

## ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE $\beta$ -LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Antonio Oliver<sup>1</sup> y Rafael Cantón<sup>2</sup>

Servicios de Microbiología. Hospital Universitario Son Dureta<sup>1</sup>, Palma de Mallorca, y Hospital Universitario Ramón y Cajal<sup>2</sup>, Madrid

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam. Las BLEE clásicas derivan de las  $\beta$ -lactamasas con actividad fundamentalmente penicilinasas e inhibibles por el ácido clavulánico, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, enzimas del grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Debido a mutaciones en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. Las BLEE, por lo tanto, se engloban dentro del grupo 2be de la clasificación antes mencionada.

Las cepas que producen BLEE, en su mayoría enterobacterias, y en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, son resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con la excepción de las carbapenemas, las cefamicinas y las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, existe una serie de microorganismos que producen  $\beta$ -lactamasas cromosómicas que, en el caso de una hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. Entre las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de  $\beta$ -lactamasas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera*. De hecho, en los últimos años, como se comentará posteriormente, están adquiriendo gran relevancia un nuevo tipo de BLEE plasmídicas, denominadas CTX-M que, precisamente, derivan de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. Por lo general, cuando hablamos de BLEE nos referimos únicamente a las enzimas de codificación plasmídica ya que son éstas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de diseminación.

### EPIDEMIOLOGIA DE LAS ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE

La primera BLEE (SHV-2) fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983. Desde entonces se ha publicado una gran cantidad de brotes epidémicos de enterobacterias con BLEE, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuentemente involucrada. La primera descripción de cepas de enterobacterias productoras de BLEE en España fue en 1988 y la primera epidemia documentada ocurrió entre 1988 y 1990. Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE 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 los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.

Durante las décadas de los 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran del tipo TEM o SHV, habiéndose descrito hasta la fecha más de

cien variantes distintas derivadas de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de SHV-1 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>), lo que da idea de la gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto periodo de tiempo debido, esencialmente, a la presión selectiva de los antibióticos. En 1989 se describió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, prácticamente de forma simultánea en una cepa de *E. coli* en Alemania y en una cepa de *Salmonella* en Argentina. Estas enzimas se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a la cefuroxima, cefotaxima y cefepima, prácticamente sin incrementar las CMI de la ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Estas BLEE, de naturaleza plásmidica al igual que las TEM o SHV, derivan de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. También existen otras BLEE, algunas de ellas descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, con menor importancia epidemiológica desde el punto de vista de su diseminación, al menos por el momento en España (Tabla 1).

**Tabla 1. Diferentes grupos de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.**

BLEE	$\beta$ -lactamasa relacionada	País de origen	Especies en las que se detectaron inicialmente
TEM	TEM-1, TEM-2	Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1/LEN	Alemania	<i>P. aeruginosa</i> /BGNNF
CTX-M	KLUA <i>Kluyvera</i>	Alemania/Argentina	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
OXA	OXA-10	Turquía / Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER		Francia	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER	Vietnam/Tailandia	<i>E. coli</i>
TLA	CME-1	Méjico	<i>E. coli</i>
GES/IBC		Guayana/Sudáfrica	<i>K. pneumoniae</i> / <i>P. aeruginosa</i>
BES	<i>Y. enterocolitica</i>	Brasil	<i>S. marcescens</i>
SFO	AmpA <i>S. fonticola</i>	Japón	<i>E. cloacae</i>

