



# Detección de cepas productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido por el sistema DIRAMIC: Comparación con los métodos doble difusión con discos y E-test

María Espino H., Estrella Álvarez V., Ángela Zayas T. y Rolando Contreras A.

Escuela Latinoamericana de  
Medicina, La Habana, Cuba  
(MEH).  
Centro Nacional de  
Investigaciones Científicas  
(CNIC), La Habana, Cuba (EAV,  
AZT, RCA).

Institución donde se realizó el  
trabajo: Centro Nacional de  
Investigaciones Científicas (CNIC),  
La Habana, Cuba.  
Fuente de financiamiento: CNIC

Recibido: 14 de diciembre de 2009  
Aceptado: 7 de septiembre de 2010

Correspondencia a:  
Rolando Contreras Álvarez

## Detection of expanded-spectrum-betalactamases by DIRAMIC system: Comparison with the double-disk synergy test and E-test

The capacity of the DIRAMIC system to detect strains producing extended-spectrum-betalactamase (ESBL) was evaluated through the comparison with two phenotypic confirmatory tests: double-disk synergy test and E-test. Ninety seven clinical isolates of *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. previously characterized; not repeated and suspected of being ESBL producers were studied by the three methods. In comparison with E-test and double-disk synergy test, DIRAMIC system showed a sensitivity of 85.7% and 92.7% as well as specificity of 100% and 92.9%; respectively. The values found have a very high degree of concordance ( $\kappa$  index > 0.80). The results obtained vouch for the utility of the DIRAMIC as a rapid method to alert about the presence of strains producing ESBL enzymes.

**Key words:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, extended spectrum betalactamases.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

## Introducción

La resistencia de las bacterias a antimicrobianos constituye en la actualidad un problema 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  $\beta$ -lactámicos representan el grupo de antimicrobianos de uso más habitual en la terapéutica anti-infecciosa. Como una consecuencia de esta práctica, surgen y se diversifican a través del tiempo las enzimas  $\beta$ -lactamasas las que se erigen en la actualidad, como el principal y más eficiente mecanismo desarrollado por las bacterias para contrarrestar el efecto de dichos fármacos<sup>1</sup>.

Se conocen hoy día, más de 200  $\beta$ -lactamasas con una amplia variedad de perfiles de sustratos. Las denominadas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, predominantes en bacilos gram-negativos, están codificadas por plásmidos e hidrolizan fundamentalmente penicilinas y cefalosporinas. Variedades bioquímicas de estas enzimas originarias, con variados espectros de acción, constituyen las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) capaces de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos. Entre otras, las del tipo CTX-M, son comunes en miembros de la familia Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp<sup>1,2</sup>.

A escala mundial, las cepas productoras de BLEE

están ampliamente diseminadas en los hospitales y en la comunidad. Un número importante de estas enzimas se inactivan por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) y no son activas contra cefamicinas y carbapenémicos. No obstante, algunas de ellas, por una selección de mutaciones, amplían sus propiedades fenotípicas para incrementar sus perfiles de sustratos o crear resistencia a los inhibidores. Aunque muchos aspectos bioquímicos y de la estructura molecular de las enzimas BLEE se han estudiado profundamente, y son por lo general bien comprendidos, éstas perfeccionan cada vez más su acción catalítica entorpeciendo su caracterización en el laboratorio<sup>2-4</sup>.

El laboratorio de microbiología juega un papel crucial en la detección de las cepas productoras de BLEE, por la dificultad que entrañan para el tratamiento las infecciones que causan y por su comportamiento epidemiológico. No obstante, dado el carácter constitutivo de la mayoría de estas enzimas, su nivel de expresión en las pruebas de laboratorio resulta muchas veces escaso y enmascara los resultados de los antibiogramas derivando en informes de falsa susceptibilidad, que conducen a fallos terapéuticos<sup>2</sup>.

Diferentes procedimientos técnicos han sido normalizado por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, siglas en inglés) para presumir y confirmar la presencia de BLEE en los aislados de prueba, específicamente, en *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella*



*oxytoca* y *Proteus mirabilis*<sup>5</sup>. Otros métodos como el Etest (epsilometría) y algunos sistemas automatizados, también han sido avalados, a través de diferentes estudios, para estos fines<sup>6-8</sup>.

