

## **Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario**

*Molecular Characterization and Extended Spectrum Betalactamase Detection in *E. coli* and *K. pneumoniae* Strains Isolates from Intensive Care Units in a Teaching Hospital*

**Perozo-Mena, Armindo<sup>1</sup>;  
Castellano-González, Maribel<sup>2</sup>;  
Ginestre-Pérez, Messaria<sup>2</sup> y Harris, Belinda<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Cátedra de Práctica Profesional de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis, Maestría en Diagnóstico Bacteriológico, Universidad del Zulia. Centro de Referencia Bacteriológica, Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.

<sup>2</sup>Cátedra de Bacteriología General, Escuela de Bioanálisis, Maestría en Diagnóstico Bacteriológico, Universidad del Zulia.

<sup>3</sup>Cátedra de Bacteriología Clínica, Escuela de Bioanálisis, Maestría en Diagnóstico Bacteriológico, Universidad del Zulia.

E-mail: aperozomena@cantv.net.ve; arperozo@luz.edu.ve

### **Resumen**

La producción de Betalactamasas de Espectro Extendido por cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, es un grave problema de salud pública ya que causa la pérdida de la eficacia terapéutica a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En este trabajo se investigó la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de pacientes de las unidades de cuidados intensivos de un hospital universitario. Se estudiaron 41 cepas de *E. coli* y 59 de *K. pneumoniae*, aisladas de los cultivos bacteriológicos realizados en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM). Para la detección de betalacta-

masas de espectro extendido se utilizaron los métodos normalizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El 39,02% de las cepas de *E. coli* y el 52,54% de las de *K. pneumoniae* fueron betalactamasas de espectro extendido positivas, en estas cepas se observó resistencia acompañante a quinolonas, aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol. El estudio epidemiológico mediante Electroforesis de Campo Pulsado, mostró una gran diversidad genética entre los aislamientos, esta policlonalidad indica que la diseminación dentro del ambiente hospitalario no se da por transmisión de una cepa entre pacientes, sino que se da por transferencia de plásmidos entre diferentes cepas producto de la alta presión selectiva ejercida por la mala utilización de cefalosporinas de tercera generación.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, betalactamasas de espectro extendido, unidad de cuidados intensivos, electroforesis de campo pulsado.

## Abstract

Extended Spectrum Betalactamases production from *E. coli* and *K. pneumoniae* strains, is a serious public health problem since cause loss of therapeutic effectiveness of betalactams antibiotics. In this research the presence of extended spectrum betalactamases was investigated in *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated from intensive cares unit patient's in a teaching hospital. 41 *E. coli* and 59 *K. pneumoniae* strains isolated from bacteriological cultures carried out in the Bacteriological Reference Centre at Autonomous Service Maracaibo's University Hospital (SAHUM) were studied. For the detection of extended spectrum betalactamases the normalized methods proposed by Clinical and Laboratory Standards Institute were used. 39,02% of *E. coli* and 52,54% *K. pneumoniae* was positive for extended spectrum betalactamases production, in these isolates accompanying resistance to quinolones, aminoglycosides, chloramphenicol, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole was detected. The epidemiological research by means of pulsed field gel electrophoresis showed a great genetic diversity among these strains, this polyclonal pattern, allows to determine that dissemination inside the hospital services is not given by transmission of a single clone among patients, but rather it is given by plasmids transfer among different strains product of the selective high pressure exercised by third generation cephalosporins bad use.

**Key words:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Extended-spectrum beta-lactamases; intensive care unit; Pulse field gel electrophoresis.

## Introducción

Uno de los grupos de antibióticos más importantes, tanto histórica como clínicamente, es el grupo de los  $\beta$ -lactámicos. Estos incluyen las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemas y monobactámicos, entre otros antibióticos médicamente útiles (1), este grupo es el más utilizado para el tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro (2). Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constitu-

yen una amplia familia, estos impiden la síntesis de la pared celular bacteriana al inhibir la síntesis del peptidoglicano, a través de la inactivación de una o varias proteínas (transpeptidasas) de unión a penicilina (PBP) (3). La resistencia bioquímica a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se puede atribuir a cuatro mecanismos diferentes: ya sea inactivación enzimática de la droga, alteración del sitio blanco, incapacidad de la droga de alcanzar su sitio blanco debido a modificación de las porinas a nivel de la pared celular y eflujo de la

droga una vez que ingresa. El mecanismo más utilizado por los bacilos Gram negativos para adquirir resistencia a penicilinas y beta-lactámicos en general, ya sea que esto ocurra de manera natural o adquirida, es la inactivación de las drogas por las enzimas  $\beta$ -lactamasas, que abren el anillo de las penicilinas y demás  $\beta$ -lactámicos entre los átomos de C y N para formar compuestos inactivos (4).

La diseminación de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 se produjo como consecuencia directa de la presión selectiva ejercida por la introducción de la ampicilina, carbenicilina y las primeras cefalosporinas en los años 60. En 1969 se detectaron enzimas TEM en *Pseudomonas aeruginosa* y de 1973 a 1975 se encontraron en *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae* (5). En 1983 se detectaron en Alemania los primeros aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Posterior a su análisis, se demostró que la resistencia era debida a la producción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica transferible, estas enzimas se denominaron  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ya que eran capaces de hidrolizar un buen número de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo los que contienen el grupo oximino, como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como al aztreonam (6). Estas enzimas derivan de mutaciones concretas en los genes que codifican las  $\beta$ -lactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), originando cambios en su secuencia de aminoácidos. Estas mutaciones han dado lugar a una gran variedad de enzimas (de TEM-3 a TEM-29 y de SHV-2 a SHV-7) (7, 8).

La aparición de bacterias productoras de BLEE tiene importantes repercusiones clínicas y terapéuticas: a) la mayoría de los aislamientos tienen codificada la resistencia en

plásmidos que pueden ser transferidos a otros microorganismos, b) son causantes de brotes en instituciones prestadoras de salud, c) aumentan la morbimortalidad nosocomial y d) limitan las opciones terapéuticas, incrementándose el uso de antibióticos costosos como el imipenem (9). Los microorganismos que más comúnmente sintetizan BLEE son: *Klebsiella* spp. y *E. coli*, pero también se han detectado en: *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Capnocytophaga ochracea* (10). Se ha descrito que la administración indiscriminada de cefalosporinas de tercera generación, particularmente ceftazidima es una de las principales causas de la aparición de estas cepas. Cepas productoras de BLEE, han ocasionado brotes de infección intrahospitalaria con multirresistencia a los antibióticos, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos, dificultando el tratamiento y aumentando la morbimortalidad nosocomial. Los brotes fueron controlados al reducir la utilización de ceftazidima junto con la implementación de medidas de control de infecciones (11).

