

RESULTADOS

---

## 1) Número de cepas estudiadas

---

Durante el trienio 1997-1999, en el laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, se seleccionaron mediante técnica de difusión en agar las cepas de enterobacterias que presentaron sensibilidad disminuida a C3G y/o aztreonam, y sinergia con el ácido clavulánico, con el fin de detectar las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEAs) y cefamicinasas plasmídicas.

Se descartaron las cepas hiperproductoras de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica en función de su resistencia a penicilinas, C1G, C2G, cefamicinas y/o en menor medida a C3G y a la ausencia de sinergia entre el ácido clavulánico y las C3G. Con este criterio de 7705 cepas de *E. coli* se seleccionaron 41; de 491 cepas de *K. pneumoniae*, se seleccionaron 11 cepas; de 913 cepas de *S. enterica*, fueron seleccionadas dos; y finalmente, de 948 cepas de *P. mirabilis* se seleccionó solamente una cepa.

## 2) Características clínicas de los pacientes

---

### 2.1 Pacientes a los que se le aisló *Escherichia coli*

Se estudiaron 41 cepas de *E. coli*. Cinco cepas correspondieron a un mismo paciente (A), mientras que de dos pacientes (B y C) se aislaron dos y tres cepas respectivamente. Los 31 restantes fueron aisladas de diferentes pacientes.

Del paciente A, las cepas de *E. coli* se aislaron de cinco muestras de orina, encontradas con aproximadamente 4 semanas de diferencia entre cada una de ellas. Las cinco cepas presentaron igual biotipo y serogrupo. Cuatro cepas mostraron similar patrón de resistencia; presentando dos  $\beta$ -lactamasas, con pI de 5,2 y 5,4. Mientras que en la última se tenía una  $\beta$ -lactamasa con pI de 5,6 y presentó un patrón de mayor resistencia. Por lo dicho, para el paciente A sólo se consideran dos muestras para el estudio. La cepa 1365-

D como representante de las 4 cepas con pI 5,2 y 5,4 y la cepa 1401-D, con la  $\beta$ -lactamasa con pI de 5,6.

En el caso del paciente B, las dos cepas (una aislada de orina y otra de exudado esternal) tomadas el mismo día, presentaban el mismo patrón de sensibilidad, la misma sinergia y dos  $\beta$ -lactamasas con pI 8,0 y 5,4 por lo que se consideró sólo la cepa 1381-D.

En el caso del paciente C, una cepa se aisló de orina, otra de sangre y la otra de un control de heces que se le tomo al paciente para ver si era portador de la cepa con la BLEA. Las muestras de orina y sangre fueron tomadas el mismo día y el control de heces tres días después, presentaban dos  $\beta$ -lactamasas con pI de 8,0 y 5,4 y el mismo patrón de resistencia, por lo que se consideró sólo la cepa 1387-D (orina).

Finalmente, las 35 cepas que se estudiaron procedían de los siguientes productos patológicos: 26 de orina (73%); 3 de sangre (8%); 2 de exudado cutáneo (8%); 1 de exudado esternal (2,5%), 1 de drenaje sub-frénico (2,5%) y 1 de catéter de vía femoral (2,5%). De una muestra de heces, se aisló *E. coli* productor de BLEA, este microorganismo se consideró como perteneciente a un portador, y se incluye en el estudio como cepa procedente de heces. Los datos se recogen en la tabla 3. Estas cepas representaron el 0,45% del total de *E. coli* aislados en el trienio 97-99, y a su vez fueron el 74,5%, de las 47 cepas de enterobacterias con sensibilidad disminuida a C3G, en el mismo trienio.

Durante el período estudiado, se observa que la mayor parte de los aislamientos de *E. coli* portadores de BLEAs son obtenidos a partir de muestras de orina y en menor medida de sangre o de exudado cutáneo.

Así mismo, se observa que la mayoría de las cepas son de origen intrahospitalario (24 que representa el 68,5% de las cepas estudiadas). El servicio de Cirugía general presenta el mayor número de casos 6 (25%), le siguen el de Medicina Interna y Oncología con 4 casos cada uno (11,5%) y con tres casos el de Cardiología (8,6%). En menor medida también se aislaron cepas de procedencia extrahospitalaria, considerándose así aquellas

---

muestras que procedían de urgencias generales (7) y de pacientes ambulatorios (4), tal como se señala en la tabla 4.

De los 34 pacientes de los que se aisló *E. coli* productora de alguna BLEA, 22 (64,7%) fueron mujeres y 12 (35,3%) varones (Tabla 5). La mayoría (21) correspondieron a pacientes mayores de 60 años, luego a pacientes entre 46 y 60 años (6) y en menor medida a los otros cuatro intervalos de edad considerados.

Respecto a las enfermedades de base de los pacientes (Tabla 5), se observa que en la mayor parte de casos las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas procedieron de pacientes con neoplasias sólidas (11 de 34) y patología cardíaca (7). Con menor frecuencia también se obtuvieron de pacientes con infección urinaria (3), neumonía (2) y neoplasias hematológicas (2). En pacientes con otras enfermedades de base se aisló solamente una cepa en cada caso (gastroenteritis aguda, prostatitis y otras).

**Tabla 3** Producto patológico de cual se aislaron las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEAs

	1997	1998	1999	TOTAL (%)
Orina	5	11	10*	26 (72,98)
Sangre	2	0	1	3 (8,11)
Exudado cutáneo	1	1	0	2 (8,11)
Exudado esternal	0	0	1	1 (2,70)
Drenaje subfrénico	0	1	0	1 (2,70)
Cateter vía femoral	0	1	0	1 (2,70)
Heces	0	1	0	1 (2,70)
<b>TOTAL</b>	8	15	12	35

\*Dos muestras pertenecen al mismo paciente (1365-D y 1401-D)

**Tabla 4** Distribución de los servicios donde fueron atendidos los pacientes a los que se aisló *Escherichia coli* productoras de BLEAs

	1997	1998	1999	TOTAL <sub>1</sub>
<b>Intrahospitalario</b>				
Cardiología	1	0	2	3 (12,50)
Cirugía General	1	3	2	6 (25,00)
UCI	1	1	0	2 (8,33)
Hematología clínica	1	0	0	1 (4,17)
Medicina Interna	1	1	2	4 (16,67)
Neurología	0	1	0	1 (4,17)
Oncología	2	1	1	4 (16,67)
Ortopedia- Traumatología	0	0	1	1 (4,17)
Pediatría	0	0	2 <sup>2</sup>	2 (8,33)
<b>Sub Total</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>24</b> <b>(68,57)</b>
<b>Extrahospitalario.</b>				
Urgencias generales	0	6	1	7 (63,63)
Ambulatorio	1	2	1	4 (36,37)
<b>Sub Total</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>11</b> <b>(31,43)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>35</b>

<sup>1</sup>Los porcentajes de las cepas aisladas en cada servicio se han determinado respecto a los subtotales (intrahospitalario y extrahospitalario). Los porcentajes correspondientes a los subtotales han sido calculados respecto a las 35 cepas de *E. coli*

<sup>2</sup>Las dos corresponden al mismo paciente pero son cepas portadoras de -lactamasas diferentes.

