

## **β-LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO: EXPERIENCIA DEL PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD, DOS AÑOS DESPUÉS**

**José L. Pérez, Concepción Gimeno**

**Servicios de Microbiología, Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, y Hospital Clínico Universitario, Valencia.**

En el año 1997 se inició una nueva etapa en el Programa de Control de Calidad SEIMC. Entre sus objetivos, destacaba la necesidad de dotar a éste con una infraestructura estable que permitiese su continuidad a largo plazo. Sin embargo, un aspecto que siempre se tuvo presente fue mantener la faceta de formación continuada que, con acierto, había caracterizado al Programa a lo largo de los ocho años anteriores. De acuerdo con este objetivo, se buscaba el poner a disposición de todos los microbiólogos, una herramienta que les permitiese mejorar no sólo la calidad de los resultados emitidos por sus respectivos laboratorios sino de los *servicios*, en forma de experiencia profesional, que ellos pueden aportar, con el objetivo último de contribuir a la mejora de la especialidad. Se presenta el resultado de una experiencia que confirma que la apuesta del Programa a lo largo de más de diez años ha sido acertada.

El primero de los controles de Bacteriología de esta época (B-1/97) incluyó una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una β-lactamasa plasmídica de espectro ampliado (βLEA), exactamente la misma que ahora es motivo de análisis en el presente control B-3/99. La tabla siguiente nos muestra las diferencias entre los dos años.

<b>Característica a comparar</b>	<b>Año 1997</b>		<b>Año 1999</b>	
	<b>Número/total</b>	<b>%</b>	<b>Número/total</b>	<b>%</b>
Detectan la presencia de βLEA	45/186	24,2	155/282	55,0
Resistencia a la cefotaxima	57/149	38,3	139/201	69,2
Resistencia a la ceftazidima	78/84	92,9	109/109	100,0
Resistencia al aztreonam	78/81	96,3	98/101	97,0

Como puede apreciarse, existen diferencias tanto en lo que se refiere a los laboratorios que señalan la presencia de una βLEA, como de los que informan que la cepa es resistente a la cefotaxima, haciendo una interpretación del fenotipo de resistencia, con independencia de la CMI concreta que obtienen. En cambio, no existen diferencias en la detección de la resistencia a la ceftazidima y al aztreonam, circunstancia lógica, debido a la elevada CMI que presentaba la cepa para estos dos antibióticos.

Si se analizan los datos del año 1999, se pueden distinguir dos grupos entre los laboratorios inscritos: el de aquéllos que habían participado en años anteriores y un grupo que se incorporó por primera vez ese año al Control de Calidad. A continuación se muestra la comparación entre ambos.

Característica a comparar	Participantes antiguos		Nuevos participantes	
	Número/total	%	Número/total	%
Detección de la presencia de $\beta$ LEA	134/188	71,3	21/94	22,3
Resistencia a la cefotaxima	117/146	80,1	22/55	40,0

En la tabla siguiente se analizan las diferencias en la interpretación del fenotipo de resistencia, según los participantes hayan detectado o no que la cepa era productora de una  $\beta$ LEA. Los resultados del control de 1999 fueron:

Sensibilidad a la cefotaxima	Informan la presencia de una $\beta$ LEA			
	Sí		No	
	Número	%	Número	%
Resistente	113	91,9	26	33,3
Intermedio	7	5,7	14	17,9
Sensible	3	2,4	38	48,7
Total	123	100,0	78	100,0

A modo de resumen de todos estos datos, se aprecian diferencias importantes en la mejora de la calidad microbiológica, en función del año de envío del control, de la experiencia previa y de la capacidad del participante para detectar que la cepa en cuestión era portadora de una  $\beta$ LEA. No se puede atribuir exclusivamente al Programa de Control de Calidad la razón de esta mejora. Hay otros factores que también han podido contribuir, como el autoaprendizaje de los propios microbiólogos a lo largo de los dos años transcurridos y la adecuación de los programas informáticos que gobiernan a los sistemas comerciales de sensibilidad antibiótica, entre otros. Sin embargo, desde la dirección del Programa nos sentimos legítimamente satisfechos.

## CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS $\beta$ LEA

Como su propio nombre indica, las  $\beta$ LEA son enzimas de codificación plasmídica que hidrolizan un buen número de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Su espectro incluye las amino y ureidopenicilinas, al igual que las  $\beta$ -lactamasas clásicas presentes en muchas enterobacterias, pero ampliándolo a las cefalosporinas de segunda y tercera generación y a los monobactames (aztreonam). Las cefamicinas, como la cefoxitina y el cefotetam, así como los carbapenemes, como el imipenem y el meropenem, continúan siendo activos. Estas enzimas tampoco hidrolizan a los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (clavulanato, sulbactam, tazobactam), por lo que, en principio, las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con estos compuestos son también activas. Más adelante se harán algunas precisiones acerca de su utilización clínica.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) mostradas por las cefalosporinas de tercera y cuarta generación son más elevadas si las comparamos con las que presentan habitualmente estas bacterias. Sin embargo, los valores de las CMI en las cepas que poseen una  $\beta$ LEA pueden ser interpretados como sensibles o intermedios si se siguen los criterios de diversos organismos de normalización, tales como los del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Por esta razón, una CMI de cefotaxima igual o superior a 2  $\mu$ g/ml debe hacernos sospechar la posible presencia de una  $\beta$ LEA. Si se confirma, la cepa deberá ser informada como poseedora de un fenotipo resistente a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluidas las cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Las  $\beta$ LEA derivan de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas de las enterobacterias, como la TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (grupo 2b de la clasificación de Bush de 1995). Las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactames fueron diseñados para que fuesen resistentes a la acción hidrolítica de estas enzimas pero, al igual que había pasado con otros casos de resistencia, las bacterias encontraron la vía para soslayar la acción de estos nuevos

antibióticos. Para ello bastó con la selección de pequeñas mutaciones que afectaban a unos pocos aminoácidos del núcleo activo, por lo general de aquellas  $\beta$ -lactamasas que previamente mostraban una mayor capacidad hidrolítica frente a algunas de las nuevas cefalosporinas, como la ceftazidima. Así ocurrió con SHV-2, la primera  $\beta$ LEA descrita en 1983. A partir de entonces, son muchas las enzimas de este tipo reseñadas en la literatura. Todas ellas muestran pequeñas diferencias entre sí a escala molecular que, sin embargo, se traducen en cambios importantes en su actividad sobre los distintos sustratos. Desde el punto de vista funcional y evolutivo, las  $\beta$ LEA están clasificadas dentro del grupo 2be, como derivadas de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas 2b. Para una mayor información, remitimos al lector a revisiones bien documentadas, como la de Livermore de 1995.

Además de las  $\beta$ LEA con el fenotipo antes apuntado (resistencia a las penicilinas, cefalosporinas y monobactames, sensibilidad a las combinaciones de penicilinas con inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, cefamicinas y carbapenemes), también se han descrito otras enzimas plasmídicas que amplían el espectro de resistencia a las cefamicinas o a los carbapenemes, aunque no derivan de las TEM ni de las SHV. No es infrecuente que los plásmidos R que codifican las  $\beta$ LEA posean también determinantes de resistencia a otros antibióticos, particularmente a los aminoglucósidos y a las fluoroquinolonas. Es posible, por último, que una cepa de una especie determinada exprese una resistencia constitutiva, además de la adquirida, o que sea hiperproductora de otras  $\beta$ -lactamasas cromosómicas o plasmídicas que, aunque no tengan actividad hidrolítica intrínseca, modifiquen al alza las CIM de los diversos  $\beta$ -lactámicos para esa cepa en particular. Todas estas circunstancias tienen consecuencias directas sobre la epidemiología y los mecanismos de transmisión, la detección fenotípica por parte del laboratorio y, como es lógico, sobre las decisiones terapéuticas.

## EPIDEMIOLOGÍA

La primera descripción de una cepa productora de una  $\beta$ LEA se remonta al año 1983, en Alemania (Knothe *et al*). Inicialmente, el problema se circunscribió a las especies *K. pneumoniae* y *Serratia marcescens* y a un ámbito geográfico limitado, pero muy pronto se extendieron por toda Europa occidental, Estados Unidos y el resto de países. El espectro de enterobacterias capaces de codificar una  $\beta$ LEA ha aumentado. Aunque la especie más frecuente sigue siendo *K. pneumoniae*, como la cepa objeto del presente Control de Calidad y, en menor medida, *Escherichia coli*, es posible encontrar una  $\beta$ LEA en los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y, más recientemente, también en *Salmonella*.

