

Artículo original

Epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido

Rosa María Tedesco-Maiullari^{a,b}, Armando Guevara^{b,c,*}

^aPostgrado en Ciencias Médicas Fundamentales. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. ^bDepartamento de Parasitología y Microbiología. Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Battistini". Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar. Venezuela. ^cLaboratorio de Resistencia Bacteriana. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Universidad de Oriente. Venezuela.

Recibido 24 de febrero de 2012; aceptado 5 de junio de 2012

Resumen: La rápida emergencia de la resistencia antimicrobiana debida a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tiene un impacto clínico significativo, lo cual se considera un problema de salud pública. El objetivo de este estudio fue determinar si existe diseminación clonal de *K. pneumoniae* productora de BLEE, en pacientes adultos hospitalizados en el Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" (CHRP), Ciudad Bolívar, Venezuela. Se evaluaron 13 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes adultos con infección intrahospitalaria. La confirmación fenotípica de la producción de BLEE, fue realizada por los métodos de sinergia de doble disco y del disco combinado. Se realizó la tipificación molecular de los aislados mediante electroforesis de campo pulsante (ECP). Todas las cepas presentaron resistencia asociada a las fluoroquinolonas y 9 fueron resistentes a los aminoglucósidos. Se encontraron 12 fenotipos de susceptibilidad; el fenotipo I prevaleció en dos cepas. La ECP reveló que la mayoría de las cepas presentaron pulsotipos distintos, descartando una posible relación clonal entre ellas, a excepción de dos aislados que presentaron pulsotipos indistinguibles entre sí, ambos del mismo servicio de hospitalización. Se puede concluir que en el CHRP para el periodo marzo-junio de 2011, no hubo diseminación clonal de *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, betalactamasas de espectro extendido, electroforesis de campo pulsante.

Molecular epidemiology of extended spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae*

Abstract: The rapid emergence of antimicrobial resistance to extended spectrum β -lactamases (ESBL) has a significant clinical impact, and is considered a public health problem. The purpose of this study was to determine if there is clonal dissemination of ESBL producer *K. pneumoniae* in adult patients hospitalized at the Complejo Hospitalario "Ruiz y Paez" (CHRP) of Ciudad Bolivar, Venezuela. Thirteen *K. pneumoniae* strains isolated from adult patients with intra-hospital infections were evaluated. The phenotypic confirmation of ESBL production was done with the double disk synergy and combined disk methods. The molecular typing of the isolates was done through pulse field electrophoresis (PFE). All the strains presented fluoroquinolone-associated resistance and 9 were aminoglycoside resistant. Twelve susceptibility phenotypes were found; phenotype I prevailed in 2 strains. PFE revealed that most of the strains presented different pulsetypes, discarding a possible clonal relationship among them, except for 2 isolates which presented undistinguishable pulsetypes, both from the same hospitalization service. It can be concluded that at the CHRP there was no clonal dissemination of ESBL producer *K. pneumoniae* during the March-June 2011 period.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, extended spectrum β -lactamase, pulse field electrophoresis.

* Correspondencia:
E-mail: agvillefort@yahoo.com

Introducción

La rápida emergencia de la resistencia antimicrobiana debida a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

tiene un impacto clínico significativo y actualmente es motivo de preocupación, por lo cual se considera un problema de salud pública. Las BLEE son enzimas que producen los bacilos gramnegativos y confieren resistencia a las

penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenemos ni a las cefamicinas y la mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico [1-6]. Se ha descrito que la administración indiscriminada de cefalosporinas de tercera generación, particularmente ceftazidima, es una de las principales causas de la aparición de enterobacterias productoras de BLEE, que han ocasionado brotes de infección, con resistencia a múltiples antibióticos, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), dificultando el tratamiento y aumentando la morbimortalidad asociada a los cuidados de la salud [3,7,8].

Las principales enterobacterias productoras de BLEE son *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. La frecuencia de este tipo de enzima en estas especies bacterianas es variable, con un predominio en casi todas las regiones de *K. pneumoniae*; sin embargo, existen regiones del mundo, e incluso países, donde la producción de BLEE es más frecuente en *E. coli*. En Europa, la producción de BLEE se observa principalmente en *K. pneumoniae* (22,6%) [9,10], mientras que en Asia se presenta más frecuentemente en *E. coli* con 67% seguida de *K. pneumoniae* con un 55% [11]. En Latinoamérica, la frecuencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* es variable entre los distintos países. Para *K. pneumoniae* oscila entre 36 a 56% mientras que para *E. coli* es de 8,5 a 31% [9,10,12-15].