**Tabla 5:** Sexo, edad y enfermedad de base de los pacientes de los que se aisló *Escherichia coli* productora de alguna BLEA

		1997	1998	1999	TOTAL
<i>E. coli</i>	Sexo				
	Hombre	4	6	2	12
	Mujer	4	9	9	22
	Edad				
	0-5		1		1
	6-18		1	1	2
	19-30		1	1	2
	31-45		1	1	2
	46-60	4		2	6
	>60	4	11	6	21
	Enfermedad de base				
	Neoplasias				
	Sólidas	3	5	3	11
	Hematológicas	1		1	2
	Patología cardíaca	2		5	7
	Patologías infecciosas				
	Neumonía		2		2
	Gastroenteritis aguda		1		1
	Infección urinaria	1	2		3
	Prostatitis		1		1
	Hipertrofia cornete nasal			1	1
	Accidente vascular cerebral		1		1
	Sincope		1		1
	Diabetes	1			1
	Colostomía		1		1
	Gestante		1		1
	ND (Ambulatorio)			1	1

ND: no se pudo determinar la enfermedad de base

## 2.2 Pacientes a los que se le aisló *Klebsiella pneumoniae*

Se estudiaron 9 cepas de *K. pneumoniae*. Todas procedieron de pacientes diferentes. Siete cepas (78%) fueron aisladas a partir de orina, una a partir de sangre (11%), y una a partir de esputo (11%), datos recogidos en la tabla 6.

Según la procedencia de las cepas, 6 (67%) fueron de origen intrahospitalario y 3 (33%) de origen extrahospitalario (Tabla 7). De las cepas provenientes de pacientes de las salas de hospitalización 5 (83%) pertenecían a Neurología, aunque aisladas en fechas diferentes.

De los 9 pacientes de los que se aisló *K. pneumoniae* productor de BLEA o cefamicinasas, 5 (55,5%) fueron de mujeres y 4 (44,5%) de varones. La mayoría (6 pacientes) fueron mayores de 60 años; 2 pacientes correspondieron al intervalo 45-60 años y sólo uno fue menor de 5 años. Respecto a la enfermedad de base de los pacientes se observó que en 4 casos, la cepa fue aislada de pacientes con diagnóstico de accidente vascular cerebral. Estos datos se presentan en la tabla 8.



**Tabla 6** Producto patológico de cual se aislaron las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEA o cefamicinasa

	1997	1998	1999	TOTAL (%)
Orina	0	2	5	7 (77,78)
Sangre	0	0	1 <sup>1</sup>	1 (11,11)
Espuito	0	0	1	1 (11,11)
<b>TOTAL</b>	0	2	7	9

<sup>1</sup>Esta es la muestra del paciente portador de *K. pneumoniae* productora de CMY-2

**Tabla 7** Distribución de los servicios donde fueron atendidos los pacientes a los que se aisló *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEA o cefamicinasa

	1997	1998	1999	TOTAL 1
<b>Intrahospitalario</b>				
Medicina Interna	0	0	1	1(16,70 )
Neurología	0	0	5 <sup>2</sup>	5 (83,30)
<b>Sub Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>6</b> <b>(66,70)</b>
<b>Extrahospitalario</b>				
Urgencias generales	0	1	0	1 (33,30)
Urgencias pediátricas	0	1	0	1 (33,30)
Ambulatorio	0	0	1	1 (33,30)
<b>Sub Total</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b> <b>(33,30)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>9</b>

<sup>1</sup>Los porcentajes de las cepas aisladas en cada servicio se han determinado respecto a los subtotaes (intrahospitalario y extrahospitalario). Los porcentajes correspondientes a los subtotaes han sido calculados respecto a las 9 cepas)

<sup>2</sup>En este servicio fue atendido el paciente portador de *K. pneumoniae* productor de CMY-2

**Tabla 8:** Sexo, edad y enfermedad de los pacientes a los que se les aisló *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEA o cefamicinasas

	1997	1998	1999	TOTAL
<i>K. pneumoniae</i>				
Sexo				
Hombre		1	3 <sup>1</sup>	4
Mujer		1	4	5
Edad				
0-5		1		1
6-18				
19-30				
30-45				
45-60			2	2
>60		1	5 <sup>1</sup>	6
Enfermedad				
Neoplasia sólida		1		1
Quiste renal			1	1
Mastopatía fibroquística			1	1
Infección urinaria		1		1
Mielomeningoencefalitis			1	1
Accidente vascular cerebral			4 <sup>1</sup>	4

<sup>1</sup>En este grupo se encuentra el paciente portador de *K. pneumoniae* productor de CMY-2

### **2.3 Pacientes a los que se le aisló *Salmonella enterica***

En el período estudiado, se aislaron dos cepas de *S. enterica*. La cepa de *S. enterica* serovar Mikawasima (170-Ma) se aisló en las heces de una niña de 5 años, que acudió a urgencias de pediatría por presentar un cuadro de gastroenteritis aguda, que no requirió hospitalización. La segunda cepa correspondió al *S. enterica* serovar Virchow (144-Ma), que se aisló de las heces de una niña de 7 meses, que también acudió a urgencias de pediatría por gastroenteritis aguda, tampoco requirió hospitalización (Tablas 9, 10 y 11).

### **2.4 Paciente a los que se le aisló *Proteus mirabilis***

La cepa de *P. mirabilis* (89-Hb) se detectó en una paciente de 87 años en el exudado de una herida postquirúrgica, hospitalizada en el servicio de Ortopedia y Traumatología, por fractura de femur. Los datos se recogen como en el caso anterior en las tablas 9, 10 y 11.

