

Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería

Pedro Martínez, Bact.¹, Máximo Mercado, M.D.², Salim Máttar, Ph.D.³

RESUMEN

Objetivo: Este estudio tuvo como objetivos establecer la prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en bacilos Gram negativos nosocomiales y comparar tres métodos para su identificación.

Materiales y métodos: Se estudiaron en el Hospital San Jerónimo (HSJ) de Montería durante los años 2001 y 2002, 201 microorganismos aislados de pacientes con infección nosocomial. Para identificar la presencia de BLEE se tuvo en cuenta la actividad hidrolítica sobre la ceftazidima que midió el sinergismo del ácido clavulánico en combinación con ceftazidima. Para comparar los métodos de identificación de BLEE, se utilizaron los propuestos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) difusión de disco, la concentración mínima inhibitoria (CMI₉₀) y el método de combinación de disco de Jarlier.

Resultados: Los resultados mostraron que 86 (43%) de 201 gérmenes fueron productores de BLEE. Se presentaron BLEE en 24 (63%) de 38 *Acinetobacter baumannii*, 11 (61%) de 18 *Enterobacter spp*, 17 (46%) de 37 *Klebsiella pneumoniae*, 22 (38%) de 58 *Pseudomonas aeruginosa*, 5 (31%) de 16 *Proteus mirabilis* y 7 (20.5%) de 34 *Escherichia coli*. Al comparar los métodos de identificación no se presentaron diferencias entre sí ($p > 0.05$). Los resultados muestran una prevalencia alta de BLEE (43%) en los bacilos Gram negativos nosocomiales del HSJ de Montería.

Conclusiones: El estudio logró demostrar la importancia de los métodos de identificación de BLEE como apoyo para la correcta instauración de la terapia antimicrobiana en gérmenes nosocomiales y sobre esta base sugerir la implementación de medidas de vigilancia que prevengan y disminuyan la diseminación de BLEE en este hospital.

Palabras clave: β -lactamasas espectro extendido. Hospital. Prevalencia. Enterobacteriaceae. No-fermentadores. Montería.

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas hidrolíticas derivadas de β -lactamasas TEM y SHV por una o más substituciones de aminoácidos que confieren resistencia a los antibióticos oximino β -lactámicos; muchas de estas enzimas no muestran un aumento significativo en la concentración mínima inhibitoria (CMI) lo que dificulta su identificación. La actividad hidrolítica de las BLEE es inhibida *in vitro* por el ácido clavulánico, además las BLEE no afectan las cefamicinas (cefoxitina, cefo-

tetán), ni los carbapenems¹. Las BLEE mediadas por plasmidos se identificaron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* en Alemania en 1983². Las infecciones nosocomiales causadas por miembros de la familia Enterobacteriaceae productores de BLEE son un importante problema de salud que se ha incrementado y diseminado rápidamente en todo el mundo. Los gérmenes productores de BLEE prolongan la duración de las hospitalizaciones y aumentan los costos del cuidado de los pacientes².

Las BLEE están asociadas con megaplasmidos transferibles (>100 Kda), que codifican frecuentemente resistencia cotransferida a aminogluósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol; estos megaplasmidos se diseminan rápidamente en los ambientes hospitalarios entre diferentes especies bacterianas. Las BLEE codificadas por estos elementos móviles pueden ser adquiridas de Enterobacteriaceae resistentes a múltiples antibióticos como *K. pneumoniae* y *Escherichia coli*³. Los bacilos Gram negativos son patógenos nosocomiales oportunistas y son particularmente importantes en neumonía asociada con ventilador, infecciones urinarias, bacteriemias y heridas. *Acinetobacter bau-*

1. Bacteriólogo, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería.

2. Servicio de Medicina Interna, Hospital San Jerónimo, Montería.

3. Profesor Titular, Director Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería. smattar@escarsa.net.co mattarsalim@hotmail.com

Recibido para publicación septiembre 17, 2003 Aprobado para publicación diciembre 19, 2003

mannii, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp son especies predominantes en aislamientos clínicos a menudo multirresistentes que complican la terapia antimicrobiana⁴. En muchos centros hospitalarios los carbapenems se han convertido en la droga de elección para infecciones serias causadas por estos microorganismos obteniéndose mejor actividad en comparación con otros antibióticos.

Los resultados de estudios del *Antimicrobial Resistance Surveillance Program* (SENTRY)⁵ que monitorea la frecuencia de aparición y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos causantes de infecciones en el mundo, informó en Latinoamérica entre 1997 y 1998 una alta prevalencia de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* las cuales superan 40%; frecuencias similares se encontraron en gérmenes aislados de neumonías, heridas, infecciones urinarias y bacteriemias. Estudios del National Nosocomial Infections Surveillance Systems⁶ (NNIS) realizado entre 1986 y 1993 en EE.UU. en cepas de *K. pneumoniae* informaron tasas de BLEE de hasta 58%. Otro estudio realizado en 1998 por el programa de vigilancia epidemiológica Resisnet⁷ en Latinoamérica, informó que la prevalencia de BLEE por *E. coli* en algunos países llega casi a 65% y en *K. pneumoniae* la prevalencia es aun más alta llegando hasta 73%. Todos estos estudios muestran una variación geográfica en cuanto a la prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* en el mundo.

De otra parte, los métodos de laboratorio para la identificación de BLEE son muy importantes en la medida en que pueden dirigir el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos productores de estas enzimas. Aunque los métodos para la identificación de BLEE han sido estandarizados sólo para *K. pneumoniae* y *E. coli*, también pueden ser identificadas en otros

miembros de la familia Enterobacteriaceae y no-fermentadores². Como existe un aumento en la producción de BLEE en Enterobacteriaceae, esto justifica la necesidad de que los laboratorios de microbiología clínica posean suficiente experiencia para la identificación de estas enzimas en los aislamientos clínicos.

