Álvarez-Lerma *et al.*, 2001), cefotaxima fue el tercer antibiótico más utilizado después de amoxicilina-ácido clavulánico y cefazolina. Fue el primer antibiótico prescrito para el tratamiento de infecciones de la comunidad y el quinto entre los usados para profilaxis de las mismas. Fue el primer antibiótico utilizado de forma empírica, de manera que en la mayoría de las ocasiones se indicó sin conocerse la etiología de la infección.

Aunque en este estudio no se analizaron los mecanismos de resistencia frente a cefotaxima de los microorganismos aislados como causantes de la infección, en un 23,7% de los casos fue necesario modificar el tratamiento inicial en base a la resistencia detectada.

El uso y, a veces, abuso, de las cefalosporinas de tercera generación tanto a nivel hospitalario, como, y más importante, a nivel comunitario, ha favorecido el incremento, desde el punto de vista epidemiológico, de nuevos mecanismos de resistencia, como son las betalactamasas de espectro extendido (Winokur *et al.*, 2001). Debido a la gravedad e importancia de algunas infecciones por aislados productores de BLEEs, a la dificultad de tratamiento que entrañan, al comportamiento

epidemiológico, a la posibilidad de que puedan transmitirse a otros enfermos o a bacterias de la microbiota comensal, y a las limitaciones con los criterios habituales de sensibilidad, el papel del laboratorio de Microbiología Clínica para su detección es crucial. Éste debe estar preparado para reconocer la presencia de un fenotipo BLEE e iniciar un plan racional para el control de las infecciones que pudieran producirse.

Desde el punto de vista técnico, el laboratorio de Microbiología se enfrenta a dos retos. Por una parte, el elevado número de enzimas con características de BLEE que se han descrito y cuyas diferencias fenotípicas, a veces, son muy sutiles. Por otra, la posibilidad de encontrar aislados de enterobacterias que producen enzimas que no deben ser consideradas estrictamente como BLEE, pero cuyo fenotipo puede, a veces, parecerse y confundirse, como la producción de la betalactamasa cromosómica AmpC, la codificación plasmídica del gen *AmpC* por parte de diversos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, la hiperproducción de betalactamasas plasmídicas clásicas (TEM-1, TEM-2 o SHV-1) o la presencia de la betalactamasa K1 en *K. oxytoca*.

Con nuestro estudio hemos pretendido analizar cuáles son las características epidemiológicas de los microorganismos productores de BLEEs en nuestro medio, centrándonos en las especies *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, aquellas para las que el NCCLS ha establecido normas para una correcta detección. Si bien es cierto que en otras especies bacterianas se ha descrito producción de BLEEs, no hay normas NCCLS establecidas, y por tanto no las consideraremos, a fin de poder realizar, además, una evaluación de distintos métodos de detección fenotípica de estas betalactamasas.

5.1. Métodos de difusión con disco

Los criterios del NCCLS para detección de BLEEs en *E. coli* y *Klebsiella* spp. (apartado 3.2.) están basados en la inhibición del enzima por los inhibidores de betalactamasas, utilizando para ello ácido clavulánico (NCCLS, 2003a; NCCLS, 2003b). Pueden emplearse varios substratos para permitir la detección de enzimas con baja capacidad hidrolítica para alguno de ellos: ceftazidima, cefotaxima, cefpodoxima, ceftriaxona o aztreonam. Estos criterios han sido validados por diferentes autores, encontrándose una buena sensibilidad y especificidad, superiores al 90% (Carter *et al.*, 2000; Steward *et al.*, 2001), pero que puede variar dependiendo de la colección utilizada para su análisis o de la prevalencia de aislados con BLEEs en el caso de evaluarse con aislados consecutivos.

Nosotros hemos considerado de referencia para la detección de aislados productores de BLEEs, las normas NCCLS establecidas para la difusión con disco (NCCLS, 2003a). Para ello se usó la combinación de discos de cefpodoxima, cefotaxima y ceftazidima solos y en combinación con ácido clavulánico (Carter *et al.*, 2000; Steward *et al.*, 2001) descrita en el apartado 3.2.1. como método A. Tras la selección de los 469 aislados clínicos, éstos se dividieron en dos grupos, 125 productores de BLEEs y 344 no productores, en función de los resultados obtenidos tras la aplicación del método.

Muchos autores han aportado resultados sobre la capacidad que cada una de estas cefalosporinas, por sí solas y en combinación con ácido clavulánico, tienen para confirmar la presencia de BLEEs en aquellos aislados que cumplen los criterios de cribado establecidos por el NCCLS (tablas 19 y 20). La mayor parte de ellos establecen que ceftazidima sola y en combinación con ácido clavulánico es el mejor procedimiento para detectar estos aislados, no obteniéndose resultados tan favorables para la combinación de cefotaxima y ácido clavulánico. Esto se puede deber a

que en la mayor parte de los estudios en los que se realiza este planteamiento los aislados clínicos estudiados, o las cepas con BLEEs conocidas ensayadas, eran preferentemente productoras de enzimas SHV y TEM (Vercauteren *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998; Hadziyannis *et al.*, 2000), y en muy pocos casos en estos estudios aparecen enzimas CTX-M. Por eso, cualquier estrategia encaminada a detectar la presencia de BLEEs se debería planificar evaluando, al menos, estos dos antibióticos (Jarlier *et al.*, 1988; Cormican *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 2000). Las BLEEs tipo SHV y TEM presentan resistencia de alto nivel a ceftazidima, mientras que las de tipo CTX-M confieren resistencia de alto nivel a cefotaxima (Oliver *et al.*, 2001).

Cefpodoxima es también un antibiótico muy sensible para detectar la presencia de BLEEs, por la alta capacidad hidrolítica de éstas sobre el mismo (Coudron *et al.*, 1997; Thomson y Sanders, 1997). Muchos investigadores sugieren que los métodos, tanto de dilución como de difusión con disco, que utilizan cefpodoxima, detectan más BLEEs que si se usan otras cefalosporinas (Emery y Weywouth, 1997; Moland *et al.*, 1998). Sin embargo, otros, sugieren que los ensayos de sensibilidad con cefpodoxima pueden dar lugar a un alto número de falsos positivos si se aplican los criterios del NCCLS, ya que este antibiótico también puede verse afectado por otros mecanismos de resistencia como la hiperproducción de una betalactamasa cromosómica AmpC, alteraciones de la permeabilidad, presencia de una betalactamasa K1 en *K. oxytoca*, producción de una enzima TEM-1 junto a pérdida o alteraciones de las porinas, o varios de estos mecanismos presentes en la misma bacteria. Todos ellos afectan más la CMI de cefpodoxima que la de cefotaxima o ceftazidima, pudiendo generar falsos positivos al valorar la presencia de BLEEs en bacterias como *E. coli* o *Klebsiella* spp. si sólo se usa cefpodoxima como cribado de estas enzimas (Oliver *et al.*, 2002). Este ha sido el motivo por el que el NCCLS en el año 2002 modificó la CMI de

cefepodoxima de $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ a $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ en los métodos de cribado para sospechar la presencia de BLEEs (tabla 19), pues los mecanismos anteriores pueden ser responsables de resistencias de bajo nivel.

5.1.1. Método A

El 100% de los aislados clínicos de nuestro estudio productores de BLEEs presentaron diámetros del halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de cefepodoxima sola (CPD) $\leq 17 \text{ mm}$ (media 7,0 y rango 6-17), y, en todos los casos, hubo un incremento superior a 5 mm en el halo de inhibición del disco que además contenía ácido clavulánico (CD01) (media 21,5 y rango 13-30), por tanto, cumplieron los criterios establecidos para este antibiótico (tablas 25 y 39).

Hubo diferencias en el comportamiento de cefepodoxima según los aislados fuesen productores de CTX-M9 o de SHV (tablas 40 y 41). Entre los primeros los valores de media, desviación estándar y rango de los diámetros de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de CPD y CD01 fueron inferiores respecto al grupo de productores de SHV, consecuencia de una mayor capacidad de hidrólisis de las enzimas CTX-M9 sobre cefepodoxima.

Entre los aislados no productores de BLEEs cefepodoxima se mostró claramente por encima del valor límite de 17 mm (media 25,1 y rango 6-34), aunque hubo 24 aislamientos con diámetros alrededor del disco CPD $< 17 \text{ mm}$, pero en ningún caso hubo incremento del diámetro en la asociación con ácido clavulánico (CD01) como puede verse por una media que apenas incrementa el valor de la cefalosporina sola (media 25,4 y rango 6-34) (tabla 42).

Cefepodoxima se mostró, por tanto, como un antibiótico muy sensible para detectar BLEEs, tanto CTX-M9 como SHV, sin embargo, por sí solo, sin asociarse para ello a otras cefalosporinas, no es un método

válido, pues como se ha comentado, este antibiótico puede verse también afectado por otros mecanismos, pudiendo generar falsos positivos.

Cefotaxima se mostró también, según nuestro estudio, como un antibiótico muy sensible para la detección de BLEEs. El 100% de los aislados productores de BLEEs presentaron diámetros del halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco CTX < 27 mm (media 16,1 y rango 6-26), y en todos los casos hubo incremento superior a 5 mm en el diámetro alrededor del disco de cefotaxima más ácido clavulánico (CD03) (media 29,9 y rango 23-36), cumpliéndose los criterios establecidos para este antibiótico (tablas 25 y 39).

El comportamiento de cefotaxima por este método fue similar para detectar aislados productores de CTX-M9 que para los productores de SHV (tablas 40 y 41). Entre los primeros la media de los diámetros de inhibición del crecimiento para CTX fue de 15,5 mm con un rango 8-22 mm y para CD03 la media fue 29,7 mm con un rango 24-36 mm, mientras que entre los aislados productores de SHV la media para CTX fue 16,8 mm y rango 6-26 mm y para CD03 la media fue 30,2 mm y rango 23-36 mm.

Entre los aislados no productores de BLEEs cefotaxima se mostró claramente por encima del valor límite de 27 mm (media 32,2 y rango 25-40). Aunque hubo 16 aislamientos con diámetros alrededor del disco CTX < 27 mm, en ningún caso hubo incremento del diámetro en la asociación con ácido clavulánico (CD03) como puede verse por una media que incrementa poco el valor de la cefalosporina sola (media 33,3 y rango 26-40) (tabla 42).

El comportamiento de ceftazidima, sin embargo, fue distinto comparado con las dos cefalosporinas anteriores. Aunque el diámetro medio alrededor del disco que sólo contenía ceftazidima (CAZ), entre los aislados productores de BLEEs, fue inferior a 22 mm (media 19,8 y rango 6-32) y hubo un incremento superior a 5 mm, con diámetro medio

alrededor del disco con ácido clavulánico (CD02) de 28,8 mm (y rango 20-36) (tabla 39), el comportamiento de este antibiótico fue diferente en los aislados CTX-M9 y en los SHV.

La media del diámetro alrededor del disco CAZ en los aislados CTX-M9 fue 24,5 mm (rango 12-32) (tabla 40), 17 aislados presentaron halos ≤ 22 mm, con incremento ≥ 5 mm en el disco que además contenía ácido clavulánico; mientras que 50 aislados presentaron diámetros > 22 mm, por lo que no fue valorable la sinergia con ácido clavulánico (tabla 25). En los aislados SHV la media del diámetro alrededor del disco CAZ fue 14,3 mm (rango 6-27), con un incremento superior a 5 mm cuando se asoció ácido clavulánico (CD02) (media 27,4 y rango 20-34) (tabla 41). Cuatro aislados presentaron diámetros alrededor del disco CAZ > 22 mm, no siendo valorable la sinergia con ácido clavulánico (tabla 25). Ninguno de estos 4 aislamientos fueron *K. oxytoca*, especie que podría presentar una enzima K1 hiperproducida con un perfil de resistencia a cefotaxima, cefpodoxima o aztreonam y sinergia en la combinación con ácido clavulánico, y sensibilidad a ceftazidima (Navarro *et al.*, 2002).

Este comportamiento se explica porque las enzimas CTX-M se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a cefuroxima, cefotaxima y cefepime, prácticamente sin incrementar las CMI de ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima en comparación con la de las otras cefalosporinas (Bradford, 2001). Así, en los microorganismos productores de BLEEs tipo CTX-M la utilización de ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico como único substrato impedirá una detección correcta. Habitualmente la hidrólisis de este antibiótico por estas enzimas es muy pobre, al contrario de lo que acontece con la mayoría de las BLEEs del grupo SHV. Por el contrario, la hidrólisis de cefotaxima es muy eficiente por las CTX-M, siendo el mejor marcador para su detección. Esto podría explicar por qué algunos autores en estudios de aislados productores de enzimas SHV y TEM,

pero no de CTX-M, encuentran un rendimiento tan bajo a los métodos de detección de BLEEs basados en cefotaxima y cefotaxima con ácido clavulánico (Vercauteren *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998; Hadziyannis *et al.*, 2000) mientras que el rendimiento de esta combinación en nuestro estudio fue alto.

5.1.2. Método B

El comportamiento de estos tres antibióticos (cefpodoxima, cefotaxima y ceftazidima) en el otro procedimiento de difusión con disco, método B, fue similar al método A (iguales medias, desviación estándar y rango para los diámetros alrededor del disco de la cefalosporina sola) (tablas 43 a 46).

Cefpodoxima presentó diámetros ≤ 17 mm y un incremento del halo (sinergia) en la zona cercana al disco de amoxicilina-ácido clavulánico en el 100% de los aislados productores de BLEEs (tabla 47). Entre los 24 aislados no productores de BLEEs en los que el diámetro de CPD fue inferior a 17 mm, no se mostró sinergia en la zona cercana al ácido clavulánico.

De la misma forma que en el método A, cefotaxima presentó halos reducidos e incremento del diámetro en la zona cercana al ácido clavulánico en el 100% de los aislados productores de BLEEs (tabla 47), mientras que ninguno de los 16 aislados no productores de BLEEs con diámetro inferior a 27 mm presentó sinergia con ácido clavulánico.

Ceftazidima se comportó de forma distinta según los aislados fuesen CTX-M9 o SHV (tablas 44 y 45, respectivamente). Entre los primeros, 17 aislados presentaron diámetros ≤ 22 mm alrededor del disco CAZ y sinergia en la zona cercana al ácido clavulánico, mientras que 50 tenían halos > 22 mm; entre los segundos, 4 aislados poseían diámetros alrededor del disco CAZ > 22 mm, no siendo valorable la sinergia (tabla

47). Estos aislados, que presentaron discordancia entre los resultados obtenidos para ceftazidima y la presencia de una BLEE, fueron los mismos en los métodos A y B. Así, por tanto, ceftazidima detectó el 56,8% (71/125) de los aislados productores de BLEEs.

Aztreonam tuvo también un comportamiento variable. En líneas generales se mostró útil para detectar los aislados productores de BLEEs, con diámetros de inhibición del crecimiento alrededor del disco ATM ≤ 27 mm (media 20,1 y rango 6-32) (tabla 43) y sinergia en la zona adyacente al ácido clavulánico en 50 aislados CTX-M9 y 53 aislados SHV (tabla 47), cumpliéndose los criterios establecidos para este antibiótico (tabla 25) en el 82,4% (103/125) de los aislados productores de BLEEs. Hubo diámetros inferiores a 27 mm pero sin sinergia con ácido clavulánico en 7 CTX-M9 y 4 SHV; y por último, en 10 CTX-M9 y 1 aislado SHV los diámetros alrededor del disco ATM fueron superiores a 27 mm, no siendo valorable la sinergia (tabla 47). Entre los aislados no productores de BLEEs aztreonam se mostró claramente por encima del valor límite de 27 mm (media 32,9 y rango 25-43) (tabla 46), aunque hubo 28 aislamientos con diámetros alrededor del disco ATM inferiores a 27 mm pero en ningún caso hubo sinergia en la asociación con ácido clavulánico.

En definitiva, en nuestro medio es imprescindible utilizar cefotaxima y ceftazidima, solos y en combinación con ácido clavulánico (bien sea en discos independientes o con un disco de amoxicilina-ácido clavulánico como fuente de ácido clavulánico), como los dos antibióticos de elección en cualquier método de difusión con disco que se utilice con la finalidad de identificar aislados productores de BLEEs. El uso de discos de cefpodoxima y aztreonam solos y en combinación con ácido clavulánico no aportan, necesariamente, mayor capacidad de detección de BLEEs en nuestro medio. Ahora bien, la elevada resistencia que expresarían aislados poseedores del enzima K1 de *K. oxytoca* a

cefotaxima, cefpodoxima y sobretodo, a aztreonam, la sinergia de éstos con ácido clavulánico y la sensibilidad a ceftazidima, puede convertir la interpretación de los resultados de aztreonam en necesarios para distinguir esta enzima de una posible producción de BLEEs (Navarro *et al.*, 2002).

5.1.3. Difusión con disco con cefepime y cefoxitina

Aunque no es un criterio NCCLS, cefepime y cefoxitina fueron dos antibióticos ensayados mediante difusión con disco para determinar la posible coexistencia, en los aislados clínicos, de producción de BLEEs y presencia de betalactamasas no inducibles AmpC o mecanismos de impermeabilidad, siguiendo las directrices expuestas en el apartado 3.2.1.

Entre los 125 aislados que se clasificaron por el método A como productores de una BLEE, se pudo determinar (tabla 53):

- 105 aislados fueron sensibles para cefepime (diámetro del halo de inhibición ≥ 18 mm) y para cefoxitina (diámetro del halo de inhibición ≥ 18 mm). Se consideró que estos aislados sólo expresaban una BLEE.
- 13 aislados fueron resistentes para cefepime (diámetro del halo de inhibición < 18 mm) y éste presentaba sinergia con ácido clavulánico; además fueron sensibles para cefoxitina. Se consideró que estos aislados sólo expresaban una BLEE.
- 4 aislados fueron resistentes para cefepime y éste presentaba sinergia con ácido clavulánico; además fueron resistentes para cefoxitina (diámetro del halo de inhibición < 18 mm). Se consideró que estos aislados además de expresar una BLEE, podrían presentar una alteración de la permeabilidad o una betalactamasa AmpC.
- 3 aislados fueron sensibles para cefepime y resistentes para cefoxitina. También se consideró que estos aislados además de

expresar una BLEE, podrían presentar una alteración de la permeabilidad o una betalactamasa AmpC.

La resistencia a cefoxitina en aislados productores de BLEEs (que, en principio, son sensibles a cefoxitina) no diferencia entre organismos productores de AmpC y otros mecanismos de resistencia como las alteraciones de la permeabilidad (Steward *et al.*, 2001).

Entre los 344 aislados clínicos que no poseían un fenotipo compatible con la presencia de BLEEs 284 fueron sensibles tanto a cefepime como a cefoxitina y 60 fueron sensibles a cefepime y resistentes a cefoxitina. En ninguno de los 344 aislados hubo sinergia de cefepime con ácido clavulánico.