K. pneumoniae es considerada una especie patógena oportunista para el hombre. A partir de 1998 en Venezuela y América Latina se ubica entre los principales patógenos causantes de infecciones intrahospitalarias. La presencia de mecanismos de resistencia, como producción de enzimas BLEE (tipo SHV, TEM, CTX-M entre otras), enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloranfenicol-acetiltransferasas y proteínas protectoras del sitio blanco de las topoisomerasas (Qnr), han originado fallas terapéuticas en el tratamiento de las infecciones causada por *K. pneumoniae* [4,6].

K. pneumoniae productora de BLEE podría diseminarse de forma epidémica en áreas de riesgo; en estos casos la diseminación habitualmente es clonal y los factores para adquirir infección por esta bacteria están muy relacionados con la comorbilidad del paciente, las manipulaciones diagnósticas o terapéuticas y el uso de antibióticos [8,16].

Por razones que no son bien conocidas, *K. pneumoniae* es más prevalente en los hospitales, causando brotes epidémicos en las UCI, o como un patógeno endémico en las áreas quirúrgicas [7,17]. La presión antibiótica selectiva, sobre todo con cefalosporinas de tercera generación, ha sido señalada como factor desencadenante de brotes epidémicos producidos por *K. pneumoniae* productoras de BLEE y del mantenimiento de situaciones de endemia elevada [17]; además, *K. pneumoniae* es el microorganismo productor de BLEE descrito con más frecuencia, probablemente relacionado con el hecho de que esta especie forma parte de la flora normal, sobrevive durante largos períodos de tiempo sobre la piel y los fómites y adquiere, con cierta facilidad, plásmidos conjugativos, que en la mayoría de los casos, portan genes que codifican resistencia para múltiples

antimicrobianos altamente estables [3,7,8]. En muchas oportunidades, los brotes epidémicos y las endemias por enterobacterias productoras de BLEE son ocasionadas por una cepa clonal o por un único plásmido. Esto es más evidente en *K. pneumoniae* productora de BLEE, que puede diseminarse entre hospitales o áreas sanitarias; en cualquier caso, esta situación también se ha descrito en *E. coli* productoras de BLEE [1,18].

La alta prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* sugiere restringir el uso de antibióticos betalactámicos de amplio espectro e implementar medidas rigurosas de higiene para el control de las infecciones y la prevención de la diseminación de microorganismos productores de BLEE en el ambiente hospitalario. Por tal motivo, esta investigación tuvo como objetivo determinar si existe diseminación clonal de *K. pneumoniae* productora de BLEE entre pacientes adultos hospitalizados en el Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” de Ciudad Bolívar, Venezuela.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos: Se analizaron 13 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes adultos con infecciones asociadas a los cuidados de salud, recluidos en diferentes servicios del Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela, durante el período marzo-junio de 2011. Las características clínico-epidemiológicas de los pacientes con infección por *K. pneumoniae* se muestran en la tabla 1.

Susceptibilidad antimicrobiana: Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevaron a cabo mediante el método de difusión con discos, siguiendo los lineamientos para enterobacterias del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2011 [19]. Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulánico (20/10µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), cefoperazona (75µg), cefepima (30µg), imipinem (10µg), meropenem (10µg), aztreonam (30µg), amikacina (30µg), gentamicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), ciprofloxacina (5µg), levofloxacina (5µg).

Detección fenotípica de BLEE: Se realizó la confirmación fenotípica de la producción de BLEE, a todas las cepas de *K. pneumoniae*, mediante el método de sinergia de doble disco, y por el método del disco combinado [20,21].

Tipificación molecular de los aislados de *K. pneumoniae*: Se realizó la tipificación molecular de los aislados mediante la electroforesis de campo pulsante (ECP) en el equipo Guefast-06® (NEURONIC, S.A).

Preparación del ADN inmovilizado: Las cepas de *K. pneumoniae* fueron subcultivadas en agar Müeller-Hinton (BBL®), luego fueron recolectadas, lavadas con una solución de NaCl al 0,5% y EDTA al 0,01M pH 8,0; posteriormente, se suspendieron en 50 µL de la solución de

Tabla 1. Características epidemiológicas de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* productora de BLEE asociadas a los cuidados de la salud. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" (CHRP), Ciudad Bolívar, Venezuela.