Este estudio se condujo para establecer la prevalencia de BLEE en bacilos Gram negativos aislados de infección nosocomial en el HSJ de Montería (Córdoba) así como la de comparar tres métodos para la identificación de BLEE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio, muestreo, lugar, cálculo del tamaño de la muestra y tipo de especímenes. Se llevó a cabo un estudio descriptivo prospectivo y un muestreo no probabilístico de casos consecutivos. Se incluyeron pacientes que adquirieron infección nosocomial por Enterobacteriaceae y bacilos Gram negativos no-fermentadores durante los años 2001 y 2002 en el HSJ. La infección nosocomial se definió como aquella infección que no estaba presente ni incubándose en el momento de la admisión al hospital y que se presentó entre 48 y 72 horas después de la admisión⁸. Para el cálculo del tamaño de la población se tuvo en cuenta que en este hospital se aislaron 6.000 gérmenes en el año 2000; de ellos 15% fueron bacilos Gram negativos nosocomiales. Con base en estos datos, el tamaño de la muestra se calculó con un error máximo permisible de 1% (EpiInfo versión, 1.1.2, 2001, CDC, Atlanta, Ga. USA); se debieron analizar 97 gérmenes anuales para un total de 194 en dos años, casuística que se elevó hasta un total de 201 gérmenes Enterobacteriaceae y no-fermentadores aislados de pacientes con infecciones nosocomiales del HSJ. La vigilancia de las infecciones hospitala-

rias en el HSJ se estableció a través de las tasas e índices de infección mensual empleando el programa EpiInfo. El análisis estadístico se hizo con un error alfa de 5% para considerarlo significativo.

Aislamientos bacterianos. Se obtuvo un total de 201 aislamientos clínicos nosocomiales no repetitivos de Enterobacteriaceae y bacilos Gram negativos no-fermentadores en el Laboratorio de Microbiología del HSJ de Montería. Este hospital tiene una capacidad de 204 camas y pertenece al nivel II de atención. De los 201 gérmenes, 58 fueron *P. aeruginosa*, 38 *A. baumannii*, 37 *K. pneumoniae*, 34 *E. coli*, 18 *Enterobacter* spp y 16 *Proteus mirabilis*. Los gérmenes provenían de los servicios de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), cirugía, medicina interna y pediatría. Las muestras de las que se obtuvieron los microorganismos fueron: sangre, fluidos corporales, secreciones bronquiales y de herida, orina, catéter, absceso hepático. Todos los microorganismos se identificaron por el sistema API 20E (Biomérieux SA, Marcy l'Etoile, France).

Transporte y preservación de los aislamientos bacteriales. Las muestras se cultivaron en medios de cultivos estándares y se transportaron en sistemas de recolección y transporte para bacterias aerobias y anaerobias con carbón activado BBL™ Culture swab plus™ (Becton Dickinson Microbiology Systems France SA), al Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), para la realización de las pruebas correspondientes. Durante el estudio las bacterias se mantuvieron a -70°C en *skim milk*.

Pruebas de susceptibilidad y métodos para la identificación de BLEE. Para la identificación de BLEE se emplearon tres métodos: difusión de disco, concentración mínima inhibitoria en caldo (CMI₉₀) ambos del National Committee for Clinical Laboratory

Cuadro 1
Porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos y comparación de las cepas productoras y no productoras de BLEE

Antibiótico	<i>P. aeruginosa</i> (n=22)		<i>A. baumannii</i> (n=24)		<i>Enterobacter</i> sp (n=11)		<i>K. pneumoniae</i> (n=17)		<i>P. mirabilis</i> (n=5)		<i>E. coli</i> (n=7)	
	BLEE +	BLEE -	BLEE +	BLEE -	BLEE +	BLEE -	BLEE +	BLEE -	BLEE +	BLEE -	BLEE +	BLEE -
SXT	100	64	79 ^b	64 ^b	64 ^b	43 ^b	76 ^a	30 ^a	100	18	100	59
CN	73	14	42 ^b	50 ^b	27 ^a	28 ^a	41 ^a	0 ^a	80	0	43	22
AK	59	0	29 ^b	43 ^b	9 ^a	14 ^a	18 ^a	0 ^a	8	0	14	3
CAZ	100	0	100 ^b	0 ^b	100 ^b	0 ^b	100 ^a	0 ^a	100	0	100	0
IMI	9	0	21 ^a	21 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CIP	68	14	54 ^a	57 ^a	73 ^b	43 ^b	18 ^b	15 ^b	80	9	100	44
AMC	100	67	79	57	64 ^b	43 ^b	70 ^a	30 ^a	60	18	57 ^a	52 ^a

SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; CN: gentamicina; AK: ampicilina; CAZ: ceftazidima; IMI: imipenem; CIP: ciprofloxacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico a : p>0.05 b : p<0.05

Standards (NCCLS)^{9,10} y combinación de disco de Jarlier¹¹.

Para el método de difusión de disco del NCCLS⁹ se utilizó una concentración de bacterias con 0.5 de Mcfarland (10⁵-10⁶ UFC/ml); se realizó un inóculo masivo sobre la superficie del agar *IsoSensitest*[®] (Oxoid, Basingstoke, UK) y luego se colocaron sensidiscos de ceftazidime [30µg], ceftazidime/clavulonato [30/10µg], cefotaxima [30µg], ceftriaxona [30µg], aztreonam [30µg], cefepime [30µg], cepodoxima [10µg], cepodoxima/ clavulonato [10/1µg], cefalotina [30µg], cefoxitin [30µg], imipenem [10µg], gentamicina [10µg], ampicilina [30µg], ciprofloxacina [5µg], trimetoprim-sulfametoxazol [25µg] y tazobactam/ piperacilina [30/ 10µg] (Oxoid, Basingstoke, UK). Las placas de agar se incubaron por 24 horas, la resistencia o sensibilidad de los gérmenes se interpretó por la medida de los diámetros de los halos de inhibición. Los diámetros de zonas de <22 mm para ceftazidime y cepodoxima sugieren la presencia de BLEE⁹.

