

Detección de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido por el sistema DIRAMIC

¹Escuela Latinoamericana de Medicina y ²Centro Nacional de Investigaciones Científicas

¹DrC. María Espino Hernández, ²DrC. Estrella Álvarez Varela, ²Lic. Ángela Zayas T, ²DrC. Rolando Contreras Alarcón

E-mail: mespino@elacm.sld.cu

RESUMEN

Se evaluó la capacidad del sistema DIRAMIC para detectar cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), mediante la comparación con dos métodos fenotípicos confirmatorios: doble difusión con discos y E-test. Noventa y siete aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. previamente caracterizados, no repetidos, sospechosos de producir BLEE se estudiaron por los tres procedimientos para determinar sensibilidad, especificidad y concordancia entre los resultados. Para el sistema DIRAMIC se encontró una sensibilidad de 85,7% y 92,7% y una especificidad de 100% y 92,9% en comparación con E-test y doble difusión con discos, respectivamente. Los valores de concordancia encontrados fueron muy altos (índice kappa > 0,80). Los resultados obtenidos avalan la utilidad del sistema DIRAMIC como vía rápida, factible y confiable, para alertar al médico acerca de la presencia de cepas productoras de enzimas BLEE, aunque es necesario profundizar y ampliar el estudio a modo de emitir resultados más precisos.

Palabras clave: Infecciones por Enterobacteriaceae, farmacorresistencia bacteriana, resistencia.

INTRODUCCIÓN

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos constituye en la actualidad un problema de salud mundial que dificulta el tratamiento de las infecciones, en particular, las adquiridas en el hospital. Por su menor nivel de toxicidad y efectos secundarios, los antibióticos del tipo β -lactámicos representan el grupo más numeroso de fármacos de uso habitual en la terapéutica antinfeciosa (1). Como una consecuencia de esta práctica, surgen y se diversifican a través del tiempo las enzimas β -lactamasas las que se erigen en la actualidad, como el principal y más eficiente mecanismo desarrollado por las bacterias para contrarrestar el efecto de dichas drogas. Se conocen hoy día, más de 200 enzimas β -lactamasas con una amplia variedad de perfiles de sustratos. Las denominadas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, predominantes en bacilos gramnegativos, están codificadas por plásmidos e hidrolizan fundamentalmente penicilinas y cefalosporinas. Variedades bioquímicas de estas enzimas originarias, con variados espectros de acción, constituyen las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) capaces de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos. A escala mundial, las cepas productoras de enzimas BLEE están ampliamente diseminadas en los hospitales y en la comunidad (2-4).

Desde hace aproximadamente una década, el sistema semiautomatizado DIRAMIC, se introdujo en Cuba a través de una red de centros asistenciales constituida en la actualidad por 36 hospitales entre los que figuran pediátricos, ginecobstétricos, clínicos quirúrgicos y otros centros médicos especializados del país. A través del presente trabajo se evalúa la capacidad del sistema DIRAMIC para detectar cepas productoras de enzimas BLEE en un grupo de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. multirresistentes, mediante la comparación con los métodos E-test y doble difusión con discos (DDD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 97 aislamientos clínicos (58 *Escherichia coli*, 28 *Klebsiella pneumoniae*, 7 *Klebsiella oxytoca* y 4 *Klebsiella ozaenae*), no repetidos, colectados durante el periodo junio a diciembre de 2008, obtenidos de pacientes hospitalizados de las siguientes instituciones participantes en la investigación: Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ), Hospital Pediátrico del Cerro y Hospital Pediátrico "Dr. William Soler".

Detección fenotípica de BLEE: Se emplearon de modo simultáneo el sistema semiautomatizado DIRAMIC, el método DDD y el E-test. Todas las pruebas fueron realizadas por un mismo técnico debidamente entrenado para estos fines.

Sistema semiautomatizado DIRAMIC: Utiliza como medio de cultivo Caldo de Mueller-Hinton, discos de antibiótico calidad reactivo (OXOID, Inglaterra) y una concentración de inóculo ajustado al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Para el trabajo con el equipo, cada tira de antibiograma (compuesta hasta por 24 pocillos) contiene, por cada pocillo, un disco del antibiótico a evaluar al que se adiciona 200 μ L de la suspensión de inóculo. Cada tira cuenta con un control positivo (200 μ L del medio de cultivo con el microorganismo sin antibiótico) y un control negativo (200 μ L del medio de cultivo solo). La lectura se realiza en las primeras 4 horas después de realizado el montaje. Para ello, se determinan los valores de densidad del inóculo en el pocillo control positivo, y a partir de este, se calcula el índice de crecimiento. Seguidamente, se realizan las lecturas de las muestras. El equipo ofrece valores en por cientos de inhibición los que son generados a partir del cálculo del índice de crecimiento en cada uno de los controles. De acuerdo a las normas establecidas por el fabricante, cifras iguales o por debajo de 60% se corresponden con el criterio de "Resistente", valores de inhibición entre 60-80% se corresponden con la categoría "Intermedio" o "Medianamente Susceptible", y valores de inhibición iguales o superiores a 80, hasta 100%, con la categoría "Sensible". Cada resultado es chequeado automáticamente por el equipo para determinar si el índice de crecimiento del microorganismo de prueba se encuentra entre los valores mínimo y máximo admisibles, emitiendo en ese caso la notificación de "antibiograma satisfactorio".