**Tabla 9** Producto patológico del que se aislaron las cepas de *Salmonella enterica* productora de BLEA o cefamicinasa y *Proteus mirabilis* productor de cefamicinasa

	1997	1998	1999	TOTAL
<i>S. enterica</i>				
Heces	1	0	1 <sup>1</sup>	2
<i>P. mirabilis</i>				
Exudado de herida			1 <sup>1</sup>	1

<sup>1</sup>Muestras de las que se aislaron cepas productoras de cefamicinasa CMY-2

**Tabla 10** Distribución de los servicios donde fueron atendidos los pacientes a los que se aisló *Salmonella enterica* y *Proteus mirabilis*

	1997	1998	1999	TOTAL
<i>S. enterica</i>				
Extrahospitalario				
Urgencias pediátricas	1	0	1 <sup>1</sup>	2
<i>P. mirabilis</i>				
Intrahospitalario				
Ortopedia	0	0	1 <sup>1</sup>	1

<sup>1</sup>Muestras de las que se aislaron cepas productoras de cefamicinasa CMY-2

**Tabla 11** Sexo, edad y enfermedad de los paciente de los que se aisló *Salmonella enterica* productora de BLEA o cefamicinasa y *Proteus mirabilis* productor de cefamicinasa

	1997	1998	1999	TOTAL
<i>S. enterica</i>				
Sexo				
Hombre				
Mujer	1		1 <sup>1</sup>	2
Edad				
0-5	1		1 <sup>1</sup>	2
Enfermedad				
Gastroenteritis aguda	1		1 <sup>1</sup>	2
<i>P. mirabilis</i>				
Sexo				
Hombre				
Mujer			1	1
Edad				
>60			1	1
Enfermedad de base				
Fractura femur			1	1

<sup>1</sup>Este es la paciente portadora de *S. enterica* productora de CMY-2

### 3) $\beta$ -lactamasas detectadas en *Escherichia coli*

---

A continuación se presentan con mayor detalle los resultados obtenidos, tanto fenotípicos como genotípicos, de las diferentes cepas estudiadas desglosadas por tipos de BLEAs presentes. Para cada grupo de  $\beta$ -lactamasas detectadas se detalla en primer lugar los patrones de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de las cepas portadoras de dicha  $\beta$ -lactamasa, en función de los valores de CIM obtenidos y de las características de la sinergia observada. Posteriormente, se señalan peculiaridades observadas en estas cepas al determinar el pI de las  $\beta$ -lactamasas presentes en las mismas. Por otro lado, con el fin de descartar brotes epidémicos intrahospitalarios de cepas portadoras de dichas  $\beta$ -lactamasas, se determinó el biotipado y el serogrupo con un reducido banco de antisueros (ver apartado 3.1.3 de materiales y métodos). Asimismo, se tuvo en cuenta la procedencia del paciente al que se le aisló la cepa, es decir, el servicio donde estuvo ingresado, así como la fecha del primer aislamiento de la cepa. Posteriormente se presentan las características genotípicas de las  $\beta$ -lactamasas implicadas a las que se les realizó PCR y, si procede, secuenciación.

Para una mejor caracterización del patrón de resistencia de las diferentes  $\beta$ -lactamasas, así como para determinar el máximo nivel de expresión posible de dichas  $\beta$ -lactamasas, se procedió a seleccionar cepas altamente resistente sin, *a priori*, adquisición de nuevas mutaciones (ver apartado 4 de materiales y métodos).

Se aislaron un total de 35 cepas de *E. coli*, las cuales fueron sospechosas de ser portadoras de BLEAS por su sensibilidad disminuida a C3G y por su sinergia entre éstas y el ácido clavulánico. Tras determinar el pI de las  $\beta$ -lactamasas presentes en estas cepas, obtuvimos 4 valores distintos: 5,2, 5,6, 7,6 y 8. En función de estos pIs se sospechó la presencia de diferentes familias de BLEAS; para poder diferenciarlas en cada caso se realizaron PCRs con iniciadores específicos.

Las PCRs de las 27 cepas, con pIs de aproximadamente 8, resultaron positivas con iniciadores para CTX-M-9, razón por la cual se las consideró portadoras de una BLEA compatible con CTX-M-9.

Las PCRs de las cepas con pI de 7,6, resultaron positivas con iniciadores para SHV y el producto amplificado fue digerido por la enzima de restricción *NheI*; basándonos en estos resultados, estas cepas se consideraron como posibles portadoras de SHV-2.

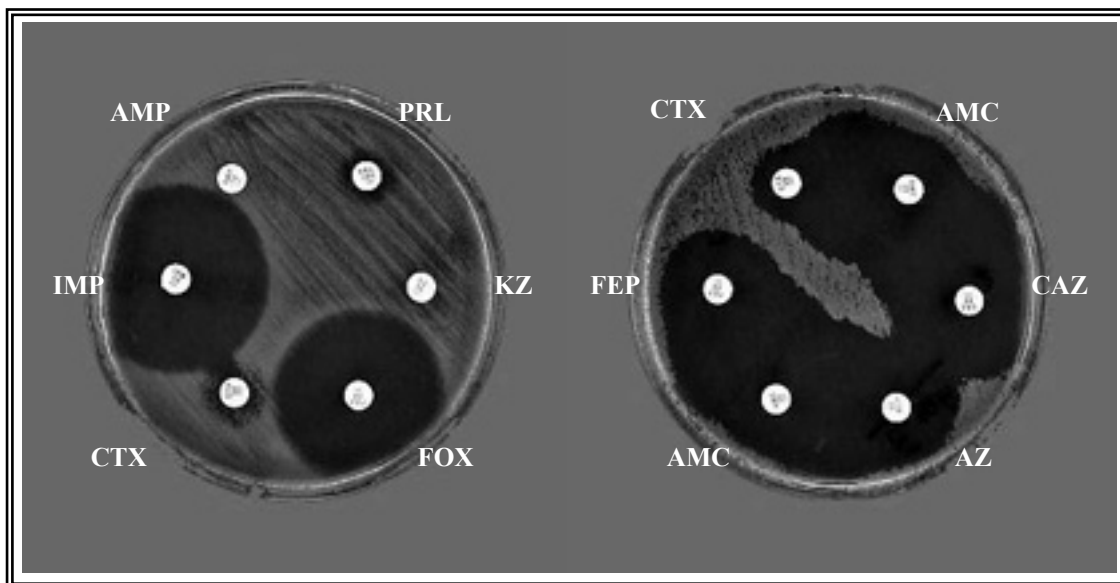
Finalmente, las cepas con pI 5,2 y 5,6, resultaron positivas con iniciadores para las lactamasas tipo TEM. Como las BLEAS tipo TEM son numerosas, y muchas de ellas comparten el mismo pI, para su identificación se procedió a la secuenciación del producto amplificado. La secuencia de las mismas demostró la presencia de TEM-10 en las cepas con pI de 5,6 y de TEM-12 en las de pI de 5,2.