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M. La diseminación de este tipo de BLEE, como será comentado en apartados posteriores, plantea ciertas dificultades para su detección, especialmente cuando se utiliza ceftazidima como único marcador. Por otro lado, *K. pneumoniae*, la especie más frecuentemente asociada con la producción de BLEE en las décadas anteriores, actualmente está siendo desplazada de forma paulatina, aunque con menor carácter epidémico, por *E. coli*. En España, si bien el porcentaje de cepas con BLEE encontradas en un estudio multicéntrico reciente fue mayor en *K. pneumoniae* (2,7%) que en *E. coli* (0,5%), el número absoluto de cepas fue significativamente superior para *E. coli*. En relación con este último punto, es cada vez más frecuente el aislamiento de enterobacterias con BLEE, especialmente *E. coli*, fuera del ámbito hospitalario, particularmente como causa de infección urinaria en pacientes de atención primaria y así, en el estudio anteriormente aludido, se encontró que el 50% de las cepas de *E. coli* con BLEE procedían de la comunidad. Esta fue la razón que guió el diseño del control que acompaña a la presente revisión.

Otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEE en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC. En este sentido, la cepa productora de BLEE, para la cual se ha documentado una mayor diseminación, es una cepa de *Enterobacter 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.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE han sido diseñados para enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibible de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Existen también otros métodos basados en bioensayos, en el análisis del perfil de sustrato o en técnicas moleculares, aunque son más propios para su caracterización. Con independencia de ello, la aplicación de los métodos que se describen a continuación debe ir precedida de un riguroso análisis del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos, con los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma, que permita detectar fenotipos compatibles con su presencia. En algunos casos, dado que se encuentran preferentemente en determinantes genéticos transferibles, es necesario transferir la resistencia conferida por la BLEE a otro microorganismo en el que sea más sencilla la demostración de su presencia.

### Métodos de detección basados en la utilización de inhibidores de $\beta$ -lactamasas

Son los métodos más sencillos. El más difundido en los laboratorios clínicos es el de aproximación de discos, también denominado de **doble difusión con discos**. Fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu$ g) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazima (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g), ceftriaxona (30  $\mu$ g) y aztreonam (30  $\mu$ g). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE. Esta prueba ha sufrido diferentes modificaciones para aumentar su eficiencia entre ellas la reducción de la distancia entre los discos (a 20 mm), la utilización de un inóculo algo más elevado que el habitual en las pruebas de difusión y la utilización de cefaloporinas de cuarta generación, esencialmente la cefepima. Con ello se facilita la detección de cepas con BLEE con poca eficiencia hidrolítica y, por lo tanto, con halos de inhibición poco afectados, así como de microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasa AmpC (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*) que podrían enmascarar su presencia.

Las limitaciones de la doble difusión con discos dependen de la pericia en la realización de la prueba (disposición de los discos) y de la interpretación de la sinergia. En algunas cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas puede verse mermada la capacidad de detección de esta prueba. Asimismo, pueden producirse falsos positivos en cepas hiperproductoras de SHV-1, o que presenten  $\beta$ -lactamasas cromosómicas sensibles a los inhibidores (*K. oxytoca*, *Proteus vulgaris* o *Stenotrophomonas maltophilia*).

En la actualidad existen sistemas comerciales que añaden inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, esencialmente ácido clavulánico, a las cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima, ceftazidima y cefepima. Por ejemplo, debe destacarse los **discos con ácido clavulánico** [ceftazidima-clavulánico (30-1  $\mu$ g), cefotaxima-clavulánico (30-1  $\mu$ g) y cefepima-clavulánico (30-1  $\mu$ g)], y las **tiras de E-test®**, que contienen en una parte de ellas concentraciones decrecientes de la cefalosporina y en la otra la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico (2  $\mu$ g) por cada concentración. En todos los casos es recomendable utilizar simultáneamente los discos o las tiras de ceftazidima y cefotaxima en asociación con el ácido clavulánico ya que no todas las enzimas hidrolizan por igual estos dos sustratos, y con la utilización exclusiva de uno de ellos podría limitarse su detección. Éste sería el caso de los microorganismos productores de BLEE de tipo CTX-M en los que la utilización de ceftazidima como único sustrato impediría una detección correcta. Habitualmente, la hidrólisis de este último antibiótico por estas enzimas es muy pobre, al contrario de lo que acontece con la mayoría de las BLEE de los grupos TEM y SHV. Por el contrario, la hidrólisis de la cefotaxima es muy eficiente con las CTX-M, siendo

