

Artículo original

Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae*

Militza Guzmán^{a,*}, Florangel Guzmán^a, Elsa Salazar^a, Luzmila Albarado^a, Hectorina Rodulfo^b, Marcos de Donato^b

^aLaboratorio de Bacteriología Molecular, Departamento de Bioanálisis. ^bLaboratorio de Genética Molecular, IBCAUDO, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Recibido 9 de diciembre de 2015; aceptado 16 de junio de 2016

Resumen: Las infecciones por *Klebsiella pneumoniae*, constituyen un problema creciente en los centros hospitalarios. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la resistencia a los aminoglucósidos, así como la presencia de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) en aislados intrahospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*. Se analizaron 56 cepas provenientes de pacientes con diagnóstico de infección intrahospitalaria del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el periodo enero-septiembre de 2008. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana mediante los métodos de difusión y dilución en agar, siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar los genes que codifican EMA. Se encontró resistencia a gentamicina y tobramicina en el 33,9% y 35,7%, respectivamente. Los fenotipos de resistencia a aminoglucósidos más frecuentes fueron I (ANGMKTob) y II (GMKTob). Se identificaron los genes *aadA* (21,4%), *aac(3)-IIa* (16,1%), *aadB* (14,3%), *aac(6)-Ib* (3,6%) y *aph(3)-Ia* (1,8%). En 10 cepas se observó la presencia de más de un gen y en 13 cepas se correlacionó el fenotipo con los genes encontrados. La resistencia a los aminoglucósidos en los aislados evaluados se debe, principalmente, a enzimas de tipo acetiltransferasas.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, acetiltransferasas, adeniltransferasas, aminoglucósido, resistencia.

Identification of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* infection is a growing problem in hospitals. The objective of this study was to evaluate resistance to aminoglycosides and detection of genes encoding for aminoglycoside modifying enzymes (AME) in hospital isolates of *K. pneumoniae*. Fifty-six isolates from patients with diagnosis of nosocomial infection at the University Hospital Antonio Patricio de Alcalá, during the period January to September 2008 were included for study. Antimicrobial susceptibility was determined by the methods of diffusion and agar dilution, following the Institute for Clinical and Laboratory Standards Guidelines. Genes encoding AME were determined by the polymerase chain reaction procedure. Resistance results for Gentamycin were 33.9% and for Tobramycin 35.7%. Aminoglycoside resistance phenotypes most frequently identified were I (ANGMKTob) and II (GMKTob). The genes involved were *aadA* (21.4%), *aac(3)-IIa* (16.1%), *aadB* (14.3%), *aac(6)-Ib* (3.6%) and *aph(3)-Ia* (1.8%) For 10 of the isolates studied more than one gene was identified. In 13 isolates the phenotype corresponded to the genes found. Aminoglycoside resistance in the isolates studied is mainly due to the presence of acetyltransferase enzymes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, acetyltransferases, adenyltransferases, aminoglycoside, resistance.

* Correspondencia:
E-mail: miltzaguz@yahoo.es

Introducción

Las infecciones bacterianas causadas por *Klebsiella pneumoniae*, son consideradas un problema creciente en los centros hospitalarios. A partir de 1998 en Venezuela y

América Latina esta bacteria se ubica entre los principales patógenos oportunistas causantes de cuadros clínicos a nivel intrahospitalario [1]. Debido a que la terapia antimicrobiana es la única alternativa eficaz para combatirla, su amplio uso ha aumentado las tasas de resistencia, principalmente a los

β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas [2].

Los aminoglucósidos representan un grupo de antimicrobianos de amplio espectro que son utilizados para el tratamiento de las infecciones por bacterias gramnegativas y ejercen su actividad inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la unión al ARNr 16S [3]. El principal mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos en *K. pneumoniae* es la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA) las cuales catalizan la modificación covalente de los grupos aminos e hidroxilos del compuesto, generando cambios químicos que llevan al antimicrobiano a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos. Existen más de 50 tipos de EMA reportadas y entre las más frecuentemente detectadas en enterobacterias se encuentran acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH). Su acción se evidencia fenotípicamente en una resistencia de alto nivel de expresión en las cepas; el nivel de resistencia resultante depende de varios factores entre los cuales se pueden mencionar: la producción de la enzima, la eficacia catalítica y el tipo de aminoglucósido [4,5].