Desde hace aproximadamente una década, se inició en Cuba la introducción del sistema semi-automatizado DIRAMIC-Cuba a través de una red de centros asistenciales, constituida en la actualidad por 36 hospitales entre los que figuran pediátricos, gineco-obstétricos, clínicos quirúrgicos y otros centros médicos especializados del país. El equipo permite detectar cambios turbidimétricos debido al crecimiento microbiano, para lo cual emplea dos dispositivos fundamentales: un minilector turbidimétrico estático y un sensor a microflujo accionado por una bomba peristáltica y acoplado a una microcomputadora con un paquete de programas para la adquisición, procesamiento y creación de bases de datos para generar los reportes necesarios. El juego de diagnóstico consta de un frasco con medio de cultivo, que contiene un polímero con actividad de-represora y dos sustratos que se adicionan opcionalmente para la identificación particular de *E. coli*, así como un número determinado de discos de antimicrobianos, organizados en una tira, para la determinación del antibiograma a partir de colonias aisladas o de muestras positivas que se obtienen directamente de las fuentes que las contienen, como por ejemplo, muestras de orina, incluyendo la identificación simultánea de *E. coli*<sup>9</sup>. Algunas de sus aplicaciones ya han sido evaluadas mientras que otras se encuentran en proceso a lo largo de la red de hospitales cubanos<sup>10</sup>.

Mediante el presente trabajo se evalúa la capacidad del sistema DIRAMIC para detectar las cepas productoras de enzimas BLEE, en un grupo de aislados clínicos de *E. coli* y *Klebsiella* spp, posibles portadores de dichas enzimas, mediante la comparación con los métodos E-test y doble difusión con discos (DDD).

## Materiales y Métodos

**Aislados bacterianos.** Se estudiaron 97 aislados clínicos (58 *E. coli*, 28 *K. pneumoniae*, 7 *K. oxytoca* y 4 *K. ozaenae*), no repetidos, colectados durante el período junio a diciembre de 2008, y que fueran 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. Wiliam Soler", todos de la Ciudad de La Habana, Cuba. Las cepas fueron debidamente tipificadas mediante el sistema para la identificación de Enterobacteriaceas API 20E (API Biochemical Identification Kits, BioMérieux) y la procedencia de estas fue: urocultivo (n: 53), pus de lesiones (n: 16), secreción de herida quirúrgica (n: 14), hemocultivo (n: 4), exudado

uretral (n: 4), secreciones respiratorias (n: 4) y exudado vaginal (n: 2). Todos los aislados eran potenciales productores de BLEE, de acuerdo al resultado de la prueba presuntiva, basado en el método de difusión con discos (Bauer-Kirby), según lo establecido por CLSI<sup>5</sup>. Dichas cepas presentaron resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los siguientes antimicrobianos: (antimicrobiano y medida límite del halo de inhibición correspondiente a los posibles productores de BLEE, según lo establece el CLSI): ceftazidima (CAZ) 30 mg  $\leq$  22 mm; ceftriaxona (CRO) 30 mg  $\leq$  25 mm; cefotaxima (CTX) 30 mg  $\leq$  27 mm; y aztreonam (ATM) 30 mg  $\leq$  27 mm<sup>5</sup>.

En todos los ensayos se utilizaron como controles negativo y positivo cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603, respectivamente.

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

**Sistema semi-automatizado DIRAMIC:** Utiliza como medio de cultivo caldo de Mueller-Hinton, discos de antimicrobiano 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 antimicrobiano a evaluar al que se adiciona 200 mL de la suspensión de inóculo. Cada tira cuenta con un control positivo (200 mL del medio de cultivo con el microorganismo sin antimicrobiano) y un control negativo (200 mL del medio de cultivo solo). La lectura se realiza en las primeras cuatro 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 porcentajes 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 y 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". Los resultados obtenidos y los datos editados de cada muestra se pasan automáticamente para crear las bases de datos correspondientes<sup>9</sup>.



