

Caracterización fenotípica de la resistencia antibiótica en aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* asociadas a infecciones intrahospitalarias

Drs. Andrea Sakurada Z.*, Alberto Fica C.,
Gloria Ruiz, Marisol Ruiz M.

Laboratorio Central y Comité de IIH, Hospital Clínico J.J. Aguirre

*Médico Becado de Laboratorio Clínico

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an important agent of nosocomial infections, and is often associated to multidrug antibiotic resistance that limit therapeutic options. A study was performed to characterize antibiotic resistance among *K. pneumoniae* isolates identified in nosocomial infection at our hospital. 18 isolates (from 17 patients) collected between January and July 1997 were analyzed according to the Kirby-Bauer procedure, and characterized according to antibiotyping, cluster analysis and phenotypic identification of known β -lactamases. Results showed a high percentage of resistance against trimetoprim-sulfamethoxazol, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin and cephalosporins. Furthermore, a high percentage of isolates demonstrated resistance against β -lactams- β -lactamase inhibitors combinations. Antibiotyping and cluster analysis indicated 3 phenotypic groups, characterized by a minor group (22%) of highly susceptible strains and two multiresistant groups, being one of these, associated with an outbreak in an intensive care unit. Phenotypic identification of known β -lactamases suggests that extended spectrum β -lactamases are prevalent and hyperproduced in highly resistant isolates.

INTRODUCCION

Klebsiella pneumoniae ocupa un importante lugar como agente de infecciones intrahospitalarias y está frecuentemente asociado a una resistencia que incluye diferentes familias de antimicrobianos. En años recientes el manejo de las infecciones asociadas a este agente, se ha complicado y limitado por reportes de brotes intrahospitalarios con cepas de *K. pneumoniae* resistentes a diversos antibióticos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas ^(1,2).

En nuestro medio existen escasos estudios que hayan caracterizado la aparición de cepas multiresistentes de *K. pneumoniae* en infecciones intrahospitalarias. Por ello se ha realizado un estudio que permita conocer la susceptibilidad de los aislamientos de *K. pneumoniae* aislados en las IIH presentes en nuestro hospital, conocer la magnitud de resistencia a diferentes antibióticos, los perfiles predominantes de resistencia y conocer la posible relación que pudiera existir entre perfiles específicos y ciertas variables epidemiológicas. También se ha realizado un análisis fenotípico de los mecanismos probables de resistencia ante diferentes β -lactámicos mediante el reconocimiento de perfiles específicos, lo que puede ser de utilidad para conocer las propiedades y características del pool genético imperante en esta especie.

METODOLOGIA

Para el desarrollo de este estudio se incluyen aislamientos de *K. Pneumoniae* identificados en IIH en los diferentes Servicios del Hospital Clínico J.J. Aguirre, durante los primeros 7 meses de 1997. Un

total de 18 aislamientos (de 17 pacientes) que cumplieran con los criterios de definición de IIH fueron identificados. En un caso se incluyeron muestras del mismo paciente pertenecientes a aislamientos del mismo sitio anatómico tomados con 18 días de diferencia. La resistencia antibiótica en *K. Pneumoniae* fue determinada por el método de Kirby-Bauer de acuerdo a normas estandarizadas (NCCLS) y analizadas mediante el porcentaje de resistencia individual ante diferentes antibióticos y por el análisis de los resultados combinados de resistencia para cada cepa (antibiotipos). Para el análisis se incluyeron doce antibióticos: trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, amikacina, cefazolina, cefuroxime, cefotaxima, ceftazidima e imipenem y las combinaciones con inhibidores de β -lactamasas: cefoperazona-sulbactam y ticarcilina-clavulánico.

La diversidad de antibiotipos fue analizada mediante la construcción de dendrogramas de distancias fenotípicas entre las diferentes combinaciones observadas^(3,4), utilizando para ello el programa computacional Statistica (Statsoft, Inc., version 4.5, 1993), que permite comparar dos perfiles entre sí y establecer las diferencias como una distancia relativa (en porcentaje de diferencia). El cálculo de estas distancias fue realizado mediante el algoritmo UPGMA (unweighed pair group matching

analysis) contenido en éste programa^(3,4). Las dendrográficas obtenidas fueron comparadas contra variables epidemiológicas para identificar posibles agrupamientos de algunos subgrupos con ciertas unidades de hospitalización o meses del año. Los perfiles de resistencia de los antibióticos β -lactámicos fueron comparados contra perfiles típicos de resistencia otorgados por diferentes β -lactamasas de acuerdo a la información disponible en la literatura^(4,5), para identificar las probables enzimas existentes en el pool genético de la muestra.

