
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUCTORA DE BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENSO AISLADAS DE DOS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS

González¹ Ana, Nieves¹ Beatriz, Solórzano² Marisé, Cruz² Jhon, Moreno³ Magaly

¹Laboratorio de Investigaciones en Bacteriología “Roberto Gabaldon”(ULA)

²Laboratorio de Biomedicina Experimental

³Hospital Universitario de los Andes
anagonzalezr@ula.ve

Resumen

Klebsiella pneumoniae productora de betalactamasa de espectro extenso (β LEE) es la bacteria más frecuentemente implicada en infecciones nosocomiales en las unidades de alto riesgo neonatal y cuidados intensivos de adultos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. El objetivo de la investigación fue determinar las características microbiológicas y moleculares asociadas a las infecciones causadas por esta bacteria. Las cepas de *K. pneumoniae* se identificaron mediante procedimientos convencionales. La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se realizó a través de la prueba de difusión del disco en agar de acuerdo a las instrucciones del CLSI 2010. La CIM se determinó a través del método Etest. La detección de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en las cepas de *K. pneumoniae* se realizó mediante PCR y la Genotipificación a través de la Reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragenéticos repetitivos.

Se caracterizaron 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos con infección nosocomial, así como 11 aisladas de pacientes hospitalizados en la UCIA entre Junio-Noviembre 2009. Los resultados de esta investigación revelan un alto porcentaje de resistencia a los betalactámicos y la presencia de β LEE tipo TEM, SHV y CTX-M en las cepas aisladas en las dos unidades. Mediante el análisis genotípico REP-PCR se detectaron varias clonas lo cual sugiere que existen cepas resistentes específicas no endémicas más que la circulación y transmisión de un aislado habitual entre pacientes.

Palabras clave: klebsiella pneumoniae, beta lactamasa, cuidados intensivos.

Introducción

Klebsiella pneumoniae es un patógeno bacteriano importante, asociado a infecciones en la comunidad y nosocomiales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las cepas de *K. pneumoniae* tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos.

Las betalactamasas de espectro extendido (β LEE) son enzimas producidas por bacilos Gram negativos capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las cefamicinas ni los carbapenémicos. Son betalactamasas mediadas generalmente por plásmidos y derivan de otras enzimas con menor espectro hidrolítico. La mayoría de los genes que codifican β LEE son transmitidos por plásmido y a menudo se encuentran en los transposones y los integrones, facilitando su movilización con otro determinante de resistencia. Por lo tanto, los genes que codifican β LEE pueden ser fácilmente transferidos horizontalmente entre e intra especies [Eckert *et al.*, (2006); Gaitán *et al.*, (2009); Humeniuk *et al.*, (2002)]. Las β LEE más frecuentes se han incluido en tres grupos: TEM, SHV y CTX-M [Chin-Fu *et al.*, (2010); Lee *et al.*, (2009); Livermore *et al.*, (2007)]. Estas enzimas son un problema con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil. A nivel nosocomial, las β LEE son

consideradas como causas importantes del incremento en la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados, de la prolongada estancia hospitalaria y del aumento de los costos globales de salud [Minarini *et al.*, (2008); González *et al.*, (2011)].

Numerosos estudios señalan que las tasas de infección por *K. pneumoniae* productora de β LEE causantes de brotes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) está en aumento y debido al papel que ha jugado este microorganismo en estas unidades en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), se planteó un estudio con el propósito de determinar las características microbiológicas y moleculares asociadas a las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) y la Unidad de Cuidados Intensivos Adultos (UCIa) y de esta manera, contribuir con la prevención y control de las infecciones.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

El estudio se realizó con cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados en las Unidades de Alto Riesgo Neonatal (UARN) y en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIa), durante el periodo comprendido entre Junio-Noviembre 2009. El procesamiento de las muestras y el estudio microbiológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica “Dr. Roberto Gabaldón”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia;

y el estudio molecular en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), Universidad de Los Andes.