5.2. Estudio bioquímico y molecular de los aislados productores de BLEEs

Una vez que los dos grupos estuvieron definidos en función de los resultados obtenidos por el método de referencia, se realizó estudio bioquímico, mediante isoelectroenfoque, y estudio molecular, mediante PCR, de los 125 aislados que fenotípicamente expresaron la producción de una betalactamasa de espectro extendido, tal como se describen en los apartados 3.3.1. y 3.3.2. respectivamente. En cada caso se decidió qué técnica de PCR realizar según el estudio fenotípico (menor o mayor capacidad de hidrólisis de ceftazidima y cefotaxima) y del resultado de pI obtenido por isoelectroenfoque, pues cada BLEE posee un punto isoeléctrico definido (tablas 3, 6 y 8).

A los 23 aislamientos de la especie *E. coli* que poseían exclusivamente una betalactamasa de punto isoeléctrico 8.1 se les realizó

PCR para las enzimas CTX-M9 y CTX-M10. Todas ellas fueron positivas a CTX-M9.

A los 44 aislados de *E. coli* con pI 8.1 y 5.4 también se les realizó PCR para las enzimas CTX-M9 y CTX-M10, siendo positivo el resultado en todos ellos a la presencia de CTX-M9. Se consideró que el punto isoelectrónico 5.4 es compatible en esta especie bacteriana con la presencia de una betalactamasa plasmídica clásica tipo TEM-1.

Así, se obtuvieron 67 aislados productores de CTX-M9 (54% del total), todos ellos de la especie *E. coli* (tabla 32 y figura 31).

A los 9 aislados de *E. coli*, 1 de *K. pneumoniae* y 2 de *K. oxytoca* que presentaron por isoelectroenfoque un pI 8.2 se les realizó PCR genérica para enzimas SHV, siendo en los 12 casos positiva.

A los 39 aislados de *E. coli* con pI 8.2 y 5.4 se les realizó PCR genérica para enzimas SHV, siendo positiva en todos los casos. Se consideró que el punto isoelectrónico 5.4 es compatible en esta especie bacteriana con la presencia de una betalactamasa plasmídica clásica tipo TEM-1.

A los 7 aislados de *K. pneumoniae* con pI 8.2 y 7.6 se les realizó PCR genérica para enzimas SHV, siendo positiva en todos los casos. Se consideró que el punto isoelectrónico 7.6 es compatible en esta especie bacteriana con la presencia de una betalactamasa plasmídica clásica tipo SHV-1.

Así, se obtuvieron 58 aislados productores de SHV, (46% del total), de las especies *E. coli* (83%), *K. pneumoniae* (14%) y *K. oxytoca* (3%). No se pudo determinar qué BLEE tipo SHV poseían, aunque un pI 8.2 es compatible con SHV-5, SHV-9, SHV-10, SHV-12, y SHV-45 (tabla 6).

5.3. Prueba de Epsilon

La prueba de difusión en gradiente o E-test permite solventar la limitación de las técnicas de difusión con disco para obtener directamente valores de CMI. Muchos estudios han demostrado la fiabilidad y la reproducibilidad del E-test, que ofrece, en general, resultados similares a los obtenidos con un método estandarizado de dilución (Jones, 2001).

Siguiendo las normas de detección de BLEEs según la prueba de Epsilon (apartado 3.2.2.), el E-test CT/CTL fue capaz de detectar la producción de BLEEs en los 125 aislados. En todos los casos, el cociente entre la CMI de cefotaxima sola (CT) y de cefotaxima con ácido clavulánico (CTL) fue ≥ 8 (≥ 3 diluciones) (tabla 26 y figura 71). Sesenta y seis aislados productores de CTX-M9 presentaron una CMI de cefotaxima ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$, y sólo 1 aislado CTX-M9 tuvo una CMI inferior (1 $\mu\text{g/ml}$), pero en todos los casos la reducción en presencia de ácido clavulánico fue ≥ 3 diluciones (figura 50). De los 58 aislados productores de SHV, 37 poseían una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ y 21 la presentaban inferior, pero en todos los casos hubo una reducción ≥ 3 diluciones en la asociación con ácido clavulánico (figura 50).

Sin embargo, el E-test TZ/TZL no fue capaz, por sí solo, de detectar la presencia de BLEEs en todos los casos. El cociente entre la CMI de ceftazidima sola (TZ) y en combinación con ácido clavulánico (TZL) fue ≥ 8 (≥ 3 diluciones) en 14 aislados productores de CTX-M9 (21%) (figura 72) y en 50 de los aislados productores de SHV (86%) (figura 74), es decir, en el 51% del total de aislados productores de BLEEs (figura 70). En el resto de aislados productores de BLEEs el cociente fue inferior a 3 diluciones (44%) o indeterminado (5%) (figura 70). Sólo 5 aislados productores de CTX-M9 presentaron CMIs de ceftazidima ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; para los 62 aislados restantes fueron inferiores

(figura 46). Cuarenta y seis aislados productores de SHV poseían una CMI de ceftazidima ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$, mientras que los restantes 12 presentaban una CMI inferior (figura 46).

Si analizamos los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ para ceftazidima obtenidos mediante el método Epsilon, podemos observar que las concentraciones de ceftazidima que inhiben el 50% (CMI₅₀) y el 90% (CMI₉₀) de los aislados productores de CTX-M9 son muy inferiores a los valores que para estos parámetros presenta el mismo antibiótico en los aislados productores de SHV (tablas 55 y 56), es decir, la CMI de ceftazidima en los aislados CTX-M9 se movió en valores muy bajos respecto a los aislados SHV, consecuencia de la menor capacidad de hidrólisis de las enzimas CTX-M por ceftazidima (Bradford, 2001). Estos resultados son acordes con los mostrados por la prueba de Kruskal-Wallis.

Sin embargo, si analizamos los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀ para cefotaxima obtenidos mediante el método Epsilon, podemos observar que las concentraciones de cefotaxima que inhiben el 50% (CMI₅₀) y el 90% (CMI₉₀) de los aislados productores de CTX-M9 fueron algo superiores a los valores que para estos parámetros presentó el mismo antibiótico en los aislados productores de SHV (tablas 55 y 56), es decir, la CMI de cefotaxima en los aislados CTX-M9 se movió en valores similares a los aislados SHV (ligeramente superior la CMI₅₀ para los aislados CTX-M9, por una mayor capacidad de hidrólisis de estas enzimas por cefotaxima) (Bradford, 2001). También estos resultados son acordes con los obtenidos mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Los aislados no productores de BLEEs fueron sensibles a las cefalosporinas ensayadas, con CMIs < 2 $\mu\text{g/ml}$, a excepción de 4 aislados con CMI = 12 $\mu\text{g/ml}$ para TZ (resistentes) y 8 aislados con CMI = 2 $\mu\text{g/ml}$ para CT (sensibles, pero en el punto de corte según el NCCLS para sospechar una BLEE) (figuras 47 y 49), y en ningún caso hubo reducción

≥3 diluciones de la CMI de las cefalosporinas solas cuando se añadió ácido clavulánico (figuras 76 y 77).

Por tanto, al igual que en los métodos de difusión con disco, el E-test de ceftazidima, por sí solo, no es capaz de identificar la presencia de BLEEs debido a la baja capacidad de hidrólisis de las enzimas CTX-M9, fundamentalmente, para este antibiótico, como ha quedado demostrado. Aunque el E-test de cefotaxima sí detectó el 100% de las BLEEs de nuestro estudio, no podemos decir que el uso exclusivo de este E-test pueda detectar la presencia de todos los tipos de BLEEs (incluyendo BLEEs tipo TEM, que nosotros no encontramos) y pensamos que siempre deben usarse conjuntamente para este fin.

Como ningún aislado presentó CMIs superiores a los límites superiores de detección de los E-test TZ/TZL y CT/CTL, no hubo indicación de realizar E-test con cefepime (PM/PML).

5.4. Resultados obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos betalactámicos

A los 469 aislados se les realizó estudio de sensibilidad mediante el sistema VITEK 2 como se describe en el apartado 3.2.3.1. Como la selección de especies bacterianas se había realizado previamente a través de pruebas bioquímicas usando el sistema Api20E, la identificación de especie se introdujo manualmente en el sistema VITEK 2 y éste aportó el estudio de sensibilidad del microorganismo inoculado en las tarjetas AST-N020 tras ensayar las distintas concentraciones de antibióticos para cada aislado (tabla 21). El sistema VITEK 2 emitió un informe para cada aislado clínico donde constaban la identificación de especie, las CMIs obtenidas *in vitro* para cada antibiótico ensayado, la categoría clínica correspondiente (sensible, intermedio o resistente) según el resultado obtenido para cada antibiótico, la categoría clínica para antibióticos no

ensayados pero inferidos, la modificación de las CMIs y/o de las categorías clínicas obtenidas *in vitro* una vez que el sistema AES realizó la interpretación del fenotipo de resistencia obtenido para cada grupo de antibióticos, y un informe con los fenotipos de resistencia obtenidos según la valoración del sistema AES.

Los 125 aislados productores de BLEEs según el método fenotípico de referencia fueron reconocidos también por el sistema VITEK 2, que informó en todos los casos la posible presencia de una BLEE y modificó, como veremos, los resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* de los antibióticos betalactámicos afectados por la presencia de estas enzimas.

De los 344 aislados no productores de BLEEs según el método de referencia, el VITEK 2 informó posible presencia de BLEEs en 16, mientras que en 328 aislados no informó, por el fenotipo encontrado, dicha presencia.

5.4.1. Concentración mínima inhibitoria *in vitro* en los antibióticos betalactámicos

Analizando los resultados *in vitro* obtenidos para los distintos antibióticos betalactámicos ensayados mediante el sistema VITEK 2 se pudo observar que:

Aunque el 100% de los aislados que poseían una BLEE tenían una CMI de ampicilina $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ (figura 78), y hubo un 18% de los aislados no productores de BLEEs que presentaron unas CMIs de ampicilina en rangos de sensibilidad ($\leq 8 \mu\text{g/ml}$) (figura 114), ésta se mostró con CMIs elevadas tanto en el grupo de aislados productores de BLEEs como en el de los no productores (en todos los grupos de estudio CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron $\geq 32 \mu\text{g/ml}$) (tablas 58 a 61). No hubo diferencias

significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV. En el grupo de aislados no productores de BLEEs la resistencia a ampicilina se debe a que, en estas especies bacterianas, son frecuentes los mecanismos de resistencia distintos a la presencia de una BLEE que acaban afectando a este antibiótico (betalactamasa AmpC hiperproducida, betalactamasas plasmídicas clásicas o enzima K1) (Navarro *et al.*, 2002). Es, por tanto, uno de los antibióticos que más se afectan por los distintos mecanismos de resistencia frente a antibióticos betalactámicos.

Amoxicilina-ácido clavulánico presentó una $CMI_{50} = 4/2 \mu\text{g/ml}$ en los dos grupos de aislados y una $CMI_{90} = 16/8 \mu\text{g/ml}$ entre los productores de BLEEs y $\geq 32/16 \mu\text{g/ml}$ entre los no productores, es decir, hubo significativamente más resistencia en el segundo grupo. No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV. La presencia de ácido clavulánico en esta combinación antibiótica hace disminuir considerablemente las CMIs de ampicilina sola puesto que las BLEEs son enzimas inhibidas por los inhibidores de betalactamasas. Es muy importante determinar cual es la CMI de este antibiótico, pues en el tratamiento de una ITU no complicada, en un paciente extrahospitalario, por un microorganismo portador de una BLEE (representan el 18,8% de las 469 muestras de nuestro estudio y el 70,4% de los aislados productores de BLEEs), amoxicilina-ácido clavulánico podría ser una buena opción terapéutica, siempre y cuando se muestre con CMIs bajas y en el rango de sensibilidad (Spanu *et al.*, 2002; Oliver y Cantón, 2004). En cualquier caso, el comportamiento de esta combinación de antibióticos ante la presencia de una BLEE es variable, pudiéndose mostrar activo o no, según el caso; pero la coexistencia en el mismo microorganismo de una enzima AmpC (*E. coli*) o SHV-1 (*K. pneumoniae*) hiperproducidas y la

enzima BLEE, hará que la combinación amoxicilina-ácido clavulánico se muestre poco activa (Navarro *et al.*, 2002).

Por las mismas razones que ampicilina (Navarro *et al.*, 2002), piperacilina se mostró con CMI elevadas en ambos grupos de estudio ($CMI_{50} \geq 128 \mu\text{g/ml}$ en los aislados productores de BLEEs y $CMI_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$ en los no productores, y $CMI_{90} \geq 128 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos). Sin embargo, la distribución de las CMIs no fue igual, el 97% de los aislados productores de BLEEs tuvieron CMIs $> 16 \mu\text{g/ml}$ (resistentes a piperacilina) mientras que en el otro grupo dicho porcentaje fue del 44% (figuras 80 y 116). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV.

Piperacilina-tazobactam, como amoxicilina-ácido clavulánico, mostró CMIs iguales en los dos grupos ($CMI_{50} \leq 4/4 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 8/4 \mu\text{g/ml}$), ambos resultados en el rango de sensibilidad para este antibiótico por tratarse de una combinación con un inhibidor de betalactamasas. No hubo diferencias significativas entre el grupo de aislados productores de BLEEs y el grupo de no productores, ni entre el grupo de productores de CTX-M9 y los productores de SHV. Hay que apreciar que entre los aislados productores de CTX-M9 (tabla 59) la CMI_{90} de piperacilina-tazobactam fue $\leq 4/4 \mu\text{g/ml}$, la más baja de los cuatro grupos. Esto es así porque una característica importante de las enzimas CTX-M es que son inhibidas mejor por tazobactam que por sulbactam o ácido clavulánico (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Este antibiótico, según algunos autores, es una buena opción terapéutica a nivel hospitalario para pacientes con infecciones sistémicas por microorganismos productores de BLEEs, siempre y cuando presente CMIs dentro del rango de sensibilidad (Spanu *et al.*, 2002; Oliver y Cantón, 2004); otros, sin embargo, no aconsejan su uso por haberse producido fracasos terapéuticos (Johnson *et al.*, 2002).

Cefalotina fue poco activa tanto en los aislados productores de BLEEs como en los no productores ($CMI_{50} \geq 64 \mu\text{g/ml}$ en los aislados productores de BLEEs, $CMI_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$ en los no productores y $CMI_{90} \geq 64 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos) (tablas 58 y 61), explicable por las mismas razones que lo fueron ampicilina y piperacilina (Navarro *et al.*, 2002). Pero al igual que ampicilina, mientras que el 100% de los aislados productores de BLEEs presentaban CMIs de cefalotina $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, sólo el 22% de los aislados no productores hacían lo mismo (figuras 82 y 118). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV.

Cefuroxima presentó CMIs elevadas en el grupo de aislados productores de BLEEs (CMI_{50} y $CMI_{90} \geq 64 \mu\text{g/ml}$) como corresponde a la hidrólisis por estas enzimas de una cefalosporina de segunda generación. Pero al contrario de lo que ocurría con ampicilina, piperacilina y cefalotina, entre los aislados no productores de BLEEs este antibiótico se mostró significativamente más activo ($CMI_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 32 \mu\text{g/ml}$) ya que es más activo que penicilinas y cefalosporinas de primera generación frente a betalactamasas clásicas (Navarro *et al.*, 2002). Además, las enzimas CTX-M confieren resistencia de alto nivel no sólo a cefotaxima sino también a cefuroxima (Bradford, 2001) y eso explica una mayor CMI_{50} en el grupo de productores de CTX-M9 respecto a los de SHV, consecuencia de una distribución significativamente distinta de las CMIs entre ambos grupos (figuras 95 y 107).

Cefoxitina, *in vitro*, es un antibiótico que se muestra activo frente a las BLEEs, salvo que coexistan en el mismo aislado la presencia de estas enzimas con alteraciones de la permeabilidad, cefamicinasas o betalactamasas AmpC hiperproducidas, en cuyo caso, existirá resistencia a cefoxitina por estos mecanismos (Navarro *et al.*, 2002). Cuando la CMI

de cefoxitina detectada por el VITEK 2 fue $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ entre los aislados productores de BLEEs (85%), en su informe sobre mecanismos de resistencia a betalactámicos sólo informó posible presencia de BLEEs. Sin embargo, cuando la CMI para este antibiótico fue $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ (15%), informó no sólo la posible presencia de BLEEs, sino también la asociación probable con mecanismos de impermeabilidad que modificasen la CMI que cabría esperar si sólo existiese una BLEE. Cefoxitina presentó diferencias entre los dos grupos de estudio, mostrándose significativamente más activa en el grupo de aislados productores de BLEEs ($\text{CMI}_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos de aislados, $\text{CMI}_{90} = 16 \mu\text{g/ml}$ entre los productores y $\text{CMI}_{90} = 32 \mu\text{g/ml}$ entre los no productores) (tablas 58 y 61). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV.

Las CMIs observadas para cefotaxima fueron significativamente diferentes entre el grupo de aislados productores de BLEEs y el de no productores (tablas 58 y 61). En el primero, la CMI_{50} fue de $8 \mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} fue $\geq 64 \mu\text{g/ml}$. Entre los aislados no productores de BLEEs cefotaxima se mostró claramente activa, con CMI_{50} y $\text{CMI}_{90} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ (el 100% de los aislados poseían una $\text{CMI} \leq 8 \mu\text{g/ml}$). Estos resultados fueron resultados *in vitro*, es decir, anteriores a las correcciones que el sistema AES realizó una vez determinado que el mecanismo de resistencia presente era la producción de una enzima BLEE, por esa razón, algunas CMIs que mostraron sensibilidad, posteriormente se corrigieron a resistentes. Si analizamos los resultados en los grupos productores de CTX-M9 y SHV (significativamente diferentes entre sí), observamos que las menores CMIs que presentó cefotaxima entre los aislados productores de BLEEs se producen a expensas de CMIs menores entre los aislados que poseían enzimas SHV ($\text{CMI}_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$ entre los CTX-M9 frente a $\text{CMI}_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$ entre los SHV), puesto que

cefotaxima es mejor hidrolizada por las enzimas CTX-M9 que por las SHV, explicando esta diferencia de CMIs (Bradford, 2001).

Cefpodoxima fue, de las tres cefalosporinas de tercera generación ensayadas por el sistema VITEK 2, la única en la que la concentración que inhibía el 50% de los aislados productores de BLEEs y la concentración que inhibía el 90%, fue la misma, e igual para los dos grupos, productores de CTX-M9 y productores de SHV (CMI_{50} y $CMI_{90} \geq 8 \mu\text{g/ml}$) (tablas 59 y 60), ya que el 97% de estos aislados poseían una CMI de cefpodoxima $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ (figura 86). Esta cefalosporina se mostró activa en el conjunto de aislados no productores de BLEEs ($CMI_{50} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$) (tabla 61).