el mejor marcador para su detección. Asimismo, es imprescindible añadir cefepima con clavulánico en los casos en los que se sospeche la presencia de BLEE en los microorganismos productores de AmpC ya que esta cefalosporina de cuarta generación se afecta poco por AmpC, incluso cuando está hiperproducida, y puede observarse la sinergia con el ácido clavulánico en el caso de que exista una BLEE. También se ha propuesto la utilización de discos de cefalosporinas y sulbactam como inhibidor de  $\beta$ -lactamasa pero no han tenido tanto éxito como las propuestas anteriores.

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) ha elaborado recomendaciones para la detección de *E. coli* y *Klebsiella* productoras de BLEE. Sorprendentemente, no establece recomendaciones para microorganismos en los que podrían regir los mismos criterios, como *Salmonella* o *Proteus mirabilis*, o para los productores de AmpC (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, etc). El sistema de cribado establecido por el NCCLS recomienda la confirmación de la producción de BLEE en todas las cepas de *E. coli* o *Klebsiella* en que las que se observe una reducción de los halos de inhibición o aumento de los valores de CMI para diferentes cefalosporinas (Tabla 2). Como método de confirmación recomienda la comparación de los halos de inhibición de los discos de cefotaxima o ceftazidima con discos de estos antibióticos a los que se les ha añadido ácido clavulánico (10  $\mu$ g). También recomienda como método confirmatorio la determinación de las CMI de estas dos cefalosporinas con las correspondientes tras la adición de una concentración fija de 4  $\mu$ g de ácido clavulánico en todos los pocillos. En el primer caso se requiere un aumento de al menos 5 mm en los halos de inhibición para establecer la presencia de BLEE, mientras que con la CMI debe existir una reducción de al menos tres diluciones para confirmar su producción. Estos criterios han sido validados por diferentes autores, encontrándose una buena sensibilidad y especificidad, superior al 90%, pero que puede variar dependiendo de la colección utilizada para su análisis o de la prevalencia de cepas con BLEE en el caso de evaluarse con aislados consecutivos.

**Tabla 2. Recomendaciones del NCCLS para detectar BLEE en *E. coli* y *Klebsiella*.**

• Difusión con discos			
Cribado		Confirmación	
Antibiótico (carga)	Criterio	Antibiótico (carga)	Criterio
Cefpodoxima (10 $\mu$ g)	$\leq 17$ mm	Cefotaxima-clavulánico (30-10 $\mu$ g)	Aumento $\geq 5$ mm
Cefotaxima (30 $\mu$ g)	$\leq 27$ mm	Ceftazidima-clavulánico (30-10 $\mu$ g)	en los halos
Ceftriaxona (30 $\mu$ g)	$\leq 25$ mm		
Ceftazidima (30 $\mu$ g)	$\leq 22$ mm		
Aztreonam (30 $\mu$ g)	$\leq 27$ mm		

  

• Dilución			
Cribado		Confirmación	
Antibiótico	Criterio	Antibiótico	Criterio
Cefpodoxima	$\geq 8$ $\mu$ g/ml	Cefotaxima-clavulánico	Disminución CMI
Cefotaxima	$\geq 2$ $\mu$ g/ml	Ceftazidima-clavulánico	$\geq 3$ diluciones
Ceftriaxona	$\geq 2$ $\mu$ g/ml		
Ceftazidima	$\geq 2$ $\mu$ g/ml		
Aztreonam	$\geq 2$ $\mu$ g/ml		