El estudio fue aprobado por las instancias del IAHULA involucradas, y no requirió procedimientos clínicos distintos a los realizados habitualmente en la atención de los pacientes.

Estudio microbiológico

Identificación y biotipificación

Las cepas de *K. pneumoniae* se identificaron mediante los procedimientos descritos por Koneman *et al.*, (2007). La biotipificación de las cepas se realizó mediante el sistema comercial API 20E (BioMérieux, Francia). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de la casa fabricante.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

A las cepas de *K. pneumoniae*, se les determinó la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos mediante la prueba de difusión del disco en agar (Kirby -Bauer) de acuerdo a las instrucciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (CLSI, 2009). Se ensayaron los siguientes agentes antimicrobianos: a) β -lactámicos: cefotaxima (30 μ g. bioDiscs), ceftazidima (30 μ g. bioDiscs), cefoxitin (30 μ g. BBL), cefepime (30 μ g. BBL), b) Combinaciones de inhibidores de β - lactamasas: ampicilina– sulbactam (10/10 μ g. Difco); Amoxicilina /Ac clavulánico (10/10 μ g. Difco); Piperacilina / tazobactam (10/10 μ g. Difco); c) Monobactámicos: aztreonam (30 μ g. Difco); d) Carbapenemos: imipenem (10 μ g HIMEDIA); e)

Quinolonas: ciprofloxacina (5 μ g HIMEDIA); f) Aminoglucósidos: gentamicina (10 μ g. Difco), amikacina (30 μ g. Difco). Se utilizó como cepa control a *Escherichia coli*, ATCC 25922. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó a través del método Etest (BioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los antibióticos que se utilizaron en estos ensayos fueron los siguientes: Ceftazidima, piperacilina /tazobactam, gentamicina, amikacina y aztreonam. Los resultados se interpretaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial y según lo establecido en CLSI (2009).

A las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, se les detectó la producción de β LEE mediante el método descrito por Pitout *et al.*, (2003).

Estudio molecular

Detección de genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en cepas de *K. pneumoniae* mediante PCR

La extracción de ADN se realizó por calentamiento a 90°C. La secuencia del iniciador TEM1 fue (TCCGCTCATGAGACAATAACC) y TEM2 (TTGGTCTGACAGTTACCAATGC). Tamaño del fragmento 750 pb. [Coque *et al.*, (2002)].

La secuencia del iniciador SHV1 fue (TGGTTATGCGTTATATTCGCC) y SHV2 (GGTTAGCGTTGCCAGTGCT). Tamaño del fragmento 370 pb. [Coque *et al.*, (2002)]. El iniciador CTX-M1 fue (5-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3) y CTX-M2 (5-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3)

Tamaño del fragmento 540 pb. [Edelstein et al., (2003)]. Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto el ADN, y como control positivo se utilizó una cepa de *K. pneumoniae* productora de β LEE tipo TEM, SHV, CTX-M caracterizada previamente.

El programa de amplificación para TEM se realizó bajo las condiciones siguientes: Temperatura de desnaturalización inicial: 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C 1 minuto, 50°C 1 minuto, 72°C 1 minuto.

En el caso de la amplificación correspondiente a SHV el programa fue: Temperatura de desnaturalización inicial: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C 1 minuto, 66°C 1 minuto, 72°C 30 segundos y una temperatura final de extensión de 72°C durante 5 minutos. Los parámetros de amplificación que se utilizaron para CTX-M fueron: desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que incluían 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto a 72°C y un período de extensión final de 20 minutos a 72°C. Para detectar los productos de la amplificación se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% durante 60 minutos, a 100 voltios. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0,0001 μ g/ml) en agua destilada. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN resultante, se utilizó una escalera de peso molecular con bandas de concentración definida (fago lambda (λ) digerido con *BsTEII*). Los patrones resultantes se visualizaron por tansiluminación con luz ultra violeta

y documentado fotográficamente.