La no detección e investigación de cepas productoras de BLEE, por parte de algunos laboratorios, trae como consecuencia, la instalación de terapias que resultan ineficaces y que además inducen a la diseminación de la resistencia. No existen datos suficientes que correlacionen tipos de BLEE con terapias antimicrobianas, tipos de infección, severidad de la enfermedad de base, dosis y duración de la terapia, lo que hace difícil evaluar las opciones terapéuticas (2). Se requieren estudios para conocer las características epidemiológicas de las cepas productoras de BLEE en nuestras Unidades de Cuidados Intensivos, sobre todo por la resistencia a betalactámicos

de amplio espectro como cefalosporinas, así como la resistencia cruzada a otros grupos de antimicrobianos. La detección oportuna de estas cepas en los hospitales, permite la implementación de medidas de control de infecciones para impedir su diseminación y lo más importante, brindar una terapia apropiada a quienes sufren infección por una bacteria productora de BLEE.

Las infecciones nosocomiales son aquellas que no están presentes, ni en período de incubación en el momento de la admisión al hospital. La mayoría de las infecciones nosocomiales se reconocen mientras los pacientes están hospitalizados. Los sitios del cuerpo afectados por infecciones nosocomiales y sus frecuencias relativas han permanecido relativamente constantes durante los últimos 20 años. Gran parte de la información sobre infecciones nosocomiales endémicas se deriva del Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS) del Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el cual ha hecho seguimiento en un gran grupo de hospitales a través de los Estados Unidos durante más de 25 años. La terna de la infección nosocomial comprende *Escherichia coli* debido a su predominio como causa de infecciones del tracto urinario, *Staphylococcus aureus* debido a su predominio como causa de infecciones del torrente sanguíneo, y *Pseudomonas aeruginosa* debido a su predominio como el patógeno esencial adquirido en el hospital en todos los sitios del cuerpo (12). No obstante, el orden de rango de los patógenos nosocomiales ha evolucionado un poco durante las dos últimas décadas, con el surgimiento de los cocos Gram positivos como una causa importante de infecciones nosocomiales, aumentando la prevalencia de bacterias de baja virulencia, tales como estafilococos coagulasa-negativo; incrementando la importancia de bacterias

resistentes a múltiples antibióticos, tales como los bacilos gram negativos que producen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido capaces de hidrolizar las cefalosporinas más nuevas; el surgimiento de enterococos resistentes a vancomicina, de los cuales, numerosas cepas son resistentes a todos los antibióticos comercialmente disponible y la creciente prevalencia de infecciones micóticas nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos (13).

Una parte importante de la bacteriología es el estudio de la diseminación de bacterias patógenas, su fuente, su modo y frecuencia de transmisión. Los estudios epidemiológicos pueden comenzar a determinar las relaciones de los aislamientos bacterianos con técnicas basadas en el fenotipo, como serotipificación, biotipificación y patrones de resistencia a los antibióticos, pero estos métodos han sido reemplazados por técnicas moleculares. Estas últimas pueden dividirse de un modo amplio en las basadas en proteínas y en las basadas en DNA y RNA. Las técnicas basadas en ácidos nucleicos son varias. Los perfiles de plásmidos fueron suplantados en gran parte por técnicas que utilizan DNA cromosómico combinado con sondas de DNA y PCR con cebadores arbitrarios. Actualmente la técnica aceptada como el estándar de oro para la tipificación molecular de bacterias en el contexto de un brote, es la electroforesis en gel con campo pulsado (ECP), esta técnica ha sido una de las más útiles y desarrolladas en epidemiología molecular puesto que es de tiempos recientes y ahora es considerada como la técnica oficial para la tipificación molecular de microorganismos (1).

La confirmación fenotípica de cepas BLEE positiva es sencilla, solo se deben seguir las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (14). La gran diversidad de BLEE obliga a los labora-

torios a estar preparados para detectar los diferentes tipos de resistencia, lo que permitiría que se adopten rápidamente las medidas de control. La detección oportuna por parte del laboratorio clínico de una cepa productora de BLEE permitiría activar los mecanismos de control tendientes a evitar su diseminación en el ambiente hospitalario, lo que disminuiría la estadía de los pacientes dentro del mismo, facilitaría su tratamiento y disminuiría los costos de hospitalización, lo que repercute en la calidad de vida del paciente y su comunidad (1).

Este estudio se realizó para conocer la incidencia de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes internados en las Unidades de Cuidados Intensivos del SAHUM, así como para determinar cuales son las características epidemiológicas de estos microorganismos y reconocer si existe diseminación de estas cepas dentro del ambiente hospitalario, lo que permitiría diseñar medidas adecuadas para su control.

## Materiales y Métodos

Se determinó la producción de BLEE en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de cultivos bacteriológicos procesados en el Centro de Referencia Bacteriológica (CRB) a partir de pacientes internados en las Unidades de Cuidados Intensivos (unidad de cuidados intensivos de adultos, pediatría y neonatología), del SAHUM, durante el período de Enero a Diciembre de 2006. El aislamiento, identificación y conservación de estas cepas así como las pruebas de detección de BLEE y la ECP fueron realizadas por el personal del referido centro y el personal del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete

SPSS versión 11.0, como estadístico de prueba se utilizó el Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con un nivel de significancia del 5%; mientras que para el análisis de los perfiles de resistencia, y distribución de los casos se utilizó el software WHONET 5.4. Para la diferenciación de los patrones de banda electroforéticos de los diferentes aislados se utilizó un análisis cluster de semejanzas y diferencias con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 11.