Otros mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos reportados son: impermeabilidad de la membrana externa, disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano y metilación postranscripcional del ARNr, mecanismo en el cual se han identificado los genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE* y *npmA* [6-8].

Las EMA son usualmente codificadas por genes localizados en plásmidos, transposones e integrones, elementos genéticos fundamentales en la transferencia y diseminación de genes de resistencia a cepas susceptibles, los cuales pueden complicar los problemas epidemiológicos de la resistencia bacteriana, motivado, a que por lo general, también portan otros genes que confieren resistencia a diversos compuestos [9-11].

Los posibles mecanismos enzimáticos se pueden inferir según los resultados que refleje un antibiograma. La presencia de AAC(6')-Ib se sugiere cuando se encuentra resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina y amikacina. Resistencia de alto nivel a kanamicina y sensibilidad a tobramicina y gentamicina es indicativo de APH(3')-Ia. Resistencia a kanamicina, gentamicina y tobramicina, son producidas por la enzima AAC(3')-IIa, así como ANT(2'')-I. Resistencia a estreptomina y espectinomicina son producidas por ANT(3'')-IIa [4,5].

La resistencia a aminoglucósidos está incrementándose cada vez más a nivel mundial; en *K. pneumoniae* se ha reportado resistencia a amikacina, gentamicina y tobramicina, con porcentajes que varían de 32 a 53%, mediada principalmente por enzimas AAC(6') presentes en moléculas plasmídicas e integrones y asociadas a enzimas β -lactamasas [12]. La detección de genes de resistencia es una herramienta muy útil en el seguimiento epidemiológico de especies bacterianas resistentes a los antimicrobianos en un centro hospitalario, así como en el control de las diferentes estrategias de tratamiento. En el Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (SAHUAPA) Cumaná, estado Sucre, no

se han realizado estudios con el propósito de conocer los genes que codifican las EMA en cepas de *K. pneumoniae*; solo se cuenta con un reporte donde se detectaron los genes *aac(6)-Iq*, *aadB* y *aadA* como parte de la región variable de integrones de la clase I [13]. Por este motivo, el objetivo del estudio fue evaluar la resistencia a aminoglucósidos mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y la identificación de genes que codifican EMA en aislados intrahospitalarios de *K. pneumoniae*.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos: Durante el período de enero a septiembre de 2008 se recolectaron 56 aislados de *K. pneumoniae*, provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de infección intrahospitalaria, atendidos en las diferentes áreas de hospitalización del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", (SAHUAPA). Como criterio de selección de las cepas se escogió un aislado por paciente, teniendo en consideración que éste cumpliera con los criterios establecidos para infecciones intrahospitalarias [14]. El trabajo se realizó respetando las normas de bioética para trabajos de investigación en seres humanos [15].

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se realizó mediante el método de difusión en agar y concentración mínima inhibitoria (CMI), siguiendo los lineamientos propuestos para enterobacterias por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (del inglés: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) [16].

Por el método de difusión en disco se ensayaron los aminoglucósidos: amikacina (AN, 30 μ g), gentamicina (GM, 30 μ g), tobramicina (Tob, 30 μ g) y kanamicina (K, 30 μ g). Los resultados se reportaron según las recomendaciones del CLSI (16) en las categorías de interpretación sugeridas.

Para evaluar la CMI se aplicó el método de dilución en agar, empleando los mismos aminoglucósidos seleccionados para el método de difusión. Los compuestos activos fueron preparados a concentraciones desde 0,5 a 256 μ g/mL. Se utilizó como control de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Los resultados obtenidos por difusión en disco y CMI se clasificaron según la concordancia entre ellos en: acuerdo, error menor, error mayor y error máximo; considerando a la CMI como método de referencia. Acuerdo: cuando por ambas técnicas se encontraron los mismos resultados; error menor: cuando el resultado por difusión en disco era intermedio y por CMI sensible; error mayor: cuando por difusión en disco daba resistente y CMI sensible y error máximo cuando por difusión en disco daba sensible y CMI resistente.

Para establecer los fenotipos de resistencia se tomaron en consideración los resultados del método de concentración mínima inhibitoria. Cada fenotipo se identificó con

números romanos según la resistencia obtenida para los antimicrobianos ensayados.