Al igual que las dos cefalosporinas de tercera generación anteriores, ceftazidima presentó diferencias significativas en el estudio de sensibilidad mediante el sistema VITEK 2 entre los aislados productores y no productores de BLEEs. Como en los casos anteriores, los aislados no productores de BLEEs se mostraron claramente sensibles a ceftazidima (CMI_{50} y $CMI_{90} \leq 1 \mu\text{g/ml}$), con el 100% de los aislados con $CMI \leq 4 \mu\text{g/ml}$, mientras que los aislados productores fueron resistentes. Entre estos últimos podemos ver diferencias significativas en el comportamiento *in vitro* de este antibiótico entre el grupo de los productores de CTX-M9 y los que poseyeron una enzima SHV. Como es propio de la menor capacidad hidrolítica de las enzimas CTX-M9 sobre este antibiótico (Bradford, 2001), las CMIs obtenidas en este grupo son significativamente inferiores, y en el rango de sensibilidad, respecto a las obtenidas entre los aislamientos productores de SHV ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ frente a $CMI_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$, y $CMI_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$ frente a $CMI_{90} \geq 64 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) (tablas 59 y 60). La posterior modificación por el sistema AES de los resultados *in vitro* para este antibiótico hizo que el resultado para ceftazidima se emitiese como resistente en todos los

aislados productores de BLEEs. Esta modificación se realizó en 58 aislados productores de CTX-M9 y 9 aislados productores de SHV. Este resultado obtenido para ceftazidima mediante el sistema VITEK 2 es acorde con los obtenidos por los procedimientos de difusión con disco y E-test.

Cefepime, la única cefalosporina de cuarta generación probada por el sistema VITEK 2, se mostró activa, *in vitro*, tanto en el grupo de aislados productores de BLEEs como en el de no productores (tablas 58 y 61), aunque las CMIs en este segundo grupo fueron significativamente inferiores respecto al primero (100% de los aislados no productores de BLEEs con $CMI \leq 1 \mu\text{g/ml}$) (figuras 88 y 124). Hubo diferencias significativas entre los grupos de aislados productores de CTX-M9 y el de SHV en cuanto a la distribución de las CMIs de cefepime, pero no las hubo cuando se analizaron las categorías clínicas en ambos grupos para este antibiótico: hubo una distribución de CMIs más elevadas en el grupo de aislados productores de enzimas CTX-M9 (el 94% de los aislados productores de CTX-M9 poseían una $CMI \leq 8 \mu\text{g/ml}$, mientras que en el grupo de productores de SHV este porcentaje fue del 98%), como corresponde a una mayor capacidad de hidrólisis de estas enzimas sobre este antibiótico. La capacidad hidrolítica de las enzimas tipo BLEE sobre este antibiótico es variable (Navarro *et al.*, 2002), sin embargo se desaconseja su uso terapéutico por haberse descrito fracasos (Paterson *et al.*, 2001b), por esa razón, el sistema AES informó resistencia a cefepime en el informe definitivo.

Meropenem fue el único antibiótico betalactámico ensayado por el sistema VITEK 2 que se mostró activo, y con CMIs muy bajas ($CMI \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$) en el 100% de los aislados tanto productores como no productores de BLEEs. Según estos resultados, meropenem, y por extensión los carbapenémicos, se convierten, en principio, en la mejor

opción terapéutica entre los antibióticos betalactámicos para el tratamiento de microorganismos productores de BLEEs.

5.4.2. Categorías clínicas para los antibióticos betalactámicos

Cuando el sistema VITEK 2 analiza los resultados de sensibilidad obtenidos *in vitro* para los distintos antibióticos es capaz de inferir qué mecanismo de resistencia, si lo hay, puede explicar ese comportamiento fenotípico, y modificar las CMIs y/o las categorías clínicas obtenidas para un antibiótico si el resultado no es coherente con el mecanismo de resistencia inferido para esa especie bacteriana, modificando siempre de sensible a resistente el ensayo. Por esta razón, cuando el sistema VITEK 2 identifica una posible producción de BLEEs modifica las categorías clínicas de sensible a resistentes de todas las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, e incluso, infiere resultados no ensayados, como resistencia a aztreonam, pero no modifica los resultados obtenidos para las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, para ceftazidima, ni para carbapenémicos. En las tablas 62 a 69 y en las figuras 126 a 133 quedan reflejadas las modificaciones que el sistema AES realizó de las categorías clínicas en los antibióticos betalactámicos ensayados.

Así, los resultados *in vitro* para amoxicilina y cefalotina fueron, en los 125 aislados productores de BLEEs, resistentes, y se informaron como tales, por lo que el sistema AES no tuvo que hacer ninguna modificación. No se modificaron los resultados obtenidos *in vitro* para amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, ceftazidima ni meropenem. Piperacilina, cefuroxima, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima y cefepime fueron informados como resistentes tras las

correcciones que el sistema AES realizó en aquellos aislados que presentaron CMI dentro del rango de sensibilidad.

5.5. Resultados obtenidos mediante el sistema VITEK 2 para los antibióticos no betalactámicos

Considerando que el sistema VITEK 2 demostró mejor capacidad para detectar enzimas tipo BLEEs en nuestro medio, el estudio de la posible asociación de resistencias en otros grupos antibióticos (aminoglucósidos, quinolonas, nitrofurantoína y cotrimoxazol) se realizó a partir de los resultados obtenidos para éstos en los 469 aislados estudiados mediante este sistema automatizado.

Amikacina se mostró activa tanto en el grupo de aislados productores de BLEEs (CMI_{50} y $CMI_{90} \leq 2 \mu\text{g/ml}$) como en el de no productores, aunque la distribución de CMIs mostró en este segundo grupo valores ligeramente más elevados ($CMI_{50} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$) (tablas 70 y 73). Aunque los valores de CMI_{50} y CMI_{90} fueron iguales entre sí en los grupos de aislados productores de CTX-M9 y SHV ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$), sin embargo, el 100% de los aislados productores de CTX-M9 tenían CMIs $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ mientras que en el grupo de productores de SHV fue del 91%, es decir, en este segundo grupo hubo mayor proporción de CMIs elevadas (figuras 142 y 150).

Gentamicina también se mostró activa, tanto en el grupo de aislados productores de BLEEs, con un 84% de aislamientos con CMIs $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, como en el de no productores, con un 83% ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos) (tablas 70 y 73). Por su parte, presentó CMIs más elevadas en el grupo de aislados productores de enzimas SHV ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 16 \mu\text{g/ml}$) que en el de

productores de CTX-M9 ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$) (tablas 71 y 72).

Tobramicina fue activa, tanto en el grupo de aislados productores de BLEEs, con un 84% de aislamientos con $CMI \leq 4 \mu\text{g/ml}$, como en el de no productores, con un 85% ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 8 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos). Sin embargo, presentó CMI s más elevadas en el grupo de aislados productores de enzimas SHV ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 16 \mu\text{g/ml}$) que en el de productores de CTX-M9 ($CMI_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$).

Ciprofloxacino se mostró significativamente menos activo en el grupo de aislados productores de BLEEs ($CMI_{50} \geq 4 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 4 \mu\text{g/ml}$), con un 33% de los aislados con $CMI \leq 1 \mu\text{g/ml}$ (figura 137), que en el de no productores ($CMI_{50} = 1 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 4 \mu\text{g/ml}$), con un 56% de los aislados con $CMI \leq 1 \mu\text{g/ml}$ (figura 161). Aunque los valores de CMI_{50} y CMI_{90} fueron iguales entre sí en los grupos de aislados productores de CTX-M9 y SHV ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$), sin embargo, el 26% de los aislados productores de CTX-M9 tuvieron $CMI \leq 1 \mu\text{g/ml}$ (figura 145), mientras que en el grupo de productores de SHV eran el 38% (figura 153), es decir, en el primer grupo hubo mayor proporción de CMI s elevadas.

Norfloxacino también se mostró significativamente menos activo en el grupo de aislados productores de BLEEs ($CMI_{50} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 16 \mu\text{g/ml}$), con un 35% de los aislados con $CMI \leq 4 \mu\text{g/ml}$, que en el de no productores ($CMI_{50} = 2 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} \geq 16 \mu\text{g/ml}$), con un 57% de los aislados con $CMI \leq 4 \mu\text{g/ml}$. No hubo diferencias significativas para este antibiótico entre los grupos de aislados productores de CTX-M9 y SHV.

Y por último, entre las quinolonas, ofloxacino se mostró significativamente menos activo en el grupo de aislados productores de

BLEEs ($\text{CMI}_{50} \geq 8 \mu\text{g/ml}$ y $\text{CMI}_{90} \geq 8 \mu\text{g/ml}$), con un 31% de los aislados con $\text{CMI}_{50} \leq 2 \mu\text{g/ml}$, que en el de no productores ($\text{CMI}_{50} = 2 \mu\text{g/ml}$ y $\text{CMI}_{90} \geq 8 \mu\text{g/ml}$), con un 55% de los aislados con $\text{CMI}_{50} \leq 2 \mu\text{g/ml}$. No hubo diferencias significativas para este antibiótico entre los grupos de aislados productores de CTX-M9 y SHV.

Aunque nitrofurantoína no presentó diferencias significativas en cuanto a las categorías clínicas de sensible y resistente entre el grupo de aislados productores de BLEEs y el de no productores, sí aparecían indicios de significación ya que presentó CMI_{50} más elevadas en el grupo de aislados productores de BLEEs (70% de aislados con $\text{CMI}_{50} \leq 32 \mu\text{g/ml}$ en el grupo de aislados productores de BLEEs, frente a 79% en el grupo de aislados no productores) (figuras 140 y 164, respectivamente). No hubo diferencias significativas para este antibiótico entre los grupos de aislados productores de CTX-M9 y SHV.

También hubo indicios de significación entre el grupo de aislados productores de BLEEs y el de no productores en cuanto a la sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol, ya que las CMI_{50} fueron más elevadas en el grupo de aislados productores de BLEEs (CMI_{50} y $\text{CMI}_{90} \geq 320 \mu\text{g/ml}$) que en el de no productores ($\text{CMI}_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ y $\text{CMI}_{90} \geq 320 \mu\text{g/ml}$) (tablas 70 y 73). De la misma forma, hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 que se mostraron más resistentes (CMI_{50} y $\text{CMI}_{90} \geq 320 \mu\text{g/ml}$) que los productores de SHV ($\text{CMI}_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ y $\text{CMI}_{90} \geq 320 \mu\text{g/ml}$) (tablas 71 y 72).

En relación a los datos anteriores se sabe que:

Fernández-Rodríguez *et al.* (1992b) encontraron un 84% de aislados productores de BLEEs resistentes a gentamicina, siendo el mecanismo más frecuentemente asociado la presencia de las enzimas AAC(3)V, APH(3') y APH(3')I.

Hadziyannis *et al.* (2000) no encontraron asociación entre presencia de BLEEs y resistencia a gentamicina ni cotrimoxazol.

La presencia de resistencias a tobramicina, gentamicina, tetraciclinas y cotrimoxazol, asociadas a la producción de BLEEs, fueron muy frecuentes en el estudio realizado por Winokur *et al.* (2001), con una distribución importante en las distintas áreas del estudio. Casi el 85% de los aislados de *K. pneumoniae* en Latinoamérica y el 81% de los aislados europeos mostraron resistencia a tobramicina. En general, la resistencia a amikacina fue menor que a tobramicina y a gentamicina. La co-resistencia a ciprofloxacino fue desde 14% a 80%, particularmente con niveles altos de resistencia a quinolonas en los aislados de *P. mirabilis*.

En el trabajo de Lautenbach *et al.* (2001b) el 55,8% de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs fueron resistentes a fluorquinolonas. Otros resultados de resistencias presentes en estos aislados fueron: amikacina 43,5%, gentamicina 27%, tobramicina 24,4%, tetraciclinas 32,5%, y cotrimoxazol 19,6%. La resistencia a fluorquinolonas en aislados clínicos productores de BLEEs fue más frecuente entre los pacientes que habían recibido fluorquinolonas o aminoglucósidos en los 30 días previos a la infección y en aquellos que procedían de una residencia (por una posible transmisión horizontal, aunque no se realizó estudio de clonalidad).

En otros estudios, como el realizado en Turquía por Tolun *et al.* (2004) encontraron más asociación de resistencias entre BLEEs y ciprofloxacino en la especie *E. coli* ($p=0,015$) que en la especie *K. pneumoniae* ($p=0,276$).

La frecuencia de resistencia a fluorquinolonas ha alcanzado ya niveles preocupantes, especialmente en *E. coli*. Hay una tendencia en España al aumento del consumo de fluorquinolonas, principalmente fuera del hospital, que ha hecho que la resistencia a éstos en *E. coli* adquiridos

en la comunidad haya aumentado significativamente en los últimos años (Lázaro *et al.*, 2004). En general, se observa una asociación significativa entre la producción de BLEEs y la resistencia a estos antibióticos, especialmente en aislados de *E. coli* causantes de infección del tracto urinario en la comunidad. Puesto que la resistencia a fluorquinolonas en enterobacterias depende casi exclusivamente de mutaciones en genes cromosómicos, la asociación de estas resistencias podría deberse a la transferencia conjunta de ambos mecanismos de resistencia a través de plásmidos (Martínez-Martínez *et al.* (1998) ya demostraron la transferencia de resistencia a fluorquinolonas a través de plásmidos) y también, probablemente, a la selección de aislados con ambos mecanismos de resistencia por el frecuente uso de betalactámicos y fluorquinolonas en un mismo contexto terapéutico, como es el tratamiento de las infecciones del tracto urinario.

Desde 1997 a 2002 se ha producido un incremento constante del consumo extrahospitalario de fluorquinolonas del 20%, mientras que el consumo total extrahospitalario de antibióticos ha descendido un 9% en el mismo periodo (Oteo y Campos, 2004). Además a nivel intrahospitalario Neuhauser *et al.* (2003) señalan que el descenso de la sensibilidad a ciprofloxacino de un 86% en 1994 a un 76% en el año 2000 en aislados procedentes de UCI está significativamente asociado al incremento en el uso de fluorquinolonas.

5.6. Resultados obtenidos mediante el sistema WIDER para los antibióticos betalactámicos

Al igual que se hizo con el sistema VITEK 2, a los 469 aislados se les realizó estudio de sensibilidad mediante el sistema WIDER como se describe en el apartado 3.2.3.2. Tras identificar las especies a través del sistema Api20E, la identificación se introdujo manualmente en el

sistema WIDER y éste aportó el estudio de sensibilidad del microorganismo inoculado en los paneles MIC/ID GRAMNEGATIVOS REV.1 tras ensayar las distintas concentraciones de los antibióticos para cada aislado (tabla 22). El sistema WIDER emitió un informe para cada aislado clínico donde constaban la identificación de especie, las concentraciones críticas obtenidas *in vitro* para cada antibiótico ensayado, la categoría clínica correspondiente (sensible, intermedio o resistente) según el resultado obtenido para cada antibiótico, y la modificación de las categorías clínicas obtenidas *in vitro* una vez que el sistema realizó la interpretación del fenotipo de resistencia obtenido para cada grupo de antibióticos.

De los 125 aislados productores de BLEEs por el método fenotípico de referencia, 102 fueron reconocidos también por el sistema WIDER (81,6%), que informó en todos ellos la posible presencia de una BLEE; sin embargo, en 23 de estos aislados (18,4%) el WIDER no detectó la presencia del enzima.

De los 344 aislados no productores de BLEEs por el método de referencia, el WIDER informó como posible presencia de BLEE en 56 (16,3%), mientras que en 288 aislados no informó, por el fenotipo encontrado, dicha presencia.

5.6.1. Concentración mínima inhibitoria *in vitro* en los antibióticos betalactámicos

Si analizamos los resultados *in vitro* obtenidos para los distintos antibióticos betalactámicos ensayados mediante el sistema WIDER, podemos observar que

Amoxicilina se mostró poco activa en los dos grupos de aislados, productores y no productores de BLEEs (CMI_{50} y $CMI_{90} > 16 \mu\text{g/ml}$)

(tablas 78 y 81), si bien, en el primer grupo el 99% de los aislamientos tenían $CMI > 16 \mu\text{g/ml}$, y en el segundo el 18% de los aislados poseían una $CMI \leq 8 \mu\text{g/ml}$ (figuras 170 y 203). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV. Los resultados son acordes con los mostrados por el sistema VITEK 2.

La distribución de los resultados de CMI de amoxicilina-ácido clavulánico fue significativamente diferente entre los aislados productores de BLEEs y los no productores (figuras 171 y 204). Mientras que en los primeros el 70% presentó CMIs $\leq 8/4 \mu\text{g/ml}$, en el segundo grupo sólo mostraron CMIs en el rango de sensibilidad el 41% de los aislados, es decir, los aislados productores de BLEEs se mostraron más sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico ($CMI_{50} = 8/4 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} > 16/8 \mu\text{g/ml}$) que los no productores ($CMI_{50} = 16/8 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} > 16/8 \mu\text{g/ml}$) (tablas 78 y 81). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV. Estos resultados fueron similares a los que este antibiótico presentó por el sistema VITEK 2.

El comportamiento de piperacilina-tazobactam fue igual en los dos grupos de aislados, con $CMI_{50} < 16/4 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} > 64/4 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos, y tampoco hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV ($CMI_{50} < 16/4 \mu\text{g/ml}$ y $CMI_{90} > 64/4 \mu\text{g/ml}$ en ambos grupos). Sin embargo, vemos que con el sistema WIDER las CMIs de piperacilina-tazobactam fueron más elevadas que con el sistema VITEK 2. En el grupo de aislados productores de BLEEs el 33% presentaron, mediante el sistema WIDER, $CMIs \geq 32/4 \mu\text{g/ml}$, mientras que, para este mismo grupo, el VITEK 2 sólo mostraba un 3% de los aislados con $CMIs \geq 32 \mu\text{g/ml}$ (figuras 172 y 81, respectivamente). En el grupo de no productores de la

enzima ocurría algo parecido: el 35% de los aislados poseían una CMI \geq 32/4 $\mu\text{g/ml}$ según el WIDER, mientras que según el VITEK 2 dicho porcentaje fue del 2% (figuras 205 y 117, respectivamente).

Cefalotina se mostró, al igual que amoxicilina, poco activa en los dos grupos de aislados (CMI₅₀ y CMI₉₀ $>$ 8 $\mu\text{g/ml}$) (tablas 78 y 81), si bien en el primer grupo el 100% de los aislamientos tenían CMI $>$ 8 $\mu\text{g/ml}$, y en el segundo el 72% (figuras 173 y 206). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV. Los resultados son acordes con los mostrados por el sistema VITEK 2.

El comportamiento de cefuroxima por el WIDER fue similar, también, al mostrado mediante el sistema VITEK 2, con CMIs elevadas en el grupo de aislados productores de BLEEs (CMI₅₀ y CMI₉₀ $>$ 16 $\mu\text{g/ml}$), siendo significativamente mayores en el grupo de enzimas CTX-M9 que en el de SHV (figuras 185 y 196), y CMIs más bajas en el grupo de no productores (CMI₅₀ = 8 $\mu\text{g/ml}$ y CMI₉₀ $>$ 16 $\mu\text{g/ml}$) (tablas 78 y 81).