Las muestras se cultivaron en medios de cultivo estándar, el aislamiento e identificación bacteriana se realizó siguiendo la metodología convencional, descrita por Fardel JJ., 2003 (15). Para realizar la selección inicial de las cepas se utilizó el método de descarte por difusión del disco en agar y la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar, ambos métodos recomendados por el CLSI (14). Para el método de difusión del disco en agar se utilizaron discos comerciales de papel impregnados con los siguientes antimicrobianos: ATM 30 $\mu$ g; CTX 30 $\mu$ g; CAZ 30 $\mu$ g; CPD 10 $\mu$ g y CRO 30 $\mu$ g; se utilizaron como criterios para la clasificación de las cepas como posibles productoras de BLEE los siguientes puntos de corte ATM  $\leq 27$ mm; CTX  $\leq 27$ mm; CAZ  $\leq 22$ mm; CPD  $\leq 17$ mm y CRO  $\leq 25$  mm. Por otra parte, para el método de CIM por dilución en agar; se realizaron diluciones seriadas dobles desde 256  $\mu$ g/mL hasta 0.125  $\mu$ g/mL de los antimicrobianos CRO, CTX y CAZ respectivamente. A todas las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* se les determinó la CIM preparando una suspensión bacteriana con una concentración de  $10^4$  UFC/mL, conjuntamente se probaron las cepas controles de *E. coli* ATCC 25922 BLEE (-) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 BLEE (+). La CIM se interpretó de acuerdo a los criterios del CLSI (14). Se catalogaba a una cepa como sospechosa de producir BLEE si la CIM era  $\geq 2$   $\mu$ g/mL.

Una vez identificadas las cepas como posibles productoras de BLEE por cualquiera de los métodos utilizados, el CLSI recomienda realizar pruebas confirmatorias que permitan corroborar la producción de BLEE por parte de la cepa estudiada, para ello se utilizan dos métodos, el método del disco combinado y el método de E-Test. El método del disco combinado se emplea para confirmar los resultados obtenidos por el método de difusión del disco en agar, para ello, se utilizan discos de papel filtro impregnados con las diferentes cefalosporinas y un inhibidor suicida de betalactamasas como es el ácido clavulánico; en este estudio se utilizaron tres discos combinados cefpodoxima/ácido clavulánico [10/1 $\mu$ g]; ceftazidima/ácido clavulánico [30/10 $\mu$ g] y cefotaxima/ácido clavulánico [30/10 $\mu$ g]; de la casa comercial Oxoid, Basingstoke, UK. La confirmación de la producción o no de BLEE se realiza midiendo el diámetro del halo de inhibición producido, el cual debería ser  $\geq 5$  mm por encima del halo de inhibición mostrado cuando el antimicrobiano es usado individualmente (sin la combinación del ácido clavulánico).

Por otra parte, para el método de E-test (Epsilon-meter-test) (AB Biodisk, Suecia); se utilizaron tiras de material no poroso que contiene el antimicrobiano en estudio y el antimicrobiano combinado con ácido clavulánico en un gradiente de concentración, lo que permite determinar la CIM; para ello se preparó un inóculo estandarizado y se inoculó una placa de agar Müeller Hinton, igual que para la determinación de susceptibilidad por el método de difusión del disco, seguidamente se procedió a colocar las tiras de E-test que contenían la combinación de CAZ y CAZ/ácido clavulánico con rangos de CIM de 0,50 - 32  $\mu$ g/mL y de 0,064 - 4  $\mu$ g/mL respectivamente; también se utilizó la tira de CTX y CTX/ ácido clavulánico con rango de CIM de

0.25 - 16  $\mu$ g/mL y 0.016 - 1  $\mu$ g/mL respectivamente. La CIM estuvo determinada en el punto en que la elipse de inhibición intersepta la escala de la tira. Para confirmar la producción de BLEE, se obtiene la razón de dividir la CIM del antimicrobiano solo entre la CIM del antimicrobiano con ácido clavulánico; si esta razón es  $\geq 8$ , se confirma la producción de BLEE.

Adicionalmente se utilizó el método de sinergia del doble disco, este se realizó siguiendo la metodología descrita por Jarlier y cols., (16). En esta prueba se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro de una placa de agar MH, y alrededor de este se colocan discos de CAZ, CRO, CTX, CPD y ATM a 20mm de distancia del disco central. La presencia de BLEE se manifiesta por el efecto sinérgico del inhibidor (efecto tapón de corcho), bajo la forma de ampliación del halo en uno o varios de los  $\beta$ -lactámicos (17).

Para la tipificación molecular mediante ECP se utilizó el equipo GUEFAST 06 de Neuronic S.A. Para la preparación de las muestras se inmovilizaron las células bacterianas (concentración de  $2 \times 10^9$  células/mL) en bloques de agarosa. Las células inmovilizadas son lisadas y desproteinizadas in situ por incubación con los reactivos adecuados para rendir moléculas de ADN intactas. Para ello se utilizará el equipo BACKIT (Neuronic S.A). Este es un método no enzimático, mediante el cual se provocan modificaciones químicas en la pared celular de las bacterias que permiten liberar el ADN mediante desproteinización química "in situ" (18).

Posteriormente, para la obtención de pulsotipos de bacterias, se digiere el ADN con la enzima de restricción Xba I, esta enzima hace corte en las cadenas de DNA cuando encuentra una secuencia T $\blacktriangledown$ CTAGA/AGATC $\blacktriangle$ T. Para la digestión se siguieron las instrucciones del fabricante y se utilizaron 20

U de la enzima para cada bloque de muestra en 200 µL de buffer de restricción y se incubó a 37°C durante 4 horas. Para la corrida electroforética se utilizó la cámara mini-CHEF, con un campo eléctrico de 10 vol/cm, a una temperatura de 19°C, el buffer utilizado para la corrida fue Tris-Borato-EDTA (TBE) a una concentración de 0,5X, las muestras fueron corridas en agarosa al 1,5%, se programaron seis rampas, la primera de 35 pulsos de 25 segundos cada uno, seguida de 45 pulsos de 20 segundos, 60 pulsos de 15 segundos, 200 pulsos de 10 segundos, 900 pulsos de 5 segundos y 80 pulsos de 3 segundos, para un tiempo de corrida de 5 horas y 17 minutos. Posterior a la electroforesis se reveló el gel con bromuro de etidio y se fotografió con una cámara digital SONY CyberShot de 5,1 megapixels y filtro naranja bajo iluminación ultravioleta.

Las imágenes digitales fueron analizadas para determinar la migración de cada banda utilizando como estándar un marcador de peso molecular lambda concatamerizado que produce una escalera de bandas de 49 Kb de diferencia, que va desde 49 Kb hasta 800 Kb (Promega). Una vez determinada la posición de cada banda se realizó una matriz de semejanzas y diferencias entre los diferentes patrones de bandas y se realizó un análisis tipo cluster utilizando el software SPSS versión 11, lo que permitió clasificar los aislamientos en grupos o clusters de acuerdo a sus semejanzas o diferencias.