RESULTADOS

Los aislamientos estudiados provenían mayoritariamente de hemocultivos (n=8,44%), orina (n=4,22%), secreción bronquial (n=5,28%) y herida operatoria (n=1,6%). Las muestras fueron derivadas en un 56% de los casos desde la unidad de pacientes críticos (UPC), en un 28% de la unidad intermedia de cirugía (UCIC) y los restantes casos desde la unidad coronaria, servicio de traumatología y servicio de urgencia (uno de cada uno, 16% del total).

El análisis de la resistencia aislada ante antimicrobianos (figura 1) indica un elevado porcentaje de resistencia (igual o superior a 60%) ante trimetoprim-sulfametoxazol,

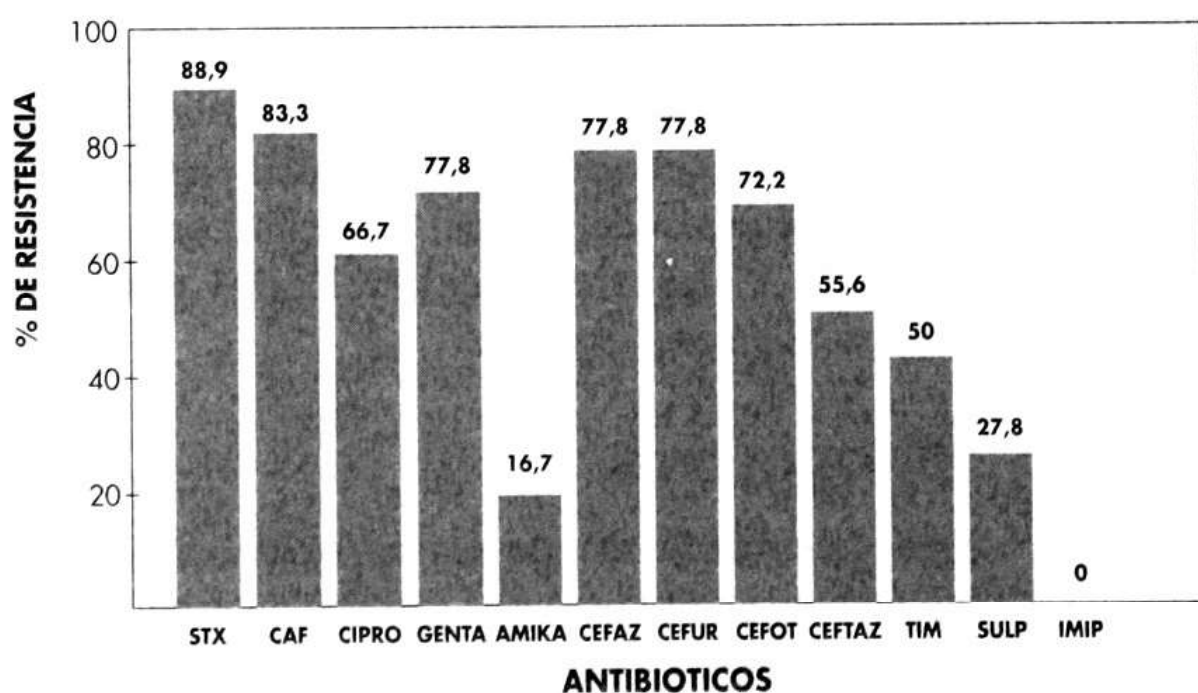


Figura 1. Distribución de la resistencia ante diferentes antibióticos en 18 aislamientos de *K. pneumoniae* asociadas a IIH. STX denota trimetoprim-sulfametoxazol; CAF: cloramfenicol; Cipro: ciprofloxacina; Genta: gentamicina; Amika: amikacina; Cefaz: cefazolina; Cefur: cefuroxime; Cefot: cefotaxima; Cefaz: ceftazidima; TIM: ticarcilina/ác. clavulánico; Sulp: sulbactam-cefoperazona; IMIP: imipenem. Los porcentajes específicos de resistencia se señalan en la parte superior de cada barra.

cloramfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, cefazolina, cefuroxima y cefotaxima. Asimismo, un número importante de cepas aparecen resistentes ante ceftazidima y las combinaciones ticarcilina-clavulánico y sulbactam-cefoperazona. Ninguna cepa fue resistente ante imipenem y sólo un 15% ante amikacina.