Para el método de dilución en caldo (CMI₉₀) recomendado por el NCCLS¹⁰, se utilizó una concentración de bacterias con 0.5 de Mcfarland (10⁵-10⁶ UFC/ml) y se emplearon concentraciones dobles seriadas de los antimicrobianos. La CMI₉₀ se consideró como la concen-

tración más baja del antimicrobiano que inhibía el crecimiento del microorganismo a 35°C durante 24 horas. La NCCLS considera que CMI₉₀ >2 µg/ml de ceftazidime, cefotaxima, ceftriaxona o aztreonam confirma un germen productor de BLEE.

La identificación de BLEE por el método de combinación de disco de Jarlier *et al.*¹¹, se determinó por el incremento de >5 mm en el diámetro de la zona de ceftazidime/clavulonato [30/10µg] comparado con sólo ceftazidime [30µg]; de igual forma el aumento en el diámetro de cepodoxima/clavulonato comparado con sólo cepodoxima confirmó la presencia de un germen productor de BLEE¹¹.

Cepas control e interpretación de los análisis de laboratorio. Se utilizó como control BLEE negativo la cepa de *E. coli* ATCC 25922 y como control BLEE positivo la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603. Con el fin de evitar posibles sesgos de información en el estudio, todas las lecturas para la interpretación de BLEE fueron observadas por sólo dos personas con suficiente experiencia en estas técnicas.

Análisis estadístico. Para el análisis de las significancias de las diferencias encontradas entre los tres métodos de comparación de BLEE, las frecuencias y la resistencia de los gérmenes encon-

trados se utilizó la prueba de χ^2 . Al ser un estudio de tipo descriptivo se utilizaron parámetros estadísticos para este tipo de trabajo, como distribución de porcentajes y frecuencias entre los gérmenes aislados.

RESULTADOS

Caracterización de los aislamientos clínicos. Con la utilización del método de difusión de disco y concentración mínima inhibitoria en caldo del NCCLS^{9,10}, 86 aislamientos clínicos incluidos Enterobacteriaceae y no fermentadores mostraron resistencia a ceftazidima, fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucosidos (p<0.05) (Cuadro 1).

A través de la utilización del método de combinación de disco¹¹, la totalidad de los 86 (43%) de los 201 microorganismos nosocomiales resultaron sensibles al sinergismo con el ácido clavulánico, lo que confirmó un germen productor de BLEE. La utilización del método de dilución en caldo¹⁰ demostró resistencia a ceftazidima con CMI₉₀ >8 mg/ml para *K. pneumoniae* y *E. coli*, para *Enterobacter* spp, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*; la CMI₉₀ fue >32 mg/ml. La sensibilidad a imipenem en Enterobacteriaceae mostró CMI₉₀ =1 mg/ml, lo

que indica que estos gérmenes productores de BLEE son altamente susceptibles a los carbapenems. Para las cepas productoras de BLEE de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* la CMI₉₀ de imipenem fue <8 mg/ml, lo que significa un nivel de resistencia entre intermedio y bajo para este antibiótico. La CMI de estas cepas resistentes a imipenem no excedieron los 64/16 mg/ml de piperacilina/tazobactam. Fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, 86% (80 cepas) de los aislamientos de Enterobacteriaceae y no-fermentadores productores de BLEE; 23% (29 cepas) fueron resistentes a ampicilina y 65% (50 cepas) fueron resistentes a ciprofloxacina (Cuadro 1). Estos resultados son significativamente diferentes a los obtenidos con los gérmenes no productores de BLEE en los que se encontró 46% (59 cepas) resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, 10% (8 cepas) resistentes a ampicilina y 30% (32 cepas) resistentes a ciprofloxacina ($p < 0.05$), por los métodos de difusión de disco⁹ y dilución en caldo¹⁰ (Cuadro 1).

Resistencia expresada en los aislamientos clínicos de Enterobacteriaceae y no-fermentadores. La alta co-resistencia presentada entre los agentes β -lactámicos, aminoglucosidos, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas sugiere la existencia de plasmidos transferibles en estos microorganismos y mutaciones responsables de esta resistencia. Es importante resaltar esta asociación en *A. baumannii* que presentó 73.6% de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, 60.5% a ciprofloxacina, 34.2% a ampicilina y 21% a imipenem. En ese sentido, altos porcentajes de resistencia se encontraron en *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp (Cuadro 2). También es importante destacar los altos niveles de resistencia a varias familias de antibióticos presentados en los microorganismos productores de BLEE comparado con los no

productores de BLEE (Cuadro 1). En *Pseudomonas aeruginosa* productora de BLEE se presentó 72.7% a gentamicina, 68% a ciprofloxacina, 59% a ampicilina y 9% imipenem; en *P. aeruginosa* no productora de BLEE la resistencia presentada fue notablemente inferior que en las productoras de BLEE, se presentó una resistencia 13.8% a ciprofloxacina, gentamicina y 0% a ampicilina e imipenem ($p < 0.05$). Esta diferencia significativa probablemente se deba a la alta asociación de resistencia que se presentó entre los β -lactámicos y otros grupos de antibióticos; *A. baumannii* presentó 73.6% de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, 60.5% a ciprofloxacina, 63% a los β -lactámicos, 34% a ampicilina, 21% a imipenem y 52.6% a tazobactam/piperacilina; de manera similar se encontró una alta asociación de resistencia en *P. aeruginosa* y Enterobacteriaceae (Cuadros 1 y 2).