Las cepas de *E. coli* aisladas en el laboratorio se distribuyeron de la siguiente manera: 2816 cepas en 1997; 2606 en 1998; y 2283 en 1999. La BLEA mayoritariamente encontrada fue CTX-M-9, con porcentajes de 0,14%, 0,54% y 0,39% respectivamente en cada año, lo cual representa 27 cepas diferentes productoras de esta enzima. Con menor frecuencia se han observado cepas de *E. coli* productoras de SHV-2 (6 cepas), TEM-10 (1 cepa) y TEM-12 (1 cepa).

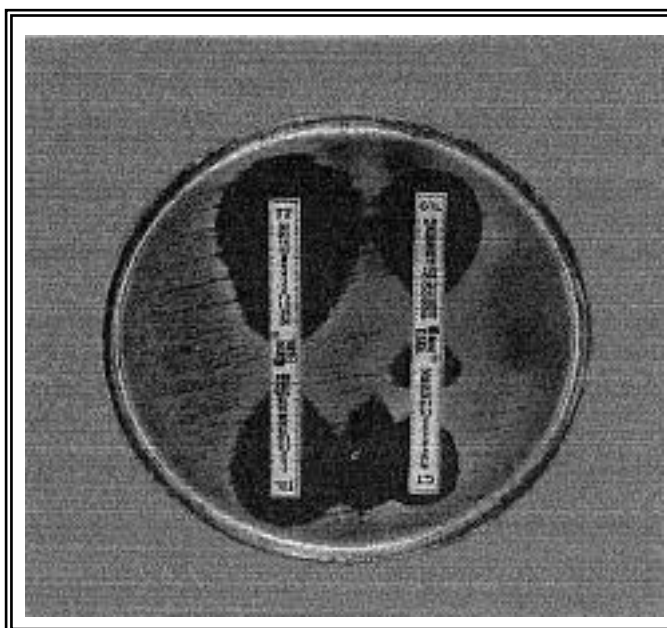
### 3.1 Cepas de *E. coli* productoras de $\beta$ -lactamasas CTX-M-9

**Patrón de resistencia a  $\beta$ -lactámicos:** Ventisiete cepas de *E. coli* mostraron un patrón de sensibilidad bastante homogéneo (Figura 2 y 3). Todas resultaron resistentes a ampicilina, ticarcilina, cefuroxima y cefpodoxima. La mayoría resultaron resistentes, a piperacilina, observándose sólo 2 cepas con sensibilidad intermedia, y a cefoperazona, con 7 cepas de sensibilidad intermedia. Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, mientras que, la mayoría resultaron sensibles a ceftazidima, con sólo una cepa de sensibilidad intermedia, y amoxicilina-ácido clavulánico, con 8 cepas de sensibilidad intermedia. El comportamiento de las cepas fue menos homogéneo frente a cefepime, frente a la cual había 24 sensibles, 1 intermedia y 2 resistentes; aztreonam, con 25 sensibles, 1 intermedia y 1 resistente; cefoxitina, con 22 sensibles, 4 intermedias y 1 resistente; y cefotaxima, con 10 sensibles, 12 intermedias y 5 resistentes.





**Fig. 2:** Antibiograma de una cepa de *E. coli* productora de CTX-M-9.



**Fig. 3:** Determinación de la CIM, por el método del E-test, para una cepa productora de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-9.

Tira de la izquierda, arriba: cefotaxima, abajo: cefotaxima con ácido clavulánico. Tira de la derecha, arriba: ceftazidima con ácido clavulánico, abajo: ceftazidima.

Respecto al comportamiento de cada cepa, individualmente, cabe resaltar las altas CIMs para la cefoxitina (32 µg/mL), cefotaxima (128 µg/mL), ceftazidima (15 µg/mL), cefepime (64 µg/mL) y aztreonam (32 µg/mL), en la 1213-D. También es notorio, aunque menor que en el caso anterior, las elevadas CIMs para cefepime (32 µg/mL) y aztreonam (16 µg/mL), en la cepa 1226-D. Todos estos datos están recogidos en la tabla 12.

La sinergia del ácido clavulánico con los cuatro antibióticos del ensayo, resultó positiva en sólo 2 cepas (1068-D y 1226-D). Lo más frecuente fue la sinergia con cefotaxima, cefepime y aztreonam, positiva en 9 cepas (1292-D, 876-D, 909-D, 1104-D, 1249-D, 1252-D, 1270-D, 1284-D y 1290-D). En 4 cepas (1213-D, 1130-D, 1287-D y 1387-D) fue positiva con cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Cefotaxima y aztreonam mostraron sinergia en 5 cepas (1129-D, 1185-D, 1266-D, 1277-D y 1334-D). Cefotaxima y cefepime en 2 cepas (1330-D y 1406-D). Finalmente, 5 cepas (1327-D, 1338-D, 1381-D, 1383-D y 1384-D) solamente con cefotaxima. En la figura 3 se observa la sinergia con tiras de E-test de cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulánico y ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulánico.