Genotipificación

Reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR). La extracción de ADN cromosomal se realizó mediante el método descrito por Snelling *et al.*, (1996). Los oligonucleotidos utilizados se basaron en elementos palindrómicos extragénicos repetitivos de ADN altamente conservados, cuya secuencia es la siguiente: REP-1 (5'-III ICGICGICATCIGGC-3) REP-2 (5 - ICGICTTATCIGGCCTAC-3), [Invitrogen; Versalovic *et al.*, (1991)].

Para cada muestra se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, la cual se desarrolló con un volumen final de 12,5 μ l, con 0,08U/ μ l de Taq polimerasa, 25mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTPs, 50 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos opuestos y la muestra de ADN genómico a una dilución de 1/1000. Se incluyó un control negativo con una mezcla de todos los componentes anteriormente citados, excepto el ADN.

La amplificación se realizó en un termociclador (Eppendorff), el cual fue programado para una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, seguidos por cuatro (4) ciclos de desnaturalización de: 94°C durante 1 min, unión: 26°C por 1min, extensión: 72°C por 2 min. Luego por 40 ciclos de desnaturalización del ADN blanco (94°C durante 5 min), unión de los oligonucleótidos al ADN blanco (40°C durante 30 segundos), y extensión de los mismos unidos al ADN (72°C durante 1min), una temperatura final de extensión (72°C durante 10 min).

Para detectar los productos de la amplificación de los elementos REP-PCR presentes en las cepas de *K. pneumoniae*, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,0001 µg/ml) en agua destilada durante 60 minutos, a 100 voltios. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN resultante, se utilizó una escalera de peso molecular con bandas de concentración definida (fago lambda (λ) digerido con *BsTEII*). Los patrones resultantes se visualizaron por tansiluminación con luz ultra violeta y documentada fotográfica.

En cuanto a los criterios de interpretación

el tamaño de los fragmentos generados por electroforesis de los productos de PCR se determinó por comparación con la escalera de peso molecular. La presencia o ausencia de bandas en una línea del gel se determinaron por inspección visual de los patrones, por tres observadores diferentes. Los patrones de PCR se consideraron iguales sobre las bases de similitud en cuanto al número y posición de todas las bandas mayores. Pequeñas diferencias en la intensidad y forma de las bandas mayores o pérdida de bandas débiles fueron ignoradas.

Resultados y Discusión

Tabla 1. Resistencia antimicrobiana encontrada en las 17 cepas de *K pneumoniae* aisladas de neonatos con infección nosocomial

Agentes antimicrobianos	Cepas resistentes		CIM50 µg/ml	CIM90 µg/ml
	Nº	%		
Ampicilina	17	100		
Ampicilina/sulbactam	17	100		
Amoxicilina/ác clavulánico	17	100		
Ceftazidima	16	94	16	96
Cefotaxima	16	94		
Piperacilina/tazobactam	7	41	8	256
Aztreonam	16	94	16	128
Amikacina	16	94	128	256
Gentamicina	14	82	96	256
Imipenem	0	0		
Ciprofloxacina	2	12		
Cefoxitin	1	6		

CIM50= Aquella concentración del antimicrobiano que inhibe el desarrollo del 50% de las cepas estudiadas.

CIM90= Aquella concentración del antimicrobiano que inhibe el desarrollo del 90% de las cepas estudiadas

Tabla 2. Resistencia antimicrobiana encontrada en 11 cepas de *Kpneumoniae* aisladas de adultos con infección nosocomial.