Los antibiogramas de los 18 aislamientos estudiados se pudieron organizar en 12 perfiles de combinaciones de resistencias (figura 2). Los perfiles de resistencia quedaron separados por una distancia máxima de 0,68 lo que equivale a que las cepas más distantes difieren hasta en el 68% de su resistencia antibiótica (en 8 de 12 antibióticos, aproximadamente). En la figura 2 se aprecia además la existencia de tres grupos fenotípicos que contienen 4, 8 y 6 aislamientos, respectivamente (Grupos A,B,C). Estos grupos están caracterizados por diferencias importantes en sus perfiles de resistencias (tabla 1). Por ejemplo el grupo A se caracteriza por aislamientos multisensibles en general o que expresan monoresistencia a antibióticos tradicionales. El grupo B se caracteriza por aislamientos multiresistentes, con resistencia universal a cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, incluyendo ceftazidima, además de gentamicina y ciprofloxacina (excepto en dos casos para este último antibiótico). El grupo C queda caracterizado por ser un grupo con sensibilidad intermedia entre dos grupos anteriores. Son aislamientos en general sensibles a ceftazidima (excepto en 2 casos), cefoperazona-sulbactam y ticarcilina-clavulánico. El promedio de resistencia antibiótica por cepa difiere entre estos tres grupos, siendo igual a 0,75 antibióticos resistentes por cepa para el grupo A, 9,6 para el grupo B y 6,0 para el grupo C. Dos perfiles idénticos fueron observados en el grupo A, cuatro en el grupo B y tres en el grupo C. En ninguno de estos casos las muestras provenían del mismo paciente.