Prevalencia de BLEE en Enterobacteriaceae. De los 105 aislamientos de Enterobacteriaceae 40 (37.6%) mostraron resistencia a ceftazidima y aztreonam por los métodos de difusión de disco⁹, dilución en caldo¹⁰ y combinación de disco¹¹. La producción de BLEE en *Enterobacter* spp fue 11/18 (61%) en *K. pneumoniae* 17/37 (46%), en *P. mirabilis* 5/16 (31%) y en *E. coli* 5/34 (20.5%) (Cuadro 2). Los niveles de resistencia presentados a ceftazidima y aztreonam mostraron CMI = 8 μ g/ml para *K. pneumoniae* y *E. coli* (Cuadro 3). La CMI para estos mismos antibióticos fue >32 mg/ml en *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp y *P. mirabilis*; posiblemente esto indique la presencia de BLEE tipo SHV (Cuadro 3). En general es diferente la distribución de Enterobacteriaceae productoras de BLEE en los servicios hospitalarios en donde se obtuvieron estos gérmenes ($p < 0.05$); sin embargo, existen algunas relaciones significantes en la

distribución ($p > 0.05$) de gérmenes productores de BLEE en ciertos pabellones. En ese sentido, la distribución de *K. pneumoniae* productora de BLEE fue 41% en UCI, 11.7% en pediatría, 47% en medicina interna y 0% en cirugía; la diferencia en la distribución de BLEE entre los servicios de UCI y medicina interna no fue significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 4).

Prevalencia de BLEE en no-fermentadores. De los 96 microorganismos no-fermentadores 46 (47.6%) mostraron resistencia a las ceftazidima y aztreonam por los métodos de difusión de disco⁹, dilución en caldo¹⁰ y combinación de disco¹¹. En *P. aeruginosa* la producción de BLEE fue 22/58 (38%) y en *A. baumannii* fue 24/38 (63%) (Cuadro 2). Asimismo en las cepas productoras de BLEE 4 (18%) de 22 cepas de *P. aeruginosa* presentaron resistencia a ceftazidima y aztreonam con CMI >32 μ g/ml y CMI para imipenem de 2 mg/ml lo que posiblemente indique la presencia de BLEE tipo PER (Cuadro 3). En 5 (22.7%) de 22 cepas de *P. aeruginosa* presentaron alto nivel de resistencia a ceftazidima CMI >32 μ g/ml con aztreonam los niveles de resistencia fueron bajos CMI <4 μ g/ml, lo que presume la existencia de BLEE tipo OXA-11, OXA-14 (Cuadro 3). En 11 (50%) de 22 *P. aeruginosa* y 19 (79%) de 24 cepas de *A. baumannii* se presentó resistencia característica a la expresada por la mayor parte de la producción de BLEE tipo SHV con CMI para ceftazidima y aztreonam >32 mg/ml y CMI para imipenem = 1 μ g/ml (Cuadro 3). La resistencia a ceftazidima, aztreonam e imipenem se encontró en 2 (9%) de 22 *P. aeruginosa* y 5 (21%) de 24 *A. baumannii*; este fenotipo de resistencia ampliado de ceftazidima, aztreonam e imipenem, permite también presumir la existencia de β -lactamasas clase molecular D de los tipos OXA-25, OXA-26 y OXA-27

Cuadro 2
Susceptibilidad antimicrobiana de bacterias Gram negativas ante diferentes grupos de antibióticos

Cepa	Antimicrobiano	Rango CMI ₉₀ µg/ml	Mediana de la CMI ₉₀	% de Resistencia	% de BLEE		
<i>A. baumannii</i> (n=38)	Amicacina	4-128	14	34.2	63.0		
	Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/19-8/152	7.2/107.6	73.6			
	Imipenem	0.5-32	3.8	21.0			
	Ciprofloxacina	0.06-32	9.2	60.5			
	Ceftazidime	1-32	18	63.0			
	Aztreonam	1-32	12	63.0			
	Tazobactam-Piperacilina	4/1-256/32	47.4/6.1	52.6			
	Cefoxitin	2-32	3.9	0.0			
	<i>Enterobacter spp</i> (n=18)	Amicacina	4-128	9.8		11.1	61.0
		Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/19-8/152	3.4/68.6		50.0	
Imipenem		0.5-32	0.7	0.0			
Ciprofloxacina		0.06-32	12.06	61.0			
Ceftazidime		1-32	19.9	61.0			
Aztreonam		1-32	19.9	61.0			
Tazobactam-Piperacilina		4/1-256/32	77/12.2	44.4			
Cefoxitin		2-32	3.8	0.0			
<i>K. pneumoniae</i> (n=37)		Amicacina	4-128	13.3	13.5	46.0	
		Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/19-8/152	2.8/53.2	51.3		
	Imipenem	0.5-32	0.7	0.0			
	Ciprofloxacina	0.06-32	6.8	32.4			
	Ceftazidime	1-32	14.6	46.0			
	Aztreonam	1-32	10.2	46.0			
	Tazobactam-Piperacilina	4/1-256/32	10/1.7	10.8			
	Cefoxitin	2-32	3	0.0			
	<i>P. aeruginosa</i> (n=58)	Amicacina	4-128	20.2	17.2		38.0
		Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/19-8/152	>8/152	100.0		
Imipenem		0.5-32	1.08	3.4.0			
Ciprofloxacina		0.06-32	7.3	36.2.0			
Ceftazidime		1-32	12.7	38.0			
Aztreonam		1-32	12.7	40.0			
Tazobactam-Piperacilina		4/1-256/32	24.5/3.5	31.0			
Cefoxitin		2-32	4	0.0			
<i>Proteus mirabilis</i> (n=16)		Amicacina	4-128	6.2	25.0	31.0	
		Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/19-8/152	1.7/34.3	31.2		
	Imipenem	0.5-32	0.7	0.0			
	Ciprofloxacina	0.06-32	6.03	31.0			
	Ceftazidime	1-32	10.6	31.0			
	Aztreonam	1-32	10.6	31.0			
	Tazobactam-Piperacilina	4/1-256/32	22/3.5	25.0			
	Cefoxitin	2-32	2.4	0.0			
	<i>E. coli</i> (n=34)	Amicacina	4-128	4	2.9		20.5
		Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/19-8/152	4.6/87.5	50.0		
Imipenem		0.5-32	0.5	0.0			
Ciprofloxacina		0.06-32	6.7	41.5			
Ceftazidime		1-32	6.4	20.5			
Aztreonam		1-32	5.2	20.5			
Tazobactam-Piperacilina		4/1-256/32	6/1.5	0.0			
Cefoxitin		2-32	2.3	0.0			