## Resultados

De las 100 cepas estudiadas, 41 fueron de *E. coli* y 59 de *K. pneumoniae*. Al distribuir las según su procedencia, tenemos que para *E. coli* 26, 11 y 4 cepas pertenecían a la unidad de cuidados intensivos de adultos (UCIA), unidad de cuidados intensivos de pediatría (UCIP) y neonatología (NEO), respec-

tivamente; mientras que, para *K. pneumoniae* 35, 21 y 3 cepas pertenecían a la UCIA, UCIP y NEO, respectivamente.

El 39,02% de las cepas de *E. coli* y el 52,54% de las de *K. pneumoniae* fueron BLEE positivas. Al discriminar la producción de BLEE según la ubicación del paciente en cada unidad de cuidados intensivos, tenemos que para la UCIA, el 23,08% de las cepas de *E. coli* fueron productoras de BLEE; mientras que para la UCIP y NEO el 54,55% y el 100,00% de las cepas respectivamente, fueron productoras de BLEE. En el caso de *K. pneumoniae*, el 42,86% de las cepas de la UCIA fueron productoras de BLEE, mientras que el 71,43% y el 33,33% de las cepas de la UCIP y NEO respectivamente, fueron productoras de BLEE. La Tabla 1 muestra la distribución de la producción de BLEE en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, aisladas de pacientes de las unidades de cuidados intensivos.

En el caso de las cepas de *E. coli* aisladas de la UCIA se observaron altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (66,70%); para los aminoglucósidos se observa un 33,30% de resistencia a TM, un 20,00% de resistencia a GM pero no se detectó resistencia a AK y NET; para C y SXT se observa un 50,00% de resistencia y para TE un 83,30%. En cuanto a los antibióticos betalactámicos se observan altos niveles de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación; las cefalosporinas de tercera generación tuvieron un comportamiento divergente, por ejemplo CTX y CPD presentaron 100,00% de resistencia, CRO 66,70%, ZOX 16,70% mientras que; para CAZ no se presentó resistencia, en cuando a FEP (cefalosporina de cuarta generación) el porcentaje de resistencia fue de 20,00%. No se detectó resistencia a FOX, ATM ni a los carbapenemas; en cuanto a los antibióticos combinados con inhibidores de

**Tabla 1.** Distribución de la Producción de BLEE en las cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de pacientes internados en las unidades de cuidados intensivos.

Microorganismos	Total de Cepas		UCIA		UCIP		NEO	
	Nº	BLEE+	Nº	BLEE+	Nº	BLEE+	Nº	BLEE+
<i>Escherichia coli</i>	41	16(39,02%)	26	6(23,08%)	11	6(54,55%)	4	4(100,00%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	59	31(52,54%)	35	15(42,83%)	21	15(71,43%)	3	1(33,33)

betalactamasas se observa un 100,00% de resistencia para CFS, un 66,60% para SAM, 50,00% para AMC y 16,70% para TZP.

En el caso de las cepas de *E. coli* aisladas de la UCIP se observó un 33,30% de resistencia a fluoroquinolonas; en cuanto a los aminoglucósidos se observa un 100,00% de resistencia a TM, un 66,70% de resistencia a GM; un 50,00% a AK y 16,70% para NET; para TE se observó un 100,00% de resistencia, 80% a SXT y 16,70% para C. En cuanto a los antibióticos betalactámicos se observan altos niveles de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación; las cefalosporinas de tercera generación tuvieron un comportamiento similar a los aislados de la UCIA, CTX, CPD y CRO 100,00% de resistencia, CAZ 66,60% y ZOX 50,00%, en cuando a FEP el porcentaje de resistencia fue de 33,30%. No se detectó resistencia a FOX ni a los carbapenemas; ATM presentó un 50,00% de resistencia y, en cuanto a los antibióticos combinados con inhibidores de betalactamasas, se observa un 100,00% de resistencia a CFS, 66,70% para SAM, 20,00% para AMC y no se observó resistencia a TZP.

Para las cepas de *E. coli* aisladas de NEO, se observó un 50,00% de resistencia a fluoroquinolonas; en cuanto a los aminoglucósidos se observó un 100,00% de resistencia TM y GM, y un 50,00% para AK y NET; para TE se observó un 100,00% de resistencia y para C y SXT un 75,00%. En cuanto a los antibióticos betalactámicos se observan altos ni-

veles de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación al igual que los aislados de la UCIA y UCIP; las cefalosporinas de tercera generación tuvieron el siguiente comportamiento, CTX, CPD y CRO 100,00% de resistencia, CAZ 50,00% ZOX 66,70%, en cuando a FEP el porcentaje de resistencia fue de 100,00%. No se detectó resistencia a FOX ni a los carbapenemas; el monobactámico ATM presentó un 100,00% de resistencia y en cuanto a los antibióticos combinados con inhibidores de betalactamasas se observa un 100,00% de resistencia a CFS, 50,00% para SAM, 33,30% para AMC y no se observó resistencia a TZP.

En cuanto a las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UCIA, se observó de 81,80% a 93,30% de resistencia a fluoroquinolonas; en cuanto a los aminoglucósidos se observa un 71,40% de resistencia TM, 46,70% para GM y NET, y 40,00% para AK; TE presentó un 66,70% de resistencia, C 86,70% y SXT un 93,30%. En cuanto a los antibióticos betalactámicos se observan altos niveles de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación; las cefalosporinas de tercera generación tuvieron el siguiente comportamiento, CPD 100,00% de resistencia, CAZ y CRO 80,00%, CTX 71,40% y ZOX 26,70%, en cuando a FEP el porcentaje de resistencia fue de 16,17%, la resistencia a FOX fue de 13,30%; no se detectó resistencia a los carbapenemas; el monobactámico ATM presentó un 93,30% de resistencia y en cuanto a los antibióticos combinados con inhibidores

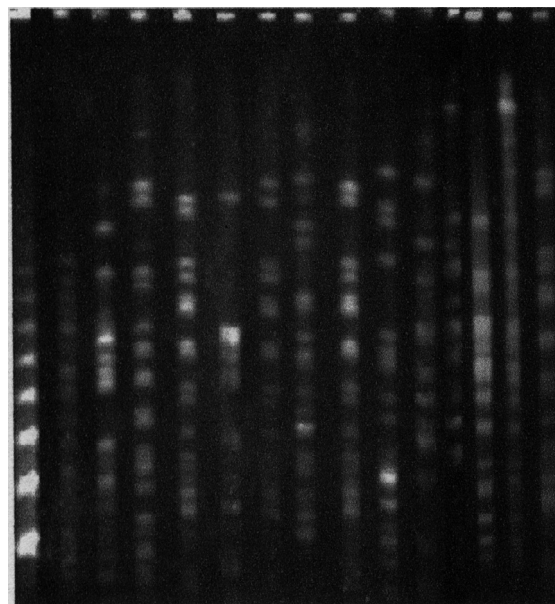


de betalactamasas se observa un 53,30% para SAM, 42,90% para AMC, 26,70% a TZP y no se observó resistencia a CFS.