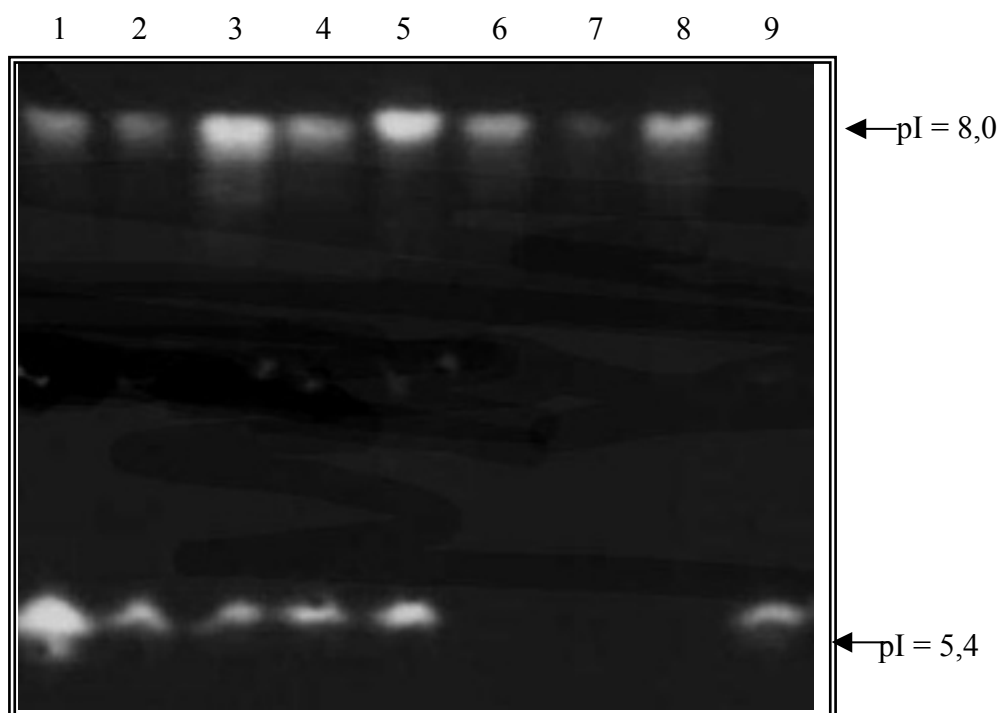
**Isoelectroenfoque:** Con un extracto crudo de las cepas se realizó la determinación de pI, encontrándose el valor de 8,0 para todas las cepas; además, 24 cepas (de las 27) presentaban un segundo valor de pI de 5,4. Las  $\beta$ -lactamasas que presentaban pI de aproximadamente 8,0, tenían actividad en el revelado iodométrico usando como sustrato ceftriaxona, mientras que las  $\beta$ -lactamasas de pI de 5,4 no mostraron actividad con este sustrato. Las cepas que no presentaron la banda 5,4 fueron las 1068-D, 1213-D y 1292-D (Figura 4).

**Tabla 12** Patrón de sensibilidad de 27 cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas compatibles con CTX-M-9 y TEM-1

CEPA	AMP	AMC	TIC	PIP	TZP	CXM	FOX	CTX	CAZ	CPD	CFP	FEP	ATM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	4/2	64	32	4/4	8	4	0,125	0,125	0,25	0,5	0,125	0,125
1068-D*	1024	8/4	>1024	512	8/4	>1024	16	32	1	256	128	8	8
1213-D*	1024	16/8	>1024	>256	16/4	>1024	32	128	16	256	1024	64	32
1292-D*	128	4/2	>1024	64	4/4	256	4	8	0,25	32	32	1	1
876-D	1024	8/4	>1024	512	2/4	1024	8	16	1	128	128	4	1
909-D	>256	16/8	>64	>256	1	>256	3	32	0.75	ND	ND	1.5	0.75
1104-D	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	1024	16	32	1	64	128	4	4
1130-D	1024	8/4	>1024	512	8/4	1024	16	32	1	64	128	4	1
1129-D	1024	8/4	>1024	512	8/4	1024	8	8	1	64	32	2	1
1185-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	8	32	1	128	64	2	8
1226-D	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	128	8	512	1024	32	16
1249-D	1024	16/8	>1024	64	4/4	512	4	16	1	64	64	4	4
1266-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	16	8	1	32	64	4	1
1252-D	1024	16/8	>1024	1024	4/4	>1024	4	32	1	256	128	4	8
1270-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	4	8	1	32	32	1	1
1277-D	1024	8/4	>1024	512	2/4	1024	4	32	0,25	64	64	2	1
1284-D	512	8/4	>1024	512	4/4	1024	4	8	0,5	32	32	1	1
1287-D	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	1024	8	8	1	32	64	1	1
1290-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	8	8	1	64	64	2	1
1327-D	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	>1024	4	32	1	128	64	4	4
1330-D	1024	8/4	>1024	512	8/4	1024	4	8	1	64	32	2	1
1334-D	1024	8/4	>1024	1024	4/4	1024	8	16	1	64	64	2	1
1338-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	256	4	8	0,25	32	32	1	1
1381-D	512	8/4	>1024	>1024	4/4	>1024	4	128	1	256	512	16	4
1383-D	>1024	4/2	>1024	512	4/4	1024	4	8	0,125	32	32	1	1
1384-D	>1024	8/4	>1024	1024	4/4	>1024	8	64	1	128	64	8	2
1387-D	>1024	8/4	>1024	1024	4/4	1024	4	64	1	128	64	4	1
1406-D	>1024	8/4	>1024	>1024	8/4	1024	2	32	1	64	64	4	1
CIM <sub>50</sub>	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	4	32	1	64	64	4	1
CIM <sub>90</sub>	>1024	16/8	>1024	>1024	8/4	>1024	16	64	1	256	512	8	8
Cons.	128	2/1	>1024	64	1/2	256	2	8	0,125i	32	32	1	1
Extrem.	i >1024	i 16/8		i >1024	i 16/4	i >1024	i 32	i 128	16	i 512	i 1024	i 64	i 32

\* son las cepas que no presentan TEM-1.

Cons. Extrem.: concentraciones extremas.



**Fig. 4:** Gel de isoelectroenfoque con cepas portadoras de CTX-M-9. Carriles 1-5, cepas de *E. coli* 876-D, 1104-D, 1226-D, 1290-D y 1406-D con pI de 5,4 y 8,0. Carriles 6 y 7, 1213-D y 1068-D, con pI de 8,0. Carril 8, cepa control *E. coli* CTX-M-9 (MSP 492) con pI de 8,0. Carril 9, cepa control *E. coli* TEM-1 (RL 111), con pI de 5,4.

**Relación epidemiológica de las cepas:** Como se ve en la tabla 13, los biotipos de estas 27 cepas de *E. coli*, presentan una alta variabilidad. Sin embargo, pueden observarse algunos grupos: a) Cuatro cepas presentan biotipo 1775; dos eran de pacientes ambulatorios y dos de Urgencias generales. En las primeras, se carece de la información del serogrupo y fueron aisladas el mismo año pero con 3 meses de diferencia; b) Otro posible grupo lo forman cuatro cepas con biotipo 6775; una muestra es de un paciente procedente de Urgencias generales, mientras que las otras 3 muestras procedían de pacientes de salas de hospitalización diferentes y en fechas distantes entre sí, al menos 3 meses; c) Un tercer grupo podría estar formado por las cepas con biotipo 7775; sin embargo, en dos de ellas, la procedencia y el serogrupo son diferentes y las fechas de aislamiento son distantes. Las otras 2 provienen de pacientes de la misma sala (Cirugía general), pero no se dispone de información del serogrupo y fueron tomadas con 5 meses de diferencia; y d) El cuarto grupo está formado por 5 cepas con biotipo 0775, cuatro de las cuales provienen de Urgencias (pacientes ambulatorios) y una de UCI. Sin embargo, dos que proceden de Urgencias generales, presentan el mismo serogrupo (02) y fueron tomadas en fechas cercanas (diciembre de 1998). Diez cepas presentan biotipos diferentes entre sí, por lo que no pueden ser agrupadas mediante este carácter.