(Cuadro 3). La distribución de los aislamientos de no-fermentadores productores de BLEE en los servicios hospita-

larios en donde se obtuvieron estos gérmenes fueron diferentes ($p < 0.05$); en contraste, existió relación en la dis-

tribución de gérmenes productores de BLEE en algunos pabellones (Cuadro 4). La distribución de *A. baumannii*

Cuadro 3
Fenotipos de resistencia a ceftazidima, aztreonam e imipenem y posibles tipos de BLEE

Microorganismo	CMI (µg/ml)			Inhibición por clavulonato Jarlier <i>et al.</i> ¹⁰	Posible tipo de BLEE	% de BLEE en el estudio
	CAZ	AZT	IMI			
<i>A. baumannii</i>	>32	>32	1	+	SHV	79
	>32	>32	8	-	OXA ^a	21
<i>P. aeruginosa</i>	>32	>32	2	+	PER	18
	>32	< 4	2	-	OXA ^b	23
	>32	>32	1	+	SHV	50
	>32	>32	8	-	OXA ^a	9
<i>K. pneumoniae</i> ^c	8	8	1	+	SHV	94
<i>Enterobacter</i> spp	>32	>32	1	+	SHV	100
<i>P. mirabilis</i>	>32	>32	1	+	SHV	100
<i>E. coli</i>	8	8	1	+	SHV	100

CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam, IMI: imipenem

a. β-lactamasas de la clase molecular D posiblemente tipos OXA-25, OXA-26 y OXA-27

b. BLEE tipo OXA-11, OXA-14

c. 1 (6%) de 17 *K. pneumoniae* presentaron fenotipo de resistencia similar a las BLEE tipo CTX-M

Cuadro 4
Porcentaje de distribución de los gérmenes productores de BLEE por servicios

Gérmes	<i>A.baumannii</i> % (n=24)	<i>P.aeruginosa</i> % (n=22)	<i>K.pneumoniae</i> % (n=17)	<i>Enterobacter</i> spp % (n=11)	<i>E.coli</i> % (n=7)	<i>P.mirabilis</i> % (n=5)
UCI	70.8	59.0	41.0	36.3	42.8	80.0
Pediatría	8.3	0.0	11.7	18.0	0.0	40.0
Med Interna	8.3	22.7	47.0	36.3	28.5	60.0
Cirugía	12.5	18.0	0.0	9.0	28.5	0.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

productor de BLEE fue 70.8% en UCI, 8.3% en pediatría, 8.3% en medicina interna y 12.5% en cirugía; no existió diferencia ($p>0.05$) en la distribución de BLEE entre los servicios de cirugía y medicina interna (Cuadro 4).

Se encontró resistencia a imipenem asociada con amicacina, gentamicina y ciprofloxacina sin existir resistencia a ceftazidima y aztreonam en 3 (21.4%) de 14 *A. baumannii* lo que presume la existencia de mutaciones en las porinas de estas cepas o la presencia de mecanismos de eflujo (*pump efflux*). Este fenotipo de resistencia no fue encontrado en *P. aeruginosa*. El porcentaje de distribución de los aislamientos no-fermentadores y los servicios en donde se obtuvieron estos gérmenes aparecen en el Cuadro 4.

Métodos de identificación de BLEE. Los métodos difusión de disco⁹, concentración mínima inhibitoria en

caldo¹⁰ y combinación de disco¹¹ determinaron la producción de BLEE en 86 de 201 Enterobacteriaceae y no-fermentadores, no existieron diferencias entre los resultados hallados por estos métodos ($p>0.05$) (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

Es un estudio multicéntrico realizado en once países latinoamericanos Mendes *et al.*¹², hubo tasas de BLEE que superaron 40%; en Colombia, se encontraron 27% de BLEE en *E. coli* y 44% en *K. pneumoniae*. Estas tasas son similares a las halladas en el presente estudio, donde se encontró 43% de BLEE para todos los aislamientos estudiados, para *K. pneumoniae* 46% y en *E. coli* 20.5% (Cuadro 2). De acuerdo con los datos mostrados por Mendes *et al.*¹², en Colombia ha permanecido estable el porcentaje de infección por

gérmenes productores de BLEE. Los altos índices de BLEE son marcadores clínicos importantes que deben conducir a la toma de decisiones para intervenir y prevenir altos índices de morbimortalidad que los gérmenes productores de BLEE pueden ocasionar en pacientes intrahospitalarios. De otro lado, estos gérmenes poseen resistencia cotransferida a trimetoprim-sulfametoxazol y a la mayoría de los aminoglicósidos¹³; esta resistencia también se encontró en la presente investigación (Cuadro 1).