Cefoxitina presentó diferencias entre los dos grupos de estudio, mostrándose ligeramente más activa en el grupo de aislados productores de BLEEs (CMI₅₀ = 16 $\mu\text{g/ml}$ y CMI₉₀ $>$ 16 $\mu\text{g/ml}$) que en el de los no productores (CMI₅₀ $>$ 16 $\mu\text{g/ml}$ y CMI₉₀ $>$ 16 $\mu\text{g/ml}$) (tablas 78 y 81). No hubo diferencias significativas entre los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV. En los resultados obtenidos por el sistema WIDER podemos observar que cefoxitina se mostró menos activa que por el sistema VITEK 2, como podemos ver si comparamos las CMI₅₀ y CMI₉₀ en ambos casos para los dos grupos de aislados (tablas 58, 61, 78 y 81). El 50% de los aislados productores de BLEEs presentaron CMI $>$ 8 $\mu\text{g/ml}$ por el sistema WIDER, frente al 15% por el sistema VITEK 2 (figuras 175 y 84, respectivamente). El 80% de los aislados no

productores de BLEEs presentaron CMI $> 8 \mu\text{g/ml}$ por el sistema WIDER, frente al 26% por el sistema VITEK 2 (figuras 208 y 120, respectivamente). Esta sobrevaloración de resistencias a cefoxitina del sistema WIDER, respecto al VITEK 2, tuvo implicaciones diagnósticas. Como dijimos anteriormente, el sistema WIDER no detectó la presencia de BLEEs en 23 de los 125 aislados productores de estas enzimas. Pues bien, 22 de estos aislados presentaron CMIs $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ para cefoxitina; sin embargo, en otros 41 aislados, a pesar de tener CMIs $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, el sistema sí fue capaz de identificar la presencia del enzima. Por lo tanto, pensamos que la incorrecta valoración de otros posibles mecanismos de resistencia que afecten a cefoxitina puede generar interpretaciones erróneas de la producción de BLEEs en los aislados clínicos ensayados por el sistema WIDER.

Cefotaxima se mostró poco activa en los aislados productores de BLEEs (CMI₅₀ y CMI₉₀ $> 8 \mu\text{g/ml}$) (tabla 78) y activa entre los no productores (CMI₅₀ = $2 \mu\text{g/ml}$ y CMI₉₀ $> 8 \mu\text{g/ml}$) (tabla 81). El sistema WIDER no fue capaz de diferenciar la distinta capacidad hidrolítica sobre este antibiótico de las enzimas CTX-M9 y de las SHV (aunque hubo indicios de significación), pues presentaron una distribución de CMIs similares (el 100% de los aislados productores de CTX-M9 tenían una CMI $> 8 \mu\text{g/ml}$ y el 95% de los productores de SHV) (figuras 187 y 198). Entre los aislados no productores de BLEEs el 12% presentó una CMI $> 8 \mu\text{g/ml}$, frente a los resultados del VITEK 2 en el que ningún aislado presentó estos valores de CMI (figuras 209 y 121, respectivamente).

Ceftazidima también se mostró significativamente menos activa en los aislados productores de BLEEs (CMI₅₀ = $16 \mu\text{g/ml}$ y CMI₉₀ $> 16 \mu\text{g/ml}$) (tabla 78) que en los no productores (CMI₅₀ = $4 \mu\text{g/ml}$ y CMI₉₀ $> 16 \mu\text{g/ml}$) (tabla 81). Con este antibiótico sí se observó claramente la

menor actividad de las enzimas CTX-M9, con una CMI₅₀ inferior en este grupo respecto a los aislados productores de SHV (8 µg/ml frente a > 16 µg/ml) (tablas 79 y 80). Entre los aislados no productores de BLEEs el 19% presentó una CMI > 8 µg/ml, frente a los resultados del VITEK 2 en el que ningún aislado presentó estos valores de CMI (figuras 210 y 123, respectivamente).

La reducción de la CMI de la combinación ceftazidima-ácido clavulánico, respecto a la CMI de ceftazidima sola, es un parámetro usado por el sistema WIDER para interpretar la posible presencia de BLEEs (TAZ no sensible, > 8 µg/ml, y TZ/C ≤ 1/4 µg/ml). Los cuatro grupos de estudio presentaron las mismas CMI₅₀ (< 1/4 µg/ml) y CMI₉₀ (8/4 µg/ml) (tablas 78 a 81) y presentaron distribuciones similares de los valores de CMI (el 88% de los aislados productores de BLEEs, el 85% de los aislados no productores, el 86% de los aislados productores de CTX-M9 y el 90% de los aislados productores de SHV presentaron una CMI < 1/4 µg/ml), es decir, los cuatro grupos se mostraron básicamente sensibles a esta combinación antibiótica. Sin embargo, hay que considerar que, entre los aislados productores de BLEEs sólo 58 cumplieron las condiciones que para la combinación TAZ-TZ/C hemos expuesto y fueron identificados correctamente por el WIDER como productores de BLEEs, el resto, o presentaron CMIs para TAZ ≤ 8 µg/ml (55 aislados, de los que 32 fueron identificados por el WIDER como productores de BLEEs y 23 no lo fueron) o presentaron CMIs > 8 µg/ml pero con CMIs para TZ/C > 1/4 µg/ml (12 aislados que fueron identificados por el WIDER como productores de BLEEs). A su vez, de entre los 344 aislados no productores de BLEEs cumplieron las condiciones establecidas para la combinación TAZ-TZ/C para la determinación de la presencia de BLEEs 44 aislados, de los cuales 40

fueron identificados erróneamente por el WIDER como productores de BLEEs.

Al contrario de lo que ocurría con el sistema VITEK 2, los resultados *in vitro* para cefepime en el sistema WIDER son de escasa actividad sobre los aislados productores de BLEEs (CMI_{50} y $\text{CMI}_{90} > 16 \mu\text{g/ml}$) (tablas 78 a 80), con el 83% de los mismos con $\text{CMI} > 8 \mu\text{g/ml}$ (figura 179), mientras que los aislados no productores de BLEEs se mostraron más sensibles ($\text{CMI}_{50} = 1 \mu\text{g/ml}$ y $\text{CMI}_{90} = 16 \mu\text{g/ml}$) (tabla 81). Las enzimas CTX-M confieren resistencia de alto nivel no sólo a cefotaxima y a cefuroxima sino también a cefepime (Bradford, 2001) y eso explica un mayor porcentaje de CMIs $> 8 \mu\text{g/ml}$ en el grupo de productores de CTX-M9 (93%) respecto a los de SHV (72%), lo que origina una distribución significativamente distinta de las CMIs en ambos grupos (figuras 190 y 201).

Meropenem fue el único antibiótico betalactámico ensayado por el sistema WIDER que se mostró activo, y con CMIs muy bajas ($\text{CMI} < 4 \mu\text{g/ml}$ en el 99,2% de los aislados productores de BLEEs y en el 97,7% de los no productores) (figuras 180 y 213). Estos resultados son similares a los observados en el sistema VITEK 2.

5.6.2. Categorías clínicas para los antibióticos betalactámicos

Cuando el sistema WIDER analiza los resultados de sensibilidad obtenidos *in vitro* para los distintos antibióticos es capaz de inferir qué mecanismo de resistencia, si lo hay, puede explicar ese comportamiento fenotípico, y modificar las categorías clínicas obtenidas para un antibiótico si el resultado no es coherente con el mecanismo de resistencia inferido para esa especie bacteriana, modificando siempre de

sensible a resistente el ensayo. Por esta razón, cuando el sistema WIDER identifica una posible producción de BLEEs modifica las categorías clínicas de sensible a resistentes de todas las penicilinas, cefalosporinas de primera a cuarta generación, pero no modifica los resultados obtenidos para las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, cefoxitina, ni carbapenémicos.

En las tablas 82 a 89 y en las figuras 214 a 221 quedan reflejadas las modificaciones que el sistema WIDER realizó de las categorías clínicas en los antibióticos betalactámicos ensayados.

Así, los resultados *in vitro* para cefalotina fueron en los 125 aislados productores de BLEEs, resistentes, y se informaron como tales, no hubo que hacer ninguna modificación.

El único aislado sensible a amoxicilina y también a cefuroxima entre los productores de BLEEs (aislado 246, productor de CTX-M9) no fue interpretado como resistente pues el sistema no fue capaz de detectar el enzima. Lo mismo ocurrió con un aislado con categoría clínica intermedia a cefuroxima (aislado 215, productor de SHV). En otros 5 de categoría intermedia pero en los que el sistema identificó la presencia de una BLEE (aislados 217, 224, 242, 267 y 280, productores todos ellos de SHV) el sistema WIDER modificó la categoría clínica y se informaron como resistentes.

Cefotaxima fue informado como resistente tras las correcciones que el sistema realizó en los 3 aislados que presentaron CMIs dentro del rango de sensibilidad y que fueron correctamente identificados como productores de BLEEs (aislados 217, 267 y 280).

El sistema modificó las categorías clínicas obtenidas *in vitro* para ceftazidima de todos aquellos aislados correctamente identificados como productores de BLEEs, pero no modificó dichas categorías en los 23 aislados incorrectamente detectados.

El WIDER no modificó las categorías clínicas de cefepime de 7 aislados productores de BLEEs, permaneciendo sensibles a este antibiótico; 5 de estos no fueron correctamente identificados como productores de BLEEs (aislados 54, 141, 215, 237 y 246), y, aunque 2 sí lo fueron, el sistema no modificó la categoría a resistente (aislados 224 y 231).

No se modificaron los resultados obtenidos *in vitro* para amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, ceftazidima ni meropenem, independientemente que el sistema detectase o no el enzima.

Entre los aislados no productores de BLEEs el sistema WIDER modificó las categorías clínicas para 5 antibióticos, incrementando el total de aislamientos que se informaron como resistentes: 4 aislados para cefalotina, 44 para cefuroxima, 36 para cefotaxima, 20 para ceftazidima y 36 para cefepime. Todos ellos pertenecían al grupo de aislados no productores de BLEEs según el método fenotípico de referencia y que el sistema WIDER había identificado falsamente como productores de estas enzimas, de ahí que modificó las categorías clínicas a resistentes (figuras 220 y 221).

5.7. Evaluación de métodos fenotípicos

Como hemos dicho en varias ocasiones, las BLEEs son uno de los mecanismos de resistencia más difíciles de detectar en los laboratorios de Microbiología Clínica. Este hecho se pudo poner de manifiesto en un estudio multicéntrico en el que participaron 130 laboratorios de América, Europa, Asia y África (Tenover *et al.*, 2001). Se envió una cepa de *K. pneumoniae* productora de una enzima TEM-3 a los laboratorios participantes, que no conocían ningún dato sobre la sensibilidad de la bacteria, y se solicitó el correspondiente informe emitido por cada laboratorio. Ochenta y tres de los laboratorios (63,9%) usaron un método

de difusión con disco y 47 (36,1%) usaron un método de determinación de CMI. Los laboratorios, por uno u otro procedimiento, ensayaron la sensibilidad del aislado a diferentes grupos de antibióticos, entre ellos a cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona) y aztreonam, a excepción de 6 laboratorios, que no ensayaron ninguno de estos antibióticos.

Siete de los laboratorios participantes (5,4%) informaron el aislado sensible a todas las cefalosporinas y al aztreonam. Noventa y seis de 105 laboratorios (91,4%) informaron resistente o intermedio a ceftazidima, 80 de 92 (86,9%) informaron resistente o intermedio a cefotaxima, 13 de 16 (81,2%) informaron resistente o intermedio a ceftriaxona.

Aunque el 88% de los laboratorios informaron que el aislado era resistente, al menos, a una cefalosporina de amplio espectro, sólo dos de los 130 laboratorios (1,5%) informaron expresamente el aislado como “productor de betalactamasas de espectro extendido”. Ningún laboratorio modificó los resultados de la categoría clínica de las cefalosporinas de “sensible“ a “resistente”, como sugiere el NCCLS.

En España se evaluó recientemente la capacidad de 52 laboratorios de Microbiología Clínica para detectar BLEEs mediante el uso de sistemas automatizados (VITEK 2, WIDER y MicroScan). Para ello a cada laboratorio se enviaron 6 cepas de enterobacterias productoras de BLEEs. Se obtuvieron los siguientes resultados para VITEK 2 y WIDER (Cantón *et al.*, 2003):

- Cepa 1 (*E. coli* productor de TEM-27 y TEM-1): Fue detectada la presencia de BLEE en el 82% de los laboratorios que usaron VITEK 2 y en el 61% de los que usaron WIDER.
- Cepa 2 (*E. coli* productor de CTX-M9 y TEM-1): Fue detectada la presencia de BLEE en el 64% de los laboratorios que usaron VITEK 2 y en el 47% de los que usaron WIDER.

- Cepa 3 (*K. pneumoniae* productor de SHV-5 y pérdida de OmpK35): Fue detectada la presencia de BLEE en el 82% de los laboratorios que usaron VITEK 2 y en el 61% de los que usaron WIDER.
- Cepa 4 (*K. pneumoniae* productor de SHV-5 y pérdida de OmpK35 y OmpK36): Fue detectada la presencia de BLEE en el 41% de los laboratorios que usaron VITEK 2 y en el 22% de los que usaron WIDER.
- Cepa 5 (*E. cloacae* productor de AmpC y CTX-M10): Fue detectada la presencia de BLEE en el 23% de los laboratorios que usaron VITEK 2 y en el 39% de los que usaron WIDER.
- Cepa 6 (*E. cloacae* hiperproductor de AmpC y CTX-M10): Fue detectada la presencia de BLEE en el 5% de los laboratorios que usaron VITEK 2 y en el 4% de los que usaron WIDER.

Por tanto, los laboratorios de Microbiología Clínica deben disponer de métodos que ofrezcan la mejor capacidad de detección posible, conjuntamente a una buena relación coste-beneficio. Por esa razón, y en función de los resultados que hemos obtenido evaluando varios métodos fenotípicos para la detección de BLEEs en *E. coli* (especie bacteriana productora de BLEEs más representada en nuestro estudio), pretendemos conocer el método más rentable en nuestro medio para tal fin.

En la tabla 91 se resumen los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los diferentes métodos empleados para detectar la presencia de BLEEs en *E. coli*, y en la tabla 120 (ver más adelante) se resume el comportamiento en el laboratorio que, a nuestro entender, muestran los diferentes métodos usados.

5.7.1. Métodos de difusión con disco y prueba de Epsilon

El método A es cómodo, de fácil realización e interpretación, pero presenta el problema de utilizar discos que no son de uso habitual en un laboratorio de Microbiología Clínica, salvo para este cometido. Por otra parte, es el método de difusión con disco aconsejado por el NCCLS, y ha sido validado por diversos trabajos.

M'Zali *et al.* (2000) refieren una sensibilidad para la combinación ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico del 86% y para la combinación cefotaxima y cefotaxima-ácido clavulánico del 65,5%. Sin embargo, cuando considera el uso conjunto de las dos combinaciones, el método detecta hasta el 93% de los aislados productores de BLEEs.

En los resultados expuestos por Carter *et al.* (2000) el uso de los discos de cefpodoxima y cefpodoxima-ácido clavulánico fue capaz de identificar, sin ningún falso negativo el total de aislamientos productores de BLEEs, con un 2% de falsos positivos; mientras que los discos de ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico identificaron correctamente el 95,5% de los aislados productores de BLEEs sin obtener falsos positivos.

La diferencia en los resultados obtenidos para la combinación ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico entre estos dos estudios puede radicar, no sólo en los diferentes aislados estudiados, sino en que M'Zali *et al.* (2000) utilizaron el cociente entre los diámetros (consideraron que hay producción de BLEEs cuando el cociente entre el diámetro alrededor del disco de ceftazidima-ácido clavulánico y el que contiene sólo ceftazidima es $\geq 1,5$) y Carter *et al.* (2000) usaron la diferencia entre diámetros para determinar la producción o no de una BLEE.

El método B también es un método cómodo, de fácil realización e interpretación. En la tabla 116 comparamos sensibilidad y especificidad obtenida en nuestro estudio con las obtenidas en otros trabajos.

Tabla 116: Datos de sensibilidad y especificidad para el método de aproximación de discos en diferentes estudios

	Sensibilidad	Especificidad
Nuestro estudio	100%	100%
Thomson y Sanders (1992)*	79%	-
Cormican <i>et al.</i> (1996)	87%	100%
Sanders <i>et al.</i> (1996)	98,1%	99,4%
Vercauteren <i>et al.</i> (1997)*	96,9%	-
Ho <i>et al.</i> (1998)	96%	100%

*Estudios realizados en colecciones de cepas productoras de BLEEs caracterizadas genotípicamente

Thomson y Sanders (1992) refieren una sensibilidad para el método de aproximación de discos del 79%, inferior a la encontrada por nosotros, sobre una colección de 32 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEEs.

Para Cormican *et al.* (1996) la sensibilidad del método de aproximación de discos (valorando la sinergia sólo entre ceftazidima y ácido clavulánico en aislados productores de SHV y TEM) fue del 87% y la especificidad del 100%.

Sanders *et al.* (1996) evaluaron el método de difusión con discos de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y ceftriaxona con un disco central de amoxicilina-ácido clavulánico en 119 aislados productores de BLEEs previamente caracterizados y 38 aislados no productores de BLEEs, obteniendo una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 99,4%, valores más parecidos a los obtenidos por nosotros.

Vercauteren *et al.* (1997) realizan una ligera modificación del método de aproximación de discos consistente en el uso de discos de 30 µg de ceftazidima, ceftriaxona, cefepime y aztreonam dispuestos alrededor de un disco central de amoxicilina-ácido clavulánico con una composición 30/15 µg/ml (y no 20/15 µg/ml, como en el resto de los estudios y el que nosotros hemos realizado). Así refiere una sensibilidad para este método del 96,9%.

Ho *et al.* (1998) obtuvieron una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100%. Cuando evalúan por separado la sinergia entre cada uno de los antibióticos usados y ácido clavulánico, estas sensibilidades descienden al 93% para ceftazidima, 89% para aztreonam y 81% para cefotaxima. La baja capacidad de cefotaxima para detectar BLEEs en este estudio se puede deber a que las 81 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que se ensayaron eran productoras de enzimas TEM y SHV y ninguna era poseedora de una enzima CTX-M.

Algunos de los elementos que pueden incidir en la sensibilidad del método son: la correcta colocación de los discos alrededor del disco central de amoxicilina-ácido clavulánico, una correcta distancia entre ellos (la disminución de la distancia desde 30 mm a 20 mm facilita la detección de la sinergia con ácido clavulánico), una lectura adecuada de la sinergia y el uso de cefpodoxima, un antibiótico muy sensible a la acción de las BLEEs.

