

Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología

Emergence of antimicrobial resistance to extended-spectrum- β -lactamases (ESBL): detection, clinic impact and epidemiology

SALIM MÁTTAR¹

PEDRO MARTÍNEZ²

RESUMEN

La rápida emergencia de la resistencia antimicrobiana debida a las BLEE tiene un impacto significativo en la salud pública. En los últimos 24 años ha suscitado un gran interés el conocimiento acerca de las BLEE, esta explosión de publicaciones abarca a todos los continentes y más de 30 países, actualmente es motivo de preocupación y se considera un problema de salud pública. Las BLEE son enzimas que producen los gram negativos y confieren resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenems ni a las cefamicinas y la mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico. En general las BLEE son derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, difieren entre sí de sus progenitoras por unos escasos aminoácidos por lo que su filogenia es cercana. Son comúnmente encontradas en *E.coli*, *Klebsiella* sp, y *P.mirabilis*, no obstante, existen otras BLEE que difieren filogenéticamente de TEM y SHV, como las CTX-M, las carbapenemasas tipo OXA y las metalo- β -lactamasas VIM e IMP, típicamente encon-

tradas en especies de *P. aeruginosa*, *Serratia* sp and *Enterobacter* sp. La producción de BLEE en los patógenos de importancia clínica es un problema serio en los pacientes hospitalizados debido a las implicaciones clínicas, terapéuticas y económicas. Las técnicas para la detección de las BLEE van de lo simple con aspectos fenotípicos hasta las pruebas complejas moleculares de geno-detección específica. El objetivo de esta revisión es discutir el impacto clínico y epidemiológico de las BLEE más prevalentes así como las técnicas para su detección y su seguimiento nosocomial.

Palabras clave: β -lactamasas, BLEE, detección, tratamiento, epidemiología.

Infectio 2007; 11(1): 23-35

¹ Ph.D, Profesor titular, Director Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia, Sur América.
² Pedro Martínez. Bacteriólogo, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería.

Correspondencia: Salim Máttar V., Ph. D., Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Montería (Córdoba), Colombia. Teléfono: (094) 756 0710; mattarsalim@hotmail.com.

Fecha de recepción: 17/08/2005; **fecha de aceptación:** 25/06/2006

ABSTRACT

The rapid emerge of antimicrobial resistance due to ESBL has a significant impact in public health. In the last 24 years, the study of extended-spectrum- β -lactamases (ESBL) has created great interest. This has been documented by publications from all continents and more than 30 countries, and the extent of this problem is a public health concern. ESBLs produced by Gram negative bacilli are enzymes that confer resistance to penicillins, cephalosporins and aztreonam, but not to carbapenems or cephamycins, and are usually inhibited by clavulanic acid. Most of the ESBLs are derived from TEM-1, TEM-2 and SHV-1, and differ from their progenitors by only a few amino-acids. Thus, their phylogeny is close. ESBLs are usually found in *E. coli*, *Klebsiella* sp, and *Proteus mirabilis*. However, there are some ESBL phylogenetic branches that differ from TEM and SHV, such as CTX-M, OXA carbapenemases, VIM and IMP metallo- β -lactamases, typically found in *P. aeruginosa*, *Serratia* sp and *Enterobacter* sp. ESBL production by different clinical pathogens imply an important clinical problem in nosocomial patients due to medical, therapeutic and economical impact. ESBL detection techniques include simple tests as well as complex detection system involving molecular genotyping. This review discusses the most prevalent ESBLs and their epidemiological and clinical impact. Also, it presents tools and strategies for ESBL detection and molecular tracking at the nosocomial level.

Key words: β -lactamases, ESBL, detection, treatment, epidemiology.

Infectio 2007; 11(1): 23-35

INTRODUCCIÓN

La aparición de las β -lactamasas es un fenómeno natural, se conoce desde 1940 cuando fue identificada la primera enzima en *E. coli* (1). La ocurrencia natural de las β -lactamasas se debe a sustancias bacterianas naturales (bacteriocinas o colicinas) que producen ellas para competir por un nicho con otro microorganismo (2).

La rápida emergencia de las BLEE en los últimos 24 años ha suscitado un gran interés el conocimiento acerca de las BLEE, esta explosión de publicaciones cubre a todos los continentes y más de 30 países (1), esto es debido a que actualmente es motivo de preocupación y se considera un problema serio de salud pública por sus implicaciones clínicas y económicas. La primera β -lactamasa mediada por plásmidos fue descrita en 1965 se denominó TEM-1 y se diseminó rápidamente a otros miembros de las enterobacterias y bacterias oxidantes (1). Poco tiempo después fue encontrada la β -lactamasa SHV-1 (sulfhidrido-variable) (3, 4). La aparición e introducción de los antibióticos β -lactámicos de espectro extendido (piperacilina, ceftazidima, cefotaxima, aztreonam) en los años 80s conllevó a la emergencia de una nueva clase de enzimas β -lactamasas, las de espectro extendido (BLEE). La primera de estas enzimas BLEE mediadas por plásmidos fue SHV-2 descrita en Alemania en 1983 a partir de un aislamiento de *K. pneumoniae* capaz de hidrolizar las oximino-cefalosporinas (ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona, cefotaxima) y aztreonam (5). Actualmente se han descrito más de 200 BLEE las cuales se encuentran disponibles en el sitio web <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> 24/03/2006 diseñado por George Jacoby y Karen Bush (1,6).