La producción de BLEE en los aislamientos clínicos nosocomiales del presente estudio fueron las responsables de la resistencia a los agentes β-lactámicos de amplio espectro. Probablemente la producción de BLEE en estas cepas no sólo se deba a la existencia de plasmidos transferibles que expresan resistencia cotransferida a ami-

Cuadro 5
Comparación de los métodos de
determinación de BLEE

Gérmenes	Método 1*	Método 2*	Método 3*
<i>A. baumannii</i> ^a	24	24	24
<i>P. aeruginosa</i> ^b	22	22	22
<i>K. pneumoniae</i> ^a	17	17	17
<i>Enterobacter</i> spp. ^b	11	11	11
<i>P. mirabilis</i> ^b	5	5	5
<i>E. coli</i> ^a	7	7	7

* No existen diferencias entre los tres métodos utilizados ($p > 0.05$); los resultados en porcentaje se refieren a la identificación de BLEE.

Diámetro de zona de inhibición para ceftazidima <22mm sugiere BLEE; CMI₉₀ =2 µg/ml para ceftazidima sugiere BLEE. El aumento en el halo de inhibición de =5 mm para ceftazidima/clavulonato comparado con ceftazidime confirma BLEE.

a. Valores obtenidos CMI =8 µg/ml para ceftazidima; sinergismo de ceftazidima/clavulonato comparado con ceftazidima y cepodoxima/clavulonato comparado con cepodoxima.

b. Valores obtenidos CMI >32 µg/ml para ceftazidima; sinergismo de ceftazidima/clavulonato comparado con ceftazidima.

noglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol¹³, sino también a la presencia de otros elementos genéticos móviles como transposones e integrones que codifican estos altos niveles de resistencia asociados con varias familias de antibióticos¹⁴, o la existencia de mutaciones en las porinas de membrana que causan resistencia a las fluoroquinolonas y carbapenems en el caso de los no-fermentadores^{15,16}.

La presencia de plásmidos en el HSJ es un factor de riesgo pues su eliminación se vuelve difícil por la resistencia cotransferida mencionada antes, por lo que las medidas para evitar la alta presión selectiva producida por estos antibióticos sugiere una mejor vigilancia epidemiológica y la posible instauración de rotación de antibióticos como estrategia de racionalización de la administración de antibióticos¹⁷.

Los resultados de este estudio mostraron la totalidad de los 40 aislamientos de Enterobacteriaceae productores

de BLEE (17 *K. pneumoniae*, 11 *Enterobacter* spp, 7 *E. coli* y 5 *P. mirabilis*); el mayor porcentaje de producción de BLEE se presentó en *Enterobacter* spp (11/18, 61%) y no en *K. pneumoniae* (17/37, 46%) (Cuadro 2), por lo que puede representar el principal reservorio de aislamientos entéricos productores de BLEE¹⁸. La resistencia de *Enterobacter* spp a las cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam se debió a la producción de BLEE y no a otro tipo de β-lactamasas como AmpC o CMY. Esto se debe al sinergismo mostrado del ácido clavulánico en combinación con ceftazidima comparado con sólo ceftazidima y por la ausencia de resistencia a cefalotina, cefoxitin y la estabilidad de cefepime frente a estas cepas. Sin embargo, aunque el NCCLS no ha establecido guías para la identificación de β-lactamasas AmpC, la existencia de estas enzimas en los aislamientos clínicos se puede presumir con base en la resistencia de ceftazidima/clavulonato, cefoxitin, cefotetan y estabilidad frente a cefepime. Estos fenotipos también fueron tenidos en cuenta para la identificación de BLEE en *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. El perfil de resistencia mostrada hacia la ceftazidima, aztreonam e imipenem en los aislamientos nosocomiales de Enterobacteriaceae y no-fermentadores permiten presumir la existencia de BLEE tipo SHV, β-lactamasas de la clase molecular D tipo OXA-25, OXA-26 y OXA-27¹⁹, BLEE tipo PER²⁰ y BLEE tipo OXA-11²¹ y OXA-14²² (Cuadro 3); estos tipos particulares de β-lactamasas también se han encontrado en aislamientos clínicos en Chile, Argentina, Uruguay, Francia y Bélgica²³.

De otra parte, los resultados de este estudio, mostraron resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* (3.4%) y *A. baumannii* (21%) aislados de diferentes servicios hospitalarios, sobre la base de los resultados de sensibilidad con las

cefalosporinas, cefamicinas y β-lactámicos en combinación con inhibidores de β-lactamasas y carbapenems. Es probable que haya enzimas carbapenemasas en estos gérmenes, lo que ocasionaría un problema clínico y epidemiológico importante. En ese sentido, datos del programa SENTRY⁵ indican que 28% de las cepas de *P. aeruginosa* fueron resistentes a imipenem; *Acinetobacter* spp mostró 9% de resistencia a imipenem. El hallazgo de estos patógenos es preocupante y hace difícil realizar recomendaciones de tratamiento antibiótico empírico para pacientes gravemente enfermos^{5,24}. No obstante, el uso de carbapenems es una buena opción terapéutica para tratar las infecciones causadas por gérmenes productores de BLEE; en este estudio se encontró que 39/46 (85%) de los bacilos Gram negativos no-fermentadores productores de BLEE fueron sensibles a imipenem. Sin embargo, el uso de estos agentes debe ser bien moderado y cauteloso, pues se pueden seleccionar gérmenes resistentes entre pacientes que reciben carbapenems como tratamiento antibiótico empírico. La mejor alternativa terapéutica para el manejo de las infecciones severas causadas por bacilos Gram negativos podría ser el uso de cefepima o piperacilina/tazobactam más un aminoglucósido en el paciente convencional y así reservar los carbapenems para el individuo que se sabe tiene una cepa productora de BLEE o que ha recibido cefalosporinas previamente y que por tanto, el riesgo de tener un bacilo Gram negativo resistente es especialmente alto²⁵.