En este trabajo, se incluyeron las cefalosporinas, y las combinaciones con ácido clavulánico (AC): CAZ (30 μ g), (CAZ + AC) (30 μ g/10 μ g); CTX (30 μ g), (CTX + AC) (30 μ g/10 μ g). Se consideró que hubo producción de BLEE cuando se obtuvieron para CAZ y CTX valores de inhibición iguales o menores de 60% (Resistente), y para las correspondientes combinaciones con AC, valores iguales o superiores al 80% (Sensible). Se consideraron negativos los resultados (no presencia de BLEE), para valores de inhibición iguales o menores de 60% (Resistente) para los antibióticos solos y del 60-80% (Intermedio) en la combinación con AC, y cuando se obtuvieron valores entre 60-80% (Intermedio) para los antibióticos solos e iguales o superiores a 80% (Sensible) en la combinación con AC.

Doble difusión con discos (DDD): Se realizó por el método de Jarlier y colaboradores recomendado por la normativa del CLSI (5). Las placas de Agar Mueller-Hinton se inocularon con la suspensión bacteriana previamente ajustada al patrón 0,5 de la escala de McFarland. Sobre las placas se colocaron discos (OXOID, Inglaterra) con carga estándar (30 μ g) de CTX, ceftriaxona (CRO), CAZ, cefepima (FEP) y ATM, a una distancia equidistante aproximada de 20 mm de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20 μ g/10 μ g) colocado en el centro de la placa. Las placas se incubaron por 18-24 h. La aparición de una ampliación del halo de inhibición para algunas de las cefalosporinas de espectro amplio, o para ATM, se consideró como evidencia de la presencia de BLEE.

Prueba de E-test: Se emplearon tiras conteniendo las combinaciones: CAZ (0,5 - 32 μ g/mL) y CAZ + AC (0,064 - 4 μ g/mL); CTX (0,25 - 16 μ g/mL) y CTX + AC (0,016 - 1 μ g/mL); FEP (0,25 - 16 μ g/mL) y FEP + AC (0,064 - 4 μ g/mL) (AB Biodisk, Solna, Suecia). La concentración mínima inhibitoria (CIM) se determinó por la detección del punto en que la elipse de inhibición interceptó la escala de la tira. Se consideró producción de BLEE cuando el ácido clavulánico causó un decrecimiento de la CMI \geq 3 diluciones (radio \geq 8), si se produjo un halo "fantasma" o una deformación de la elipse, con independencia de los radios o de la CIM. Un resultado no determinable (ND) se consideró, cuando la CIM fue mayor que el rango de CIM de la tira de Etest respectiva. Para la interpretación de los resultados se siguieron los criterios del fabricante.

Procesamiento estadístico: Se determinó la sensibilidad y especificidad del sistema DIRAMIC en comparación con la DDD y el E-test por separado, considerando estas últimas pruebas como referencias. Se cuantificó el grado de concordancia entre los resultados por la determinación del índice Kappa de Cohen (k) para un nivel de confianza del 95%. Para determinar la significación de este valor se empleó la escala de Landis y Koch en la que (12): Muy fuerte: $k \geq 0,80$; Fuerte: $0,60 \leq k < 0,80$; Moderada: $0,40 \leq k < 0,60$; Escasa: $0,20 < k < 0,40$ y Nula: $k < 0,20$. El procesamiento de los datos se efectuó empleando el paquete estadístico EPIDAT, 3.0.