Nº de cepa	Edad del paciente (años)	Sexo	Servicio Hospitalario	Diagnóstico clínico
11-A	54	F	Medicina II	Infección de herida operatoria
347-A	63	M	Medicina I	Infección de herida traumática
133-A	52	M	Medicina I	Pie diabético
575-O	53	M	Medicina I	Infección urinaria
420-O	42	M	Medicina I	Infección urinaria
62-A	19	M	Medicina I	Sepsis
349-A	24	F	Cirugía II	Infección de herida operatoria
231-A	16	F	Cirugía II	Quemaduras de 2do y 3er grado
205-A	46	M	UCI	Neumonía asociada a ventilación mecánica
244-B	64	M	UCI	Neumonía asociada a ventilación mecánica
189-A	29	F	E/A	Celulitis de mano izquierda
61-A	45	M	E/A	Infección de herida operatoria
350-A	19	F	E/A	Infección de herida operatoria

UCI: Unidad de cuidados intensivos. E/A: Emergencia de adultos.

lavado, se mezclaron con 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%, fundida y estabilizada a 45 °C. Utilizando el molde para la fabricación de bloques, se prepararon minibloques de 3 x 3 x 0,7 mm. La concentración final de células bacterianas en cada minibloque fue de 2,1 x 10⁹ células/mL aproximadamente. Posteriormente, las células inmovilizadas fueron sometidas a un proceso de lisis y desproteínización, colocándolas en una solución que contenía Tris AL 0,01M; EDTA al 0,1M; sarcosyl al 1%; 1% nonident P40 al 1% y urea al 4M pH 9,5. Se incubaron por 2 horas a 45 °C, luego se eliminó esta solución, se lavaron con agua destilada y con una solución Tris-HCL al 0,01M; EDTA al 0,1M pH 8, donde se conservaron a 4 °C hasta el momento de la digestión [22].

Digestión del ADN inmovilizado con enzimas de restricción:

Un minibloque de cada aislado en estudio fue lavado tres veces con la solución 0,01M Tris-HCL y 0,05M EDTA pH 8 a temperatura ambiente por 10 minutos, luego fueron incubados con 100 µL de tampón de digestión SH 1X de la enzima, proporcionado por el fabricante (Sigma®) a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, fueron transferidos a 100 µL de tampón de digestión recién preparado y se colocó 1 µL de la enzima de restricción *Xba*I

(Sigma®). Se incubó durante 2 horas a 37 °C. La reacción se detuvo reemplazando el tampón por 1 mL de Tris-HCL al 0,01 M; EDTA al 0,1M pH 8 [22].

Separación de los fragmentos de macrorrestricción del ADN de K. pneumoniae: La electroforesis se realizó en la cámara minichief del equipo Guefast-06® (NEURONIC, S.A). Los fragmentos de ADN fueron separados en un campo eléctrico de 10 V/cm durante 5 horas, 20 minutos en un gel de agarosa al 1,5% de 7 x 5 x 0,5 cm sumergido en tampón de electroforesis TBE 0,5X. Posteriormente, el gel se coloreó con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®), se visualizó en un transiluminador UV y se fotografió con una cámara digital PowerShot A700 (Canon®).

El análisis de los perfiles obtenidos por ECP y la construcción del dendograma fueron realizados mediante análisis computarizado, utilizando el software GuefaScan® (NEURONIC S.A.), acorde con el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). Las cepas que presentaron índice de similitud igual o mayor al 80% se consideraron clonalmente relacionadas.

Resultados

Al realizar las pruebas de susceptibilidad a los 13 aislados de *K. pneumoniae*, provenientes de pacientes adultos con infecciones asociadas a los cuidados de salud, se encontró que presentaron 12 fenotipos; el fenotipo I prevaleció en dos de ellas. Así mismo, se pudo corroborar la producción de BLEE por los métodos de sinergia de doble disco y del disco combinado; además se encontró que todas las cepas presentaron resistencia asociada a las fluoroquinolonas y 9 aislados fueron resistentes a los aminoglucósidos (Tabla 2).

En la tipificación molecular mediante la ECP se encontró que la mayoría de las cepas presentaron patrones de bandas (pulsotipos) totalmente distintos, por lo que los porcentajes de similitud fueron bajos (menor al 80%), con excepción de dos aislados (420-O y 133-A) que presentaron patrones de bandas indistinguibles entre sí y el mismo fenotipo de susceptibilidad (fenotipo I); ambas cepas fueron aisladas del servicio de Medicina I (Figuras 1 y 2).