En este trabajo, para la detección fenotípica de BLEE se incluyeron en la tira de antibiograma del equipo cefalosporinas y las combinaciones con ácido clavulánico (AC) siguientes: CAZ (30 µg), (CAZ + AC) (30 µg/10 µg) y CTX (30 µg), (CTX + AC) (30 µg/10 µg). Se consideró que hubo producción de BLEE cuando se obtuvieron para CAZ o 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), cuando los valores de inhibición fueron iguales o menores de 60% (resistente) para las cefalosporinas solas y del 60-80% (intermedio) en la combinación con AC, y cuando se obtuvieron valores entre 60-80% (intermedio) para las cefalosporinas solas 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 cols<sup>11</sup>. 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 mg) de CTX, CRO, CAZ, cefepima (FEP) y ATM, a una distancia equidistante aproximada de 20 mm de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20 µg/10 mg) 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 µg/mL) y CAZ + AC (0,064-4 µg/mL); CTX (0,25-16 µg/mL) y CTX + AC (0,016-1 µg/mL); FEP (0,25-16 µg/mL) y FEP + AC (0,064-4 µg/mL) (AB Biodisk, Solna, Suecia). La concentración inhibitoria mínima (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 CIM  $\geq 3$  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 E-test respectiva. Para la interpretación de los resultados se siguieron los criterios del fabricante.

**Análisis estadístico:** Se determinó la sensibilidad y especificidad del sistema DIRAMIC en comparación con la DDD y el E-test por separado, considerando estas últimas como “pruebas de oro”. Se cuantificó el grado de concordancia entre los resultados por la determinación del índice Kappa de Cohen (k) para un nivel de confianza de 95%. Para determinar la significación de este valor se empleó la escala de Landis y Koch en la que<sup>12</sup>: *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%) aislados fueron negativos por los tres métodos. Cuatro (4,1%) resultados indeterminados por E-test fueron negativos por DIRAMIC y DDD (Tabla 1).

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 la 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 (Tabla 2).

En comparación con la DDD, la sensibilidad y especificidad obtenidas para el DIRAMIC fueron de 92,7% y 92,9%; respectivamente, mientras que en comparación con el E-test, 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 3 y 4).

Por el sistema DIRAMIC, 45,2% de los aislados productores de BLEE se detectaron con CTX, CTX+AC mientras que 46,7% de las cepas se revelaron por la presencia de las dos cefalosporinas ensayadas y sus combinaciones con ácido clavulánico (CTX; CTX+AC y CAZ, CAZ+AC). Mediante el E-test, la presencia de las tres cefalosporinas utilizadas y sus correspondientes combinaciones con el ácido clavulánico (CTX, CTX+AC; CAZ, CAZ CTX+AC y FEP; FEP+AC) detectaron 43 del total de los 49 aislados productores de BLEE para 87,8% (Tabla 5).

## 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, en toda la nación, la disponibilidad de un procedimiento para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, capaz de brindar datos coherentes y comparables. Desde su concepción, la tecnología DIRAMIC incluyó soluciones de alta racionalidad y originalidad, entre las que se destaca la introducción del concepto de lector óptico no convencional a microflujo continuo, que abarata y simplifica notablemente el sistema


**Tabla 1. Resultados de la detección de BLEE por DIRAMIC, doble difusión con discos y E-test**

Organismo	DIRAMIC		Doble difusión con discos		E-test *		ND (%)
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)	
<i>E. coli</i>	33 (34,0)	25 (25,8)	35 (36,1)	23 (23,7)	38 (39,2)	16 (16,5)	4 (4,1)
<i>K. pneumoniae</i>	8 (8,2)	20 (20,6)	5 (5,2)	23 (23,7)	8 (8,2)	20 (20,6)	0
<i>K. oxytoca</i>	1 (1,0)	6 (6,2)	1 (1,0)	6 (6,2)	2 (2,1)	5 (5,2)	0
<i>K. ozaenae</i>	0	4 (4,1)	0	4 (4,1)	1 (1,0)	3 (3,1)	0
Total	42 (43,3)	55 (56,7)	41 (42,3)	56 (57,7)	49 (50,5)	44 (45,4)	4 (4,1)

\* Se excluyen 4 aislados de *E. coli* con resultado no determinable (ND) por E-Test® (los cuatro, negativos por doble difusión con discos y DIRAMIC).