Anteriormente se defendía la utilización de la cefpodoxima en las pruebas de sensibilidad como mejor sensor para sospechar la presencia de BLEE. Sin embargo, este antibiótico puede verse también afectado por la hiperproducción de AmpC o por alteraciones de la permeabilidad. Con todo, el mejor sistema es aquél que utiliza varias cefalosporinas simultáneamente y emplea criterios habituales en la lectura interpretada del antibiograma. En la actualidad, los **sistemas automáticos** para la determinación de la sensibilidad a los

antimicrobianos han recogido esta experiencia y tienden a incluir simultáneamente cefotaxima y ceftazidima con ácido clavulánico e iguales recomendaciones deben establecerse con los discos o el E-test® con el ácido clavulánico. Su capacidad de detección también ha sido evaluada con colecciones de microorganismos con BLEE obteniéndose en algunos casos una sensibilidad y especificidad superior al 99%.

Recientemente, se ha evaluado la capacidad de detección de cepas BLEE con fenotipos complicados (escasa hidrólisis de algunos de los sustratos o superposición con otros mecanismos de resistencia) en los laboratorios españoles que utilizan sistemas automáticos. En general, la eficiencia ha sido superior a la de otras experiencias en otros países, superior al 70% en *E. coli* y *K. pneumoniae*. No obstante, se obtuvieron resultados más discretos cuando se consideraron cepas de *E. cloacae* con hiperproducción de AmpC y producción de una BLEE de tipo CTX-M, debido a la aplicación de criterios establecidos por el NCCLS que no hacen referencia a la producción de estas enzimas en los microorganismos productores de AmpC.

## Bioensayos

La utilización de bioensayos, como la prueba de Masuda o el método tridimensional, pueden ser adecuados para demostrar la presencia de estas enzimas en cepas en las que existan dudas acerca de su producción. Ambas pruebas, dependiendo de los sustratos que se utilicen, son útiles para cualquier tipo de  $\beta$ -lactamasa. A pesar de su versatilidad, son engorrosas de realizar y han tenido poco éxito. La **prueba de Masuda**, consiste en la disposición de un microorganismo indicador sensible (generalmente *E. coli* ATCC 25922) a los sustratos hidrolizados (en este caso cefotaxima, ceftazidima o aztreonam) por la  $\beta$ -lactamasa que se pretende detectar. Estos sustratos se colocan en un disco (sirven los discos comerciales) y en las zonas marginales del halo de inhibición, discos de papel impregnados con el extracto, generalmente obtenido por sonicación, del microorganismo a estudiar. La distorsión de halo de inhibición en el microorganismo sensor nos indica la presencia de la BLEE. Aparte de la laboriosidad, tiene el inconveniente de que se obtienen resultados poco interpretables cuando existe más de un enzima en el microorganismo a estudiar, sobre todo en los casos en los que las  $\beta$ -lactamasas compartan sustratos en su hidrólisis, como es el caso de los productores de AmpC que supuestamente produzcan una BLEE.

El **método tridimensional** es igualmente engorroso de realizar pero tiene la ventaja de utilizar diferentes sustratos. Este hecho permite, al menos cualitativamente, determinar el perfil de sustrato del enzima presente en el microorganismo a estudiar. Consiste en la disposición de un microorganismo sensor sensible a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (generalmente *E. coli* ATCC 25922), realizar un surco (puede ser circular) en el que se dispone el extracto sonificado del microorganismo a estudiar y colocar discos con antibióticos a una distancia de unos 3 mm del surco. La distorsión de los halos de inhibición nos indicará el perfil de sustrato del enzima.