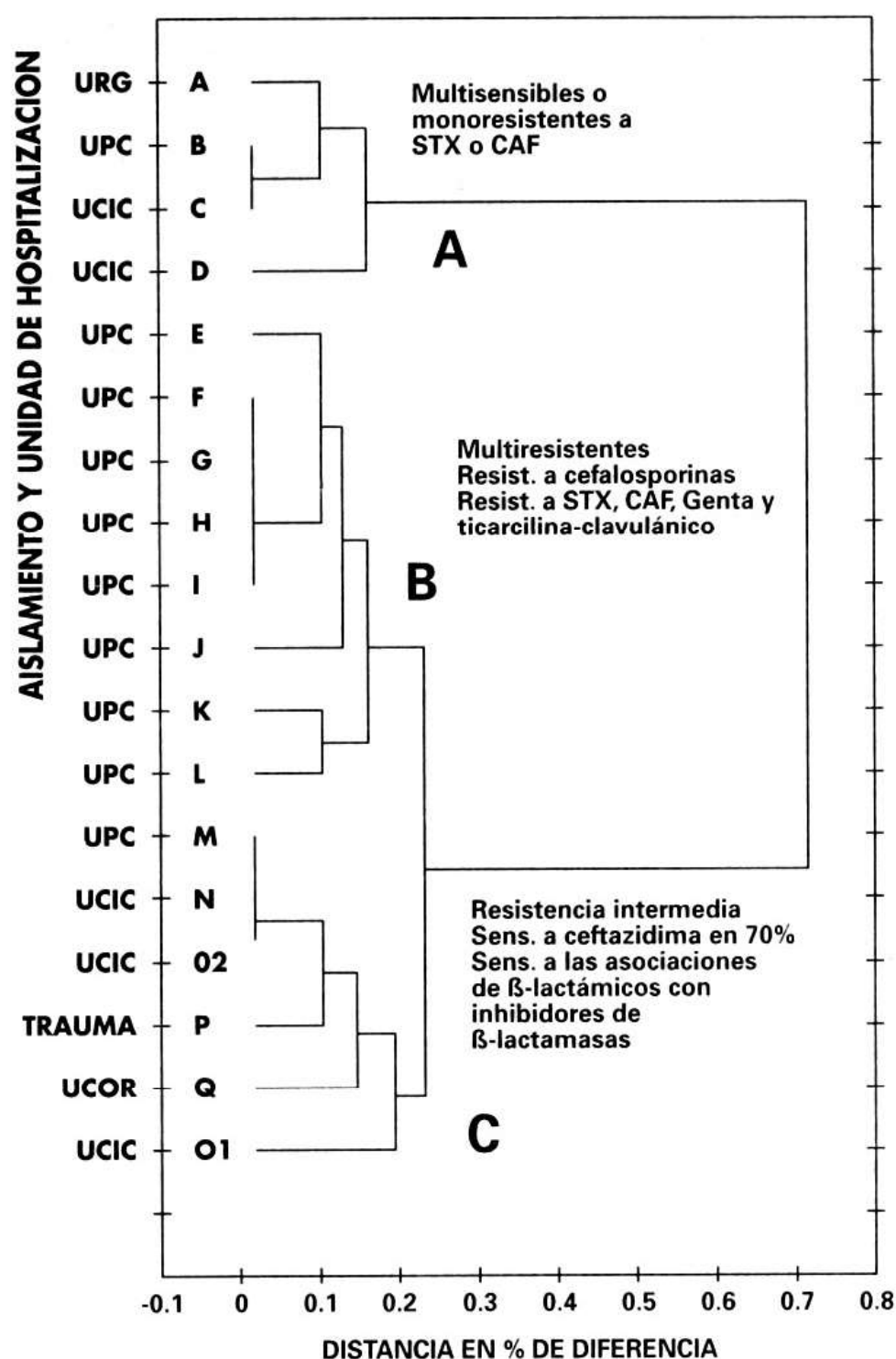


Figura 2. Arbol dendrográfico de los perfiles de resistencia en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* asociadas a IIH. El árbol fonotípico obtenido fue realizado mediante el algoritmo UPGMA (ver texto) y las distancias se expresan como porcentajes de diferencia entre perfiles (0,1 equivale a un 10% de diferencia en resistencia antibiótica). Los porcentajes y/o aislamientos se señalan a la izquierda, donde cada letra indica un aislamiento independiente. Aislamientos del mismo paciente se señalan con la misma letra pero diferenciados por un número que indica el orden relativo de los aislamientos. Las unidades de hospitalización se señalan en el extremo izquierdo de la figura y corresponden a URG: Urgencia, UPC: Unidad de pacientes críticos, UCIC: Unidad intermedia de cirugía, UCOR: Unidad coronaria, TRAUMA: traumatología. Las características comunes de resistencia a cada grupo se señalan al interior de la figura. Las nomenclaturas de los antibióticos son las mismas utilizadas en el texto.

Al comparar las diferentes ramas obtenidas en la figura 2 con parámetros epidemiológicos tales como la unidad de origen o la distribución temporal de estos aislamientos, se pudo apreciar que todos los aislamientos del grupo B fueron derivados desde la Unidad de Pacientes Críticos (UPC) (8 de 8) y en

Tabla 1. Grupos fenotípicos de resistencia en aislamientos intrahospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*.

Grupo	n	%	Características	Lugar	Mes
A	4	22%	Aislamientos multisensibles en general Sólo monoresistencia (STX o CAF) 0,75 antibióticos resistentes por cepa en promedio Promedio estadía hospitalaria: 4,6 días*	Unidades intermedias no relacionadas: UCIC-SAIM.	Febrero y Abril de 1997
B	8	45%	Multiresistentes Contiene grupos más frecuente Todas resistentes ante STX, CAF, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, incluyendo ceftazidima, resistencia a gentamicina y ticarcilina/ác.clavulánico. Casi todas resistentes ante sulbactam-cefoperazona y ciprofloxacina. 9,6 antibióticos resistentes por cepa en promedio Promedio estadía hospitalaria: 22,3 días*	Todas pertenecientes a la Unidad de Pacientes Críticos	Enero-Mayo de 1997 5 Cepas en Febrero-Marzo de 1997
C	6	33%	De sensibilidad intermedia En general sensibles a ceftazidima (excepto en 2 casos), sulbactam-cefoperazona y ticarcilina-clavulánico. 6,0 antibióticos resistentes por cepa en promedio Promedio estadía hospitalaria: 11,3 días*	Unidades no relacionadas	Enero-Mayo de 1997

*. Entre el ingreso y la identificación de la IIH por *K. pneumoniae*

Tabla 2. Perfiles de resistencia antibiótica conferidos por diferentes β -lactamasas en *Klebsiella pneumoniae* y presentación de algunos hallazgos en las cepas analizadas.