El E-test es fácil de realizar e interpretar, aunque pueden aparecer colonias dentro del halo que elevan la CMI y complican la interpretación (hecho que no ocurrió en nuestro estudio), además de requerir el uso de tiras exclusivas para el análisis. Aunque la tira CT/CTL fue capaz de detectar la presencia de BLEEs en todos los aislamientos, eso no implica que en todos los casos ocurra así. De hecho el fabricante recomienda el uso simultáneo de los E-test CT/CTL y TZ/TZL, aunque nosotros

tengamos muy buenos resultados sólo con CT/CTL. En la tabla 117 comparamos la sensibilidad y especificidad obtenida en nuestro estudio con las obtenidas en otros trabajos.

Tabla 117: Datos de sensibilidad y especificidad para el E-test en diferentes estudios

	Sensibilidad			Especificidad		
	TZ/TZL	CT/CTL	En paralelo	TZ/TZL	CT/CTL	En paralelo
Nuestro estudio	49,6%	100%	100%	100%	100%	100%
Nüesch-Inderbinen et al. (1996)*	52%	-	-	-	-	-
Cormican et al. (1996)	100%	-	-	100%	-	-
Vercauteren et al. (1997)*	81%	-	-	-	-	-
Ho et al. (1998)	89%	-	-	100%	-	-
Bolmström et al. (1999)	77%	91%	98%	93%	96%	99%
Leverstein-van Hall et al. (2002)	-	-	100%	-	-	87%

*Estudios realizados en colecciones de cepas productoras de BLEEs caracterizadas genotípicamente

Nüesch-Inderbinen *et al.* (1996) estudiaron la capacidad del E-test TZ/TZL para detectar la presencia de enzimas SHV en 29 aislados productores de las mismas. Para ello consideran que un aislado es productor de BLEEs cuando el cociente entre la CMI de TZ y la CMI de TZL es ≥ 16 . Obtienen un resultado de sensibilidad del 52%. Si hubiesen evaluado el método para un cociente entre CMIs ≥ 8 , la sensibilidad hubiese aumentado hasta el 65,5%.

Cormican *et al.* (1996) evaluaron la capacidad del E-test TZ/TZL para detectar BLEEs en 82 cepas productoras de BLEEs tipo TEM y SHV, pero considerando que una cepa era productora de BLEEs cuando el cociente entre las CMIs de TZ y TZL fue ≥ 5 , y no a 8, como recomienda el fabricante. Ofrecen resultados de sensibilidad y especificidad para el E-test TZ/TZL del 100% en ambos casos, frente al

87% de sensibilidad y 100% de especificidad que obtuvieron con la aproximación de discos

Según Vercauteren *et al.* (1997) el E-test TZ/TZL detecta el 81% de los aislados clínicos productores de BLEEs cuando la presencia de las enzimas se valora con un cociente de CMIs ≥ 8 , pero si siguen el criterio de Cormican *et al.* (1996) entonces la sensibilidad aumenta al 87%; resultados, en cualquier caso, superiores a los obtenidos por nosotros, y que pueden deberse a que en el estudio de Vercauteren *et al.* (1997) sólo hubo aislados productores de enzimas TEM y SHV, pero no CTX-M.

Ho *et al.* (1998) dan una cifra de sensibilidad para el E-test TZ/TZL del 89%, un resultado muy inferior al que en este mismo estudio se obtuvo para el método de aproximación con discos (sensibilidad del 96%) usando el mismo antibiótico (ceftazidima) para estudiar los mismos aislados. La especificidad, sin embargo, fue del 100%.

Bolmström *et al.* (1999) obtienen una sensibilidad del 77% y una especificidad del 93% para el E-test TZ/TZL y del 91% y 96%, respectivamente, para el E-test CT/CTL. Cuando ambas tiras se usan en paralelo la sensibilidad se incrementa hasta el 98%, con una especificidad del 99% en una colección de 337 aislados productores de BLEEs.

Leverstein-van Hall *et al.* (2002) realizan un estudio sobre 17 cepas productoras y no productoras de BLEEs, caracterizadas genótipicamente y encuentran para el E-test TZ/TZL y CT/CTL una sensibilidad del 100% y una especificidad del 87%.

Las técnicas de difusión con disco y E-test tienen algunas limitaciones, pues la hiperproducción de algunas betalactamasas cromosómicas o plasmídicas, o la existencia en el aislado de otros mecanismos de resistencia a betalactámicos, pueden favorecer la presencia de sinergia con ácido clavulánico dando lugar a falsos positivos en la detección de BLEEs. Además, estos métodos pueden generar falsos

positivos o negativos cuando son aplicados a algunas especies bacterianas en las que también se ha descrito producción de BLEEs. Así:

1. La hiperproducción de SHV-1 en *E. coli* y *K. pneumoniae*, causada por la presencia de múltiples copias del plásmido que las codifica, puede hacer que la CMI de ceftazidima suba a valores que pueden hacer sospechar una BLEE, especialmente por la ligera sinergia que puede aparecer entre ceftazidima y ácido clavulánico (Miró *et al.*, 1998). En estos casos se incrementan las CMIs de penicilinas, asociaciones con inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de primera generación e incluso ceftazidima (4-8 µg/ml), mientras que afecta escasamente a las CMIs de cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, cefepime o aztreonam, que se mostrarán sensibles (Navarro *et al.*, 2002).
2. La hiperproducción de la betalactamasa K1 de *K. oxytoca* confiere resistencia a cefuroxima, ceftriaxona, cefpodoxima, cefotaxima y aztreonam, pero no a ceftazidima, que permanece activa. Además, la hiperproducción de esta betalactamasa produce ampliación del halo con ácido clavulánico de cefuroxima, ceftriaxona, cefpodoxima, cefotaxima y aztreonam, nunca con ceftazidima (Carter *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2002). Los aislados 215 y 283 de nuestro estudio, de la especie *K. oxytoca*, presentaron en los métodos de difusión con disco y en el E-test un fenotipo compatible con la producción de BLEEs y no de la enzima K1 (fueron resistentes a ceftazidima, cefotaxima, cefpodoxima y aztreonam y hubo sinergia en la asociación con ácido clavulánico en todos los casos).
3. La hiperproducción constitutiva de AmpC en *E. coli* puede elevar los valores de CMI de ceftazidima por encima de 1 µg/ml. Los aislados que sólo son productores de AmpC se mostrarán resistentes a ceftazidima, a cefpodoxima, y a cefotaxima en el

método A y esa resistencia no será reversible en la asociación con ácido clavulánico, por lo que no se observará sinergia (Carter *et al.*, 2000).

4. La presencia de una BLEE puede estar enmascarada por una enzima AmpC en el mismo aislado, que afectará la actividad de ácido clavulánico, dando lugar a falsos negativos en el estudio fenotípico (Bradford *et al.*, 1997). Este problema es más frecuente en especies que habitualmente poseen una betalactamasa cromosómica inducible AmpC (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Aeromonas* spp., *M. morgonii*, *C. freundii*, *Hafnia alvei*). Con estos microorganismos el ácido clavulánico puede actuar como inductor de altos niveles de AmpC e incrementar la resistencia del aislado a la combinación de la cefalosporina con ácido clavulánico, produciendo un falso negativo en los métodos de detección de BLEEs. Una posible solución es incluir en el ensayo fenotípico de detección de BLEEs en estas especies cefepime (Tzouvelekis *et al.*, 1999), ya que la hiperproducción de AmpC no tiene efectos en la actividad de cefepime, siendo entonces éste el agente más eficaz en la detección de BLEEs cuando hay presencia conjunta de una betalactamasa tipo AmpC (Kenneth y Thomson, 2001).
5. La expresión de bajos niveles de OmpK35 (homóloga a OmpF de *E. coli*) junto a la presencia en el mismo aislado de enzimas TEM-1 y SHV-1, con niveles normales de OmpK36 (homóloga a OmpC de *E. coli*) puede ser responsable del incremento de CMI a cefotaxima, sin afectar a ceftazidima, en aislados de *K. pneumoniae*. La presencia de ácido clavulánico, que inhibe a las enzimas TEM-1 y SHV-1, puede reducir entonces la CMI para cefotaxima, dando lugar a sinergia entre ambos en la difusión con discos y a la reducción de CMIs en el E-test CT/CTL. En

definitiva, esta situación puede generar falsos positivos de BLEEs (Wu *et al.*, 2001).

6. La hiperproducción de la betalactamasa cromosómica de *P. vulgaris*, *P. penneri* o *C. diversus* (cefuroximasa) que es inhibida por ácido clavulánico, puede dar una ampliación del halo con cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona (Navarro *et al.*, 2002). La hiperproducción de esta enzima confiere resistencia a cefuroxima, ceftriaxona y cefotaxima, en cambio permanecen activas ceftazidima y aztreonam.
7. La producción de L2 de *Stenotrophomonas maltophilia* origina sinergia positiva con aztreonam debido a que la acción hidrolítica de esta enzima sobre aztreonam se ve inhibida por ácido clavulánico (Vila y Marco, 2002). Este fenómeno no debe confundirse con la presencia de una BLEE.

Por último, otro problema que se puede plantear y es común a todos los métodos de difusión con disco y E-test, es el correcto almacenaje de los discos y tiras que contienen ácido clavulánico, ya que la pérdida de actividad de éste, por una conservación inadecuada, puede alterar los resultados, disminuyendo la sensibilidad de todos estos métodos.

5.7.2. Métodos automatizados

En la tabla 118 exponemos algunas de las ventajas e inconvenientes que pueden tener los sistemas automatizados de lectura e interpretación del antibiograma (García, 2002).

La principal ventaja de los sistemas automatizados de estudio de sensibilidad *in vitro* es la rapidez de los resultados desde el laboratorio.

Al acortar el tiempo de respuesta en los estudios de sensibilidad *in vitro* se puede iniciar o cambiar más oportunamente la terapia antimicrobiana, lo que conlleva una reducción en los días de hospitalización y una reducción en el uso de antimicrobianos y en los costes totales. Por otro lado, el uso de los sistemas automatizados confiere una mejor estandarización y reproducibilidad de los resultados y una disminución de la carga de trabajo en los laboratorios, ya que los métodos de determinación de CMI (dilución en agar o dilución y microdilución en caldo), la prueba de Epsilon o los métodos de difusión con disco, son muy laboriosos cuando se realizan manualmente. Además, disponen de sistemas expertos que permiten utilizar algoritmos de informes. Estos sistemas permiten sospechar patrones fenotípicos de resistencia como betalactamasas de espectro extendido, entre otros, facilitan la obtención de estadísticas y permiten el análisis de las tendencias locales de resistencia.

En los sistemas automatizados sobretodo, pero también en los procedimientos de difusión con disco, hay que considerar la importancia de un inóculo bacteriano adecuado para los ensayos de sensibilidad. Un inóculo bajo puede dar lugar a falsos negativos de BLEEs porque dan lugar a CMIs bajas, por debajo de las concentraciones establecidas por el NCCLS para la detección de estas enzimas (Queenan *et al.*, 2004).

Tabla 118: Ventajas e inconvenientes de los sistemas automatizados de estudio de sensibilidad bacteriana (García, 2002)

Ventajas	Inconvenientes
Rapidez en el informe de resultados (3-10 horas, inicio o cambio precoz del tratamiento y reducción de costos de hospitalización.	Hay que disponer de una metodología de respaldo (habitualmente manual) por si falla el equipo
Reproducibilidad intra e interlaboratorio	Alto costo de paneles o tarjetas
Disminución de la carga de trabajo en método que determinen CMI	No existen normas NCCLS para sistemas automatizados
Permite actualizaciones de las guías NCCLS	Discrepancia con los métodos de referencia
Permiten sospechar la presencia de BLEEs y otros mecanismos de resistencia bacterianos	Los paneles o tarjetas están diseñados por el fabricante por lo que hay poca flexibilidad en los antibióticos ensayados
Capacidad de almacenar y procesar la información facilitando la obtención de estadísticas	
Facilita el control en el uso de antimicrobianos	

El sistema VITEK 2 permite, junto a la identificación y estudio de la sensibilidad a otros antibióticos, conocer la presencia de BLEEs desde las primeras 4 horas de la inoculación de las tarjetas. Esto permite la caracterización rápida de estos aislados, de especial importancia entre las muestras hospitalarias. A esto hay que unir que el sistema evalúa la presencia de BLEEs sin una acción específica, es decir, junto al protocolo de identificación y sensibilidad a todos los antibióticos. Pero, además, dado el buen comportamiento del sistema VITEK 2 en nuestro estudio no sería, en principio, necesario confirmar los resultados obtenidos.

En la tabla 119 comparamos los resultados de sensibilidad y especificidad que nosotros hallamos, con los encontrados en otros trabajos.

Tabla 119: Datos de sensibilidad y especificidad para el sistema VITEK 2 en diferentes estudios

	Sensibilidad	Especificidad
Nuestro estudio	100%	95,8%
Sanders <i>et al.</i> (2000)*	89%	-
Cantón <i>et al.</i> (2001)*	98,8%	-
Livermore <i>et al.</i> (2002)*	93%	-
Leverstein-van Hall <i>et al.</i> (2002)	100%	87%
Sturemburg <i>et al.</i> (2003)*	85%	-

*Estudios realizados en colecciones de cepas productoras de BLEEs caracterizadas genotípicamente

Sanders *et al.* (2000) obtuvieron una sensibilidad del 89% evaluando 36 aislados de las especies *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* productoras de BLEEs caracterizadas genotípicamente. En este estudio se afirma que el sistema no siempre discrimina entre un fenotipo BLEE, la presencia de un fenómeno de impermeabilidad y la producción de AmpC y sugiere la necesidad de una prueba específica para la detección de BLEEs en las tarjetas VITEK basado en la presencia y ausencia de ácido clavulánico.

Cantón *et al.* (2001) evalúan la capacidad del sistema VITEK 2 para identificar la presencia de BLEEs en 86 aislados productores de estas enzimas (31 *E. coli*, 38 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii*, 10 *Enterobacter* spp., y 6 *Salmonella* spp.), obteniendo una sensibilidad del 98,8%. Cuando en este estudio nos referimos exclusivamente a las especies *E. coli* y *K. pneumoniae*, entonces la sensibilidad es del 100%.

Livermore *et al.* (2002) obtienen una sensibilidad del 93% al evaluar el sistema VITEK 2 en 28 aislados de *E. coli* (26/28) productores de BLEEs tipo TEM y SHV. Cuando en el estudio se introducen otras especies como *Klebsiella* spp. (99 aislados), *E. cloacae* (6), *Salmonella* spp. (3) y *Enterobacter gergoviae* (1), la sensibilidad es del 92% (126/137).

Leverstein-van Hall *et al.* (2002) realizan un estudio sobre 17 cepas productoras y no productoras de BLEEs, caracterizadas genotípicamente y encuentran para el sistema VITEK 2 una sensibilidad del 100% y una especificidad del 87%. Sin embargo, cuando este estudio se amplía con 70 aislados clínicos la sensibilidad cae al 74% y la especificidad apenas cambia (85%), debido, según el autor, al alto número de resultados indeterminados por el sistema VITEK 2.

Sturenburg *et al.* (2003) analizan el sistema VITEK 2 en 34 aislados de las especies *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEEs caracterizadas por PCR y obtienen una sensibilidad para el método automatizado del 85%.

Uno de los problemas que plantean los métodos de difusión con disco y el E-test para la detección de BLEEs es el tiempo que se emplea en confirmar si el aislado es o no productor de la enzima. El primer día se obtiene el aislado sospechoso (en base a una sensibilidad disminuida a cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima y/o aztreonam) y se debe esperar un día más para conocer la sensibilidad a los discos de las cefalosporinas con el inhibidor de betalactamasas y confirmar la sospecha. Si el aislado no se informó, y ahora es productor del enzima, la terapia adecuada se ha retrasado durante un día, y si se informó como productor, y no lo es, se ha estado usando indebidamente una terapia (posiblemente un antibiótico carbapenémico). En aquellos laboratorios que utilicen el método automatizado VITEK 2 para identificación y estudio de sensibilidad de los microorganismos obtenidos en las muestras clínicas, y según nuestros resultados, podríamos estar reduciendo el tiempo del informe sobre un aislado, tanto positivo como negativo, referido a la producción de BLEEs. Esto es así porque el sistema VITEK 2 puede informar el resultado de una CMI aproximadamente entre las 6 y 10 horas de inoculado el microorganismo en las tarjetas correspondientes del sistema; este tiempo se reduce a 2 horas en caso de resistencia. Si

dicha CMI es igual o superior a los límites establecidos por el NCCLS para identificar un aislado productor de BLEE, se puede ir ya, en ese momento informando al clínico de la limitación de uso de los antibióticos betalactámicos afectados.

En relación a la capacidad del sistema WIDER para detectar BLEEs pensamos, en base a los resultados obtenidos (sensibilidad del 82,6%, especificidad del 84,5%, valor predictivo positivo del 68,3% y valor predictivo negativo del 92,3%), que éste no es un método apto para la detección de estas enzimas, tanto porque es incapaz de detectarlas en algunos aislados (que serían informados posiblemente como sensibles a algunas cefalosporinas de tercera generación pudiendo dar lugar a fallos terapéuticos), como por la necesidad de requerir un método de confirmación de los resultados positivos.

Por otro lado, la necesidad de incubar las placas, una vez inoculadas con la suspensión bacteriana, a 37° C durante al menos 18 horas, retrasa el informe definitivo al clínico.

Existen pocos estudios que hayan evaluado el sistema WIDER para la detección de enzimas tipo BLEEs. El estudio que Cantón *et al.* (2000) realizó sobre el WIDER no aporta valores de sensibilidad y especificidad del sistema pero obtiene un 92,3% de concordancia entre los valores de CMI de los diferentes antibióticos ensayados por el sistema WIDER y las CMIs obtenidas por microdilución, como método de referencia, al estudiar, tan sólo, 7 cepas productoras de BLEEs (1 *E. coli*, 1 *C. freundii* y 5 *Enterobacter* spp.). Este valor de concordancia entre un total de 328 combinaciones antibióticos-microorganismo es el más bajo obtenido en este estudio si lo comparamos con los obtenidos para otros grupos de aislados productores de otros mecanismos de resistencia distintos a las BLEEs.

Tabla 120: Características de los métodos usados para la detección de BLEEs (original)

Prueba	¿Requiere acción específica en el laboratorio?	Interpretación	Tiempo de obtención de resultados	Ventajas	Inconvenientes
Método A	Requiere la utilización de discos específicos.	Necesita poner de manifiesto la sinergia con ácido clavulánico.	48 horas.	Fácil interpretación de los resultados. Adaptado a los criterios NCCLS.	No descarta otro mecanismo de resistencia simultáneo.
Método B	Requiere correcta colocación de los discos con antibióticos y control de la distancia entre ellos.	Necesita poner de manifiesto la sinergia con ácido clavulánico.	48 horas.	Fácil ejecución en el laboratorio.	Precisión en la correcta lectura de los halos de inhibición.
E-Test	Requiere tiras específicas.	Cociente entre las CMI's obtenidas.	48 horas.	Informa de la CMI.	Precisión en la correcta lectura de las CMI's.
VITEK2	No. Se realiza dentro del trabajo habitual del laboratorio.	Está automatizada por un sistema experto (AES)	A partir de las 4 horas, aproximadamente.	Interpretación automatizada y rapidez del resultado.	Precio elevado que puede limitar su uso a los aislados hospitalarios.
WIDER	No. Se realiza dentro del trabajo habitual del laboratorio.	Está automatizada por un sistema experto.	24 horas	Interpretación automatizada.	Precio elevado Menor capacidad de detección de BLEEs.