## Métodos bioquímicos

La mayoría de 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 isoelectroenfoco, el análisis del perfil de sustrato, la cinética enzimática y la determinación de los IC<sub>50</sub> para diferentes inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

El **isoelectroenfoco** (IEF) permite conocer el punto isoelectrico (pI) de la proteína y era de gran utilidad cuando existían pocas BLEE descritas. En la actualidad, se utiliza poco debido a la descripción de diferentes BLEE que comparten idéntico pI (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). Sin embargo, es muy útil si se combina con el análisis del

fenotipo de sensibilidad ya que puede orientar el tipo de BLEE para un análisis posterior del perfil de sustrato o estudio molecular. También es de gran interés cuando existen varias enzimas en un mismo aislado y se utilizan sustratos antes de proceder al revelado con nitrocefín o se compara el IEF de la cepa salvaje con el de los transconjugantes o transformantes. Las BLEE de tipo TEM descritas hasta el momento tienen valores de pI que oscilan entre 5,2 y 6,5, las de tipo SHV entre 7,0 y 8,2 y las CTX-M entre 7,6 y 9,0.

El **perfil de sustrato** es imprescindible para la caracterización final de las BLEE. Se determina por medio de un espectrofotómetro la tasa de hidrólisis ( $V_{max}$ ) relativa de diferentes sustratos  $\beta$ -lactámicos, generalmente a una concentración elevada (1 mM), en comparación con un sustrato estándar (bencilpenicilina, cefaloridina o nitrocefín). Como complemento del perfil de sustrato suele determinarse la concentración de inhibidor (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam en el caso de las BLEE) que reduce la actividad hidrolítica de una  $\beta$ -lactamasa cuando se compara con un control ( $IC_{50}$ ). En algunos casos es preciso definir el mecanismo de actuación del enzima mediante el **estudio cinético** de la constante de afinidad ( $K_m$ ) y la eficiencia relativa de hidrólisis ( $V_{max}/K_m$ ). La mayoría de estas determinaciones quedan relegadas a laboratorios especializados en los que se realiza una caracterización bioquímica de las  $\beta$ -lactamasas.

## Métodos moleculares

Al igual que los métodos bioquímicos, muchos de ellos son más propios de la caracterización específica del tipo de BLEE que útiles en su detección. Habitualmente se aplican una vez demostrada la presencia de la BLEE por los métodos descritos en el apartado anterior. Entre los métodos moleculares destaca las sondas de DNA, escasamente utilizadas en la actualidad, y las técnicas de amplificación. Las **sondas de DNA** permiten realizar cribados en colecciones amplias de aislados, sobre todo 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 (en algunos casos puede inferirse según el fenotipo de sensibilidad). Por este motivo la detección es solo presuntiva, puede ser positiva en los casos en los que el aislado presente más de una  $\beta$ -lactamasa e incluso en situaciones en las que no exista una BLEE. Ejemplos habituales de ello sería el resultado positivo con una sonda TEM en una cepa de *E. coli* que presenta una  $\beta$ -lactamasa 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. En estos casos sería preciso transferir la resistencia a una cepa de laboratorio conocida y realizar la detección sobre el transconjugante o transformante.

Las **técnicas de amplificación** son las que más éxito han tenido, debido a su fácil realización. Tienen los mismos inconvenientes que las sondas de DNA pero, a diferencia de éstas, permiten la secuenciación posterior del producto de PCR, siendo muy útiles para la caracterización del enzima. El uso de cebadores específicos diseñados para detectar mutaciones puntuales y el desarrollo de la reacción de amplificación en condiciones estrictas permite la caracterización de algunas de las BLEE. Esta técnica, denominada "**oligotyping**", fue diseñada para las BLEE de tipo TEM y SHV. Está limitada en la actualidad por el alto número de variantes y el aumento del número de mutaciones en las nuevas BLEE que pertenecen a estas familias.