convirtiéndolo en una atractiva opción para países con recursos limitados. Tiene como ventajas sobre otros sistemas, que utiliza discos de antimicrobianos que pueden incorporarse a voluntad, permitiendo conformar los juegos atendiendo a las necesidades del cliente, con un alto nivel de flexibilidad, lo que lo hace competitivo con respecto a los juegos de diagnóstico existentes, en particular, las galerías para la determinación del antibiograma, que habitualmente utilizan un conjunto rígido de antimicrobianos que están especialmente diseñados para países específicos. Las características distintivas del sistema DIRAMIC se conforman en varias invenciones, una de ellas solicitada en el año 1993 (concedida en Brasil), y tres prioridades cubanas del año 1997, que posteriormente fueron presentadas como una solicitud a través del Tratado de Cooperación de Patentes (PCT siglas en inglés) la que ha sido concedida, hasta el presente, además de en Cuba, en Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, China, México, Chile, Argentina, Filipinas, y la Oficina Europea de Patentes (España, Portugal, Italia, Alemania, Francia, Suecia, Suiza, Reino Unido, Bélgica, Países Bajos), lo que corrobora su nivel de originalidad. Estudios previos realizados por los propios autores de este trabajo, así como por otros investigadores, muestran los resultados alcanzados por su utilización, tanto en Cuba como en otras regiones<sup>13-17</sup>.

En esta investigación se compararon diferentes métodos de detección de BLEE; no obstante, constituyó una limitante el no haber contado con un sistema de referencia de mayor exactitud, como es la prueba fenotípica confirmatoria recomendada por la normativa del CLSI (no se dispuso de una cantidad suficiente de discos de CTX+AC y CAZ+AC), o mejor aún, de un método molecular, que permitiera proporcionar, además, una información epidemiológica valiosa adicional. Tampoco ha sido posible, hasta el momento, realizar comparaciones del DIRAMIC con otros métodos automatizados o semi-automatizados ya validados para éste u otros fines.

Idealmente, un equipo automatizado, o semi-automatizado, debería tener suficiente sensibilidad para poder discriminar enzimas BLEE y diferenciarlas de otros mecanismos de resistencia con el fin de entregar

**Tabla 2. Resultados discrepantes obtenidos con el DIRAMIC en comparación con la doble difusión con discos y el E-Test®**

Identificación del aislado	Organismo	DIRAMIC	DDD	E-test
(78-M-2)	<i>E. coli</i>	-	+	+
623	<i>E. coli</i>	-	+	+
434-U <sup>(a)</sup>	<i>E. coli</i>	-	+	+
879-U	<i>E. coli</i>	+	-	+
845-M	<i>E. coli</i>	-	-	+
844-M	<i>E. coli</i>	-	-	+
1100	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+
36-TH	<i>K. ozaenae</i>	-	-	+
591-U1	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+
1-V	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+
100-M	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+

+ positivo; - negativo. (a): Cepa para la que se obtuvo por DIRAMIC un resultado "indiferente" para cefotaxima (valor de inhibición entre 60-80%) y "sensible" (más de 80%) para la combinación cefotaxima/ácido clavulánico. (\*): Resultado positivo para las tres combinaciones de las cefalosporinas con ácido clavulánico probadas.

**Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos por DIRAMIC con el método de doble difusión con discos**

Método	Doble difusión			Sensibili-	Especifi-	k	p**
DIRAMIC	Positivos	Negativos	Total	dad	cidad		
Positivos	38	4	42	92,7	92,9	0,852	< 0,001
Negativos	3	52	55				
Total	41	56	97				

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

**Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos por DIRAMIC con el método E-test**

Método	E-test (*)			Sensibili-	Especifi-	K	p**
DIRAMIC	Positivos	Negativos	Total	dad	cidad		
Positivos	42	0	42	85,7	100,00	0,850	< 0,001
Negativos	7	44	51				
Total	49	44	93				

(\*): Se excluyeron cuatro resultados no determinables (ND) por E-test; k: Índice de concordancia (Kappa de Cohen) \*: significativo p < 0,05



Tabla 5. Fenotipos de BLEE identificados por DIRAMIC y E-test.

Método	N de aislados positivos a BLEE (%)					
	CTX, CTX/CA	CAZ, CAZ/CA	FEP, FEP/CA	CTX, CTX/CA y CAZ, CAZ/CA	FEP, FEP/CA y CTX, CTX/CA	CTX, CTX/CA; CAZ, CAZ/CA y FEP, FEP/CA
DIRAMIC	19 (45,2)	3 (7,2)	NP	20 (47,6)	NP	NP
E-test	0	0	0	1 (2,0)	5 (10,2)	43 (87,8)

CTX: cefotaxima; CA: ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; NP: no probado.

oportunamente al médico 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 el 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).