ENZIMA	SHV-1	TEM-1,2 SHV-1	ESBL* DERIVADAS DE TEM Y SHV	PERFIL OBSERVADO EN GRUPO B
CLASE UBICACION	A CROMOSOMAL	A PLASMIDIAL	A PLASMIDIAL	
Ampicilina	R	R	R	?
Amoxicilina	R	R	R	?
Amoxilina/clavulánico	S	R,I	R,I	?
Ticarcilina	R	R	R	?
Ticarcilina/clavulánico	S	R,I	R,I,S	R
Piperacilina	S,I	R,I	R	?
Pipercilina/tazobactam	S	S,I	S,I	?
Cefoperazona	S	S,I	R	R
Cefazolina	S	S	R	R
Cefuroxima	S	S	R	R
Cefotaxima	S	S	R	R
Ceftazidima	S	S	R	R
Aztreonam	S	S	R	?
Imipenem	S	S	S	S

S: Susceptible, I: Susceptibilidad Intermedia, R: Resistente

*Beta-lactamasas de espectro extendido

forma opuesta solo dos de los 10 aislamientos pertenecientes a los otros grupos provenían de esta unidad ($p < 0,002$ Test de Fisher bilateral). El análisis de la distribución temporal demostró que las cepas de la rama predominante en el grupo B, constituida por 4 aislamientos idénticos pertenecientes a la UPC, se concentraron en los meses de febrero y marzo de 1997. Un paciente contribuyó con un número repetido de muestras (2 aislamientos). Estos aislamientos no presentaron perfiles idénticos y se distribuyeron en ramas del mismo grupo fenotípico (casos 0-1 y 0-2 en figura 2.)

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los aislamientos de *K. pneumoniae* identificados en IIH de nuestro hospital están asociados predominantemente a multiresistencia, al igual que lo observado en otros centros hospitalarios ⁽¹⁾. Los aislamientos de *K. pneumoniae* de nuestro hospital son en general resistentes a gentamicina, ciprofloxacina y cefalosporinas de primera y segunda generación y la mitad de los aislamientos presentó también resistencia ante ceftazidima (aprox. 55%). Un número no despreciable presentó incluso resistencia ante combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas (27%-50%). Estudios previos desarrollados en este mismo centro, han revelado un aumento progresivo de la resistencia antibiótica ante ceftazidima en aislamientos de *K. pneumoniae* y otros bacilos gram negativos en un corto período de tiempo, con incrementos desde el 5% al 50% en sólo 6 años ⁽²⁾. La multiresistencia observada en *K. pneumoniae* determina que sólo un antibiótico de alto costo (imipenem) pueda ser utilizado empíricamente en el tratamiento de infecciones por este agente antes de contar con el informe de un antibiograma, o que en su defecto, un antibiótico nefrotóxico (amikacina) deba ser utilizado, lo que confirma las limitaciones del manejo de las IIH asociadas a este agente.

El análisis combinado de la resistencia antibiótica observada en cada aislamiento ha demostrado la

amplia diversidad bacteriana existente dentro de *K. pneumoniae* lo que indica los diferentes reservorios epidemiológicos asociados. Esta amplia diversidad se acompaña además por bacterias fenotípicamente muy distantes (hasta un 70% de divergencia) que sugiere una distancia genotípica real y por la existencia de grupos característicos que están asociados a unidades de hospitalización específicos o a diferentes tiempos de estadía hospitalaria. De esta manera es posible reconocer, un grupo menor (grupo A, 20%), que está asociado a bacterias multisensibles o escasamente resistentes y que se presenta en pacientes con estadías hospitalarias breves antes del diagnóstico de IIH por este agente (promedio 4,6 días, Tabla 1). Este tipo de IIH se explica por cuadros oportunistas causados por elementos de la microbiota que el paciente portaba al momento de ingresar al hospital. La existencia de este grupo señala la posibilidad de readecuar rápidamente el tratamiento antimicrobiano, una vez recibido el informe del antibiograma. Por otra parte, el grupo B está conformado por aislamientos *K. pneumoniae* multiresistentes ante antibióticos de primera línea como cefalosporinas, incluyendo ceftazidima, ciprofloxacino, algunas combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas y gentamicina. Estos aislamientos representan el 45% del total analizado, se agrupan de preferencia en la UPC, están asociados a estadías mayores antes del diagnóstico de IIH (promedio 22,3 días) y representan un reservorio intrahospitalario localizado. Este grupo determina escasas alternativas terapéuticas en estos pacientes y obliga a la elección de esquemas de muy alto costo. Un tercer grupo (grupo C), no asociado a la UPC y de distribución amplia en unidades intermedias quirúrgicas o médicas (UCIC, SAIM), unidad coronaria y traumatología, está caracterizado por aislamientos con un grado intermedio de resistencia y hospitalización que ofrece mayor flexibilidad terapéutica. Este grupo representa el 33% de los aislamientos, procede en general de muestras urinarias y su presencia podría permitir focalizar y educar sobre la selección de alternativas terapéuticas eficaces pero más económicas.