Identificación molecular de los genes mediante reacción en cadena de la polimerasa: La extracción del ADN genómico se realizó empleando el estuche comercial Wizard® Genomic (Promega). Los genes que codifican EMA (*aadA*, *aadB*, *aac(6')-Ib*, *aac(3')-IIa* y *aph(3')-Ia*) se determinaron utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se investigaron en todos los aislados de *K. pneumoniae*. Para la amplificación se emplearon los oligonucleótidos propuestos por Díaz y col. [17]. Las condiciones de reacción para los genes investigados fueron las siguientes: desnaturalización a 96 °C por 30 segundos, hibridación a 52 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos durante un tiempo total de 30 ciclos, con una extensión final de 72 °C por 10 minutos. En cada caso se emplearon 12,5 µL de master Mix 2X de la casa comercial Promega, 4,0 µL de cada oligonucleótido, para una concentración final de 0,48 µmol.l⁻¹ y 4,5 µL del ADN genómico, hasta obtener un volumen final de reacción de 25 µL. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador marca Techne® (TC-312). Los productos fueron corridos en geles de agarosa al 2,0%, coloreados con bromuro de etidio y visualizados en un equipo Gel Doc™ (Bio-Rad).

Análisis de los resultados: El análisis de los resultados se realizó, empleando porcentajes de frecuencias; para ello, se elaboraron tablas y figuras de los datos obtenidos mediante el programa estadístico SPSS versión 11.5.

Resultados

En la tabla 1 se muestra la resistencia de *K. pneumoniae* a los aminoglucósidos ensayados. La CMI se manifestó en un rango de 64 a 256 µg/ml (Tabla 2), obteniéndose porcentajes menores de cepas resistentes a amikacina y kanamicina, con respecto a tobramicina y gentamicina.

Al comparar los resultados obtenidos por el método de difusión en disco y por CMI, se encontró errores menores y mayores. El error mayor se manifestó en tres aislados

Tabla 1. Resistencia antimicrobiana presentada por los aislados intrahospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*. Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (SAHUAPA). Cumaná, estado Sucre. Enero-septiembre 2008.

Antimicrobiano	Difusión en agar (%)		CMI
	R (%)	I (%)	R (%)
Amikacina	14(25,0)	2(3,6)	11(19,6)
Kanamicina	18(32,1)	2(3,6)	16(28,6)
Gentamicina	17(30,4)	3(5,4)	19(35,7)
Tobramicina	16(28,6)	4(7,1)	20(33,9)

CMI: concentración mínima inhibitoria; R: resistencia; I: susceptibilidad intermedia.

resistentes a amikacina y dos a kanamicina, los cuales, por el método de difusión eran resistentes y por CMI se manifestaron como sensibles.

Con el análisis de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos por CMI se establecieron tres fenotipos diferentes para los aminoglucósidos. Los fenotipos I (KGMANTob) y II (KGMTob) fueron los más prevalentes con 50% y 45% respectivamente; en menor porcentaje se encontró el fenotipo III (KANTob) con 5%. El fenotipo I estuvo representado por cepas que mostraron resistencia a todos los aminoglucósidos ensayados en este estudio.

Los genes detectados mediante PCR revelaron 21,4%, 14,3% y 16,1%, de *aadA*, *aac(3')-IIa* y *aadB* respectivamente. En menor proporción se encontró el gen *aac(6')-Ib* con 3,6% y *aph(3')-Ia* con 1,8%. El estudio permitió la detección de aislados con igual fenotipo pero con distintos genes; tal es el caso de los aislados 801 y 805. En el fenotipo I se agruparon aislados con resistencia a todos los aminoglucósidos ensayados y portadores solo del gen *aadA*, el cual codifica una enzima que no modifica a dichos antimicrobianos (Tabla 2).

Discusión

El hecho de utilizar ampliamente a los aminoglucósidos para tratar a las infecciones causadas por bacilos gramnegativos, ha incidido en el incremento de los niveles de resistencia de manera alarmante, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos, donde estos superan el 60%, aproximadamente [18].

Los aminoglucósidos que se emplean como opción terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias son amikacina, tobramicina y gentamicina, razón por la cual fueron los que se evaluaron en esta investigación. De ellos, amikacina resultó tener mejor actividad contra los aislados. Los porcentajes de resistencia a los aminoglucósidos en el centro hospitalario han tenido fluctuaciones. Al evaluar los resultados de la presente investigación, se evidencian porcentajes de resistencia similares a los obtenidos durante un estudio de susceptibilidad realizado en el mismo centro durante el año 2005, pero inferiores, a los reportados durante los años 2003 y 2004 [13,19]. En el ámbito nacional e internacional otros investigadores han descrito porcentajes similares; sin embargo, Perozo y col. en el Hospital Universitario de Maracaibo-Venezuela, encontraron 71,4% de aislados resistentes a tobramicina, 46,7% a gentamicina y un 40,0% a amikacina [11,20-22].