**Tabla 13** Cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas compatibles con CTX-M-9 y TEM-1 según fecha de aislamiento, serogrupo, biotipo y procedencia

CEPA	MES	AÑO	SEROGRUPO <sup>1</sup>	BIOTIPO <sup>2</sup>	PROCEDENCIA
876-D	1	97	O1	7775:A	UCI
909-D	2	97	R	4561	Medicina Interna
1068-D*	10	97	R	7575	Oncología
1104-D	11	97	O9	6775:B	Hematología
1130-D	1	98	R	1375	Medicina Interna
1129-D	1	98	O6	6555	Cirugía general
1185-D	3	98	ND	7775:A	Cirugía general
1213-D*	7	98	R	1775:C	Ambulatorio
1226-D	8	98	R	7775:A	Cirugía general
1270-D	10	98	ND	1775:C	Ambulatorio
1252-D	10	98	ND	0775:D	UCI
1249-D	10	98	ND	0775:D	Urgencias generales
1266-D	10	98	ND	0775:D	Urgencias pediátricas
1284-D	11	98	ND	1775:C	Urgencias generales
1277-D	11	98	ND	6775:B	Oncología
1287-D	12	98	R	6775:B	Urgencias generales
1292-D*	12	98	O2	0775:D	Urgencias generales
1290-D	12	98	O2	0775:D	Urgencias generales
1327-D	2	99	O2	6775:B	Cirugía general
1330-D	3	99	R	3775	Cardiología
1334-D	3	99	ND	5775	Cirugía general
1338-D	4	99	O2	7775:A	Medicina Interna
1381-D	8	99	ND	5575	Cardiología
1384-D	8	99	ND	7771	Medicina Interna
1383-D	9	99	O2	1775:C	Urgencias generales
1387-D	9	99	ND	7571	Ortopedia Traumatología
1406-D	11	99	ND	1765	Oncología

\* son las cepas que no presentan TEM-1.

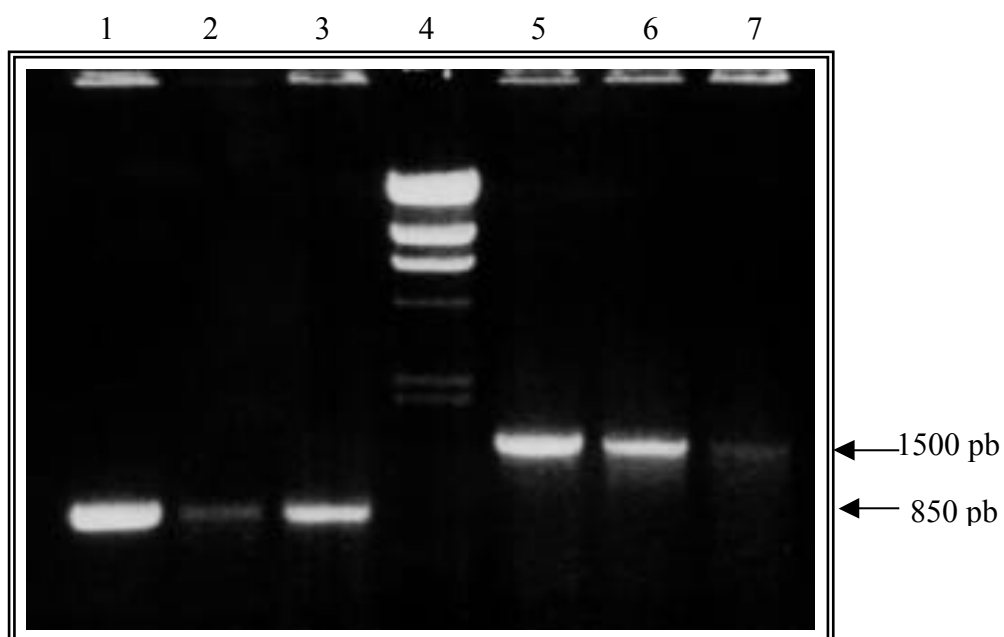
<sup>1</sup> R: rugoso. ND: no presento aglutinación con los antisueros estudiados.

<sup>2</sup>Se ha dado una letra a los distintos biotipos mayoritarios.

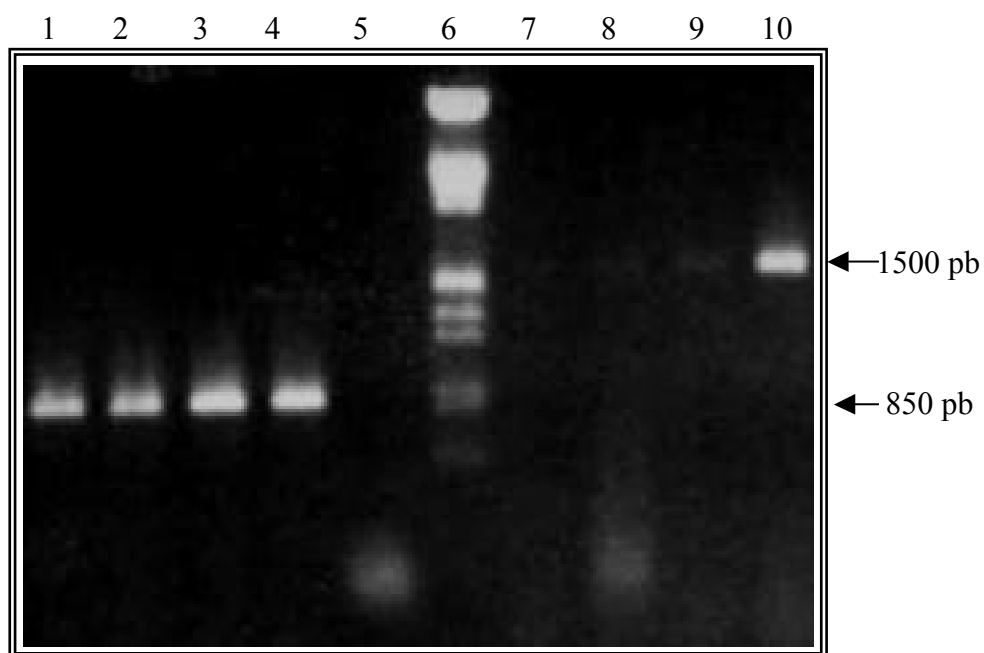
**PCR:** Las 27 cepas de *E.coli* que mostraron un patrón de sensibilidad similar al de las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-9, fueron sometidas a PCR; se usaron dos pares de iniciadores CTX-M-9<sub>IATG</sub> - CTX-M-9<sub>ISTOP</sub> y CTX-M-9<sub>EATG</sub> y CTX-M-9<sub>ESTOP</sub>, el primero específico para la parte interna del gen y el último que incluye todo el gen y regiones vecinas (Figura 5). En todas los casos se obtuvieron los fragmentos esperados: 0,85Kb y 1,5Kb; excepto en la cepa 1387-D, en la cual no se observó el fragmento mayor (Figura 6). Estos resultados confirmaron la presencia del gen de una  $\beta$ -lactamasa compatible con la CTX-M-9.