5.8. Epidemiología

Una vez evaluada la capacidad de los distintos métodos fenotípicos usados en nuestro estudio para detectar la presencia de BLEEs en enterobacterias de las especies *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, y obtenidos los resultados sobre identificación bioquímica y molecular de las enzimas presentes en los aislados, es importante analizar qué características demográficas o epidemiológicas presentan estas betalactamasas en nuestro medio:

1. Distribución por especies bacterianas: De entre los aislados productores de BLEEs el 92% correspondieron a la especie *E. coli*, 6% a *K. pneumoniae* y 2% a *K. oxytoca*. De entre los aislados no productores de BLEEs el 82% fueron de la especie *E. coli*, el 12% de *K. pneumoniae* y el 6% de *K. oxytoca* (figuras 23 y 24).
2. Distribución por sexos: 69% de mujeres entre los aislados productores de BLEEs frente a 67% de este sexo entre los aislados no productores y 31% frente a 33% de varones en cada grupo (figuras 32 y 33).
3. Distribución por el origen de las muestras: El 74% de los aislados productores de BLEEs fueron de origen extrahospitalario frente al 77% de este mismo origen entre los aislados no productores. El 26% restante de los aislados productores de BLEEs procedían de muestras intrahospitalarias frente al 23% con esta misma procedencia en el otro grupo (figuras 38 y 40). La distribución de las muestras hospitalarias según el servicio solicitante queda reflejada en las tablas 37 y 38, donde podemos ver que los servicios de Pediatría, Medicina Interna y Cirugía General son los que más muestras aportaron en el estudio. Las muestras extrahospitalarias procedieron fundamentalmente de centros de Atención Primaria y de consultas hospitalarias (97,8%).

4. Distribución por tipo de muestras: Hubo un claro predominio de la orina entre los aislados, tanto productores (86,4%) como no productores de BLEEs (91,9%) (figuras 34 y 35) frente a exudados de origen quirúrgico, secreciones genitales y otras muestras. Este claro predominio de la orina se debe a que ésta es la muestra más frecuente recibida en nuestro laboratorio, la infección de orina es más frecuente en mujeres que en varones y *E. coli* es la enterobacteria más frecuentemente implicada en las ITUs. Así, el 65% de los aislados productores de BLEEs y este mismo porcentaje entre los no productores, procedieron de estudios de infección urinaria en mujeres (tablas 35 y 36). Teniendo en cuenta que la ITU es una de las causas más frecuentes de sepsis, nosotros consideramos que el estudio de la posible producción de BLEEs en este tipo de muestras es obligado.

Al no haberse realizado una selección sistemática, aunque sí aleatoria, de los aislados clínicos, se decidió realizar un estudio prospectivo en el que se aislaron 744 enterobacterias entre los meses de Octubre y Noviembre de 2002 y cuyos resultados ya han quedado expuestos en el apartado 4.11. Cabe destacar que el 10,2% de los aislados pertenecientes a las especies en estudio presentaron una BLEE, predominando *E. coli* (92,6% entre los productores y 9,4% del total de estas especies), el origen extrahospitalario de las muestras (79,6% de los aislados productores) y la orina como muestra predominante (90,7% de los aislados productores de BLEEs). El 66,7% del total de aislados procedieron de mujeres. Como vemos, estos resultados obtenidos para un periodo de dos meses son acordes, en líneas generales, con los expuestos para el total de aislamientos productores de BLEEs de este estudio.

En la tabla 121 comparamos los resultados de prevalencia de BLEEs que se han obtenido para distintos estudios realizados tanto en el ámbito nacional como en el internacional.

Tabla 121: Resultados de prevalencia de BLEEs en diferentes trabajos

	Prevalencia		Comentarios
	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>E. coli</i>	
Nuestro estudio	10,2%		Referido a <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i> spp.
Martín <i>et al.</i> (2002)	1%	1,6%	1,2% en el total de enterobacterias
Romero <i>et al.</i> (2004)	2,7%	5,2%	
Moreno <i>et al.</i> (2004)	6,9%	6,1%	
Yeste <i>et al.</i> (2002)	1,84%		Referido sólo a muestras de orina
Mirelis <i>et al.</i> (2003)		7,5%	Entre muestras extrahospitalarias
Hernández <i>et al.</i> (2003a)	0,5%	2,7%	
Saurina <i>et al.</i> (2000)	17,2%		<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. mirabilis</i>
De Champs <i>et al.</i> (2000)	3,2%		En el total de enterobacterias
Spanu <i>et al.</i> (2002)	6,3%		En el total de enterobacterias
Lewis <i>et al.</i> (1999)	<10%		<i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i> spp.

En el Hospital Carlos Haya de Málaga aportan cifras de presencia de BLEEs en el 1,6% y 1% de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente, con 1,2% de prevalencia total de BLEEs entre enterobacterias (Martín *et al.*, 2002).

En el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla se puede ver la evolución de los aislados a lo largo del tiempo. En términos de frecuencia, *K. pneumoniae* productor de BLEEs pasó de un 9,7% en 1995 a un 2,7% en 2003, mientras que *E. coli* productor de BLEEs se incrementó de un 0,3% a un 5,2% en el mismo periodo; además, mientras que *K. pneumoniae* aparece en forma de brotes intrahospitalarios, los aislamientos de *E. coli* se distribuyeron de forma homogénea, aumentando en los últimos años tanto a nivel intrahospitalario, como, sobretudo, a nivel extrahospitalario, y predominando en orinas tanto una como otra especie (Romero *et al.*, 2004).

En el hospital Nuestra Señora de la Candelaria de Tenerife pasa algo similar, con cifras de frecuencia de 1% en 1999 para *E. coli* y 0% para *Klebsiella* spp. a cifras de 6,1% en 2003 para *E. coli*, 1,6% para *K. pneumoniae* o 5,3% de los aislados de *K. oxytoca* (Moreno *et al.*, 2004).

En el Hospital Virgen de las Nieves de Granada la prevalencia de BLEEs entre enterobacterias aisladas en muestras de orina es del 1,84% (todas de la especie *E. coli*), con un predominio del sexo femenino, en relación, también, al tipo de muestra donde se realizó el estudio y destacando en el mismo, como elemento diferenciador respecto al nuestro, que el porcentaje de aislados de enterobacterias productoras de BLEEs en el ámbito extrahospitalario es menor que en el intrahospitalario (Yeste *et al.*, 2002).

En Barcelona, en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau observan una prevalencia de *E. coli* productor de BLEEs entre muestras de pacientes extrahospitalarios del 7,5% en Octubre de 2002, mientras que en un estudio realizado entre los meses de Febrero a Mayo de 2001 la prevalencia fue del 2,1%, constatando, por tanto, un importante incremento de la presencia de estas enzimas (Mirelis *et al.*, 2003).

Comparando los datos de nuestro estudio prospectivo con los aportados por el grupo GEIH (Hernández *et al.*, 2003a), el estudio más ambicioso en el ámbito nacional, podemos establecer:

1. Que al igual que el GEIH, la muestra donde predominantemente se aislaron las enterobacterias productoras de BLEEs fue la orina, con un 90,7% de aislamientos en nuestro estudio frente a un 66% y 43% para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente en el estudio del GEIH.
2. Que los porcentajes de aislados provenientes de muestras extra o intrahospitalarias, con relación al estudio GEIH son: 80% de extrahospitalarias y 20% de intrahospitalarias de *E. coli*, y 75% de extrahospitalarias y 25% de intrahospitalarias de *K. pneumoniae* en

Granada; frente a un 51% de extrahospitalarias y 49% de intrahospitalarias de *E. coli*, y, 93% de intrahospitalarias y 7% de extrahospitalarias de *K. pneumoniae* en el estudio del GEIH.

3. Que en el área correspondiente al Hospital San Cecilio el 66,7% de los aislados provenían de muestras obtenidas de mujeres, mientras que en el estudio GEIH predominó el varón como fuente del microorganismo, con un 46% de los aislamientos de *E. coli* y un 66% de los de *K. pneumoniae*.
4. Los datos del trabajo indican, durante el periodo estudiado, una prevalencia global en España de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs del 0,5% y el 2,7%, respectivamente. Sin embargo, en números absolutos, *E. coli* productor de BLEEs fue más frecuente que *K. pneumoniae*, tanto en aislamientos intrahospitalarios como extrahospitalarios. Probablemente este hecho se deba al aumento en el número de aislamientos de *E. coli* productor de BLEEs en muestras procedentes de la comunidad, que supusieron más de la mitad (51%). En el caso de *E. coli* productor de BLEEs los datos obtenidos en este estudio indican, por tanto, que en España este microorganismo se aísla principalmente en muestras de orina (66%), procedente de personas en un amplio rango de edad (0-93 años) y, en el 51% de los casos, en pacientes no hospitalizados. Por el contrario, los datos de este estudio, en el cual el 93% de los aislamientos de *K. pneumoniae* productor de BLEEs proceden de muestras intrahospitalarias, indican que este microorganismo sigue siendo un problema principalmente nosocomial y que los servicios donde se encuentran principalmente son las UCIs, tanto de adultos, como pediátricas.

La distribución de las cifras de prevalencia de BLEEs en diferentes estudios se han referido casi siempre a aislados de origen intrahospitalario, consecuencia del estudio de brotes nosocomiales, y que habitualmente se ha considerado a éste como un mecanismo de

resistencia presente, sobretodo, en muestras de este origen. Entre los estudios internacionales Saurina *et al.* (2000) es el autor que aporta unas cifras mayores de prevalencia, con un 17,2% de los aislados de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. mirabilis* en el área hospitalaria de Brooklyn (Nueva York). En el estudio francés de De Champs *et al.* (2000) (tabla 11) la prevalencia fue del 3,2%; en un estudio italiano fue del 6,3% (Spanu *et al.*, 2002) (tabla 12), y en otro japonés, en aislados de *E. coli* y *Klebsiella spp.*, fue inferior al 10% (Lewis *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista molecular, en España se han descrito las siguientes betalactamasas de espectro extendido: TEM-4, TEM-12, TEM-24, TEM-27, TEM-54, TEM-70, SHV-2, SHV-5a, SHV-12, CTX-M1, CTX-M3, CTX-M7, CTX-M9, CTX-M10, CTX-M14 y CTX-M15. Mientras que, al principio, la mayoría de las BLEEs eran del tipo TEM o SHV (Baquero *et al.*, 1988; Fernández-Rodríguez *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1998), actualmente las más frecuentes en España son las enzimas CTX-M, descritas especialmente en los últimos tres años, y siendo el tipo de BLEE más prevalente en *E. coli* (Sabaté *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001; Coque *et al.*, 2002b; Hernández *et al.*, 2003b).

Las enzimas tipo CTX-M se están describiendo como las BLEEs más frecuentes no solo en nuestro país, sino también en otros países de nuestro entorno (Pagani *et al.*, 2003), e incluso en países más alejados como Rusia, con un 35% de enzimas CTX-M (tipos 1 y 2) (Edelstein *et al.*, 2003) o China (Munday *et al.*, 2004). Además, en un estudio realizado en 12 hospitales de 7 países sobre 455 hemocultivos, de los cuales 73 eran por *K. pneumoniae* productor de BLEEs, el 67,1% de los aislados eran SHV, el 16,4% eran TEM y el 23,3% eran CTX-M; siendo esta última enzima la única que se describió en todos los países excepto Estados Unidos, y en Australia, Bélgica, Turquía y Sudáfrica, era la primera descripción de una BLEE de este tipo (Paterson *et al.*, 2003).

En hospitales de nuestro entorno se describe una situación similar. En el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, en un estudio sobre muestras extrahospitalarias de *E. coli* con predominio de la orina (76% de las muestras) hubo un 64% de aislados productores de CTX-M9 frente a un 18% para los aislados SHV y TEM (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004). En nuestro estudio el 55% de los aislados de *E. coli* de origen extrahospitalario producían una enzima CTX-M9, mientras que el 45% restante producía una enzima SHV.

La diseminación de este tipo de BLEEs plantea ciertas dificultades para su detección, especialmente cuando se utiliza ceftazidima como único marcador (Sabaté *et al.*, 2000; Sabaté *et al.*, 2002), problema que, como hemos visto en los apartados 5.1.1., 5.1.2. y 5.3., en los que hemos analizado la capacidad de ceftazidima para detectar BLEEs tipo CTX-M, también a nosotros se nos ha planteado.

Otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEEs en enterobacterias productoras de betalactamasas cromosómicas AmpC. En este sentido, la cepa productora de BLEE, para la cual se ha documentado una mayor diseminación, es una cepa de *E. aerogenes* productora de TEM-24 que ha sido la causa de brotes epidémicos en un gran número de hospitales de distintos países europeos, como Bélgica, Francia, Portugal y España (Cantón *et al.*, 2002).

5.9. Estudio de clonalidad

Entre los aislados hospitalarios obtenidos durante el periodo Octubre-Noviembre de 2002, en los que se realizó estudio de clonalidad por electroforesis en campo pulsado, no se observaron patrones compatibles con una posible diseminación clonal intrahospitalaria.

5.10. Opciones terapéuticas

Los mayores porcentajes de sensibilidad de los aislados productores de BLEEs a antibióticos, obtenidos mediante el sistema VITEK 2, fueron a carbapenemas (100%) y amikacina (100%), seguidos de piperacilina-tazobactam (97,6%), amoxicilina-ácido clavulánico (85,6%), cefoxitina (84,8%), tobramicina (84%), gentamicina (83,2%), nitrofurantoína (70,4%), cotrimoxazol (49,6%), y por último las quinolonas, norfloxacin (34,4%), ciprofloxacino (32%) y ofloxacino (31,2%).

Los estudios de sensibilidad realizadas sobre los aislados obtenidos en el estudio español del GEIH demostraron que los mayores porcentajes de sensibilidad de *E. coli* fueron a carbapenemas (100%), seguidos de amikacina (92%), piperacilina-tazobactam (77%), cefoxitina (75%), gentamicina (65%), amoxicilina-ácido clavulánico (40%), cotrimoxazol (38%) y ciprofloxacino (37%) (Hernández *et al.*, 2002a); mientras que para los aislados de *K. pneumoniae* las mayores frecuencias de sensibilidad fueron a carbapenemas (100%), seguidos de amikacina (90%), cefoxitina (87%), ciprofloxacino (86%), piperacilina-tazobactam (64%), cotrimoxazol (51%), gentamicina (33%) y amoxicilina-ácido clavulánico (24%) (Hernández *et al.*, 2002b).

No es raro en la práctica clínica enfrentarse a un patrón de multirresistencia asociado a la producción de BLEEs en *Enterobacteriaceae*, lo que facilita la detección de estos microorganismos, pero limita enormemente las opciones terapéuticas. En la tabla 122 planteamos algunas de las posibilidades terapéuticas para los aislados productores de BLEEs

Tabla 122: Opciones terapéuticas en las infecciones por bacterias productoras de BLEEs (Oliver y Cantón, 2004)

Grupo	Antibiótico	Comentario
Betalactámico/ inhibidor de betalactamasas	Amoxicilina-ácido clavulánico	Escasa experiencia en infección sistémica. Útil en infección urinaria.
	Piperacilina-tazobactam	Variable en infección sistémica. Necesario estudio de sensibilidad.
	Cefalosporinas-ácido clavulánico	Ausencia de formulaciones.
Metoxi- betalactámicos	Cefoxitina	Desarrollo de mutantes de permeabilidad.
	Moxalactam	Escasa experiencia. Efectos secundarios.
Carbapenémicos	Imipenem Meropenem Ertapenem	Betalactámicos de elección. Hay que vigilar la aparición de resistencia en otros patógenos.
Aminoglucósidos		Necesario estudio de sensibilidad. Incremento de resistencias.
Quinolonas		Necesario estudio de sensibilidad. Incremento de resistencias.
Otros	Fosfomicina	No suelen existir resistencias cruzadas.
	Nitrofurantoína	No suelen existir resistencias cruzadas.

Aunque las asociaciones con inhibidores de betalactamasas como amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam o ticarcilina-ácido clavulánico pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones por estos microorganismos, uno de los problemas que podrían plantarse por

su uso es la posible aparición y selección de cepas tipo IRT, resistentes a estas combinaciones (Amyes y Miles, 1998).

Amoxicilina-ácido clavulánico es una buena opción para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario no complicadas por *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEEs, siempre y cuando sean sensibles, ya que es frecuente la resistencia a esta combinación por producción simultánea de otras betalactamasas, alteraciones de permeabilidad o, en menor medida, la hiperproducción de la propia BLEE. Por eso, puede ser una buena opción terapéutica en ITU en el medio extrahospitalario (Oliver y Cantón, 2004).

No obstante, para el tratamiento de infecciones del tracto urinario no complicadas producidas por *E. coli* productores de BLEEs es posible recurrir al uso de antibióticos, casi ya olvidados, pero que presentan todavía una buena actividad y para los cuales no se encuentran habitualmente resistencias cruzadas en aislados con BLEE como son fosfomicina y nitrofurantoína (70,4% de aislados sensibles en nuestro estudio).

Cefoxitina es frecuentemente activa y podría ser usada, pero este antibiótico desarrolla fácilmente resistencia por reducción de la permeabilidad, por lo que no se recomienda (Pangon *et al.*, 1989; Martínez-Martínez *et al.*, 1996).

En los aislados productores de BLEEs cefepime debe ser informado resistente aunque *in vitro* sea sensible. Así lo recomienda el NCCLS, pues en aquellos casos en los que se ha usado cefepime, se ha producido fallo terapéutico (Paterson *et al.*, 2001b).

Existen pocos estudios que evalúen *in vivo* la capacidad de cefepime y piperacilina-tazobactam como fármacos útiles en el tratamiento de infecciones por microorganismos productores de BLEEs y normalmente están basados en una escasa experiencia clínica, como es el caso del estudio de Paterson *et al.* (2001b). Thomson y Moland (2001)

evalúan la actividad *in vitro* de ocho antibióticos, entre ellos meropenem, cefepime y piperacilina-tazobactam, frente a 82 aislados de diferentes especies productoras de BLEEs solas y conjuntamente con otras betalactamasas. Para ello usan dos tipos de inóculo bacteriano, uno estándar (10^5 UFC/ml) y otro más elevado (10^7 UFC/ml). Se definió el efecto inóculo como la elevación de la CMI de cada antibiótico 8 o más veces cuando se ensayaba el antibiótico para el mayor de los inóculos bacterianos respecto al menor. Mientras que meropenem no mostró efecto inóculo y mantuvo iguales sus CMIs, cefepime sí lo mostró, pasando de mostrarse sensible en el 79% de los aislados con un inóculo estándar a tan sólo el 5% cuando el inóculo era mayor. Por su parte, piperacilina-tazobactam presentó un efecto inóculo intermedio entre los anteriores, pasando de un 95% de aislados sensibles con inóculo estándar a 58% cuando el inóculo era 10^7 UFC/ml. Estos resultados indican que, al menos, en aquellas situaciones clínicas caracterizadas por presentar un elevado inóculo bacteriano (endocarditis, meningitis, artritis sépticas, osteomielitis, abscesos...), el tratamiento con cefepime o piperacilina-tazobactam no será útil.