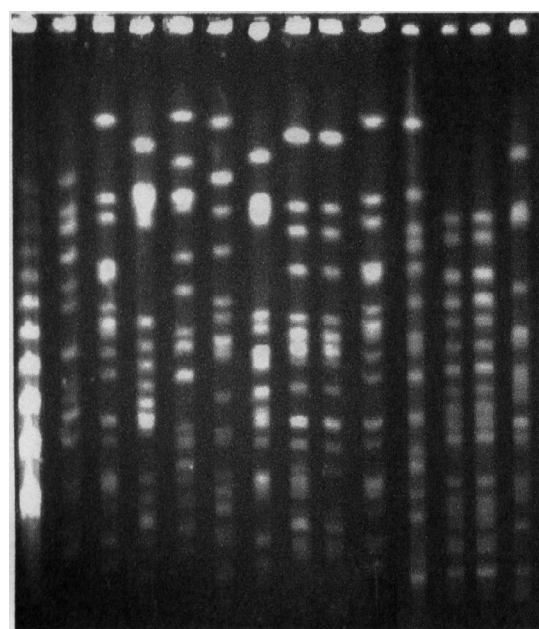
Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UCIP, mostraron los siguientes perfiles de resistencia, de 33,30% a 46,70% de resistencia a fluoroquinolonas; para los aminoglucósidos se observa un 86,70% de resistencia TM, 60,00% para GM, 53,30% para AK y 33,30 para NET; TE presentó un 13,30% de resistencia, C 60,00% y SXT un 88,90%. En cuanto a los antibióticos betalactámicos se observan altos niveles de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación; las cefalosporinas de tercera generación tuvieron el siguiente comportamiento, CAZ 80,00%, CPD 75,00%, CRO 73,30%, CTX 71,40% y ZOX 33,30% de resistencia, en cuando a FEP el porcentaje de resistencia fue de 62,50%, la resistencia a FOX fue de 20,00%; no se detectó resistencia a los carbapenemas; el monobactámico ATM presentó un 93,30% de resistencia y en cuanto a los antibióticos combinados con inhibidores de betalactamasas se observa un 85,70% para SAM, 50,00% para AMC, 33,33% a TZP y 25,00% a CFS.

En cuanto a las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de NEO, se observó 100,00% de resistencia a todos los antibióticos probados a excepción de AK, GM, TM, NET, IPM. MEM y ETP que fueron los únicos que mostraron sensibilidad.

Las Figuras 1 y 2 muestran los resultados de la ECP en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, se puede observar que cada cepa posee un patrón de bandas totalmente diferente, por lo que los porcentajes de similitud son bajos, a excepción de cuatro cepas de *K. pneumoniae* (carriles 8 y 9, y carriles 12 y 13), que si presentan altos porcentajes de similitud, dos se aislaron de NEO y dos de la UCIP.



**Figura 1.** Electroforesis de campo pulsado de las cepas de *E. coli*, en el carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2–15 muestras aisladas de pacientes, nótese el alto grado de policlonalidad presente entre los aislamientos.



**Figura 2.** Electroforesis de campo pulsado de las cepas de *K. pneumoniae*, en el carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2 – 14 muestras aisladas de pacientes, al igual que en *E. coli* se observa un alto grado de policlonalidad, pero los aislados ubicados en los carriles 8 y 9 poseen un alto grado de similitud, al igual que los ubicados en los carriles 12 y 13.

## Discusión

En los últimos años se ha descrito un incremento en el aislamiento de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) posiblemente relacionado con el uso generalizado de cefalosporinas de amplio espectro (19). Desde 1983, año de aparición de la primera cepa productora de BLEE, estos microorganismos se han ido describiendo en diferentes partes del mundo. En esta investigación es importante resaltar el hecho de que un número importante de cepas de *E. coli* (39,02%) y *K. pneumoniae* (52,54%), aisladas a partir de pacientes internados en unidades de cuidados intensivos, son capaces de producir BLEE; estos resultados se corresponden con los descritos por diversos autores a nivel regional y mundial (20, 21), quienes también han reportado importantes porcentajes en la producción de BLEE por parte de estas cepas.

Al comparar los porcentajes de producción de BLEE de estos microorganismos, se evidencia que *K. pneumoniae* fue el principal productor de BLEE. Esto probablemente se debe a la capacidad de este microorganismo de desarrollar competencia de manera natural, lo cual le confiere cierta ventaja adaptativa, esta competencia, favorece la adquisición de determinantes genéticos de resistencia (plásmidos, transposones, integrones) (22); además, las cepas de *K. pneumoniae*, son patógenos nosocomiales por excelencia, capaces de permanecer durante largos períodos de tiempo en los ambientes y utensilios hospitalarios, adicionalmente, en la mayoría de los casos, portan plásmidos de multiresistencia a los antimicrobianos, que poseen genes que codifican la producción de BLEE y son altamente estables. Un estudio realizado por Hibbert Rogers (23) demuestra que en un servicio hospitalario donde se aislaban con

frecuencia cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, se suspendió el uso de cefalosporinas de amplio espectro por cuatro años para el tratamiento de los pacientes, sin embargo, después de cuatro años los pacientes internados en ese servicio continuaban adquiriendo infecciones por cepas *K. pneumoniae* productoras de BLEE, lo que demuestra que los plásmidos de resistencia en este microorganismo son altamente estables. Al parecer los principales factores de riesgo para la adquisición de estas cepas productoras de BLEE son el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, largas estancias hospitalarias y la ejecución de procedimiento invasivos (24).