El análisis combinado por antibióticos ha permitido también reconocer un brote probable de IIH por *K. pneumoniae*, que se presentó entre los meses de febrero y marzo de 1997 en la UPC. Aunque, la identificación inequívoca de un brote requiere la participación de metodologías moleculares que permitan establecer la identidad clonal de los aislamientos involucrados, la estrecha asociación temporal y geográfica observada en concomitancia con perfiles de resistencia antibiótica idénticos, sugiere que efectivamente se presentó tal asociación. Métodos moleculares han sido utilizados previamente por investigadores nacionales para estudiar brotes por *K. pneumoniae* ⁽¹⁾ en unidades hospitalarias y han logrado demostrar que el estudio del perfil plasmidial tiene un alto poder discriminatorio y que el análisis de los perfiles de resistencia tiene una buena correlación como método inicial de análisis ⁽¹⁾. Una revisión de los procedimientos de control en esa unidad durante los meses del brote permitió identificar una escasez momentánea de toallas desechables para el secado de manos del personal. La corrección de este problema permitió controlar la aparición de nuevas infecciones por este agente de la UPC, desde el mes de Mayo de 1997.

Diferentes grupos de β -lactamasas podrían explicar la resistencia a estos antibióticos en *K. pneumoniae*. Estas enzimas incluyen a β -lactamasas ubicadas a nivel cromosomal y a enzimas que se localizan genéticamente a nivel plasmidial. Las enzimas cromosomales encontradas en *K. pneumoniae* pertenecen a la clase molecular A ^(5,6) y en general se expresan en forma constitutiva y en cantidades moderadas, lo que les permite conferir resistencia a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina y ticarcilina. La resistencia a piperacilina se presenta en forma más equívoca, dependiendo del inóculo utilizado y del contenido de antibiótico en el disco. Debido a la codificación cromosomal de estas enzimas y a su expresión constitutiva, *K. pneumoniae* es generalmente resistente a estos antibióticos. Sin embargo, como enzimas pertenecientes a la clase A, pueden ser inhibidas por la adi-

ción de inhibidores de β -lactamasas, lo que les permite aparecer susceptibles ante las combinaciones-clavulánico, piperacilina-tazobactam o amoxicilina-clavulánico (Tabla 2) ⁽⁵⁾.

Las enzimas de codificación plasmidial, son frecuentes de observar en *K. pneumoniae*. Ellas pueden corresponder a las β -lactamasas tradicionales TEM-1, TEM-2 o SHV-1, que confieren resistencia a ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, y en ocasiones a cefoperazona, amoxicilina-clavulánico, ticarcilina-clavulánico o piperacilina-tazobactam, lo que se observa en casos de hiperproducción de estas enzimas relacionadas codificadas a nivel cromosomal, estas enzimas no confieren resistencia ante ceftazidima, por lo que pueden ser excluidas como mecanismo de resistencia para el grupo B. Una miríada de β -lactamasas, han evolucionado a partir de estas enzimas, con mutaciones que modifican el sitio activo y que permiten incrementar el espectro de resistencia ^(5,6,7). Estas enzimas corresponden a la serie TEM-3 y números mayores y SHV-2-SHV-7. En forma característica, estas β -lactamasas otorgan resistencia a los mismos antibióticos señalados para las enzimas de origen y además resistencia ante cefoperazona (en forma inequívoca) y ante cefuroxima, cefotaxima y aztreonam. Sin embargo, el marcador característico para esta serie de enzimas derivadas, corresponde a la resistencia que otorgan ante ceftazidima (Tabla 2) ⁽⁵⁾. Estas enzimas se han denominado β -lactamasas de espectro extendido (ESBL en la literatura internacional) no siendo activas contra Imipenem o Meropenem y a pesar de que puedan ser inhibidas por ácido clavulánico o cualquiera de los otros inhibidores, solo presentan una sensibilidad más definida con la combinación Piperacilina-Tazobactam.