En 24 cepas, de las 27, en las que se había observado una segunda  $\beta$ -lactamasa con pI 5,4, se realizó PCR específica para detectar  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM, logrando amplificar en todos los casos el segmento esperado (938pb).





**Fig. 5:** Electroforesis de los amplificados de la PCR con iniciadores específicos CTX-M-9<sub>INT</sub> (Carriles 1-3) y CTX-M-9<sub>EXT</sub> (Carriles 5-7). Carriles 1-3, cepas de *E.-coli* 1068-D, 1290-D y 1406-D. Carril 4, marcador de peso molecular (Marker III, Roche). Carriles 5-6, cepas de *E. coli* 1068-D, 1290-D y 1406-D.



**Fig. 6:** Electroforesis de los amplificadores de la PCR con iniciadores específicos CTX-M-9<sub>INT</sub> (Carriles 1-5) y CTX-M-9<sub>EXT</sub> (Carriles 7-10) de las muestras de *E. coli* aisladas del paciente C. Carriles 1 y 7, cepa de orina. Carriles 2 y 8, cepa de sangre. Carriles 3 y 9, cepa de hisopado rectal. Carriles 4 y 10, control positivo *E. coli* CTX-M-9 (MSP 492). Carril 5, control negativo *E. coli* SHV-1 (J53 R1010). Carril 6, marcador de peso molecular (Marker III, Roche).

**Selección por cefotaxima:** De las 27 cepas de *E. coli*, se escogieron 16 al azar (en negro en la tabla 14) para ser seleccionadas con cefotaxima (método de Szybalski). Las CIMs para ampicilina, ticarcilina y cefuroxima antes de la selección eran mayor a los límites de cohorte, es decir  $>1024 \mu\text{g/mL}$ ; después de la selección, teniendo como límite de cohorte el mismo, la CIM es la misma para estos antibióticos. En el caso de la cefpodoxima las CIM<sub>90</sub> aumenta de  $256 \mu\text{g/mL}$  a  $1024 \mu\text{g/mL}$ , pero en conjunto las cepas después de la selección siguen siendo resistentes como antes de ella. Lo mismo sucedió frente a la cefoperazona, donde 3 cepas fueron reevaluadas de intermedias a resistentes; pero en conjunto, las cepas siguen siendo resistentes (CIM<sub>90</sub> se incrementa de  $512 \mu\text{g/mL}$  a  $>1024 \mu\text{g/mL}$ ). Frente a piperacilina, se observaron dos cepas que fueron reevaluadas como resistentes después de la selección (ambas incrementaron su CIM de  $64 \mu\text{g/mL}$  a  $1024 \mu\text{g/mL}$ ), pero en su mayoría las cepas tienen una CIM, que sigue siendo mayor a los límites de cohorte con CIM<sub>90</sub> antes y después  $>1024 \mu\text{g/mL}$ . El comportamiento en el caso de la piperacilina-tazobactam, no se vio afectado, ya que todas las cepas se mantuvieron sensibles después de la selección. Para la amoxicilina-ácido clavulánico no se observó un incremento de las CIM<sub>90</sub> ( $16/8 \mu\text{g/mL}$ ); de las 16 cepas analizadas, 2 han sido reevaluadas como resistentes (una era inicialmente sensible y la otra intermedia). Para la cefoxitina tampoco se observa cambio de la CIM<sub>90</sub> ( $16 \mu\text{g/mL}$ ); sólo una cepa cambia de intermedia a resistente.

En el caso de ceftazidima se observa un incremento de la CIM<sub>90</sub> ( $1 \mu\text{g/mL}$  a  $16 \mu\text{g/mL}$ ), y hay 3 cepas que incrementan su CIM en cuatro, o más, diluciones dobles progresivas. Del mismo modo, frente a aztreonam la CIM<sub>90</sub> se incrementó (de  $8 \mu\text{g/mL}$  a  $64 \mu\text{g/mL}$ ); de las 16 cepas analizadas, la mitad cambian de sensible o intermedia a resistente, y 6 incrementan su CIM en cuatro, o más, diluciones dobles progresivas.

En las cepas seleccionadas se observa, que hay un incremento de CIM<sub>90</sub> de la cefotaxima: de  $128 \mu\text{g/mL}$  a  $512 \mu\text{g/mL}$ ; en 12 cepas se observó un cambio de sensible o intermedia a resistente. Siete cepas incrementan su CIM en 4, o más, diluciones dobles progresivas.

El mayor incremento observado es frente a cefepime cuya CIM<sub>90</sub> pasa de 16 µg/mL a 128 µg/mL, lo cual significa un cambio promedio de sensible a resistente; este es el caso particular de 8 cepas. También en 8 cepas se observa el incremento de la CIM en 4, o más, diluciones dobles progresivas. Los cambios en las CIMs para cefotaxima, son proporcionales a los que se producen para ceftazidima, cefepime, aztreonam, cefpodoxima y cefoperazona. En aquellas cepas en las cuales las CIMs para cefotaxima se han incrementado en 4 (o más), diluciones dobles progresivas, también se produce un incremento de similar magnitud en las CIMs de ceftazidima, cefepime, aztreonam, cefpodoxima y cefoperazona. Del mismo modo, cuando el cambio es pequeño en la CIM para cefotaxima, frente a los otros antibióticos esta variable no se altera de manera apreciable. Esta selección prácticamente no influye en las CIMs frente a cefoxitina y amoxicilina-ácido clavulánico.