Discusión

La producción de BLEE representa en los actuales momentos un problema de salud pública en el ámbito mundial. Desde la descripción de la primera enterobacteria productora de BLEE en 1983, estos microorganismos han sido reportados progresivamente en todo el mundo, siendo relacionados, en sus inicios, a las infecciones asociadas a los cuidados de la salud, pero con una presencia cada vez más importante en la comunidad, posiblemente por el uso generalizado de cefalosporinas de amplio espectro [3,4,8,23,24]. Para el estudio de las infecciones asociadas a los cuidados de la salud, es indispensable la aplicación de

Tabla 2. Fenotipos de susceptibilidad de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" (CHRP), Ciudad Bolívar, Venezuela.

Fenotipo	Antibiótipos	Nº de aislados
I	AMC(I), TZP(I), CAZ(R), CFP(R), CTX(R), FEP(R), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(R), NA(R), CIP(R), LVX(R)	2
II	AMC(I), TPZ(I), CAZ(R), CFP(R), CTX(R), FEP(I), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(S), NA(R), CIP(R), LVX(R)	1
III	AMC(R), TZP(R), CAZ(R), CFP(R), CTX(R), FEP(S), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(S), AK(S), NA(I), CIP(R), LVX(S)	1
IV	AMC(R), TZP(R), CAZ(R), CFP(I), CTX(R), FEP(R), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(S), NA(R), CIP(R), LVX(R)	1
V	AMC(I), TZP(I), CAZ(R), CFP(R), CTX(R), FEP(I), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(R), NA(R), CIP(R), LVX(S)	1
VI	AMC(I), TZP(S)CAZ(R), CFP(I), CTX(R), FEP(R), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(R), NA(R), CIP(R), LVX(R)	1
VII	AMC(S), TZP(S), CAZ(R), CFP(R), CTX(R), FEP(S), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(R), NA(R), CIP(I), LVX(S)	1
VIII	AMC(I), TZP(I), CAZ(R), CFP(I), CTX(R), FEP(S), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(R), NA(R), CIP(S), LVX(S)	1
IX	AMC(S), TZP(S), CAZ(R), CFP(R), CTX(S), FEP(S), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(S), AK(S), NA(R), CIP(S), LVX(S)	1
X	AMC(I), TZP(I), CAZ(R), CFP(I), CTX(S), FEP(S), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(R), AK(R), NA(R), CIP(R), LVX(R)	1
XI	AMC(R), TZP(I), CAZ(R), CFP(R), CTX(R), FEP(R), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(S), AK(I), NA(S), CIP(R), LVX(S)	1
XII	AMC(S), TZP(S), CAZ(R), CFP(I), CTX(R), FEP(S), IPM(S), MEM(S), ATM(R), GM(S), AK(R), NA(I), CIP(S), LVX(S)	1

AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, TZP: piperacilina/tazobactam, CAZ: ceftazidima, CFP: cefoperazona, CTX: cefotaxima, FEP: cefepima, IPM: imipenem, MEM: meropenem, ATM: aztreonam, GM: gentamicina, AK: amikacina, NA: ácido nalidixico, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, S: sensible, I: intermedio, R: resistente.

técnicas y marcadores de epidemiología molecular, sobre todo en hospitales en los que se dispone de unidades de cuidados intensivos, neonatología, unidad de quemados u oncología, en donde ingresan pacientes susceptibles de adquirir infecciones graves [8]. La genotipificación, permite determinar si un grupo de cepas de una especie en particular tienen un origen clonal, es decir, si provienen de un precursor común. Estas técnicas de tipificación molecular han permitido detectar el origen y la ruta de epidemias hospitalarias, así como definir estrategias de control y eliminación de la infección [7]; incluyen la macrorrestricción de ADN cromosómico, siendo la ECP una de las más utilizadas debido a que presenta gran versatilidad y permite conocer la clonalidad de diferentes aislados en

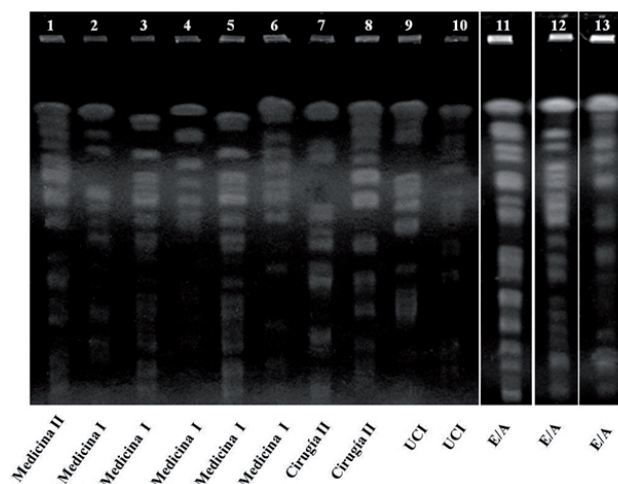


Figura 1. Electroforesis de campo pulsante de los aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" (CHRP), Ciudad Bolívar, Venezuela.

situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido [8].