Las β -lactamasas generalmente son clasificadas de acuerdo a dos esquemas: el de Ambler y el de Bush-Jacoby-Madeiras. La clasificación de Ambler (7) posee cuatro clases A, B, C, D, y está basada en la similitud u homología de los aminoácidos y no tiene en cuenta las características fenotípicas. En esta clasificación la clase B son metallo- β -lactamasas y el resto serino β -lactamasas (8, 9). La clasificación de Bush-Jacoby-Madeiras (10) se basa en la similitud funcional y la característica de inhibición o no por el ácido clavulánico (11, 12).

No existe una definición precisa de las BLEE, en esta revisión se considerará la de Bush-Jacoby-

Madeiras definidas como aquellas capaces de conferir resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenems ni a las cefamicinas y que son inhibidas por el ácido calvulánico (9, 10). Según esta clasificación la mayoría de las BLEE son derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, ellas difieren entre sí de sus progenitoras por unos escasos aminoácidos por lo que su filogenia es bien cercana. No obstante, existen otras BLEE que difieren filogenéticamente de TEM y SHV, como las CTX-M y las carbapenemasas tipo OXA común en *Acinetobacter* y las metalo- β -lactamasas VIM e IMP (8, 9, 11, 13).

Existen otras β -lactamasas comunes en algunos hospitales pero que no son consideradas estrictamente BLEE, se denominan β -lactamasas AmpC (grupo 1 Bush-Jacoby-Madeiras) (10). Estas enzimas mediadas por plasmidos confieren resistencia a la ampicilina, amoxicilina, aztreonam y a la mayoría de las cefalosporinas. Se diferencian de las BLEE por que son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas y susceptibles a las cefalosporinas de cuarta generación (14). Con base a estos perfiles de susceptibilidad es importante distinguir entre un microorganismo productor de AmpC y otro BLEE, ya que sus implicaciones terapéuticas son diferentes (14).

Es importante anotar que diferentes especies bacterianas no solo poseen BLEE sino también desconfiguración y desaparición de porinas, bombas de eflujo y sistemas complejos de islas genéticas e integrones que complican aun más el panorama y sobre todo se dificulta la detección a nivel de laboratorio (1, 2, 15, 16).

La producción de BLEE por parte de diversos patógenos de importancia clínica constituye un importante problema en los pacientes hospitalizados debido a las implicaciones clínicas, terapéuticas y económicas (17, 18). En Colombia la prevalencia de BLEE de acuerdo con lo informado por Villegas et al (19) se encuentra por encima del 40%. Adicionalmente, estudios realizados en la costa atlántica colombiana han mostrado prevalencias del 37.6% en *Enterobacteriaceae* y del 47.6% en los no-fermentadores (38% en *P. aeruginosa* y 63% en *A. baumannii*) (20). En otros estudios, de la zona andina colombiana se ha demostrado prevalencia en un rango de 10-13% para *E. coli* y del 30% para *K. pneumoniae* (21).

Con respecto a la detección de cepas productoras de BLEE, la técnica fenotípica más utilizada en

los laboratorios de microbiología clínica, es la de aproximación de disco (22). Sin embargo, la confirmación definitiva se realiza con técnicas moleculares que permiten caracterizar los genes de resistencia implicados en la resistencia del microorganismo (1, 7, 11-16).

El objetivo de esta revisión es discutir el impacto clínico y epidemiológico de las BLEE más prevalentes así como las técnicas para su detección y su seguimiento nosocomial.

DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE BLEE

La terapia inadecuada basada en un resultado de laboratorio impreciso, puede prolongar la hospitalización, el fallo terapéutico y podría elevar la mortalidad de ciertos pacientes. De ahí la importancia de conocer e interpretar las nuevas tecnologías y pruebas disponibles para la detección de BLEE en Colombia (14, 23). El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, antes NCCLS) ha establecido recomendaciones para el tamizaje y confirmación de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella spp* (24, 25). Sin embargo, a pesar que no han sido estandarizados los métodos por parte del CLSI para detectar BLEE en otros microorganismos gram negativos, estas técnicas han sido adaptadas por los microbiólogos a otros gémenes de importancia clínica. Básicamente, las pruebas para la detección de BLEE se agrupan en las de tamizaje inicial (doble disco y combinación de disco) y las de confirmación (CMI en caldo, Etest® instrumentos automatizados, y pruebas moleculares). El CLSI ha aprobado las pruebas fenotípicas de tamizaje difusión de disco (14, 24) y confirmatorias de CMI (14, 26) (Tabla 1).