Sin duda, los antibióticos carbapenémicos son el tratamiento de elección y, a veces, una de las escasas opciones terapéuticas para los aislados productores de BLEEs, consecuencia de la presencia de resistencias a otros grupos de antibióticos. Algunos estudios indican que en este sentido, el antibiótico carbapenémico más útil es ertapenem, con una CMI₉₀ de 0,06 µg/ml, frente a 0,5 µg/ml de imipenem, 16 µg/ml de cefepime o más de 128 µg/ml de piperacilina-tazobactam en aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEEs (Livermore *et al.*, 2001). Sin embargo, resulta cuando menos preocupante, que como muestra el estudio de Fernández *et al.* (2004), el 41,2% de los aislados de *A. baumannii* de los hospitales españoles sean resistentes al imipenem y el

49,8% a meropenem, alcanzando en algunos hospitales cifras del 60% (Gallego *et al.*, 2004). Mientras que, según algunos estudios, la infección por *A. baumannii* (tanto sensible como resistente a carbapenemas) se relaciona con la estancia en UCIs y el uso previo de cefalosporinas de amplio espectro, sólo la infección por *A. baumannii* resistente a antibióticos carbapenémicos se relaciona con la presión selectiva previa por estos mismos antibióticos (Lee *et al.*, 2004). Esto ha permitido que, en aquellos hospitales que han usado extensamente el uso de antibióticos carbapenémicos para el tratamiento de infecciones por BLEEs, como el hospital de Bellvitge (Barcelona), hayan aumentado las tasas de *A. baumannii* resistente a carbapenemas (Corbella *et al.*, 2000).

Cuando los microorganismos productores de BLEEs son sensibles a las fluorquinolonas, éstos son antibióticos útiles en su tratamiento (Karas *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios recientes demuestran que hasta un 55% de estos aislados son resistentes a fluorquinolonas (Lautenbach *et al.*, 2001b), alcanzando nosotros cifras superiores al 65% como hemos visto.

6. CONCLUSIONES

1. Destacamos en nuestro medio una elevada presencia de aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* productores de betalactamasas de espectro extendido, fundamentalmente en la primera especie. Estos datos están de acuerdo con la tendencia ascendente de las cifras descritas para *Escherichia coli* en las diversas publicaciones nacionales e internacionales.
2. En nuestra serie se encontraron los tipos de betalactamasas de espectro extendido CTX-M9 y SHV con un predominio importante de la primera. Esta distribución es coincidente con los estudios realizados en otros centros hospitalarios del país en los que se ha descrito aumento de la presencia de enzimas del grupo CTX-M.
3. La mayor parte de las especies productoras de betalactamasas de espectro extendido se aislaron a partir de muestras de origen extrahospitalario, con un predominio de la orina y de enfermos de género femenino. Esto puede estar en relación con el importante uso de cefalosporinas orales de tercera generación en el medio extrahospitalario y la elevada frecuencia de las infecciones del tracto urinario en el sexo femenino.
4. Los estudios de clonalidad de los aislados hospitalarios de *Escherichia coli* del período Octubre-Noviembre de 2002 pusieron de manifiesto la ausencia de una distribución clonal, incluso entre aislados productores de la misma BLEE.
5. El estudio de la capacidad de detección fenotípica de los aislados productores de enzima por el sistema VITEK 2 puso de

manifiesto un buen comportamiento diagnóstico, que no hace necesario confirmar, por métodos estandarizados, los resultados obtenidos. Por el contrario, el sistema WIDER careció de un valor predictivo positivo adecuado, quizás debido a la falta de actualización en éste de los criterios que definen la presencia de las enzimas.

6. Entre los métodos no automatizados la prueba de Epsilon con cefotaxima y cefotaxima-ácido clavulánico mostró una alta rentabilidad diagnóstica. No obstante, ante la posibilidad de que pudieran aparecer enzimas tipo SHV y/o TEM con un perfil de sustrato diferente al hallado en esta serie, pensamos que se deben usar simultáneamente con los E-test de ceftazidima y ceftazidima-ácido clavulánico.
7. El método de doble difusión con discos de cefalosporinas de tercera generación y aztreonam junto con una fuente de ácido clavulánico mostró una alta rentabilidad diagnóstica en la detección de aislados productores del enzima. Pensamos que puede constituir una alternativa en la práctica rutinaria del laboratorio clínico debido a que no requieren material específico.
8. En base a los resultados obtenidos pensamos, que, en la práctica clínica, la búsqueda de betalactamasas de espectro extendido en las especies *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. se debería realizar de forma rutinaria. En el caso de muestras procedentes de enfermos hospitalizados el sistema VITEK 2 constituye una opción válida por la precisión y rapidez en los resultados emitidos. Para muestras de origen comunitario la utilización de procedimientos con discos de cefalosporinas de tercera

generación, con o sin aztreonam, junto con ácido clavulánico constituye una alternativa rentable para la detección de estas enzimas.

9. Nuestros aislados clínicos productores de enzimas mostraron una resistencia asociada importante a fluorquinolonas de primera y segunda generación, pero no a aminoglucósidos. También mostraron importante actividad meropenem, piperacilina-tazobactam y amoxicilina-ácido clavulánico, constituyendo todas éstas las alternativas terapéuticas usadas en el medio intra y extrahospitalario

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EP y Chain E. 1940. *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*. Nature 146:837.
- Afazal-Shah M, Woodford N y Livermore DM. 2001. *Characterization of OXA-25, OXA-26 and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 45:583-588.
- Ahmad M, Urban C, Mariano N, et al. 1999. *Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. 29:352-355.
- Alonso R, Gerbaud G, Galimand M, et al. 2002. *TEM-103/IRT-28 beta-lactamase, a new TEM variant produced by Escherichia coli BM4511*. Antimicrob. Agents Chemother. 46:3627-3629.
- Álvarez-Lerma F, Palomar M, Olaechea P, et al. 2001. *Cefotaxima, 20 años después. Estudio observacional en pacientes críticos*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 19:211-218.
- Álvarez-Lerma F, Gasula M, Abad V, et al. 2002. *Efectividad del aislamiento de contacto en el control de bacterias multirresistentes en un servicio de medicina intensiva*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20:57-63.
- Ambler RP. 1980. *The structure of betalactamase*. Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. 289:321-331.
- Amyes SGB y Miles RS. 1998. *Extended-spectrum β -lactamases: the role of inhibitors in therapy*. J. Antimicrob. Chemother. 42:415-417.
- Asensio A, Oliver A, González-Diego P, et al. 2000. *Outbreak of a multiresistant Klebsiella pneumoniae strain in an intensive care unit: Antibiotic use as a risk factor for colonization and infection*. Clin. Infect. Dis. 30:55-60.
- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, et al. 1991. *Comparison of the E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria*. J. Clin. Microbiol. 29:533-538.

- Baquero F, Reguera JA, Ojeda M, *et al.* 1988. *Escherichia coli con resistencia a cefalosporinas de tercera generación codificadas por betalactamasas de tipo plasmídico: primer brote en España.* Rev. Esp. Microbiol. Clin. 581-582.
- Barroso H, Freitas-Vieira A, Lito LM, *et al.* 2000. *Survey of Klebsiella pneumoniae extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme.* J. Antimicrob. Chemother. 45:611-616.
- Barthélémy M, Peduzzi J y Labia R. 1985. *Distinction entre les structures primaires des β -lactamases TEM-1 et TEM-2.* Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 136:311-321.
- Bauernfeind A, Grimm H y Schweighart S. 1990. *A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli.* Infection 18:294-298.
- Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, *et al.* 1992. *A new plasmidic cefotaximase from patients infected with Salmonella typhimurium.* Infection 20: 158-163.
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, *et al.* 1996. *Characterization of β -lactamase gene bla_{PER-2} which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase.* Antimicrob. Agents Chemother. 40:616-620.
- Bennett PM y Chopra I. 1993. *Molecular basis of betalactamase induction in bacteria.* Antimicrob. Agents Chemother. 37:153-158.
- Bermejo J, Lesnaberes P, Arnesi N, *et al.* 2003. *Factores de riesgo asociados con las infecciones debidas a Klebsiella pneumoniae resistente a ceftazidima.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21:72-76.
- Bermudes H, Jude F, Chaibi EB, *et al.* 1999. *Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase in a clinical isolate of Klebsiella oxytoca.* Antimicrob. Agents Chemother. 43:1657-1661.
- Bolmström A, Qwörnström A, Karlsson A, *et al.* 1999. *Validation of new Etest ESBL strips for the detection and confirmation of strains producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL): a trial using FDA criteria for susceptibility testing devices.* 39 Interscience

Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society of Microbiology, Washington D.C. Póster 0898.

Bolmström A, Engerlhardt A y Wanger A. 2002. *Cefepime ± clavulanic acid in a E-test configuration for investigating non-determinable (ND) ESBL results for NCCLS criteria*. 42 Congreso ICAAC. Chicago. Póster D-527.

Bonfiglio G y Livermore DM. 1994. *Betalactamase types and amongst Staphylococcus aureus isolates in relation to susceptibility to betalactamase inhibitors combinations*. J. Antimicrob. Chemother. 33:465-481.

Bonnet R, Champs CD, Sirot D, *et al.* 1999. *Diversity of TEM mutants in Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2671-2677.

Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, *et al.* 2000. *A novel class A extended spectrum β -lactamase (BES-1) in Serratia marcescens isolated in Brazil*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:3061-3068.

Bonomo RA, Currie C y Ahlaes DM. 1992. *OHIO-1 β -lactamase resistant to mechanism-based inactivators*. FEMS Microbiol. Lett. 71:79-82.

Bou G, Oliver A y Martínez-Beltrán J. 2000. *OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an Acinetobacter baumannii clinical strain*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1556-1561.

Bradford PA, Urban C, Mariano N, *et al.* 1997. *Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase and the loss of an outer membrane protein*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:563-569.

Bradford PA. 2001. *Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clin. Microbiol. Rev. 14:933-951.

Bret L, Chanal C, Sirot D, *et al.* 1996. *Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by Proteus mirabilis strains*. J. Antimicrob. Chemother. 38:183-191.

- Bush K y Sykes RB. 1983. *Betalactamase inhibitors in perspective*. J. Antimicrob. Chemother. 11:97-107.
- Bush K. 1989. *Characterization of β -lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 33:259-263.
- Bush K, Jacoby GA y Medeiros AA. 1995. *A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1211-1233.
- Cantón R y Oliver A. *Beta-lactamase assay*. 2000. En: Antimicrobial resistance a laboratory approach. Ed: bioMérieus España S.A. 43-55.
- Cantón R, Pérez-Vázquez M, Oliver A, *et al.* 2000. *Evaluation of the Wider system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing*. J. Clin. Microbiol. 38:1339-1346.
- Cantón R, Pérez-Vázquez M, Oliver A, *et al.* 2001. *Validation of the VITEK2 and the Advance Expert System with a collection of Enterobacteriaceae harboring extended spectrum or inhibitor resistant β -lactamases*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 41:65-70.
- Cantón R, Oliver A, Coque TM, *et al.* 2002. *Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacter isolates in a spanish hospital during a 12 year period*. J. Clin. Microbiol. 40:1237-1243.
- Cantón R, Loza E, Conejo MC, *et al.* 2003. *Quality control for β -lactam susceptibility testing with a well-defined collection of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa strains in Spain*. J. Clin. Microbiol. 41:1912-1918.
- Carter MW, Onkton KJ, Warner M, *et al.* 2000. *Detection of extended-spectrum beta-lactamase in Klebsiellae with Oxoid combination disk method*. J. Clin. Microbiol. 38:4228-4232.
- Chaibi EB, Sirot D, Paul G, *et al.* 1999. *Inhibitor-resistant TEM- β -lactamase phenotype, genetic and biochemical characteristics*. J. Antimicrob. Chemother. 43:447-458.

- Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, *et al.* 2002a. *Genes encoding TEM-4, SHV-2 and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000).* Antimicrob. Agents Chemother. 46:500-510.
- Coque TM, Varela MC, Oliver A, *et al.* 2002b. *Cambio epidemiológico en las β -lactamasas de espectro extendido. Hospital Ramón y Cajal (1988-2000): De SHV a CTX-M.* X Congreso de la SEIMC. Comunicación 346. Sevilla.
- Corbella X, Montero A, Pujol M, *et al.* 2000. *Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii.* J. Clin. Microbiol. 38:4086-4095.
- Cormican MG, Marshall SA y Jones RN. 1996. *Detection of extended-spectrum betalactamases (ESBL)-producing strains by E-test ESBL screen.* Antimicrob. Agents Chemother. 34:1880-1884.
- Costa A y Botta GA. 1984. *Resumption of cell division in filaments induced in Escherichia coli by β -lactam antibiotics possessing affinity for PBP3.* Drugs Exp. Clin. Res. 10:775-780.
- Coudron PE, Moland ES y Sanders CC. 1997. *Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamses in members of the family Enterobacteriaceae in a Veterans Medical Center: seek and you may find.* J. Clin. Microbiol. 35:2593-2597.
- Danel F, Hall LMC, Duke B, *et al.* 1999. *OXA-17, a further extended-spectrum β -lactamase variant of OXA-10 β -lactamase isolated from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. 43:1362-1366.
- Datta N y Kontomichalon P. 1965. *Penicilinase synthesis controlled by infections R factors in Enterobacteriaceae.* Nature 208:239-244.
- De Champs C, Sirot D, Chanal C, *et al.* 2000. *A 1998 survey of extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in France.* Antimicrob. Agents Chemother. 44:3177-3179.
- Decré K, Gachot B, Lucet JC, *et al.* 1998. *Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing*

strains of Klebsiella pneumoniae in a medical intensive care unit. Clin. Infect. Dis. 27:834-844.

Du Bois SK, Marriott MS y Amyes SGB. 1995. *TEM and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function.* J. Antimicrob. Chemother. 35:7-22.

Dumarche P, Champs C, Sirot D, *et al.* 2002. *TEM derivative-producing Enterobacter aerogenes strains: dissemination of a prevalent clone.* Antimicrob. Agents Chemother. 46:1128-1131.

Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, *et al.* 2003. *Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian Hospitals.* Antimicrob. Agents Chemother. 47:3724-3732.

El Harrif-Heraud Z, Arpin C, Benliman S, *et al.* 1997. *Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4 producing strains of Citrobacter diversus.* J. Clin. Microbiol. 35:2561-2567.

Emery CL y Weywouth LA. 1997. *Detection and clinical significance of extended spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center.* J. Clin. Microbiol. 35:2061-2067.

Fernández F, Pascual A, Ribera A, *et al.* 2004. *Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de Acinetobacter baumannii aislados en hospitales españoles.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22:267-271.

Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, *et al.* 1992a. *Primera epidemia española de resistencia plasmídica a cefalosporinas de tercera generación: implicación de SHV-2.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 10:426-461.

Fernández-Rodríguez A, Cantón R, Pérez-Díaz JC, *et al.* 1992b. *Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum β -lactamases.* Antimicrob. Agents Chemother. 36:2536-2538.

Gales AC, Sader HS, Sinto S, *et al.* 1996. *In vitro activity of ampicillin-sulbactam againsts clinical multiresistant Acinetobacter baumannii isolates.* J. Chemother. 8:416-419.

- Gallego L, Canduela MJ, Sevillano E, *et al.* 2004. *Detección de carbapenemasas en clones de Acinetobacter baumannii resistentes a imipenem.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22:262-266.
- García P. 2002. *Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro.* Rev. Chil. Infect. 19:96-100.
- García-Rodríguez JA, Cantón R, García-Sánchez JE, *et al.* 2000. *Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.* En: Picazo JJ ed. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Disponible en: (<http://www.seimc.org>).
- Gobernado M, Bouza E, Perea E, *et al.* 1998. *Estudio multicéntrico nacional de la actividad in vitro de piperacilina/tazobactam.* Rev. Esp. Quimioterap. 11:139-146.
- Gutiérrez J, Hoyos A y Piédrola G. 1996. *Synergy between aminoglycosides and penicillin, teicoplanin and ceftiofime in enterococci.* J. Antimicrob. Chemother. 38:751-752.
- Hadziyannis E, Tuohy M, Thomas L, *et al.* 2000. *Screening and confirmatory testing for extended spectrum β -lactamases (ESBL) in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Klebsiella oxytoca clinical isolates.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 36:113-117.
- Hanson ND. 2003. *AmpC β -lactamases: what do we need to know for the future?.* J. Antimicrob. Chemother. 52:2-4.
- Henquell C, Chanal C, Sirot D, *et al.* 1995. *Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of Escherichia coli.* Antimicrob. Agents Chemother. 39:427-430.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, *et al.* 2002a. *Proyecto GEIH-BLEE 2000: Relación clonal y estudio de sensibilidad a antimicrobianos de interés clínico en E. coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hospitales españoles.* X Congreso de la SEIMC. Comunicación 334. Sevilla.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, *et al.* 2002b. *Proyecto GEIH-BLEE 2000: Relación clonal y estudio de sensibilidad a antimicrobianos de interés clínico en K. pneumoniae productora*

de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hospitales españoles. X Congreso de la SEIMC. Comunicación 335. Sevilla.

Hernández JR, Pascual A, Cantón R, *et al.* 2003a. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:77-82.

Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, *et al.* 2003b. *Diversity of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) among Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a nationwide study in Spain.* 43th I.C.A.A.C. Abstract C2-57. Chicago.

Ho PL, Chow KH, Yuen KY, *et al.* 1998. *Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsidella pneumoniae.* *J. Antimicrob. Chemother.* 42:49-54.

Huletsky A, Couture F y Levesque RC. 1990. *Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 β -lactamase.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1725-1732.

Huletsky A, Knox JR y Levesque RC. 1993. *Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling.* *J. Biol. Chem.* 268:3690-3697.

Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, *et al.* 2002. *β -lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3045-3049.

Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, *et al.* 1995. *Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from Escherichia coli.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2269-2275.

Jacoby GA y Sutton L. 1991. *Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:164-169.

Jacoby GA y Han P. 1996. *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli.* *J. Clin. Microbiol.* 34:908-911.

- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, *et al.* 1988. *Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns.* Rev. Infect. Dis. 10:967-978.
- Johnson DM, Biedenbach DJ y Jones RN. 2002. *Potency and antimicrobial spectrum update for piperacilin-tazobactam 2000: Emphasis on its activity against resistant organisms populations and generally untested species causing community-acquired respiratory tract infections.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 43:49-60.
- Jones RN. 1985. *Review of the in vitro spectrum of activity of imipenem.* Am. J. Med. 78:22-32.
- Jones RN. 2001. *Method preferences and test accuracy of antimicrobial susceptibility testing: Updates from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program.* Arch. Pathol. Lab. Med. 125:1285-1289.
- Karas JA, Pillay DG y Muckart D. 1996. *Treatment failure due to extended-spectrum β -lactamase.* J. Antimicrob. Chemother. 37:203-204.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, *et al.* 1985. *Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins.* Antimicrob. Agents Chemother. 28:302-307.
- Knothe H, Shah P, Krcméry V, *et al.* 1983. *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens.* Infection 11:315-317.
- Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, *et al.* 2001a. *Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes.* Clin. Infect. Dis. 32:1162-1171.
- Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, *et al.* 2001b. *Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.* Clin. Infect. Dis. 33: 1288-1294.

- Lázaro E, Oteo J, Baquero G, *et al.* 2004. *Evolución del consumo y de la resistencia a quinolonas en la comunidad en España*. XI Congreso de la SEIMC. Comunicación 236. Bilbao.
- Lee SO, Kim NJ, Choi SH, *et al.* 2004. *Risk factors for acquisition of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii: a case-control study*. Antimicrob. Agents Chemother. 48:224-228.
- Lefton-Guibout V, Speldooren V, Heym B, *et al.* 2000. *Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in Escherichia coli isolates in France: new genetic features of bla_{TEM} genes*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:2709-2714.
- Legrand P, Fournier G, Bure A, *et al.* 1989. *Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in four French hospitals*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8:527-529.
- Lemozy J, Sirot D, Chanal C, *et al.* 1995. *First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamase in Klebsiella pneumoniae strains*. Antimicrob. Agents Chemother. 33:2580-2582.
- Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, *et al.* 2002. *Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant Escherichia coli and Klebsiella spp.* J. Clin. Microbiol. 40:3703-3711.
- Lewis MT, Yamaguchi K, Biedenbach DJ, *et al.* 1999. *In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum β -lactams in 22 medical centers in Japan: a phase II trial comparing two annual organism samples. The Japan Antimicrobial Resistance Study Group*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 35:307-315.
- Ling M, Ishii Y, Ishiguro M, *et al.* 1998. *Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam*. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1181-1186.
- Livermore DM. 1987. *Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods*. Eur. J. Clin. Microbiol. 6:439-445.

- Livermore DM. 1995. *β -lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin. Microbiol. Rev. 8:557-584.
- Livermore DM, Gill MJ y Wise R. 1995. *Mechanisms of resistance to the carbapenems*. J. Antimicrob. Chemother. 35:1-5.
- Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, et al. 2001. *Activity of Ertapenem (MK-0826) versus Enterobacteriaceae with potent β -lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2831-2837.
- Livermore DM, Struelens M, Amorim J, et al. 2002. *Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests*. J. Antimicrob. Chemother. 49:289-300.
- Lucet JC, Chevres S, Decré D, et al. 1996. *Outbreak of multiply resistant Enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition*. Clin. Infect. Dis. 22:430-436.
- Marchandin H, Carriere C, Sirot D, et al. 1999. *TEM-24 produced by four different species of Enterobacteriaceae including Providencia rettgeri, in a single patient*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2069-2073.
- Martín L, Toro I, Díaz J, et al. 2002. *Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido*. XV Congreso SAMPAC. Comunicación 3.14. Málaga.
- Martínez JL, Vicente MF, Delgado A, et al. 1989. *Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 33:595.
- Martínez-Martínez L, Hernández S, Albertí S, et al. 1996. *In vivo selection of porin deficient mutants of Klebsiella pneumoniae with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins*. Antimicrob. Agents Chemother. 40:342-348.
- Martínez-Martínez L, Pascual A y Jacoby GA. 1998. *Quinolone resistance from a transferable plasmid*. Lancet 351:797-799.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández S, et al. 1999. *Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1669-1673.

- Martins-Loureiro M, Moraes BA, Lorenzalo-Furtado V, *et al.* 2001. *Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases-producing Klebsiella pneumoniae isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil.* Rev. Latinoam. Microbiol. 43:88-95.
- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, *et al.* 1975. *The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases.* J. Gen. Microbiol. 88:169-178.
- Medeiros A, Mayer KH y Opal SM. 1988. *Plasmid-mediated β -lactamases.* Antimicrob. Nexsl. 5:61-65.
- Meyers KS, Urban C, Eagan JA, *et al.* 1993. *Nosocomial outbreak of Klebsiella pneumoniae resistant to late-generation cephalosporins.* Annals. Intern. Med. 119:353-358.
- Miró E, del Cuerpo M, Navarro F, *et al.* 1998. *Emergence of clinical Escherichia coli isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction.* J. Antimicrob. Chemother. 42:535-538.
- Mirelis B, Navarro F, Miró E, *et al.* 2003. *Community transmission of extended-spectrum β -lactamase.* Emerg. Infect. Dis. 9:1024-1025.
- Moland ES, Sanders CC y Thomson KS. 1998. *Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of beta-lactamase production among Escherichia coli and Klebsiella isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam?.* J. Clin. Microbiol. 36:2575-2579.
- Moreno A, Sánchez R, Batista N, *et al.* 2004. *Prevalencia y epidemiología de aislados clínicos de Escherichia coli y Klebsiella spp. productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el periodo 1999-2003.* XI Congreso de la SEIMC. Comunicación 099. Bilbao.
- Morosini ML, Cantón R, Martínez-Beltrán J, *et al.* 1995. *New extended-spectrum TEM-type β -lactamase from Salmonella enterica subsp. Enterica isolated in a nosocomial outbreak.* Antimicrob. Agents Chemother. 39:458-461.

- Mugnier P, Dubrous P, Casin I, *et al.* 1996. *A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. 40:2488-2493.
- Munday CJ, Xiong J, Li C, *et al.* 2004. *Dissemination of CTX-M type beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolates in the People's Republic of China.* Int. J. Antimicrob. Agents. 23:175-180.
- Mullis J, Faloona K, Scharf S *et al.* 1986. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.* Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-271.
- Murray BJ. 1992. *Betalactamase producing enterococci.* Antimicrob. Agents Chemother. 36:2355-2359.
- M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, *et al.* 2000. *Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disk and the Etest ESBL.* J. Antimicrob. Chemother. 45:881-885.
- Naas T, Sougakoff W, Casetta A, *et al.* 1998. *Molecular characterization of OXA-20, a novel class D β -lactamase, and its integron from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. 42:2074-2083.
- Naas T, Philippon L, Poirel L, *et al.* 1999. *An SHV derived extended-spectrum β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. 43:1281-1284.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003a. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* Approved standard M2-A8. NCCLS, Wayne, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003b. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved standard M7-A6. NCCLS, Wayne, PA
- Navarro F, Miró E y Mirelis B. 2002. *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20:225-234.

- Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, *et al.* 2003. *Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use.* JAMA. 289:885-888.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, *et al.* 1993. *Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. 37:962-969.
- Nordmann P, Poirel L, Kubina M, *et al.* 2000. *Biochemical-genetic characterization and distribution of OXA-22, a chromosomal and inducible class D β -lactamase from Ralstonia (Pseudomonas) pichettii.* Antimicrob. Agents Chemother. 44:2201-2204.
- Nüesch-Inderbinnen MT, Hächler H y Kayser FH. 1996. *Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E-test.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:398-402.
- Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM, *et al.* 2001. *Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain.* Antimicrob. Agents Chemother. 45:616-620.
- Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, *et al.* 2002. *Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in Escherichia coli.* Antimicrob. Agents Chemother. 46:3829-3836.
- Oliver A y Cantón R. 2004. *Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido.* En: Control de Calidad de la SEIMC. Disponible en: (<http://www.seimc.org>).
- Oteo J y Campos J. 2004. *Uso de quinolonas y resistencia.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22:201-203.
- Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, *et al.* 2002. *Emerging extended-spectrum β -lactamases in Proteus mirabilis.* J. Clin. Microbiol. 40:1549-1552.
- Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, *et al.* 2003. *Multiple CTX-M type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy.* J. Clin. Microbiol. 41:4264-4269.

- Pangon B, Bizet C, Bure A, *et al.* 1989. *In vivo* selection of a cephamycin-resistant porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 β -lactamase. *J. Infect. Dis.* 159:1005-1006.
- Paterson DL y Yu VL. 1999. *Extended-spectrum β -lactamases: A call for improved detection and control.* *Clin. Infect. Dis.* 29:1419-1422.
- Paterson JE, Hardin TC, Kelly CA, *et al.* 2000a. *Association of antibiotic utilization measures and control of multiple drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*.* *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 21:455-458.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, *et al.* 2000b. *Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia.* *Clin. Infect. Dis.* 30:473-478.
- Paterson DL, Singh N, Rihs JD, *et al.* 2001a. *Control of an extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit.* *Clin. Infect. Dis.* 33:126-128.
- Paterson DL, Ko WC, Gottberg A, *et al.* 2001b. *Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory.* *J. Clin. Microbiol.* 39:2206-2212.
- Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, *et al.* 2003. *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.* 47:3554-3560.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, *et al.* 1998. *Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:53-58.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, *et al.* 2001a. *An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum β -lactamase.* *J. Hosp. Infect.* 47:53-59.

- Peña C, Pujol M, Ricart A, *et al.* 2001b. *Risk factors for faecal carriage of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit.* J. Hosp. Infect. 35:9-16.
- Perilli M, Segatore B, Massis MRD, *et al.* 2000. *TEM-72, a new extended-spectrum β -lactamase detected in Proteus mirabilis and Morganella morganii in Italy.* Antimicrob. Agents Chemother. 44:2537-2539.
- Philippon A, Labia R y Jacoby G. 1989. *Extended-spectrum β -lactamases.* Antimicrob. Agents Chemother. 33:1131-1136.
- Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, *et al.* 1997. *OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. 41:2188-2195.
- Poirel L, Naas T, Guibert M, *et al.* 1999. *Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene.* Antimicrob. Agents Chemother. 43:573-581.
- Primarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, *et al.* 1997. *Emergence of an inhibitor resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant.* Antimicrob. Agents Chemother. 41:838-840.
- Queenan AM, Foleno B, Gownley C, *et al.* 2004. *Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology.* J. Clin. Microbiol. 42:269-275.
- Quinteros M, Radice M, Gardella N, *et al.* 2003. *Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals.* Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2864-2867.
- Rahal JJ, Urban C, Horn D, *et al.* 1998. *Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial Klebsiella.* JAMA 280:1233-1237.
- Rasheed JK, Jay C, Metchock B, *et al.* 1997. *Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of Escherichia*

coli during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:647-653.

Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, *et al.* 2000. *Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, Klebsiella pneumoniae K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2382-2388.

Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, *et al.* 1991. *Factors determining resistance to betalactam combined with betalactamase inhibitors in Escherichia coli.* *J. Antimicrob. Chemother.* 27:569-575.

Rice LB, Yao JDC, Klimm K, *et al.* 1991. *Efficacy of different β -lactams against an extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae strain in the rat intra-abdominal abscess model.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1243-1244.

Rice LB, Carias LL, Bonomo RA, *et al.* 1996a. *Molecular genetics of resistance to both ceftazidime and β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in Klebsiella pneumoniae and in vivo response to β -lactam therapy.* *J. Infect. Dis.* 173:151-158.

Rice LB, Eckstein EC, DeVente J, *et al.* 1996b. *Ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center.* *Clin. Infect. Dis.* 23:118-124.

Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, *et al.* 2004. *Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli in nonhospitalized patients.* *J. Clin. Microbiol.* 42:1089-1094.

Romero L, Martínez-Martínez L, Rodríguez J, *et al.* 2004. *Frecuencia y distribución de cepas de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en el área norte de Sevilla en el periodo 1995-2003.* XI Congreso de la SEIMC. Comunicación 010. Bilbao.

Rosenan A, Cattier B, Gosset N, *et al.* 2000. *Capnocytophaga ochracea, characterization of a plasmid-encoded extended-spectrum TEM-17 β -lactamase in the phylum Flavobacter-Bacteroides.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:760-762.

- Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, *et al.* 1999. *Cloning of a Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum chromosomal gene (bla_{CME}) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the Bacteroides cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases.* Antimicrob. Agents Chemother. 43:2193-2199.
- Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, *et al.* 2000. *Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from Escherichia coli in Spain.* Antimicrob. Agents Chemother. 44:1970-1973.
- Sabaté M, Miró E, Navarro F, *et al.* 2002. *β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in Escherichia coli and Klebsiella spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain).* J. Antimicrob. Chemother. 49:989-997.
- Samaha-Kfoury JN y Araj GF. 2003. *Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases.* BMJ 327:1209-1213.
- Sanders CC. 1987. *Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer betalactam antibiotics.* Am. Rev. Microbiol. 41:573-593.
- Sanders CC, Barry AL, Washington JA, *et al.* 1996. *Detection of extended-spectrum β -lactamase producing members of the family Enterobacteriaceae with the Vitek ESBL test.* J. Clin. Microbiol. 34:2997-3001.
- Sanders CC, Peyret M, Moland ES, *et al.* 2000. *Ability of the VITEK 2 Advanced Expert System to identify β -lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa.* J. Clin. Microbiol. 38:570-574.
- Saurina G, Quale JM, Manikal VM, *et al.* 2000. *Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, New York: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns.* J. Antimicrob. Chemother. 45:895-898.
- Shehabi AA, Mahafzah A, Baadran I, *et al.* 2000. *High incidence of Klebsiella pneumoniae clinical isolates to extended-spectrum β -*

lactams drugs in intensive care units. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36:53-56.

Silva J, Aguilar C, Ayala G, *et al.* 2000. *TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:997-1003.

Silva J, Gatica R, Aguilar C, *et al.* 2001. *Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a Mexican hospital*. *J. Clin. Microbiol.* 39:3193-3196.

Sirot D, Recule C, Chaibi EB, *et al.* 1997. *A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15 produced by an Escherichia coli clinical isolate*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1322-1325.

Siu LK, Lu PL, Hsueh PR, *et al.* 1999. *Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes*. *J. Clin. Microbiol.* 37:4020-4027.

Siu LK, Lo JYC, Yuen KY, *et al.* 2000. *β -lactamases in Shigella flexneri isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like β -lactamase, OXA-30*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2034-2038.

Sougakoff W, Goussard S y Courvalin P. 1988. *The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 56:343-348.

Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, *et al.* 2002. *Occurrence to 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.* 46:196-202.

Spratt BG. 1983. *Penicillin-binding proteins and the future of betalactam antibiotics*. *J. Gen. Microbiol.* 129:1247-1260.

- Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, *et al.* 2001. *Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods.* J. Clin. Microbiol. 39:2864-2872.
- Strausbaugh LJ, Crossley KB, Nurse BA, *et al.* 1996. *Antimicrobial resistance in long-term-care facilities.* Infect. Control Hosp. Epidemiol. 17:129-140.
- Sturenburg E, Sobottka I, Feucht HH, *et al.* 2003. *Comparison of BDPhoenix and VITEK2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-spectrum beta-lactamase detection in Escherichia coli and Klebsiella species clinical isolates.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 45:29-34.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* 1995. *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing.* J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239.
- Tenover FC, Mohammed MJ, Stelling J, *et al.* 2001. *Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: Proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing.* J. Clin. Microbiol. 39: 241-250.
- Thomson KS y Sanders CC. 1992. *Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests.* Antimicrob. Agents Chemother. 36:1877-1882.
- Thomson KS y Sanders CC. 1997. *A simple and reliable method to screen isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae for the production of TEM and SHV derived extended spectrum β -lactamases.* Clin. Microbiol. Infect. 3:549-554.
- Thomson KS. 2001. *Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases.* Emerg. Infect. Dis. 7:333-336.
- Thomson KS y Moland ES. 2001. *Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β -*

lactamase producing Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. 45:3548-3554.

Tipper DJ y Strominger JL. 1965. *Mechanism of action of peniciline: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 54:1133-1141.

Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, *et al.* 2004. *Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains*. Clin. Microbiol. Infect. 10:72-75.

Tomasz A. 1979. *The mechanism or irreversible antimicrobial effects of penicillin: How the betalactam antibiotics kill and lyse bacteria*. Ann. Rev. Microbiol. 33:113-137.

Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, *et al.* 2000. *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacter cloacae and Enterobacter aerogenes*. J. Clin. Microbiol. 38:542-546.

Tzouvelekis LS, Gazouli M, Markogiannakis A, *et al.* 1998. *Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst Salmonella typhimurium isolates in Greece report of the first three cases*. J. Antimicrob. Chemother. 42:273-275.

Tzouvelekis LS y Bonomo RA. 1999. *SHV type β -lactamase*. Curr. Pharm. Des. 5:847-864.

Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC, Katsanis G, *et al.* 1999. *Rare case of failure by an automated system to detect extended-spectrum beta-lactamase in a cephalosporin-resistant Klebsiella pneumoniae isolate*. J. Clin. Microbiol. 37:2388.

Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, *et al.* 2000. *CTX-M-type β -lactamases an emerging group of extended-spectrum enzymes*. Int. J. Antimicrob. Agents 14:137-143.

Vahaboglu H, Öztürk R, Aygün G, *et al.* 1997. *Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial Acinetobacter and Pseudomonas aeruginosa isolates in Turkey: a nationwide multicenter study*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2265-2269.

- Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, *et al.* 1997. *Comparison of screening methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of Escherichia coli and Klebsiella sp. in a Belgian teaching hospital.* J. Clin. Microbiol. 35:2191-2197.
- Vila J, Navia M, Ruiz J, *et al.* 1997. *Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA derived β -lactamase in Acinetobacter baumannii.* Antimicrob. Agents Chemother. 41:2757-2759.
- Vila J y Marco F. 2002. *Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20:304-312.
- Weill FX, Demartin M, Tandé D, *et al.* 2004. *SHV-12-like extended-spectrum β -lactamase producing strains of Salmonella enterica serotypes babelsberg and enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali.* J. Clin. Microbiol. 42:2432-2437.
- Wiedemann B, Kliebe C y Kresken M. 1989. *The epidemiology of betalactamasas.* J. Antimicrob. Chemother. 24:1-22.
- Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, *et al.* 1999. *Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and Escherichia coli in nurseries homes.* JAMA 281:517-523.
- Winokur PL, Cantón R, Casellas JM, *et al.* 2001. *Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region.* Clin. Infect. Dis. 32:94-103.
- Wu TL, Siu LK, Su LH, *et al.* 2001. *Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -lactamases lead to false identification of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae.* J. Antimicrob. Chemother. 47:755-761.
- Yeste R, Martínez A, Bautista MF, *et al.* 2002. *Estudio de la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEEs en muestras de orina.* XV Congreso SAMPAC. Comunicación 3.15. Málaga.
- Zhou XY, Borden F, Sirot D, *et al.* 1994. *Emergence of clinical isolates of Escherichia coli producing TEM-1 derivatives of an OXA-1*

betalactamase conferring resistance to betalactamase inhibitor.
Antimicrob. Agents Chemother. 38:1085-1089.