La multiresistencia en microorganismos productores de BLEE es en la actualidad uno de los principales problemas en los hospitales de Latinoamérica y el mundo, debido a que disminuyen las opciones de tratamiento antimicrobiano [13]. Al analizar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos en los aislados de *K. pneumoniae* productoras de

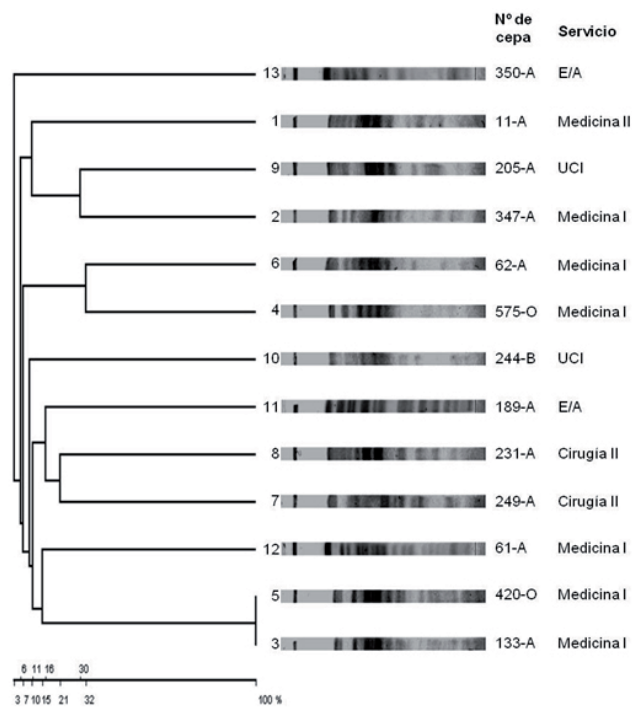


Figura 2. Dendrograma de los aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" (CHRP), Ciudad Bolívar, Venezuela.

BLEE, se pudo comprobar que, además de la resistencia a los betalactámicos, existe una alta frecuencia de resistencia asociada a los aminoglucósidos y fluoroquinolonas en la mayoría de las cepas estudiadas; esto también ha sido reportado por otros autores [8,25-27]. La resistencia asociada a otros antibióticos está dada por la transferencia de plásmidos entre diferentes cepas bacterianas, que además de portar genes que codifican para las betalactamasas de espectro extendido, también portan genes que codifican para otros mecanismos de resistencia, producto de la alta presión selectiva ejercida por la mala utilización de cefalosporinas de tercera generación, principalmente de ceftazidima [8,25-27].

Al evaluar los patrones de bandas obtenidos en la ECP, se pudo observar, que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, presentaron pulsotipos totalmente distintos, por lo que los porcentajes de similitud fueron bajos (menor al 80%), descartando una posible relación clonal entre ellas; esto concuerda con lo expresado por otros autores [8,25,28].

A pesar de que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE presentaron patrones de bandas totalmente distintos, se encontró que dos aislados del servicio de Medicina I mostraron pulsotipos indistinguibles entre sí, ambos con el mismo fenotipo de resistencia (fenotipo I). Estos aislados fueron obtenidos a partir de pacientes hospitalizados durante el mismo período de tiempo y en habitaciones contiguas. La presencia de microorganismos infectantes indistinguibles en ambos pacientes podría deberse principalmente a la transmisión de la bacteria entre pacientes de ese servicio, siendo posiblemente las manos del personal de salud la principal vía involucrada; sin embargo, también el contacto entre pacientes del mismo servicio de hospitalización y los objetos que son compartidos en una misma habitación, pueden estar implicados en el paso de bacterias de un paciente a otro. Esa permanencia de *K. pneumoniae* en las manos del personal de salud y en el ambiente hospitalario, podría deberse a diferentes propiedades y características de esta bacteria, entre las que se encuentran su capacidad de resistir a la desecación en el medio ambiente y la de sobrevivir en la piel debido a su cápsula hidrófila, que además protege a la bacteria de la fagocitosis por los polimorfonucleares, macrófagos y de los diversos factores bactericidas del hospedero [29-32].