Agentes antimicrobianos	Cepas resistentes		CIM50 µg/ml	CIM90 µg/ml
	N°	%		
Ampicilina	11	100		
Ampicilina/sulbactam	11	100		
Amoxicilina/ác clavulánico	11	100		
Ceftazidima	11	100	48	128
Cefotaxima	11	100		
Piperacilina/tazobactam	5	45,4	12	48
Aztreonam	11	100	192	192
Amikacina	10	90,9	256	256
Gentamicina	10	90,9	256	256
Imipenem	0	0		
Ciprofloxacina	9	81.8		
Cefoxitin	0	0		

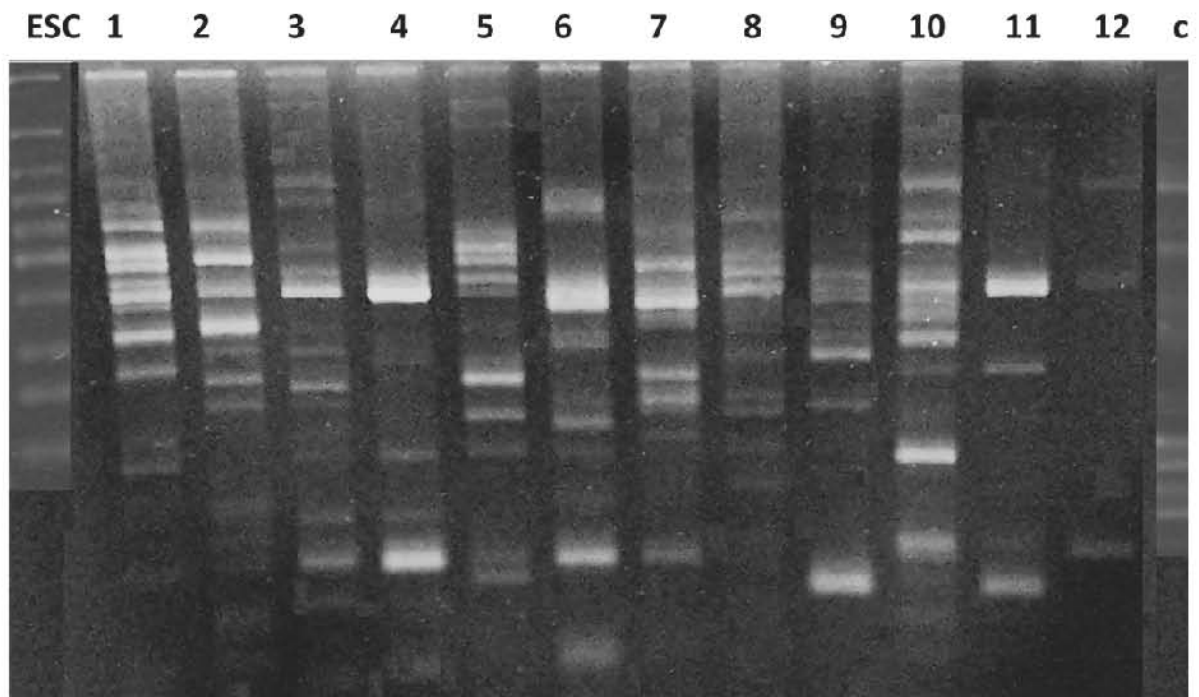
Tabla 3. Fenotipos, tipos de β-lactamasas y genotipos en cepas de *K. pneumoniae* multirresistente aisladas de los pacientes hospitalizados en UARN.

Cepa de laboratorio N°	de	Tipo de βlee	Genotipo
1	-	TEM,SHV,CTX	I
2	-	TEM,SHV	II
3	-	TEM,SHV	III
4	-	TEM,SHV	IV
5	+	TEM,SHV	V
6	+	TEM,SHV	VI
7	+	TEM,SHV	VII
8	-	TEM,SHV	VIII
9	-	TEM,SHV	IX
10	-	TEM,SHV,CTX	X
11	-	TEM,SHV,CTX	XI
12	-	TEM,SHV,CTX	XII
13	-	TEM,SHV,CTX	XIII
14	-	TEM,SHV	IVX
15	-	TEM,SHV,CTX	XV
16	-	TEM,SHV	XVI
17	-	TEM,SHV,CTX	XVII

Tabla 4. Fenotipos , tipos de β -lactamasas y genotipos en cepas de *K. pneumoniae* multirresistente aisladas de los pacientes hospitalizados en UCIA.