RESULTADOS

Por el sistema DIRAMIC se detectaron 42 (43,3%) cepas productoras de BLEE, contra un total de 41 (42,3%) identificados por DDD y 49 (50,5%) por E-test. Un total de 44 (45,4%) aislamientos fueron negativos por los

tres métodos. Cuatro (4,1%) resultados indeterminados por E-test fueron negativos por DIRAMIC y DDD. En la comparación con el método E-test se observaron para el DIRAMIC siete resultados discrepantes que fueron positivos por E-test y negativos por DIRAMIC. Ningún caso fue positivo por DIRAMIC y negativo por E-test. En comparación con la DDD, se observaron tres resultados negativos por DIRAMIC que fueron positivos por DDD, y cuatro resultados positivos por DIRAMIC que fueron negativos por DDD. En comparación con la DDD, la sensibilidad y especificidad obtenidas para el DIRAMIC fue de 92,7% y 92,9%; respectivamente, mientras que en comparación con el Etest, la sensibilidad fue de 85,7% y la especificidad del 100%. En ambos casos, el índice k obtenido fue superior a 0,80 indicativo de un grado de concordancia muy fuerte entre los resultados (tablas 1 y 2).

DISCUSIÓN

En Cuba, además del aporte económico, uno de los principales beneficios derivados de la creación de la Red Nacional de Laboratorios con equipos DIRAMIC, fue poder garantizar, a nivel nacional, la disponibilidad de un procedimiento para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos capaz de brindar datos coherentes y comparables. Estudios previos realizados por los propios autores de este trabajo, así como por otros investigadores, muestran la validez de los resultados alcanzados por la implementación del sistema en esta dirección (6).

En este estudio, para evaluar la capacidad del sistema DIRAMIC como método para identificar cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE, se realizó una comparación con dos procedimientos fenotípicos manuales, el método de DDD de Jarlier, y el Etest, ambos recomendados por la normativa del CLSI como pruebas confirmatorias. Idealmente, un equipo automatizado, o semiautomatizado como es el caso, debería tener suficiente sensibilidad para poder discriminar este tipo de enzimas y diferenciarlas de otros tipos de resistencias con el fin de ofrecer al médico, oportunamente, una interpretación adecuada de los resultados. En este trabajo, para el sistema DIRAMIC, se encontró una sensibilidad de 92,7% y una especificidad de 92,9% en comparación con la DDD; así como una sensibilidad de 85,7% y 100% de especificidad en comparación con E-test. Se comprobó, además, que el grado de concordancia entre los procedimientos (DIRAMIC vs. DDD y DIRAMIC vs. E-test) fue muy alto, partiendo del hecho que fueron debidamente controladas las variables principales que podían influir en la cuantificación del índice k (calidad en la ejecución de las técnicas y error atribuible al examinador).

Aunque los resultados encontrados en este trabajo avalan la utilidad del sistema DIRAMIC como vía rápida, factible y confiable, para alertar acerca de la presencia de cepas productoras de BLEE, se hace necesario ampliar y profundizar en el estudio a modo de emitir resultados más precisos. La caracterización molecular de las cepas estudiadas aquí, podría constituir un complemento importante a los resultados de la presente investigación.

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos por DIRAMIC con el método de doble difusión con discos

MÉTODO	Doble Difusión			Sensibilidad	Especificidad	k	p**
	Positivos	Negativos	TOTAL				
DIRAMIC							
Positivos	38	4	42	92,7	92,9	0,852	<0,001
Negativos	3	52	55				
TOTAL	41	56	97				

Leyenda: k: Índice de concordancia (Kappa de Cohen); **: significativo $p < 0,05$.

Tabla 2. Comparación de los resultados obtenidos por DIRAMIC con el método E-test

MÉTODO	E-test (*)			Sensibilidad	Especificidad	k	p**
	Positivos	Negativos	TOTAL				
DIRAMIC							
Positivos	42	0	42	85,7	100,00	0,850	<0,001
Negativos	7	44	51				
TOTAL	49	44	93				

Leyenda: (*): Se excluyeron cuatro resultados no determinables (ND) por Etest; k: Índice de concordancia (Kappa de Cohen) *: significativo $p < 0,05$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1081-85.
2. Martínez P, Mercado M, Máttar S. Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colom Med.* 2003;34(4):196-205.
3. Navarro-Navarro M, Moreno-Noriega B, López-Munguía B, Fragoso-Carmelo M del C, Sánchez-Padilla JA. Detección de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital Infantil del estado de Sonora. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son.* 2005;22(2):64-70.
4. Zemelman R, Valenzuela L, Domínguez M, Bello H, González G, Zemelman C. Detección de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. *Rev Chil Infect.* 2002;19(Supl. 2):S92-95.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI/NCCLS, 100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
6. Álvarez E, Espino M, Contreras R, Álvarez AB. Evaluación de la resistencia a los antimicrobianos por el sistema DIRAMIC. *Rev Panam Infectol.* 2005;7(4):28-32.