A nivel nacional, El Grupo Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana (GVRB) refiere porcentajes de resistencia más elevados en las cepas de *K. pneumoniae* que las cepas de *E. coli* (25); mientras que, a nivel regional, el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (26), también reporta mayores índices de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *K. pneumoniae* que en *E. coli*.

Al analizar los resultados de los perfiles de resistencia de las cepas de *E. coli* BLEE positivas, se puede notar que la cefalosporina de tercera generación más afectada por la presencia de la enzima es CTX, seguida por CRO y en último lugar se ve afectada CAZ, este patrón sigue la presencia de una betalactamasa tipo cefotaximasa, que tiene preferencia por degradar CTX y no CAZ, esta posiblemente sea de la familia CTX-M, betalactamasa que se ha descrito muy asociada a cepas de *E. coli* en América Latina (27). En cuanto a FOX, todos los aislamientos de *E. coli* se mostraron sensibles, pero presentaron valores de susceptibilidad intermedia a este antimicrobiano que van desde 16,70% hasta 25,00% (datos no

mostrados); esto podría indicar la asociación de otro tipo de betalactamasa perteneciente a la clase C de la clasificación de Ambler (28), la betalactamasa plasmídica Amp-C, que a diferencia de las BLEE confiere resistencia a las cefamicinas como el FOX; otro aspecto que respalda esta suposición es la resistencia observada a los antibióticos con inhibidores suicidas de betalactamasa, AMC, SAM, PTZ y CFS, las cepas productoras de BLEE generalmente son sensibles a estos inhibidores, ya que ellos actúan inhibiendo la acción de la enzima, pero en el caso de encontrarse en un medio con una bacteria productora de Amp-C estos inhibidores actúan como inductores de su expresión por lo que se observa resistencia a estas combinaciones de antibióticos con inhibidores suicidas. Todo esto sugiere que las cepas de *E. coli* expresan más de un tipo de betalactamasa a la vez, lo que complica el panorama terapéutico dentro de una institución prestadora de salud ya que estas betalactamasas son de origen plásmidico y se diseminan fácilmente en ambientes hospitalarios, por lo que ocasionan un gran problema. Por otra parte, los carbapenemas siguen constituyendo el grupo de antibióticos de elección para el tratamiento de cepas productoras de betalactamasas y debido, a que, no pueden ser hidrolizados por estas enzimas presentan 100% de susceptibilidad.

En cuanto a los aminoglucósidos, las cepas de *E. coli* mostraron niveles de resistencia muy variados que van desde cero hasta cien, estos resultados se comprenden mejor al separar las cepas según su procedencia, en la UCIA los resultados de resistencia son bajos, los más afectados fueron TM (33,30%) y GM (20,00%), mientras que NET y AK fueron totalmente sensibles, esto puede explicarse con el hecho de que AK y NET son los aminoglucósidos más nuevos en el mercado, mientras que los otros dos son más antiguos, por lo que las

bacterias han permanecido en contacto con ellos durante mayor tiempo y han tenido mayor oportunidad de desarrollar resistencia. Sin embargo, cuando se analizan los resultados de resistencia a estas drogas en las cepas de *E. coli* aisladas de la UCIP y NEO se observan niveles mucho más altos de resistencia, pero se mantiene la característica de ser más efectivos NET y AK (29).

En cuanto a la resistencia a quinolonas pueden observarse altos niveles de resistencia principalmente en las cepas aisladas de la UCIA, esto es comparable con lo obtenido por otros autores (19, 30), los niveles de resistencia en la UCIP y NEO son inferiores, probablemente esto se deba a la mala utilización de las quinolonas para el tratamiento de las infecciones urinarias de la comunidad, lo que a traído como consecuencia altos niveles de resistencia, por otra parte, las quinolonas eran hasta hace poco de uso exclusivo en el tratamiento en adultos, desde hace poco tiempo, se han comenzado a utilizar en el tratamiento de niños, esto podría en parte explicar los bajos niveles de resistencia encontrados en la UCIP y NEO en comparación con los encontrados en la UCIA, probablemente el uso de estas drogas en niños permitirá que en cierto tiempo se cambien los patrones de resistencia de los microorganismo generalmente presentes en el ambiente de nuestras unidades de cuidados intensivos de pediatría y neonatología. Además, por razones poco conocidas, las cepas BLEE positivas son más frecuentemente resistentes a quinolonas que las cepas no productoras de BLEE (19).

Al analizar los patrones de resistencia obtenidos en *K. pneumoniae*, puede observarse que el comportamiento de los antibióticos betalactámicos fue muy similar, pero, en este caso CAZ fue la cefalosporina de tercera generación más susceptible a la acción de la betalactamasa, a pesar de que la diferencia es

ligera, otro factor importante es la resistencia a ATM, que en el caso de *K. pneumoniae* es alta, sobre todo en la UCIA cuando se compara con el valor de las cepas de *E. coli*, este cambio en los perfiles de resistencia indica la presencia de una betalactamasa SHV, propia de las especies de *Klebsiella*, o una betalactamasas tipo TEM la cual confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación, especialmente a CAZ (31). En el caso de *K. pneumoniae* si se observan valores de resistencia a FOX y a las combinaciones con inhibidores suicidas, lo que al igual que en *E. coli* podría indicar la presencia de una betalactamasa tipo Amp-C (32). Al igual que en *E. coli*, los carbapenemas se mostraron 100,00% sensibles a la acción de las betalactamasas.

Los aminoglicósidos en las cepas de *K. pneumoniae* se comportaron de igual manera que en las cepas de *E. coli*, TM y GM fueron los que presentan mayores porcentajes de resistencia, mientras que NET y AK presentaron porcentajes menores, por lo que son más efectivos; a diferencia de las cepas de *E. coli*, en el caso de *K. pneumoniae*, los mayores porcentajes de resistencia se obtuvieron de los pacientes de la UCIP, seguidos de la UCIA, mientras que en NEO no se detectó resistencia a ninguno de los aminoglicósidos probados, esto probablemente se debe a que solo se aisló una cepa de *K. pneumoniae* BLEE positiva de este servicio, por lo que no es prudente realizar ningún tipo de afirmación al respecto ya que la población estudiada es muy baja.