Lo más habitual es que las infecciones por cepas productoras de  $\beta$ LEA se presenten como brotes nosocomiales pero también se han descrito casos aislados. Más seria es la posibilidad de que se diseminen en la comunidad. Recientemente, Wiener *et al* (1999) han descrito las características de una serie de casos detectados en un hospital de Chicago pero que tenían su origen en seis instituciones geriátricas asociadas a dicho hospital. Con todo, los brotes por cepas  $\beta$ LEA suelen afectar, sobre todo, a las unidades de cuidados intensivos. En un estudio llevado a cabo en unidades de este tipo de ocho países europeos, el 66% de los hospitales participantes aislaban cepas productoras de  $\beta$ LEA en el momento de la encuesta. La prevalencia era variable, desde el 1% al 59%.

En la mayor parte de los estudios epidemiológicos, incluidos los llevados a cabo en nuestro país, la aparición de brotes institucionales se asocia a la transmisión cruzada entre pacientes, mediada por el contacto con las manos del personal. El consumo de cefalosporinas de tercera generación es un factor de riesgo bien caracterizado en esos mismos estudios. La puesta en marcha de medidas de contención como el lavado frecuente de manos, el cambio de guantes cuando se manipulan los pacientes, etc., junto con el control en el uso de las cefalosporinas, suelen ser eficaces para controlar los brotes. Sin

embargo, es posible que el determinante genético de las  $\beta$ LEA se transmita por conjugación plasmídica a otras cepas de la misma o de otras especies de enterobacterias presentes en el tubo digestivo de los pacientes colonizados o infectados por una cepa de estas características. La experiencia acumulada en relación con la transferencia interespecies y la gran diversidad de tipos de  $\beta$ LEA que se han descrito nos alerta sobre la necesidad de que los laboratorios estén capacitados para detectar este tipo de resistencia, y para que se adopten rápidamente las medidas de control. En este sentido, tan sólo el uso racional de los antibióticos, dentro y fuera de los hospitales, ha demostrado ser una medida eficaz.

## **DETECCIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE $\beta$ LEA EN EL LABORATORIO**

Debido a la gravedad e importancia de algunas infecciones por cepas productoras de  $\beta$ LEA, 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 flora comensal, y a las limitaciones con los criterios habituales de sensibilidad, el papel del laboratorio de microbiología es crucial. Éste debe estar preparado para reconocer prontamente su presencia, dar la alerta ante la presencia de un fenotipo poco habitual 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  $\beta$ LEA que se han descrito y cuyas diferencias fenotípicas, a veces, son muy sutiles. Por otra, la posibilidad de encontrar cepas de enterobacterias que producen enzimas que no deben ser consideradas estrictamente como  $\beta$ LEA, como la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC en *E. coli* o la codificación plasmídica del gen *AmpC* por parte de diversos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, pero cuyo fenotipo puede parecerse al de las  $\beta$ LEA. De nuevo se remite al lector a la bibliografía especializada, como el trabajo de Thomson *et al.*, o la revisión que en su día hizo Ardanuy en este Boletín (accesible a través de la *web* de la SEIMC-Control de Calidad; <http://www.seimc.org>).

En la actualidad existen dos formas principales de enfocar el problema técnico de la detección de las  $\beta$ LEA. El primero es utilizar criterios modificados de interpretación de las pruebas de sensibilidad adoptando, por ejemplo, un punto de corte más bajo o un halo de inhibición menor. Este sistema no es perfecto, pues lleva consigo problemas de especificidad. Se puede confundir la presencia de una  $\beta$ LEA con la hiperproducción de AmpC cromosómica o plasmídica. Más importante aún, existen también problemas de sensibilidad, como ha sido puesto de manifiesto en artículos especializados. Sin embargo, a pesar de sus limitaciones, esta estrategia aumenta la posibilidad de detectar la presencia de una  $\beta$ LEA, o de otra enzima con un efecto similar, y su adopción tan sólo requiere la alerta del microbiólogo. Por ejemplo, en la cepa objeto del control, la mencionada estrategia hubiese sido suficiente. Lo mismo puede decirse de la detección de la mayor parte de los brotes descritos en nuestro país.

Un segundo enfoque para la detección de las  $\beta$ LEA consiste en utilizar pruebas especiales destinadas tanto al cribado como a su confirmación. Tampoco existe una prueba infalible pero, sin duda, este enfoque mejora la sensibilidad y la especificidad. Todas se basan en poner de manifiesto el efecto sinérgico de los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas sobre ciertas cefalosporinas de amplio especto o los monobactames. El método más habitual, presente en algunos sistemas comerciales y en el E-test®, es observar una disminución de al menos cuatro veces en el valor de la CMI de la ceftazidima en presencia de clavulanato. Otra posibilidad recomendable, por su sencillez, es la técnica de doble difusión con discos. Consiste en colocar discos con una carga estándar de diversas cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima) y de aztreonam alrededor de otro disco de amoxicilina/clavulanato, a una distancia respectiva de 25-30 mm. La presencia de una

$\beta$ LEA se manifiesta por el efecto sinérgico del inhibidor, bajo la forma de una ampliación del halo de uno o varios de los  $\beta$ -lactámicos. En los laboratorios que utilicen el procedimiento de difusión con discos como método base para las pruebas de sensibilidad antibiótica, puede bastar con la precaución de situar el disco de amoxicilina-clavulanato en la vecindad de los discos de las cefalosporinas.