Las consideraciones anteriores permiten, mediante un análisis fenotípico, aproximarse a la identificación de las β -lactamasas presentes en los aislamientos más resistentes de *K. pneumoniae*, identificados en nuestro hospital. De esta manera, las cepas pertenecientes al grupo B, podrían ser portadoras

de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL). A pesar de que estas enzimas son teóricamente susceptibles de ser inhibidas por la adición de tazobactam, sulbactam o ácido clavulánico, se puede observar que los aislamientos de *K. pneumoniae* de este grupo, son universalmente resistentes ante la combinación ticarcilina-clavulánico y en general resistentes ante la combinación cefoperazona-sulbactam. Este comportamiento es explicado probablemente por la hiperproducción de estas enzimas. Lamentablemente, no se pudo explorar la susceptibilidad ante piperacilina-tazobactam, una combinación que permite inhibir en forma más categórica, aunque no inequívoca, las enzimas de espectro extendido⁽⁵⁾. Las 2 cepas resistentes a ceftazidima y susceptibles a ticarcilina-clavulánico, identificadas en el grupo C son probablemente portadoras de estas mismas enzimas con menores niveles de expresión.

La probable existencia de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *K. pneumoniae* deberá ser confirmada con procedimientos complementarios. Sin embargo, su existencia sugiere que una alta presión selectiva por el uso indiscriminado de antibióticos, es operativa en nuestro medio, facilitando la selección y sobrevida de estas variantes enzimáticas. Este fenómeno, obliga a iniciar campañas activas para lograr un uso racional y controlado de antibióticos en nuestro hospital, las que de implementarse podrían limitar la generación de nuevas variantes o incluso impedir su sobrevivencia y diseminación. Por otra parte, la asociación característica de estas enzimas con plásmidos, enfatiza el potencial de diseminación de pool genético obtenido por presión selectiva y pone de relieve la importancia de las medidas de control y contención. Más aún, los genes que codifican por β -lactamasas

a nivel plasmidial, parecen estar incorporados en cassettes genéticos junto a otros determinantes de resistencia en estructuras denominadas integrones, los que facilitan tanto la diseminación en bloque de la multiresistencia, como su expresión conjunta⁽⁷⁾. De esta manera, el pool genético contenido en aislamientos de *K. pneumoniae* asociados a IIH en nuestro hospital, podría contener no sólo β -lactamasas de espectro extendido, sino que también integrones con numerosos cassettes de resistencia antibiótica, que complicarán progresivamente el manejo de las IIH.

REFERENCIAS

1. Maggi L, Paya E, Nercelles P, Cordovez A, Martinez J, Prado V, Squella F, Mendoza C. Perfil plasmidial de *Klebsiella pneumoniae*, cepas endémicas y aisladas de brotes en una unidad de neonatología. *Rev. Chil. Pediatr.* 1994;65:1-6.
2. Beltrán C, Thompson L, Borie C, González C, Silva M. Alta resistencia a ceftazidima en bacilos gram negativos intrahospitalarios: estudio prospectivo entre 1985 y 1991. *Rev. Chil. Infectología* 1995;12:129-35.
3. Sneath PHA, Sokal RR. Taxonomic structure. En: Sneath PHA, Sokal RR, eds. *Numerical Taxonomy*. San Francisco, CA: WH Freeman & Co. 1973;188-308.
4. Triantafilo V, Fica A, Silva M, Thompson L. Uso de E-Test para determinar concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), estimar la diversidad bacteriana e identificar presuntivamente β -lactamasas en cepas de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. *Rev. Méd. Chile* 1997;125:149-60.
5. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995;8:557-84.
6. Bush K, Jacoby GA, Medieros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.
7. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994;264:375-82.