Como alternativa a la secuenciación posterior del producto de PCR se han diseñado diferentes variantes de la técnica de PCR que pueden orientar sobre el tipo de BLEE. Se ha introducido la **PCR-RFLP** (*restriction fragment length polymorphisms analysis*) o análisis de los perfiles de restricción con diferentes enzimas del producto de PCR (utilizado esencialmente con la familia SHV), la técnica **RSI-PCR** (*restriction site insertion*) o amplificación con cebadores que crean lugares de restricción próximos al extremo 3' o la técnica **PCR-SSCP** (*single-strand conformation polymorphisms*) en la que una vez

amplificado el producto de PCR se somete a restricción con endonucleasas, apertura de las hebras de DNA y electroforesis de los fragmentos generados. También se ha propuesto la **LCR** (*ligase chain reaction*) para la caracterización de las BLEE de tipo SHV. Más recientemente se ha propuesto la utilización de la PCR en tiempo real para la detección y caracterización de las BLEE de tipo SHV. En esta técnica se utilizan sondas marcadas con diferentes fluorocromos según el tipo de mutación. Dada el alto número de mutaciones descritas, ninguna de estas técnicas asegura la caracterización final del enzima por lo que la secuenciación del fragmento de PCR continúa siendo el método de referencia.

## ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

Las BLEE 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 las cefamicinas. Los únicos  $\beta$ -lactámicos que mantienen actividad frente a las enterobacterias productoras de estas enzimas son, además de las cefamicinas, como la cefoxitina, las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y las carbapenemas.

La utilidad de las cefamicinas para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE es limitada debido al frecuente desarrollo de resistencia por pérdida de expresión de las porinas a través de las cuales entra el antibiótico. La amoxicilina-clavulánico es una buena opción para el tratamiento de las infecciones urinarias por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, siempre y cuando sean sensibles, ya que no es infrecuente la resistencia a esta combinación por producción simultánea de otras  $\beta$ -lactamasas, alteraciones de permeabilidad o, en menor medida, la hiperproducción de la propia BLEE. Las especies de enterobacterias productoras de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC (*E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, etc.) son intrínsecamente resistentes a la cefoxitina y a la amoxicilina-clavulánico, con lo cual la única opción entre los  $\beta$ -lactámicos para el tratamiento de las cepas con BLEE sería, además de las carbapenemas, la piperacilina-tazobactam (Tabla 3).

**Tabla 3. Opciones terapéuticas en las infecciones por microorganismos BLEE.**

Grupo	Antimicrobiano	Comentario
$\beta$ -lactámico/inhibidor de $\beta$ -lactamasas	Amoxic./clavulánico	Escasa experiencia en infección sistémica Útil en infección urinaria
	Piperac./tazobactam	Variable en infección sistémica Necesario estudio de sensibilidad
	Cefalos../clavulánico	Ausencia de formulaciones Diferente farmacocinética
Metoxi- $\beta$ -lactámicos	Cefoxitina Moxalactam	Desarrollo de mutantes de permeabilidad Escasa experiencia. Efectos secundarios
Carbapenemas	Imipenem	$\beta$ -lactámicos de elección. Hay que vigilar aparición de resistencia en otros patógenos
	Meropenem	
	Ertapenem	
Aminoglucósidos		Necesario estudio de sensibilidad
Quinolonas		Incremento reciente de la resistencia
Otros	Fosfomicina	No suelen existir resistencias cruzadas
	Nitrofurantoína	No suelen existir resistencias cruzadas
	Colistina	Descontaminación intestinal

En cuanto al uso de antibióticos no  $\beta$ -lactámicos para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE, es preciso tener en cuenta la frecuente coexistencia de otros determinantes genéticos que confieren resistencia a otros antimicrobianos, como los aminoglucósidos o el cotrimoxazol. En muchos casos la

resistencia se transfiere conjuntamente con el gen responsable de la BLEE en el mismo transposón, integrón o plásmido. Por lo que respecta al uso de fluoroquinolonas, se debe resaltar que la frecuencia de resistencia a estos compuestos ha alcanzado ya niveles preocupantes, especialmente en *E. coli*. En general, se observa una asociación significativa entre la producción de BLEE y la resistencia a estos antibióticos, especialmente en cepas de *E. coli* causantes de infección urinaria en la comunidad. Puesto que la resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias depende casi exclusivamente de mutaciones en genes cromosómicos, la asociación no se debe a la transferencia conjunta de ambos mecanismos de resistencia sino, probablemente, a la selección de cepas con ambos mecanismos de resistencia por el frecuente uso de  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas en un mismo contexto terapéutico, como en el tratamiento de las infecciones urinarias.