En el presente estudio de 37 cepas de *K. pneumoniae*, 16 mostraron niveles altos de resistencia hacia la ceftazidima y aztreonam con CMI >32 mg/ml (43%), lo que permitiría presumir que existen BLEE provenientes de los tipos SHV-2, SHV-5, SHV-7 o SHV-12, ampliamente diseminadas en los

ambientes hospitalarios de EE.UU. y Europa^{23,26} (Cuadro 3). De 37 cepas de *K. pneumoniae* 1 (2.7%) mostró niveles altos de resistencia a cefotaxima CMI >32 mg/ml y baja resistencia a ceftazidima y aztreonam CMI =4 mg/ml por lo que podría existir una BLEE tipo CTX-M, ampliamente diseminadas en hospitales de Argentina y caracterizada molecularmente por primera vez en Colombia como causa de un brote de infección intrahospitalario en una unidad de cuidado intensivo neonatal producido por *K. pneumoniae* productora de CTX-M grupo 1 en un hospital de Bogotá²⁷. También se puede presumir que el porcentaje de BLEE tipos SHV-2, SHV-5, SHV-7 y SHV-12, estén alrededor de 35% por la resistencia mostrada por todos los microorganismos hacia ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam (Cuadro 3). Estos tipos de β -lactamasas tienen una frecuencia de aparición de 5% en los EE.UU y un poco más alta en Europa y el Pacífico occidental²⁸⁻³¹. De otra parte, es posible que 18% de las BLEE identificadas en *P. aeruginosa* de nuestro estudio correspondan a PER-1, por la resistencia mostrada hacia la ceftazidima y aztreonam y 22.7% correspondan a OXA-11 y OXA-14, por la alta resistencia mostrada sólo hacia la ceftazidima. Estos tipos particulares de BLEE se encuentran comúnmente diseminados en los pabellones hospitalarios de Europa y Turquía²⁰⁻²² (Cuadro 3). La presunta existencia de estos tipos particulares de BLEE podría explicarse por el rápido aumento y diseminación de las BLEE en el mundo, ocasionado por el abuso de β -lactámicos de amplio espectro y monobactámicos.

El análisis de los microorganismos nosocomiales productores de BLEE mostró que las Enterobacteriaceae productoras de BLEE prevalecen altamente en los servicios de pediatría y medicina interna en comparación con los

no-fermentadores productores de BLEE los cuales prevalecen en mayor proporción en los servicios de UCI y cirugía (Cuadro 4). Estos importantes patógenos oportunistas (*P. aeruginosa* y *A. baumannii*), son de cuidadoso interés, porque a menudo son multirresistentes y de terapia antibiótica complicada. La alta prevalencia de Enterobacteriaceae productoras de BLEE en los servicios de pediatría y medicina interna se debe presumiblemente a la fuerte presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos β -lactámicos de amplio espectro en las infecciones de niños y adultos hospitalizados en el HSJ de Montería (Cuadro 4).

De otra parte, aunque las pruebas de identificación de BLEE en microorganismos diferentes a *K. pneumoniae* y *E. coli* no han sido estandarizadas, los autores de este artículo identificaron la presencia de BLEE en *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacter* spp y *P. mirabilis*, debido a la resistencia mostrada a ceftazidima y aztreonam CMI >32 μ g/ml y al sinergismo mostrado del ácido clavulánico en combinación con ceftazidima. Este sinergismo sólo es potenciado cuando el mecanismo de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam es producido por BLEE y no por otros mecanismos de resistencia tales como alteración o deleción de las porinas de membrana o por bombas de eflujo (*pump efflux*). El sinergismo mostrado por el ácido clavulánico en combinación con cepodoxima sólo fue utilizado en *K. pneumoniae* y *E. coli* (Cuadro 5).

Con respecto a las técnicas de identificación de BLEE, se sabe que existen diferencias en los resultados obtenidos a nivel de laboratorio. Así, los trabajos de Carter³² mostraron diferencias ($p < 0.05$) al comparar los criterios de la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)* con los del *NCCLS* y encontraron tasas de BLEE

de 97.7% y 82.2% respectivamente. A la vez ellos utilizaron la metodología propuesta por Jarlier *et al.*¹¹, y encontraron tasas de 95.5%, de un total de 180 cepas de *Klebsiella* spp productoras de BLEE ($p < 0.05$). En contraste, en los resultados de esta investigación no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) al emplear los criterios de determinación de BLEE del *NCCLS*^{9,10} y la metodología propuesta por Jarlier *et al.*¹¹. Es posible que estos métodos en la actualidad están más estandarizados a nivel de los laboratorios de microbiología clínica. Ahora bien, en este estudio desde el punto de vista cualitativo, el método que presentó mejor resultado con respecto a la interpretación fue el de combinación de disco¹¹ seguido por el método de dilución en caldo⁹. El método de difusión de disco del *NCCLS*⁹ presentó mayor dificultad para la interpretación por las medidas de los diámetros estandarizados. Estos resultados motivan a sugerir un estudio multicéntrico nacional con metodologías estándares y unificadas para establecer con exactitud la prevalencia de BLEE en Colombia y así tomar medidas de control y de vigilancia epidemiológica.