A modo de resumen de este apartado, hay que volver a resaltar que no existe una metodología que aúne sensibilidad, especificidad y sencillez, dada la complejidad de la detección de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y de sus variantes. Desde un punto de vista más optimista, también hay que hacer notar que, con algunas de ellas, se puede resolver el problema con una adecuada relación entre esfuerzo y beneficio. Una vez más es primordial el buen criterio profesional a la hora de seleccionar las pruebas más convenientes a cada circunstancia.

## **TRATAMIENTO**

Poco después de las primeras descripciones de enterobacterias productoras de  $\beta$ LEA pudo comprobarse la ineficacia clínica de las penicilinas, cefalosporinas y monobactames, con independencia de que las respectivas CMI pudiesen interpretarse dentro de la categoría sensible. Por esta misma razón, debemos informar todos esos antibióticos como resistentes. Tres son las alternativas para el tratamiento: las combinaciones de un  $\beta$ -lactámico con un inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas, las cefamicinas y los carbapenemes.

Las combinaciones comerciales con inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas se han empleado con éxito en el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de  $\beta$ LEA. Sin embargo, hemos de estar alerta a la sensibilidad concreta de la cepa, ya que es posible encontrar microorganismos que son hiperproductores de  $\beta$ -lactamasas, e incluso cabe la posibilidad de seleccionar mutaciones que confieran resistencia a los inhibidores. Se ha postulado la conveniencia de asociar los inhibidores a una cefalosporina de amplio espectro, e incluso existen experiencias con éxito, pero limitadas desde el punto de vista clínico. Aparte del problema de disponer de formulaciones farmacéuticas comerciales, existe la incógnita teórica de una posible selección de mutaciones de resistencia para uno y otro compuesto.

Las cefamicinas suelen ser activas frente a muchas de las cepas productoras de  $\beta$ LEA, por lo que, en teoría, podrían utilizarse para su tratamiento. Sin embargo, el uso de estos antibióticos plantea el problema del desarrollo de resistencia por disminución de la permeabilidad (modificaciones de las porinas), por lo que se recomienda buscar otras alternativas. Los carbapenemes, como el imipenem y el meropenem son resistentes a la acción hidrolítica de las  $\beta$ LEA y muy activos frente a las enterobacterias. Debemos considerarlos como una buena opción que ha de utilizarse con prudencia, no sólo por la posibilidad de seleccionar resistencia entre las enterobacterias, tal como ha sido descrita, sino también por el efecto sobre otras bacterias oportunistas presentes en los mismos ámbitos hospitalarios en los que se producen los brotes por cepas productoras de  $\beta$ LEA.

## **BIBLIOGRAFÍA**

AMIES SGB, MILES RS. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the role of inhibitors in therapy. J Antimicrob Chemother 1998; 42:415-417.

ARDANUY C.  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado. Boletín de Control de Calidad SEIMC 1997; 9(1):11-18.

- 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.
- FIERER J, GUINEY D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. A plague of plasmids. *JAMA* 1999; 281:563-564.
- GARAU J. Clinical strategies for serious infections: a European perspective. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:397-404.
- KNOTHE H, SHAH P, KRUMERY V, ANTAL M, MITSUHASHI S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 6:315-317.
- LIVERMORE DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-584.
- LIVERMORE DM, YUAN M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases amongst *Klebsiella* spp. From intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:409-424.
- MEDEIROS AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24(supl):S19-S45.
- REVATHI G, SHANNON KP, STAPLETON PD, JAIN BK, FRENCH GL. An outbreak of extended-spectrum,  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella senftenberg* in a burns ward. *J Hosp Infect* 1998; 40:295-302.
- THOMSON KS, SANDERS CC, SMITH MOLAND E. Use of microdilution panels with and without  $\beta$ -lactamase inhibitors as a phenotypic test for  $\beta$ -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1393-1400.
- WIENER J, QUINN JP, BRADFORD PA, GOERING RV, NATHAN C, BUSH K, WEINSTEIN RA. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999; 281:517-523.