Es por lo tanto frecuente enfrentarse a un patrón de multiresistencia asociado a la producción de BLEE en *Enterobacteriaceae* que facilita la detección de estos microorganismos, pero que limita enormemente las opciones terapéuticas. No obstante, para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas producidas por *E. coli* productores de BLEE 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 cepas con BLEE como son la fosfomicina y la nitrofurantoína.

## CONCLUSIONES

Los métodos de detección de enterobacterias productoras de BLEE comienzan por una adecuada interpretación de los perfiles de sensibilidad con los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma. Posteriormente, se deben elegir métodos de confirmación basados en la inhibición del enzima por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa, generalmente utilizando ácido clavulánico. Deben emplearse varios sustratos, esencialmente ceftazidima y cefotaxima o ceftriaxona, para permitir la detección de enzimas con baja capacidad hidrolítica para alguno de los sustratos. En el caso de las enterobacterias productoras de AmpC, la cefepima constituye el sustrato que mejor detecta la presencia de estas enzimas. La adecuada detección de los microorganismos productores de BLEE es esencial para conocer la verdadera dimensión del problema que representan, limitar su diseminación y adecuar las escasas opciones terapéuticas.

## BIBLIOGRAFIA

- BONNET R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
- BOU G, CARTELLE M, TOMÁS M *et al.* Identification and broad dissemination of the CTX-M-14  $\beta$ -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4030-4036.
- BRADFORD PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-951.
- BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.
- CANTÓN R, LOZA E, CONEJO MC, BAQUERO F, MARTINEZ-MARTINEZ L, MENSURA COLLABORATIVE GROUP. Quality control for beta-lactam susceptibility testing with a well-defined collection of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains in Spain. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1912-1918.



- CANTÓN R, OLIVER A, COQUE TM, VARELA MC, PEREZ-DIAZ JC, BAQUERO F. Epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1237-1243.
- COQUE TM, OLIVER A, PÉREZ-DÍAZ JC, BAQUERO F, CANTÓN R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:500-510.
- CHANAWONG A, M'ZALI FH, HERITAGE J, LULITANOND A, HAWKEY PM. Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184:85-89.
- HERNÁNDEZ JR, PASCUAL A, CANTON R, MARTINEZ-MARTINEZ L, GRUPO DE ESTUDIO DE INFECCION HOSPITALARIA GEIH. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21:77-82.
- JARLIER V, NICOLAS MH, FOURNIER G, PHILIPPON A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-878.
- LIVERMORE DM, BROWN DF. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(S1):59-64.
- LIVERMORE DM, STRUELENS M, AMORIM J *et al.* Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:289-300.
- LIVERMORE DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1997; 8:557-584.
- MABILAT C, COURVALIN P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2210-2216.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 13<sup>th</sup> informational supplement. M1000-S12. Wayne PA. 2003.
- NIEDERHAUSER C, KAEMPF L, HEINZER I. Use of the ligase detection reaction-polymerase chain reaction to identify point mutations in extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:477-480.
- OLIVER A, PÉREZ-DÍAZ JC, COQUE TM, BAQUERO F, CANTÓN R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:616-620.
- OLIVER A, WEIGEL LM, RASHEED JK, MCGOWAN JR JE, RANEY P, TENOVER FC. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3829-3836.

- RANDEGGER CC, HACHLER H. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1730-1736.
- SABATÉ M, TARRAGÓ R, NAVARRO F *et al.* Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1970-1973.
- THOMSON KS, SANDERS CC. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1877-1882.
- WELDHAGEN GF, POIREL L, NORDMANN P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2385-2392.