Las discrepancias del DIRAMIC con los dos métodos de referencia utilizados fueron mínimas (Tabla 2). Las más interesantes estuvieron centradas en dos cepas de *E. coli*, una *K. oxytoca* y una *K. ozaenae* que fueron negativas por DIRAMIC, así como por DDD, y sin embargo, fueron positivas por E-test, todas, por la conjunción de las tres cefalosporinas utilizadas en este sistema (CTX, CAZ y FEP). Aunque algunos estudios refieren que CAZ comúnmente detecta a la mayoría de los aislados productores de BLEE, existen evidencias de la contribución a la sensibilidad de detección de cualquier sistema que combine de forma simultánea varias cefalosporinas. Para el caso de la introducción en E-test de la tira FEP, FEP+AC; se plantea una mayor sensibilidad en la detección de enzimas BLEE (98%) y se considera particularmente útil en poblaciones con alta prevalencia de especies de *Enterobacter* productoras de BLEE, en las que la  $\beta$ -lactamasa AmpC inducible, coexiste comúnmente con las primeras<sup>6,23</sup>.

Llama también la atención entre los resultados discrepantes obtenidos, un aislado de *E. coli* (cepa denominada en la Tabla 2 como 434-U) la que fue negativa por DIRAMIC y positiva por DDD y E-test. Dicho aislado se comportó como “medianamente susceptible” para CTX y “sensible” para la combinación CTX+AC, resultado que se interpretó como negativo según los criterios establecidos para el sistema DIRAMIC en estas determinaciones. No obstante, teniendo en cuenta lo observado aquí, resultados similares a éste podrían considerarse no concluyentes y estar sujetos a comprobación.

Diferentes investigaciones realizadas en Cuba indican la existencia en nuestros hospitales de bacterias gram-

negativas productoras de BLEE, particularmente *E. coli* y *Klebsiella* spp, con tasas de prevalencia variables<sup>24-27</sup>. González y cols, como resultado de sus estudios, informan porcentajes de 10 y 36% en *E. coli* y *Klebsiella* spp productoras de BLEE, respectivamente<sup>26,27</sup>. En correspondencia con dicho hallazgo, resultó llamativo en este trabajo, haber identificado por el sistema DIRAMIC 45,2% de cepas productoras de BLEE con actividad única sobre CTX, de donde se infiere, coincidiendo también con los resultados de otros estudios, que podría existir una importante diseminación en nuestro medio de microorganismos productores de enzimas tipo cefotaximasas<sup>28,29</sup>.

Por otra parte, el hecho de que un número importante de cepas productoras de BLEE (ya bien por DIRAMIC o por E-test) se identificaron por la presencia de varias cefalosporinas, ratifica, el incremento de la sensibilidad de detección cuando se conjugan varios de estos compuestos, y que la expresión enzimática puede variar en correspondencia con el sustrato utilizado y el método empleado, tal y como se observó en el presente trabajo, aspecto éste que fuera señalado antes por otros autores<sup>22</sup>.

Aunque los resultados encontrados en el presente estudio hablan a favor de la utilidad del sistema DIRAMIC como vía rápida y factible para alertar al médico acerca de la presencia de posibles 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.

*Agradecimientos:* Agradecemos la colaboración brindada por las instituciones: Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ), Hospital Pediátrico del Cerro y Hospital Pediátrico “Dr. William Soler” de donde se obtuvieron las cepas para la realización del presente trabajo.

## Resumen

Se evaluó la capacidad del sistema DIRAMIC-Cuba para detectar cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), mediante la comparación con



dos métodos fenotípicos confirmatorios: doble difusión con discos y E-test. Noventa y siete aislados 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, para alertar al médico acerca de la presencia de cepas productoras de BLEE, aunque es necesario profundizar y ampliar el estudio a modo de emitir resultados más precisos.