Cepa de laboratorio N°	de	Tipo de β lee	Genotipo
1	+	TEM,SHV,CTX	I
2	+	TEM,SHV,CTX	I
3	+	TEM,SHV,CTX	II
4	+	TEM,SHV,CTX	III
5	+	TEM,SHV,CTX	IV
6	+	TEM,SHV,CTX	V
7	-	TEM,SHV	IV
8	+	TEM,SHV	VI
9	+	TEM,SHV,CTX	VII
10	+	TEM,SHV,CTX	VII
11	+	TEM,SHV,CTX	I

(A)



(B)

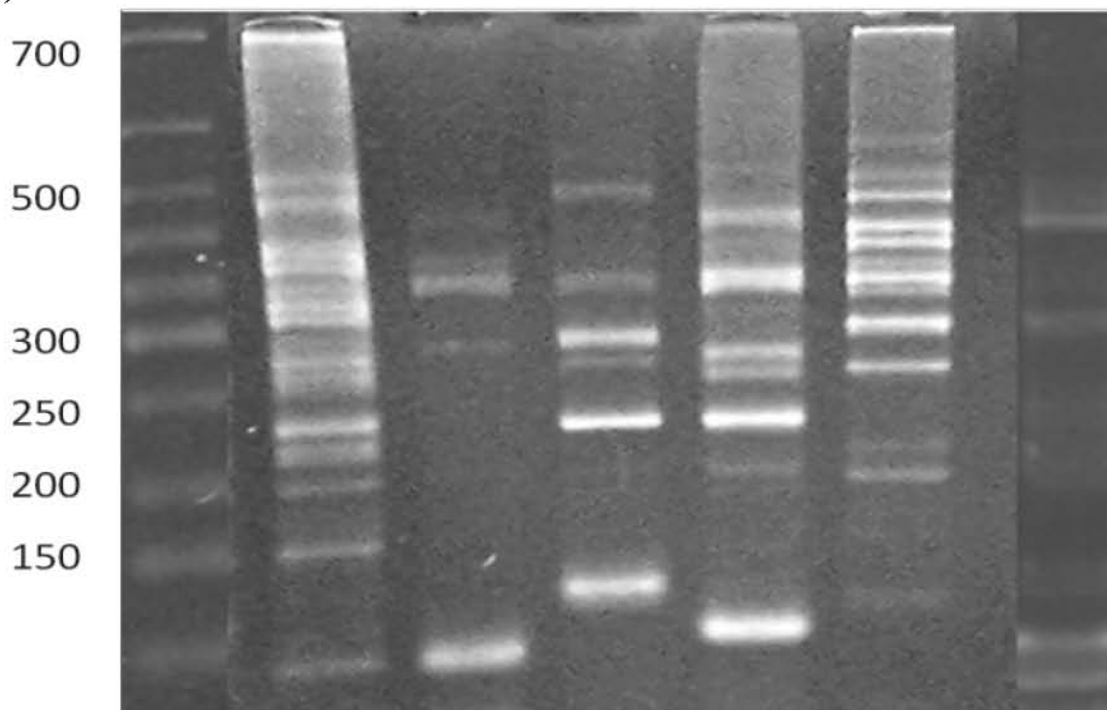


Figura 1 . Patrón de bandas obtenidas por REP-PCR de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UARN del IAHULA. (A). Línea 1 (Genotipo I), Línea 2 (Genotipo II), Línea 3 (Genotipo III), Línea 4 (Genotipo IV), Línea 5 (Genotipo V), Línea 6 (Genotipo VI), Línea 7 (GenotipoVII), Línea 8 (GenotipoVIII), Línea 9 (Genotipo IX), Línea 10 (Genotipo X). (B). Línea 11 (Genotipo XI), Línea 12 (Genotipo XII), Línea 13 (Genotipo XIII), Línea 14 (Genotipo XIV), Línea 15 (Genotipo XV), Línea 16 (Genotipo XVI), Línea 17 (Genotipo XVII). **Cb**: Cepa de *K. pneumoniae* responsable del brote 2007 ocurrido en la unidad