En cuanto a la resistencia a quinolonas, se presenta de la misma forma que en *E. coli*, con la diferencia de que las cepas de *K. pneumoniae* mostraron valores mucho más altos de resistencia que las cepas de *E. coli*, estos van desde un 81,80% hasta un 93,30% en la UCIA, mientras que en la UCIP los valores son más bajos (33,30%-46,70%), esto puede

explicarse por el mal uso de la quinolonas como tratamiento de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad, principalmente en adultos (19, 30), y su poco o reciente uso en pacientes pediátricos. Cabe destacar que para el caso de NEO, donde solo se detectó un aislado BLEE positivo, este presentó resistencia a las quinolonas probadas, pero no podemos elaborar conclusiones ya que la población estudiada es muy baja. Es importante resaltar que las cepas de *K. pneumoniae* BLEE negativas aisladas de las tres unidades de cuidados intensivos fueron altamente sensibles a quinolonas, a diferencia de las cepas de *E. coli* que si mostraron valores importantes de resistencia (datos no mostrados), esto corrobora lo descrito por Paterson (30), quien describe una fuerte asociación entre la producción de BLEE y la resistencia a quinolonas. La resistencia a ciprofloxacina in *K. pneumoniae*, está estrechamente asociada con la producción de BLEE, esta asociación es preocupante, ya que los aislados productores de BLEE usualmente son resistentes a penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos y SXT, por lo que la resistencia a quinolonas limita severamente la ya limitadas opciones de tratamiento para una cepa BLEE positiva. El estudio de Paterson (30), encontró que un 60,00% de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE fueron resistentes a quinolonas, y que el 78% de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacina fueron productoras de BLEE; todos estos datos son similares a las cifras halladas en nuestro estudio, lo que demuestra la fuerte asociación entre la producción de BLEE y la resistencia a quinolonas.

Una posible explicación a este fenómeno de coexistencia de dos mecanismos de resistencia es la transferencia de ambos en un mismo plásmido; sin embargo, la resistencia a quinolonas en *E. coli* y *K. pneumoniae* se

debe predominantemente a mutaciones cromosomales en los genes *gyrA* y *parC*, los cuales codifican el blanco de acción de las quinolonas (33). Sin embargo, ya se ha publicado el primer estudio de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (34); es importante resaltar que este plásmido también codificaba la producción de BLEE y fue aislado de una cepa de *K. pneumoniae*, a pesar de que solo proporcionaba bajos niveles de resistencia a quinolonas, este facilitaba la adquisición altos niveles de resistencia cuando el microorganismo poseía otro factor como deficiencia de porinas. La base de la resistencia a quinolonas producida por este plásmido se basa en la producción de una proteína "Qnr" que se encarga de proteger a la girasa de la acción de la quinolona, por lo que la actividad de esta no se ve afectada en presencia de la droga (35). Otra posible explicación para esta estrecha relación entre la resistencia quinolonas y a cefalosporinas de tercera generación, es el flujo activo de antibióticos y la alteración de las porinas de la membrana externa.

En los servicios de pediatría (UCIP y NEO), se observan porcentajes de resistencia mucho más elevados que en los servicios de adultos (UCIA), esto podría explicarse en parte a factores condicionantes propios del paciente, por lo general los niños, especialmente los recién nacidos y los de muy corta edad, no poseen un sistema inmunológico bien desarrollado, lo que los hace muy susceptibles, otro factor importante, especialmente en recién nacidos, es que no poseen una flora normal establecida, por lo que cualquier patógeno presente en el ambiente puede fácilmente colonizarlos y producir un proceso infeccioso, esta misma carencia de un sistema inmunológico desarrollado es lo que permitiría que una vez instalado el patógeno este desarrolle y adquiera rápidamente

múltiples mecanismos de resistencia, esto se evidencia al observar los perfiles de resistencia, las cepas aisladas de UCIP y NEO son más resistentes y a más antibióticos a la vez que las cepas aisladas de UCIA, especialmente en los aislados de *K. pneumoniae* procedentes de NEO.

El análisis mediante ECP de las cepas de *E. coli* con XbaI mostró 14 genotipos diferentes, ninguno de los cluster mostró más de un 80% de similaridad, se puede observar un alto grado de heterogeneidad genética entre todos los cluster identificados. Las cepas no están genéticamente relacionadas y no se encontró ninguna cepa epidémica. Por el contrario, la variación en el patrón de resistencia de las cepas ESBL fue menor, esto sugiere que un incremento en el número de microorganismos productores de BLEE en estos servicios, se debe principalmente a la diseminación de plásmidos de resistencia o mutaciones de las betalactamasas plasmídicas existentes, producto de la presión selectiva ejercida por el abuso y mal uso de cefalosporinas de tercera generación, esto resultados son muy parecidos a los reportados por Peter Yuk-Fong Liu (36), pero diferentes a los reportados en otras investigaciones (37, 38) que demuestran que la diseminación de cepas productoras de BLEE (especialmente cepas de *K. pneumoniae* productoras de SHV-5) en hospitales es debido principalmente a diseminación clonal.

En el análisis mediante ECP para las cepas de *K. pneumoniae* con XbaI se identificaron 13 genotipos diferentes, al igual que en *E. coli* se observa una alta heterogeneidad genética entre los cluster identificados, sin variación en el perfil de resistencia, lo que indica diseminación de plásmidos producto del mal uso de cefalosporinas de amplio espectro, esto concuerda con resultados presentados por otros investigadores (36), pero para *K.*

*pneumoniae*, se identificaron dos cluster con más de un 80% de similaridad, lo que las clasifica como estrechamente relacionadas, dos fueron aisladas de NEO y dos de UCIP, este resultado es parecido al presentado por Yu en Taiwán y otros autores (39), donde demostraron diseminación dentro de unidades de cuidados intensivos de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

Estos resultados demuestran la importancia que poseen las cepas productoras de BLEE en nuestras unidades de cuidados intensivos, otro dato importante es que demuestra que esta resistencia, se da principalmente, por diseminación de plásmidos producto del mal uso de las cefalosporinas de amplio espectro que ejercen una presión selectiva que favorece la aparición de mecanismos de resistencia; también es importante resaltar que en menor grado, pero sin dejar de ser importante, existe diseminación clonal de estos microorganismos producto de la mala aplicación de medidas de contención primarias para el control de enfermedades en ambientes hospitalarios, como son el cambio de guantes, el lavado de las manos, buena desinfección de equipos, etc.