Los resultados obtenidos mediante los dos métodos empleados para determinar la resistencia revelan discrepancias en los resultados del antibiograma, aspecto que pone de manifiesto la importancia de la lectura interpretada del mismo, ya que el análisis de los resultados fenotípicos se fundamenta en el conocimiento de los diferentes mecanismos de resistencia y su expresión; es por este motivo que siempre se debe tener presente que el objetivo principal de la evaluación de la susceptibilidad

Tabla 2. Fenotipos y genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en aislados de *Klebsiella pneumoniae* procedentes del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná, estado Sucre. Enero-septiembre 2008.

Cepa	Procedencia	Muestra	CMI (µg/mL)				Fenotipo	Genes
			AN	K	Tob	GM		
801	UCI	Sangre	64	128	128	128	I	<i>aac(3)-IIa</i>
802	UCI	Sangre	64	128	128	128	I	<i>aac(3)-IIa</i>
805	UCI	Secreción	128	256	128	256	I	<i>aadA</i>
806	Retén	Secreción	8	256	256	256	II	<i>aadA</i> y <i>aadB</i>
808	Medicina	Orina	256	256	256	256	I	<i>aadA</i>
812	Medicina	Sangre	256	256	256	256	I	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> y <i>aac(3)-IIa</i>
815	Cirugía	Secreción	128	128	128	256	I	<i>aadA</i>
817	UCI	Secreción	4	128	64	128	II	<i>aadB</i> y <i>aac(3)-IIa</i>
820	UCI	Sangre	4	256	256	256	II	<i>aadA</i> y <i>aadB</i>
821	Medicina	Secreción	8	128	64	128	II	<i>aadB</i> y <i>aac(3)-IIa</i>
825	Medicina	Orina	64	64	64	128	I	<i>aadA</i>
826	Retén	Sangre	256	128	128	2	III	<i>aadA</i> y <i>aac(6')-Ib</i>
828	Cirugía	Secreción	128	256	256	256	I	<i>aadA</i>
832	Medicina	Sangre	S	256	128	128	II	<i>aadA</i> , <i>aadB</i> y <i>aac(3)-IIa</i>
834	UCI	Orina	S	128	128	128	II	<i>aadB</i> y <i>aac(3)-IIa</i>
835	Medicina	catéter	64	256	256	256	I	<i>aac(3)-IIa</i>
838	Medicina	Secreción	128	256	256	256	I	<i>aadA</i>
840	Medicina	Orina	S	128	128	128	II	<i>aadB</i> y <i>aac(3)-IIa</i>
842	Medicina	Secreción	16	128	128	128	II	<i>aadA</i> y <i>aadB</i>
850	Retén	Sangre	128	128	256	256	I	<i>aadA</i>

CMI: concentración mínima inhibitoria; Ft: fenotipo; AN: amikacina; K: kanamicina; Tob: tobramicina; GM: gentamicina; UCI: unidad de cuidados intensivos.

antimicrobiana es evitar el posible fracaso terapéutico.

La discrepancia observada entre los resultados encontrados por difusión en disco y CMI permiten inferir que el método de difusión en disco proporciona resultados más aleatorios, sobre todo a la hora de diferenciar los aislados sensibles de aquéllos con sensibilidad intermedia; entre las posibles causas tiene relevancia el inóculo preparado para realizar el antibiograma. Al respecto se recomienda que al realizar la prueba siempre se ajuste el inóculo al patrón MacFarland.