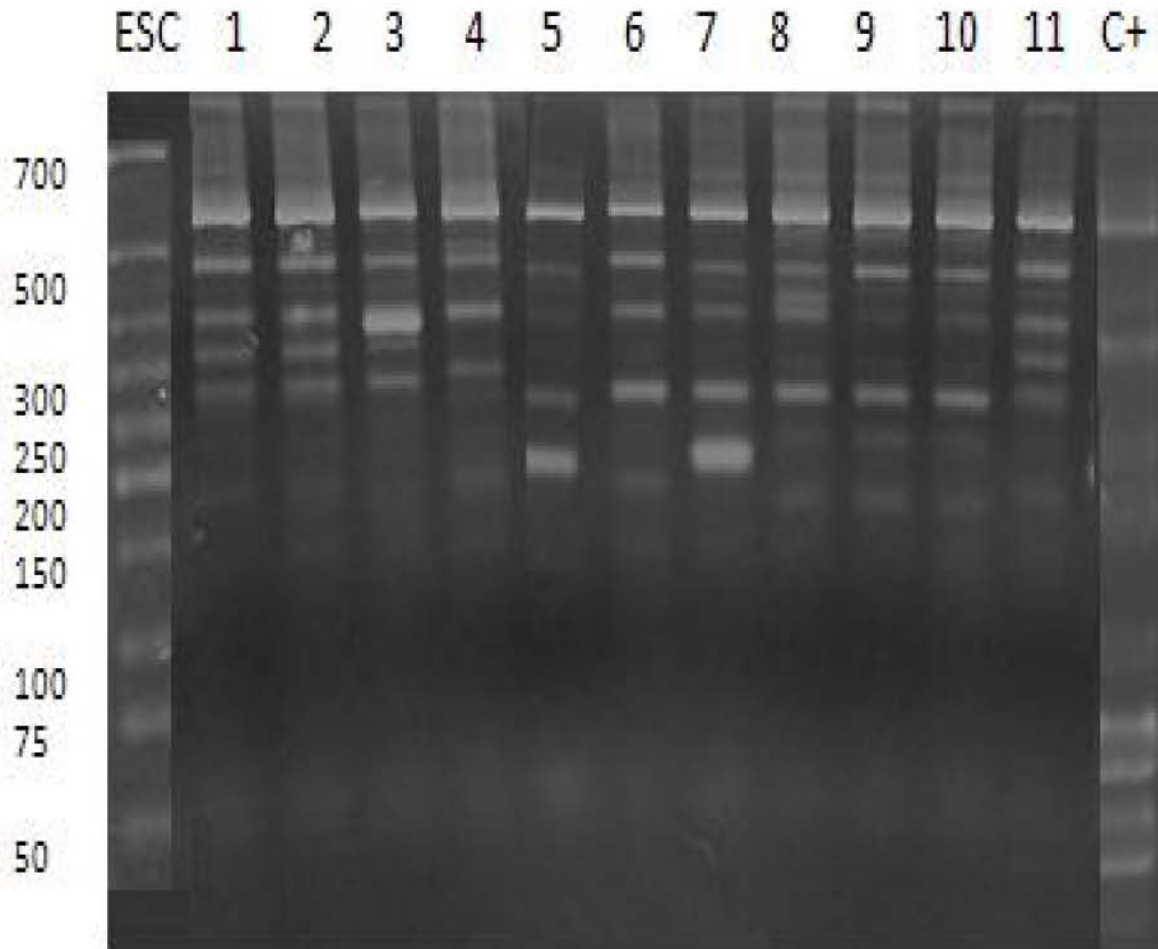


Figura 2. Patrón de bandas obtenidas por REP-PCR de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UC1a del IAHULA. Esc: escalera, 1-11 cepas de *K. pneumoniae*, aisladas en el 2009, Cb: Cepa de *K. pneumoniae* responsable del brote 2007 ocurrido en la UARN, C- Control negativo.