En conclusión, no se encontró diseminación clonal de *K. pneumoniae* productora de BLEE entre pacientes adultos hospitalizados en el CHRP durante el período marzo-junio de 2011; sin embargo, se pudo constatar que hubo transmisión de este microorganismo entre dos pacientes del servicio de Medicina I.

Agradecimientos

Esta investigación fue parcialmente financiada con recursos provenientes del proyecto de investigación CI-5-0-40605-1535-09 del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela.

Referencias

1. Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benítez M, Domínguez M, Pedroza R. Betalactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. Rev Soc Ven Microbiol. 2006; 26:190-205.
2. Máttar S, Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. Infectio. 2007; 11:23-35.
3. 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.
4. Guzmán M, Alonso G. Caracterización de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*. Sucre-Venezuela. Invest Clin. 2009; 50:419-31.
5. Gudiol C, Calatayud L, García-Vidal C, Lora-Tamayo J, Císnal M, Duarte R, et al. Bacteraemia due to extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:333-41.
6. Rodríguez-Baño E, Picón P, Gijón JR, Hernández M, Ruíz C, Peña M, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli*: Risk factors and prognosis. Clin Infect Dis. 2010; 50:40-8.
7. Hernández JR, Pascual A, Canton R, Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21:77-82.
8. Perozo-Mena A, Castellano-González M, Ginestre-Pérez 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; 35:91-106.
9. Jacoby GA, Muñoz LS. The new β -lactamases. N Engl J Med. 2005; 352:380-91.
10. Navarro-Navarro M, Robles-Zepeda E, Garibay-Escobar A, Ruiz-Bustos E. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. Salud Pública Mex. 2011; 53:341-4.
11. Hawser S, Hawser P, Badal R, Bouchillon S, Hoban, D and the SMART India Working Group. Antibiotic susceptibility of intra-abdominal infection isolates from Indian hospitals during 2008. J Med Microbiol. 2010; 59:1050-4.
12. Morales JL, Reyes K, Monteghirfo M, Roque M. Presencia de betalactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. An Fac Med Lima. 2005; 1:24-32.
13. Martínez-Ramos P, Espinal-Marín P, Bustos A, Máttar S. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. Med UNAB. 2005; 1:15-22.
14. Vargas-Superti S, Augusti G, Zavascki A. Risk factors for and mortality of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2009;

- 51:211-6.
15. Pavón-Romero S, Zalazar-Gómez M, Morales-Rodríguez M, Rojas-Pedral M. Presencia de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de casos de infección nosocomial. *Ciencia*. 2007; 18:164-70.
 16. Peña C, Pujol M. Epidemiología y control de los microorganismos productores de BLEE nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25:18-22.
 17. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21:69-71.
 18. Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi J, Orden B. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2359-66.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. Document M100-S21. Pennsylvania, USA; 2011.
 20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. Document M100-S18. Pennsylvania, USA; 2010.
 21. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29:524-34.
 22. Garrido Y. Procedimientos normalizados de operaciones para subtipar cepas de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La Habana: Editorial Universitaria; 2010.
 23. Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su JJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamasas and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:1438-42.
 24. Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Indian J Med Res*. 2010; 132:332-6.
 25. Christian N, Roye-Green K, Smikle M. Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum betalactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000-2004. *BMC Microbiology* 2010; 10:2-8.
 26. Villegas M, Guzmán M, Sifuentes-Osorio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America—2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis*. 2011; 15:34-9.
 27. Pulido I, Mantilla J, Valenzuela E, Reguero M, Gonzalez E. Distribución de genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica* 2011; 31:15-20.
 28. Akpaka P, Legall B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *E coli* from Trinidad and Tobago. *West Indian Med J*. 2010; 59: 591-6
 29. González-Vértiz A, Alcántar-Curiel D, Cuauhtli M, Daza C, Gayosso C, Solache G *et al*. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* causing an outbreak of nosocomial bloodstream infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001; 22:723-5.
 30. Vernon MO, Trick WE, Welbel SF, Peterson BJ, Weinstein RA. Adherence with hand hygiene: does number of sinks matter? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 24:224-5.
 31. Echeverri-Toro M, Cataño-Correa JC. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *IATREIA*. 2010; 23:240-9.
 32. Andrade V, Grupo de Resistencia Bacteriana, Silva J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la β -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Pública Mex*. 2004; 46:524-8.