En conclusión, los presentes resultados demuestran una alta y preocupante prevalencia de BLEE en el hospital de provincia de Montería, probablemente por el excesivo uso de β -lactámicos de amplio espectro que ocasionan un riesgo alto para la selección de microorganismos productores de BLEE de la familia Enterobacteriaceae y no-fermentadores. La investigación también demostró la importancia de los métodos de identificación de BLEE como apoyo para la instauración de la terapéutica de las infecciones nosocomiales. Se sugiere la constante y consistente implementación de medidas de vigilancia que prevengan y disminuyan la diseminación de las BLEE en este hospital.

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital San Jerónimo de Montería por permitirnos realizar este estudio, al Centro de Investigaciones de la Universidad de Córdoba (CIUC) dentro del marco del proyecto Río Sinú, a la Asociación Colombiana de Infectología (ACIN) capítulo Costa Atlántica por su apoyo institucional.

SUMMARY

Objective. The objectives of this study were to establish the extended spectrum β -lactamases (ESBL), in nosocomial bacilli Gram negative and to compare three methods for the detection of ESBL.

Materials and methods. 201 microorganisms were studied isolated of patients with nosocomial infections at the Hospital San Jerónimo (HSJ) of Montería during the years 2001 and 2002. To detect the presence of ESBL was taking account the hydrolytic activity upon ceftazidime, that measured the synergism of the clavulanic acid in combination with ceftazidime. To compare the methods of detection of ESBL, were used those proposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) disk diffusion, the Minimal inhibitory Concentration (MIC90) and the combination disk method of Jarlier.

Results. The results showed that 86 (43%) of 201 germs were ESBL producers. ESBL were observed in 24 (63%) of 38 *Acinetobacter baumannii*, 11 (61%) of 18 *Enterobacter* spp, 17 (46%) of 37 *Klebsiella pneumoniae*, 22 (38%) of 58 *Pseudomonas aeruginosa*, 5 (31%) of 16 *Proteus mirabilis* and 7 (20.5%) of 34 *Escherichia coli*. The comparison of the detection methods did not show differences between them ($p > 0.05$). The results show a high prevalence of ESBL (43%) in the nosocomial

bacilli Gram negative at the HSJ of Montería.

Conclusions. The study was able to show the importance of the methods for detection of ESBL as support to establish the correct antimicrobial therapy in nosocomial germs and upon this base to suggest the implementation of measures of surveillance that prevent and to reduce the dissemination of ESBL at this hospital.

Key words: ESBL. Hospital. Prevalence. Enterobacteriaceae. Non-fermenters. Montería. Colombia.

REFERENCIAS

1. Knothe HP, Shah V, Kremery M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-317.
2. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (suppl.1): 19-45.
3. Wong BA. Therapeutic challenges associated with extended-spectrum, β -lactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 583-592.
4. Bergogne BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148-165.
5. Sader HS, Pfaller MA, Jones RN. Bacterial pathogens isolated from patient with bloodstream infections in Latin-America, 1997. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 1999; 3: 97-110.
6. Monnet DL, Biddle JW, Edwards JR. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum β -lactamases resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1986 to 1993. The National Nosocomial Infections Surveillance Systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 492-498.
7. Sifuentes J, Prado V, Zurita J, et al. Is the antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp expanding in Latin-America. The Resisnet Collaborative Group. Abstracts 120 of the IDSA 37th Annual Meeting Philadelphia; 1999. p. 60.
8. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horu TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16:128-140.
9. National Committee Clinical Laboratory Standards 2002. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Informational supplement M100-S12. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. NCCLS document M7-A5. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.
11. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-878.
12. Mendes C, Rossi A, Prado V, et al. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The Resistent Group. Abstracts 99 of the IDSA 37 Annual Meeting Philadelphia; 1999. p. 57.
13. Livermore DM. Determinations of the activity of β -lactamases inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 9-21.
14. Poirrel LT, Naas D, Nicolas L, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-897.
15. Patterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *K. pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 473-478.
16. Livermore D, Williams D. β -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. 4th ed. In Lorian V (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p. 502-578.
17. Gould IM. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *J Antimicrobial Chemother* 1999; 43: 459-464.
18. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kamaroglu A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 542-546.
19. Afzal SM, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26 and OXA-27, Molecular class D β -lactamases associated with carbapenems resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 583-588.

20. Danel F, Hall LMC, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 281-294.
21. Hall LMC, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1637-1644.
22. Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1881-1884.
23. Thomson K. Controversies about extended spectrum β -lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 330-336.
24. Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The patient is awakening. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14: 67-81.
25. Prada G. β -lactamasas de espectro extendido: perspectivas y tratamiento. *Rev Panam Infectol* 2002; 5: 41-46.
26. Espinal PA, Alpuche C, Saavedra C, Leal AL, Mantilla JR. Epidemiología molecular de infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) SHV-5 en el Hospital Universitario Clínica San Rafael. *Infectio* 2003; 7: 109.
27. Leal AL, Olarte N, Espinal PA, et al. Caracterización epidemiológica y molecular de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de CTX-M del grupo 1, en una unidad de cuidados intensivos neonatal en un hospital de Bogotá. *Infectio* 2003; 7: 104.
28. Essack SY, May LM, Pillay DG, McFadyen ML, Livermore DM. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 88-91.
29. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype of isolates from Europe the Americas and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl): 94-101.
30. Howard C, Van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 659-664.
31. Máttar S, Sánchez L, Pérez D, Arango AI, Parodi R, Muelle C. *In vitro* activities of cefepime and other β -lactams antibiotics against clinical isolates from a Colombia teaching hospital. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 550-552.
32. Carter MW, Karen JO, Marina W, Livermore D. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the oxoid combination disk method. *J Clin Microbiol* 2000; 11: 4228-4232.