Durante el desarrollo de este proyecto de infecciones nosocomiales, llevado a cabo en la UARN y UC1a del HULA, durante el período comprendido entre junio-noviembre 2009, los BGN representaron el mayor porcentaje de aislamiento en ambas unidades. En la UARN, el 21,90% (32/146) de los aislamientos, pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuente 53,12% (17/32). Por otro lado, en la UC1a, *K. pneumoniae* se aisló en un 55% (11/20) dentro del grupo de bacilos Gram negativos fermentadores. Resultados similares a los encontrados en otras unidades de cuidados especiales en países de América Latina, donde aproximadamente el 60% de las infecciones son causadas por bacilos Gram negativos, entre ellos, *K. pneumoniae* [Oliveira *et al.*, (2008); Calderas *et al.*, (1999); González *et al.*, (2011)]. En la actualidad, una de las mayores preocupaciones de la comunidad científica internacional, es la creciente incidencia de infecciones producidas por *K.*

pneumoniae resistente a múltiples agentes antimicrobianos, especialmente a los β -lactámicos [Christian *et al.*, (2010); García *et al.*, (2011)]. Este fenómeno fue igualmente observado en este estudio. En la UARN, el 86,95% de las cepas fueron resistentes a 8 o más agentes antimicrobianos, especialmente a los β -lactámicos y a los aminoglucósidos. De igual manera, en la UCIA se observó un alto porcentaje de resistencia a estos dos grupos de antibióticos. Estas cepas mostraron CIM elevadas para Cefotaxima (CIM₉₀=128 μ g/ml), Amikacina (CIM₉₀= 256 μ g/ml) y Gentamicina (CIM₉₀= 256 μ g/ml). La resistencia a fluoroquinolonas se observó principalmente en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UCIA.

El principal problema de resistencia entre los patógenos aislados en las unidades de cuidados especiales del HULA, es la prevalencia de *K. pneumoniae* productora de β LEE multirresistente, quizás como consecuencia de la exposición incrementada a las cefalosporinas de espectro extendido ampliamente utilizadas en estas unidades en la terapia empírica inicial.

Es importante resaltar que los antibióticos carbapenémicos aún presentan actividad contra las cepas de *K. pneumoniae* productoras de β LEE aisladas en estas unidades del HULA. La prueba fenotípica de producción de β LEE permitió detectar que el 90% (10/11) de las cepas aisladas de la UCIA era productoras de β LEE. Mientras que un bajo porcentaje 17,64% (3/17) de las cepas aisladas de la UARN eran fenotipo β LEE (+), aunque a través

de PCR se demostró que las restantes negativas eran portadoras de los genes *bla*. Los resultados de esta investigación revelan la presencia de β LEE tipo TEM, SHV y CTX-M en las dos unidades estudiadas y se demostró que algunas cepas eran portadoras de más de un gen *bla* (TEM, SHV y CTX-M), lo cual es similar a los hallazgos reportados por otros investigadores (Gaitán *et al.*, (2009)]. Es importante señalar que al realizar el análisis genotípico mediante REP-PCR se detectaron varias clonas en ambas unidades y al analizarlas en conjunto no coincidieron los patrones de bandas, lo cual sugiere que las clonas que circulan en la UARN son diferentes a las que circulan en la UCIA.

Conclusiones

Los BGN pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* representaron el mayor porcentaje de aislamiento en ambas unidades, siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuentemente aislada.

Los resultados de esta investigación revelan la presencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras β LEE en las dos unidades estudiadas y se demostró que algunas cepas eran portadoras de más de un gen *bla*(TEM, SHV y CTX-M).

Mediante el análisis genotípico REP-PCR se detectaron diferentes clonas en ambas unidades lo cual sugiere que las clonas que circulan en la UARN son diferentes a las que circulan en la UCIA.