Los aminoglucósidos de uso clínico se deben vigilar constantemente desde el punto de vista microbiológico con el propósito de conocer los posibles fenotipos existentes en las bacterias de origen intrahospitalario. El fenotipo prevalente en los aislados de *K. pneumoniae* evaluados en esta investigación fue el I, caracterizándose por presentar resistencia a todos los antimicrobianos ensayados. Este fenotipo es poco frecuente, y fue reportado en estudios previos realizados en aislados de *K. pneumoniae* recolectados durante el periodo 2003-2004 en el SAHUAPA [13]. Al respecto, Neonakis *et al* [23] señalaron que cuando

existe la presencia de varias EMA en una cepa, se produce una combinación de amplio espectro, capaz de inactivar a casi todos los aminoglucósidos disponibles, manifestándose en un fenotipo con resistencia a la mayoría de estos antibióticos. Es probable que en los aislados con el fenotipo I puedan encontrarse, adicionalmente, otros mecanismos que de forma sinérgica sean los responsables de la resistencia presentada por los aislados, entre éstos tienen relevancia clínica la metilación postranscripcional del ARNr 16s y las alteraciones en la permeabilidad de la membrana [24] o la presencia de otras enzimas no detectadas en este estudio. Este fenotipo ha sido reportado previamente por Antuñez y col. [25] en enterobacterias aisladas de un centro metropolitano en Caracas-Venezuela. Los otros fenotipos encontrados se han detectado con mayor prevalencia en diversos estudios a nivel internacional [26,27].

Con respecto a los genes evaluados, fueron seleccionados porque codifican a las EMA que afectan a los aminoglucósidos empleados en el tratamiento de infecciones por enterobacterias. La mayoría de los aislados presentaron

el gen *aadA*, el cual codifica una nucleotidiltransferasa que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin. Ambos antimicrobianos son usados en casos excepcionales para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae*; la presencia de este gen puede deberse a transferencia horizontal de otras especies [28]. Existe evidencia que puede encontrarse como parte de la región variable de un integrón de la clase I, aun cuando no exista presión selectiva, o cese el uso de estreptomycin [29,30].

Otros genes prevalentes fueron *aac(3)-IIa* y *aadB*, los cuales codifican enzimas capaces de conferir resistencia a kanamicina, gentamicina y tobramicina; estos genes se encontraron de forma individual y combinados; cuando se presentaron combinados los aislados expresaron altos niveles de resistencia, excepto en la cepa 821. Es importante resaltar que la selección de aislados con combinaciones de genes de resistencia en el centro hospitalario, representa un compromiso desde el punto de vista clínico, por lo que se hace necesario mantener una activa vigilancia para el monitoreo de la resistencia bacteriana, con el objetivo de evitar la selección y diseminación de aislados resistentes.

Los genes *aph(3)-Ia* y *aac(6)-Ib* se encontraron en menor proporción; los aislados en los cuales se detectaron estos genes presentaron fenotipos de resistencia que se correlacionan con las EMA APH (3') y AAC(6). En la tabla 2 se muestran aislados cuyo fenotipo no tiene relación con los genes encontrados, tal es el caso de 805, 808, 815, 825, 828, 838 y 850, los cuales tienen resistencia a todos los aminoglucósidos ensayados y solo presentaron el gen *aadA*, el cual codifica para una adeniltransferasa que no modifica amikacina, gentamicina, tobramicina y kanamicina, razón por la cual esta resistencia pueda deberse a la presencia de otras enzimas no investigadas en este trabajo o a otros mecanismos de resistencia no evaluados.

Los aislados intrahospitalarios resistentes a aminoglucósidos generalmente presentan resistencia asociada a β -lactámicos, condición en la cual las moléculas plasmídicas juegan un papel importante ya que, en la mayoría de las bacterias, los mecanismos de resistencia adquiridos, están codificados en genes que se localizan en plásmidos o integrones [31,32]. Al respecto, en el SAHUAPA, se han detectado aislados de *K. pneumoniae* con plásmidos que portan diversos casetes de resistencia a aminoglucósidos (*aadA*, *aadB* y *aac(6)-Iq*) asociados a *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* [13,33].

Se concluye que los bajos niveles de resistencia a aminoglucósidos en las cepas, revelan que éstos todavía son una posible opción terapéutica en las infecciones causadas por bacilos gramnegativos en este centro hospitalario. La resistencia a los aminoglucósidos en los aislados intrahospitalarios de *K. pneumoniae* se debe, principalmente, a enzimas de tipo acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas, que modifican kanamicina, gentamicina y tobramicina, asimismo, se infiere que la baja frecuencia de genes *aac(6)-Ib*, sugiere que la resistencia expresada a amikacina puede ser originada por otro mecanismo u otra EMA.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al personal médico y licenciados en Bioanálisis del SAHUAPA por su aporte en la recolección de las muestras. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente bajo el proyecto de grupo número N° CI-2-040102-1409/08.