Las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en esta investigación son altamente resistentes a la mayoría de los antimicrobianos, por el tratamiento de estos pacientes se hace muy complicado, quedando únicamente como alternativa terapéutica, el uso de los carbapenemas; sin embargo, se debe tener cuidado de no sobreutilizar estos agentes antimicrobianos, ya que su mala utilización puede ejercer presión selectiva y conducir a la aparición de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, por lo que el uso de carbapenemas debería restringirse para bacteriemias severas producidas por cepas productoras de BLEE y

Amp-C, y reemplazar su uso en la medida de lo posible con otros antimicrobianos o combinaciones de estos.

La ECP demostró ser una herramienta muy útil en el control de las infecciones nosocomiales, ya que permite discriminar como se realiza la diseminación de los diferentes microorganismos, así como, en algunos casos identificar las fuentes de contaminación, lo que permite diseñar estrategias efectivas para el control de las mismas.

## Referencias Bibliográficas

- (1) Mandell G, Dolin G, Bennett J. Enfermedades infecciosas, principios y práctica. 5<sup>ta</sup> Edición ed. Editorial Médica Panamericana; 2002.
- (2) Wong-Beringer A, Hindler J, Loeloff M, Queenan AM, Lee N, Pegues DA, et al. Molecular Correlation for the Treatment Outcomes in Bloodstream Infections Caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Ceftazidime. *Clinical Infectious Diseases* 2002 Jan 15; 34(2):134.
- (3) Martinez-Martinez L, Pascual A, Conejo MdC, Garcia I, Joyanes P, Domenech-Sanchez A, et al. Energy-Dependent Accumulation of Norfloxacin and Porin Expression in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and Relationship to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Dec 1;46(12):3926-32.
- (4) Livermore DM, Brown DFJ. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001 Jul 1;48 (suppl 1):59-64.
- (5) Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to  $\beta$ -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jan 1;46(1):196-202.

- (6) Coudron PE, Moland ES, Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. *J Clin Microbiol* 1997 Oct 1;35(10):2593-7.
- (7) Araque M, Rivera I. Simultaneous presence of blaTEM and blaSHV genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med Sci* 2004 Mar; 327(3):118-22.
- (8) Perozo A, Castellano M, Ginestre M, Ávila Y. Determinación de Betalactamasas plasmídicas de espectro extendido (ESBL) en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. 2000 p. 71.
- (9) Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Feb 1;47(2):559-62.
- (10) Krontal S, Leibovitz E, Greenwald-Maimon M, Fraser D, Dagan R. *Klebsiella* bacteremia in children in southern Israel (1988-1997). *Infection* 2002 Jun;30(3):125-31.
- (11) Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997 Jan;24 Suppl 1:S19-S45.
- (12) Klempner M, Sorber B, Bartlett J, Ellner J, Friedman H, Gilbert D, et al. Enfermedades Infecciosas. Segunda ed. Educación Médica Continua LTDA; 2001.
- (13) Salmenlinna S. Molecular Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland National Public Health Institute, Department of Microbiology Helsinki Finland; University of Helsinki Faculty of Medicine Helsinki Finland; 2002.
- (14) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standards Ninth Edition. 9[26]. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- (15) Farmer JJ. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 8 ed. Washington, DC.: American Society for Microbiology; 2003. p. 636-53.
- (16) 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 Jul;10(4):867-78.
- (17) Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. Outer Membrane Profiles of Clonally Related *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Clinical Samples and Activities of Cephalosporins and Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Jul 1;42(7):1636-40.
- (18) Neuronica S.A. Protocolo BACKIT: Kit para la obtención de ADN genómico de bacterias intacto e inmovilizado. 2007. La Habana, Cuba, Neuronica S.A.
- (19) Bradford PA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001 Oct 1;14(4):933-51.
- (20) Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases in Bloodstream Isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Isolates Harbor Plasmid-Mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC Beta-Lactamases. *J Clin Microbiol* 2003 Feb 1;41(2):772-7.
- (21) Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in a Belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol* 1997 Sep 1;35(9):2191-7.
- (22) Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003 Feb;21(2):77-82.
- (23) Hibbert-Rogers LCF, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ, et al. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology

- ward. J Antimicrob Chemother 1995 Jul 1;36(1):65-82.
- (24) Lucet JC, Chevret S, Decre D, Vanjak D, Macrez A, Bedos JP, et al. Outbreak of multiply resistant *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. Clin Infect Dis 1996 Mar;22(3):430-6.
- (25) Inciarte L, Sanz L, Contreras R, Texeira G, Carmona O, Grupo Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela. Bol.Soc.Ven.Microbiol. 15[1], 15-25. 1994.
- (26) Pineda M, Bonilla X, Vargas J. Boletín sobre Etiología y Resistencia Bacteriana. CRB SAHUM 2007(5) Available from: URL: <http://www.sahum.gob.ve>
- (27) Bou G. CTX-M Beta-Lactamases: An Update. Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents 2005 Jul;4(3):219-34.
- (28) Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A Novel Type of AmpC beta -Lactamase, ACC-1, Produced by a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Nosocomial Pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1999 Aug 1;43(8):1924-31.
- (29) Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13 Suppl 1:S17-S29.
- (30) Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von GA, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 2000 Mar ;30 (3):473 -8 2000;(3:473-8):473-8.
- (31) Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC, Baquero F, Canton 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 Feb 1;46(2):500-10.
- (32) Manchanda V, Singh NP. Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. J Antimicrob Chemother 2003 Feb 1;51(2):415-8.
- (33) Bagel S, Hullen V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of gyrA and parC Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 1999 Apr 1;43(4):868-75.
- (34) Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet 1998 Mar 14;351(9105):797-9.
- (35) Li XZ. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. International Journal of Antimicrobial Agents 2005 Jun;25(6):453-63.
- (36) Liu PY-F, Tung JC, Ke SC, Chen SL. Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum beta -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a District Hospital in Taiwan. J Clin Microbiol 1998 Sep 1;36(9):2759-62.
- (37) Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. J Clin Microbiol 1994 Oct 1;32(10):2553-8.
- (38) Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. Infection 1993 Jan;21(1):18-22.
- (39) Yu WL, Jones RN, Hollis RJ, Messer SA, Biedenbach DJ, Deshpande LM, et al. Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing, Fluoroquinolone-Resistant Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. J Clin Microbiol 2002 Dec 1;40(12):4666-9.