Agradecimiento

Al Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación,

FONACIT. Avance de resultados de proyecto PEIL.

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT). Proyecto código FA-471-10-03-A por el financiamiento del estudio.

Referencias Bibliográficas

Calderas, Z.; Nieves, B.; Araque, M.; Torres, A.; Mosqueda, N. (1999). *Klebsiella pneumoniae* productora de β LEE como agente etiológico de septicemia en una unidad de cuidados intensivos. Resumen de las XXVI Jornadas Venezolanas de Microbiología Dr. José Esparza “Infecciones Emergentes”. Valencia noviembre 1999; p.33.

Chin-Fu, L.; Shih-Kuang, H.; Chao-Hsien, Chen; Jr-Rung Huang and Hsueh-Hsia Lo. (2010). Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. *J. Med. Microbiol.* 59: 665–671.

Christian, N.; Roye-Green, K.; Smikle, M. (2010). Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000 - 2004. *BMC Microbiol.* 10:27.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Coque, TM.; Oliver, A.; Pérez-Díaz, JC.; Baquero, F.; Cantón, R. (2002).

Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-Spectrum β -lactamases are Carried by Multiple *Klebsiella pneumoniae* Clones in a Single Hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 46:500–510.

Díaz, M.; Hernández, J.; Martínez-Martínez, L.; Rodríguez-Bano, J.; Pascual, A. (2009). Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: Segundo estudio multicéntrico (Proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27(9):503–510.

Eckert, C.; Gautier, V.; Arlet, G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57.

Edelstein, M.; Pimkin, M.; Palagin, I.; Edelstein, I.; Stratchounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3724–3732.

Gaitán, S.; Espinal, P.; Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana, Región Caribe. (2009). Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev. Chil. Infect.* 26 (3): 239-246.

García, A.; García, E.; Hernández, A.; Ruiz, J.; Yagüe, G.; Herrero, J.; Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia*

- coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter.* 24(2):57-66.
- González, A.; Gil, F.; Solórzano, M.; Cruz, J.; Puig, J.; Suárez, M.; Nieves, B. (2011). Brote por *Klebsiella pneumoniae* multiresistente y productora de β -lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. *Rev. Chil. Infect.* 28 (1): 28-34.
- Humeniuk, C.; Arlet, G.; Gautier, V.; Grimont, P.; Labia, R. (2002). Philippon A. β -lactamasas of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 3045–3049.
- Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P.; Winn, W. (2007). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas a Color.* 6^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 44-335.
- Lee, S.; Jeong, S.; Lee, H.; Kim, K.; Lee, Y.; Koh, E.; Chong, Y.; Lee, K. (2009). Spread of CTX-M-type extended-spectrum betalactamasas among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a Korean hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 63: 76–80.
- Livermore, D.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.; Arlet, G.; Ayala, J.; Coque, T.; Kern-Zdanowicz, I. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 59: 165–174.
- Minarini, L.; Clímaco, E.; Guimarães, D.; Ferreira, J.; Palazzo, I.; Martínez, R.; Darini, A. (2008). Clonal Transmission of ESBL- Producing *Klebsiella* spp. At a University Hospital in Brazil. *Curr. Microbiol.* 56(6): 587-591.
- Oliveira, D.; Dói, Y.; Szabo, D.; Jennifer, M.; Haduch, A.; Vaz, T.; Leite, D.; Padoveze, M.; Freire, M.; Silveira, F.; Paterson, D. (2008). Multiclonal Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-2 and Novel Variant CTX-M-59 in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 54(5):1790–1793.
- Pitout, J.; Reisbig, M.; Venter, E.; Church, D.; Hanson, M. (2003). Modification of the Double-Disk Test for Detection of *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 41 (8): 3933
- Snelling, A.; Gerner, P.; Hawkey, P.; Heritage, J.; Parnel, P.; Poster, C. (1996). Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J Clin Microbiol.* 34(5):1193-1202.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupsky, J. (1991). Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genome. *Nucleic. Acids. Res.* 19: 6823-6831.