## Referencias

- Fisher J F, Merouch S O, Mobashery S. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* 2005; 105: 395-424.
- Morales R. Terapia de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil Infect*. 2003; 20 (Supl 1): S24-S27.
- Livermore DM. Bacterial resistance: Origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis* 2003; 36: S11-23.
- Cha J, Kotra LP, Mobashery S. Resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics mediated by  $\beta$ -lactamasas: Structure, mechanism, and evolution. En: Wax R, Leis K, Salyers AA, Taber H (Editores). *Bacterial resistance to antimicrobials*. Second edition, 2008. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, pp 103-32.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th Informational Supplement. CLSI/NCCLS, 100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Linscott A J, Brown W J. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (3): 1081-5.
- Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, et al. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (9): 3257-62.
- Fagundo-Sierra R, Cerros-Santos M A, Pérez-Jáuregui J, García-López S, Mata-Rocha M, Andrade-Almaráz V. Evaluación del equipo automatizado Phoenix para la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Bioquímica* 2008; 33 (3): 94-102.
- Contreras O R, Roura G, Novo F, Hernández S, Ramírez N, Ramírez I, et al. WO/1998/047999: Equipment, kit and method for microbiological diagnosis. 1998. Disponible en: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1998047999>, [accedido: 8 de julio de 2010].
- Travieso F, Roura G, Romay Ch, Contreras R. Evaluation of DIRAMIC system for detection of urinary tract infection and for *Escherichia coli* identification. *Rev Latinoam Microbiol* 2004; 46 (3-4): 67-71.
- Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum betalactamasas conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
- Kraemer H C, Bloch D A. Kappa coefficients in epidemiology: an appraisal of reappraisal. *J Clin Epidemiol*. 1988; 41: 959-88.
- Álvarez E, Espino M, Contreras R, Álvarez A B. Evaluación de la resistencia a los antimicrobianos por el sistema DIRAMIC. *Rev Panam Infectol* 2005; 7 (4): 28-32.
- Álvarez E, Espino M, Contreras R. Determinación de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aislamientos del tracto urinario por el sistema DIRAMIC. *Rev Panam Infectol* 2006; 8 (4): 10-5.
- Travieso F, Roura G, Contreras R, Román C, Nogueira N, Barrio U, et al. Detección de infecciones urinarias en la Prefectura de Belo Horizonte mediante el sistema DIRAMIC. *Rev CNIC Ciencias Biológicas* 2005; 36 (1): 35-6.
- Hernández E, Zamora F, Martínez M, Valdéz M, Alberti E. Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones nosocomiales urinarias en las lesiones medulares espinales. *Actas Urol Esp* 2007; 31: 764-70.
- Fernández M A, Bello O, Martínez M, González I, Castillo I. Vigilancia de la resistencia antibiótica *in vitro* de *Staphylococcus aureus* a metilicina en un hospital de tercer nivel (2001-2002). XXVII Congreso Anual de la AMIMC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2002; 22 (3) A-16: 81-2.
- Sridhar Rao P N, Basavarajappa K G, Leela Krishna G. Detection of extended spectrum beta-lactamase from clinical isolates in Davangere. *Indian J Pathol Microbiol* 2008; 51: 497-9.
- Yagüe A, Rodríguez JC, Sandvang D, Ruiz M, Royo G. Evaluación de un método rápido para la detección de betalactamasas de espectro extendido mediante una cefalosporina cromógena. *Rev Esp Quimioterap* 2006; 19 (2): 185-6.
- Wiegand I, Geiss H K, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamasas among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (4): 1167-74.
- Jeong S H, Song W, Kim J S, Kim H S, Lee K M. Broth microdilution method to detect extended-spectrum b-lactamasas and AmpC  $\beta$ -lactamasas in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. *J Clin Microbiol* 2009; 47 (11): 3409-12.
- D'Accvedo P A, Goncalves A L, Musskopf M I, Ramos C G, Dias C A G. Laboratory test in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the Etest, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. *Braz J Infect Dis*. 2004; 8(5): 372-77.
- Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs S, Mack D. Evaluation of a new cephepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas in an Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(1): 134-38.
- Ramos A G, Hernández P W, Nodarse H R, Padrón S A, De Armas A E, Del Rosario C L. Detección precoz de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes graves. *Rev Cub Med Int Emerg* 2006; 5 (1): 294-301.
- Moya M A, Gómez M R, Molina D M, Mauri R O, González S J M, Alfonso S R. Emergencia de microorganismos multirresistentes en unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales. *Sexta*



- Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. 2006. ISBN: 959-7158-55-8.
26. González L, Ramos A, Nadal L, Morffi J, Hernández E, Álvarez A B, et al. Identificación fenotípica y molecular de betalactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos en hospitales. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59 (1): 52-8.
27. González L. Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales de Ciudad de La Habana. Tesis en opción al título académico de Máster en Microbiología Clínica. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2007.
28. Diestra K, Coque T M, Miró E, Oteo J, Nicolau C J, Campos J, et al. Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 (7): 404-10.
29. Gaitán S L, Espinal PA, Grupo de Investigación de Resistencia Bacteriana, Región Caribe. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infect* 2009; 26 (3): 239-46.