**Tabla 14** Patrón de sensibilidad de 16 cepas (en negro) y de sus isogénicas (en azul) de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas compatibles con CTXM-9 y TEM-1 seleccionadas con cefotaxima

CEPA	AMP	AMC	TIC	PIP	TZP	CXM	FOX	CTX	CAZ	CPD	CFP	FEP	ATM
1068-D	1024	8/4	>1024	512	8/4	>1024	16	32	1	256	128	8	8
1068-D Sel	>1024	32/16	>1024	>1024	8/4	>1024	32	512	16	>1024	>1024	256	64
1213-D	1024	16/8	>1024	>64	16/4	>1024	32	128	16	256	1024	64	32
1213-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	16/4	>1024	64	512	16	1024	>1024	64	64
1292-D	128	4/2	>1024	64	4/4	256	4	8	0,25	32	32	1	1
1292-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	8/4	>1024	16	256	8	1024	1024	128	32
876-D	1024	8/4	>1024	512	2/4	1024	8	16	1	128	128	4	1
876-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	256	4	1024	>1024	128	32
1104-D	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	1024	16	32	1	64	128	4	4
1104-D Sel	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	>1024	16	64	1	256	256	4	4
1130-D	1024	8/4	>1024	512	8/4	1024	16	32	1	64	128	4	1
1130-D Sel	1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	16	256	4	512	1024	64	16
1129-D	1024	8/4	>1024	512	8/4	1024	8	8	1	64	32	2	1
1129-D Sel	>1024	16/8	>1024	1024	8/4	>1024	8	32	4	256	64	8	8
1185-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	8	32	1	128	64	2	8
1185-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	256	8	1024	1024	64	32
1226-D	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	128	8	512	1024	32	16
1226-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	256	8	1024	1024	64	32
1249-D	1024	16/8	>1024	>64	4/4	512	4	16	1	64	64	4	4
1249-D Sel	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	>1024	8	64	4	256	128	16	16
1266-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	16	8	1	32	64	4	1
1266-D Sel	>1024	8/4	>1024	1024	4/4	>1024	16	128	4	256	256	16	16
1252-D	1024	16/8	>1024	1024	4/4	>1024	4	32	1	256	128	4	8
1252-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	128	4	512	256	32	16
1277-D	1024	8/4	>1024	512	2/4	1024	4	32	0,25	64	64	2	1
1277-D Sel	1024	8/4	>1024	512	2/4	1024	4	32	1	64	64	1	1
1284-D	512	8/4	>1024	512	4/4	1024	4	8	0,5	32	32	1	1
1284-D Sel	>1024	8/4	>1024	1024	8/4	>1024	8	128	4	256	256	16	4
1287-D	>1024	16/8	>1024	1024	4/4	1024	8	8	1	32	64	1	1
1287-D Sel	>1024	32/16	>1024	>1024	2/4	>1024	16	512	16	1024	>1024	256	64
1290-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	8	8	1	64	64	2	1
1290-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	8/4	>1024	8	256	4	1024	1024	128	16
CIM <sub>50</sub>	1024	8/4	>1024	512	4/4	1024	4	16	1	64	64	4	1
CIM <sub>50</sub> Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	4/4	>1024	8	256	4	256	1024	64	16
CIM <sub>90</sub>	>1024	16/8	>1024	>1024	8/4	>1024	16	128	1	256	512	16	8
CIM <sub>90</sub> Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	8/4	>1024	16	512	16	1024	>1024	128	64
Cons.	128	4/2	>1024	64	2/4	256	2	8	0,125	32	32	1	1
Extrem.	h	h		h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	>1024	16/8		>1024	6/4	>1024	32	128	16	512	1024	64	32
Cons.	>1024	16/8	>1024	>1024	2/4	>1024	4	32	1	64	64	1	1
Extrem.				h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
					16/4		64	512	16	>1024	>1024	256	64

### 3.2 Cepas de *E. coli* productoras de $\beta$ -lactamasas SHV-2

**Patrón de resistencia a  $\beta$ -lactámicos:** Seis cepas de *E. coli* mostraron un patrón homogéneo de sensibilidad (Figura 7). Todas resultaron resistentes a la ampicilina, ticarcilina, cefpodoxima y piperacilina; mientras que todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, cefoxitina, cefepime y aztreonam. Por otro lado, frente a la cefuroxima, cuatro cepas mostraron sensibilidad intermedia y dos fueron resistentes. De las seis cepas, 5 fueron sensibles y una intermedia a ceftazidima. Frente a cefotaxima, cefoperazona y piperacilina-tazobactam, el comportamiento fue similar, en todos casos se observaron 5 cepas sensible y una resistente (la cepa resistente fue la misma en los tres casos). La cepa 1310-D mostró un perfil de CIMs considerablemente elevado, frente a cefotaxima (CMI = 32  $\mu\text{g/mL}$ ), ceftazidima (16  $\mu\text{g/mL}$ ), cefpodoxima (128  $\mu\text{g/mL}$ ), cefoperazona (128  $\mu\text{g/mL}$ ), cefepime (8  $\mu\text{g/mL}$ ), aztreonam (8  $\mu\text{g/mL}$ ) y piperacilina-tazobactam (>256/4  $\mu\text{g/mL}$ ). Estos datos están recogidos en la tabla 15.

Las cepas 1000-D, 1034-D y 1036-D, mostraron sinergia de ácido clavulánico con los cuatro antibióticos del ensayo (cefotaxima, ceftazidima, cefepime y aztreonam). Dos cepas (907-D y 1310-D) con cefotaxima, ceftazidima y cefepime. La cepa 1245-D, mostró sinergia con cefotaxima y aztreonam. En la figura 8, se observa la sinergia con tiras de E-test de cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulánico y ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulánico.

**Isoelectroenfoque:** Las  $\beta$ -lactamasas de las seis cepas presentaron pI=7,6 y actividad con el revelado iodométrico con ceftriaxona.

**Relación epidemiológica de las cepas:** Este carácter es uniforme en las seis cepas estudiadas; todas son del biotipo 1775 (Tabla 16). Tres de ellas (1000-D, 1034-D y 1036-D), comparten además el mismo serogrupo (O4) y son aisladas en fechas cercanas (junio y julio de 1997); sin embargo, proceden de salas de hospitalización diferentes. Dos cepas (907-D y 1310-D), además del mismo biotipo, son del serogrupo O6, pero fueron aisladas en fechas distantes (1997 y 1999).