Referencias

- Gales C, Jones R, Gordon K, Sader H, Wilke W, Beach M. Activity and spectrum of antimicrobial agents tested again urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Antimicrob Chemother. 1998; 45:295-303.
- Fluit A, Visser M, Schmitz F. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:836-71.
- Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. Emerg Infect Dis. 2005; 11:951-3.
- Vakulento S, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003; 16:430-50.
- Mella S, Sepúlveda A, González R, Bellot H, Domínguez M, Zemelman Z, Ramírez G. Aminoglicósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Rev Chil Infect. 2004; 21:330-8.
- Navarro F, Calvo R, Canton R, Fenández F, Mirellis B. Phenotypic detection of resistance mechanisms in microorganisms. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29:524-34.
- Magnet S, Blanchard J. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chem Rev. 2005; 105:477-97.
- Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev. 1993; 57:138-63.
- Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, Block C, Strahilevitz J. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding *aac(6')-Ib*. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:898-901.
- Caiqian L, Bangrong X, Xiaoyan Y, Yongmei F, Yaqun F, Yongbiao Z. Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. Int J Clin Exp Med. 2015; 8:1381-5
- Xiaoli C, Xuejing X, Zhifeng Z, Han S, Junhao C, Kui Z. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13:16

12. Guzmán M, Alonso G. Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en integrones. Rev Med Chile. 2010; 138:322-9.
13. Horan T, Andrus M, Dudeck M. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control. 2008; 36:309-32.
14. De Abajo F. La declaración de Helsinki VI. Rev Esp Salud Púb. 2001; 75:407-20.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement M100-S24. Wayne (PA), USA: 2014.
16. Díaz P, Bello H, Domínguez M, Trabal N, Mella S, Zemelman R y col. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Rev Med Chile. 2004; 132:1173-8.
17. Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21:105-15.
18. García J, Rodríguez E, Carpio C, Albarado L, Salazar E, Flores E y col. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de enterobacterias nosocomiales productoras de betalactamasas de espectro expandido. Cumaná, estado Sucre. Kasmera. 2009; 37:38-50.
19. De la Parte-Pérez M, Brito A, Guzmán M, Carmona O y GVRB. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela. Análisis de una década. Rev SocVen Microbiol. 2001; 21:14-22.
20. Pedroza R, Torres L, Narváez P, Alonso G, Rodríguez V. Multirresistencia a agentes antimicrobianos mediada por plásmidos en bacilos Gram negativos de origen hospitalario. Memoria del Instituto de Biología Experimental. 2001; 3:97-100.
21. Perozo A, Castellano M, Ginestre M, Harris B. 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. Kasmera. 2007; 35:1-17.
22. Neonakis I, Gikas A, Scoulica E, Manios A, Georgiladakis Y, Tselentis T. Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. Int J Antimicrob Agents. 2003; 22:526-31.
23. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28:638-45.
24. Antuñez M, Blanco K, Marcano D, Torres L. Caracterización de la resistencia a aminoglicosidos mediadas por enzimas metilasas del ARN16S de enterobacterias. Bol Venez Infectol. 2011; 22:28-35.
25. Bremmer DN, Clancy CJ, Press EG, Almaghrabi R, Chen L, Doi Y, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains that harbor AAC(6)-Ib exhibit intermediate resistance to amikacin. Antimicrob Agent Chemother. 2014; 58:7597-600.
26. Rostami E, Siadat S, Derakhshan S. High rate of aminoglycoside resistance in CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. Labmedicine. 2014; 45:231-7.
27. Maymona K, El-Sayed A, Youssry E. Molecular cloning and characterization of streptomycin and spectinomycin resistance gene (*aadA*) in *Salmonella typhimurium* isolate from Egypt. Global J Mol Sci. 2011; 6:15-21.
28. White P, Melver C, Rawlinson W. Integrons and gene cassette in Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:2658-61.
29. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population structure and resistance genes in antibiotic resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:1179-84.
30. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren M, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. Antimicrob. Agents Chemother. 2010; 54:3002-6.
31. Cabral A, Melo R de C, Maciel M, Lopes A. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45:572-8.
32. Guzmán M, Rodríguez E, Antón K, Silva S, Navarro J, Lastra L y cols. Genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Invest Clin. 2013; 54:235-45.