Tabla 1

Tamizaje para la detección de BLEE por la técnica de difusión de disco (24, 25)

ANTIBIÓTICOS	DIFUSIÓN DE DISCO	CIM
Ceftazidima	≤ 22 mm	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
Cefpodoxima	≤ 17 mm	≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
Cefotaxima	≤ 27 mm	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
Ceftriaxona	≤ 25 mm	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
Aztreonam	≤ 27 mm	≥ 2 $\mu\text{g/ml}$

TÉCNICAS DE TAMIZAJE DE BLEE

La técnica fenotípica inicial más utilizada en el laboratorio de microbiología clínica para establecer la presencia de las BLEE es la de aproximación de doble disco (14, 22). La prueba consiste en colocar un disco de amoxicilina/ clavulonato (20/10 µg/ml) en el centro de una placa de Mueller Hinton a distancia de 30 mm de uno de ceftazidima (30 µg) y cefotaxima (30 µg) (Figura 1). El sinergismo observado entre algunas de las cefalosporinas y la amoxicilina/ clavulonato expresa la producción de la BLEE. Esta prueba ha sido modificada para mejorar su eficiencia con la disminución en la distancia entre los discos de 20 mm (27) y la utilización de cefepime para detectar BLEE en los microorganismos productores de β-lactamasas AmpC que podrían ocultar la expresión de BLEE (26-28). Este método presenta dificultades para la interpretación del sinergismo de los halos de inhibición, debido a la hiper-producción de enzimas SHV-1 por lo que genera resultados falsos positivos (29).

La otra técnica fenotípica de tamizaje es la combinación de disco que compara los diámetros de inhibición de los discos de cefotaxima o ceftazidima en combinación con clavulonato [10 µg] (30, 31). Un incremento de ≥ 5 mm en el diámetro de la zona de inhibición de la combinación cefalosporina/ clavulonato comparado con las zonas de los antibióticos sin inhibidor confirma la detección de BLEE (14, 24).

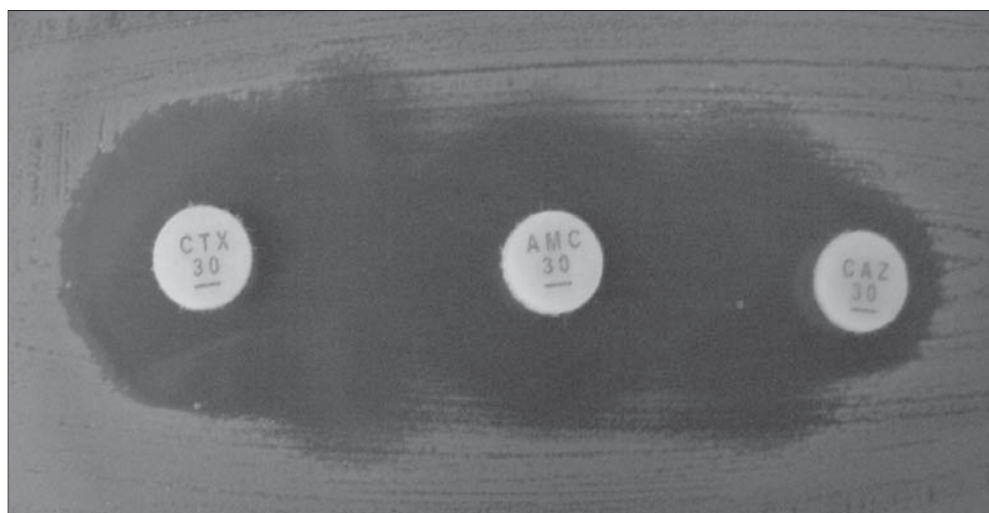
TÉCNICAS CONFIRMATORIAS DE BLEE

CMI. Esta técnica utiliza las cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima) con la adición de una concentración de 4 µg/ml de ácido clavulanico; una disminución en la CMI de ≥ 3 diluciones dobles de ceftazidima y cefotaxima en combinación con el clavulonato comparada con la CMI de las cefalosporinas sin el inhibidor confirma la producción de BLEE (14, 27, 32).

Etest®-ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden).

Son tiras impregnadas de antibióticos, poseen una excelente sensibilidad y especificidad para detectar y confirmar las BLEE. Actualmente el uso de la tira cefepime y cefepime/clavulonato es útil conjuntamente con las tiras ceftazidima y ceftazidima/clavulonato y cefotaxima cefotaxima/clavulonato para detectar la producción de BLEE en microorganismos productores de enzimas AmpC. Esto debido a que esta cefalosporina es muy estable a la hidrólisis de las enzimas AmpC, y el sinergismo con el clavulonato puede observarse en las cepas productoras de AmpC y BLEE (33) (Figura 2). La utilización de las tiras Etest® presentan algunas veces dificultades de interpretación por la producción de zonas fantasmas ocasionadas por las bajas CMI expresadas a las cefalosporinas y la difusión del clavulonato hacia el lado de la tira que contiene la cefalosporina sin el inhibidor (Figura 2) (14, 33). A pesar de ser la prueba más fácil de usar para detectar las BLEE, su uso rutinario en los laboratorios clínicos es limitado por su alto costo.

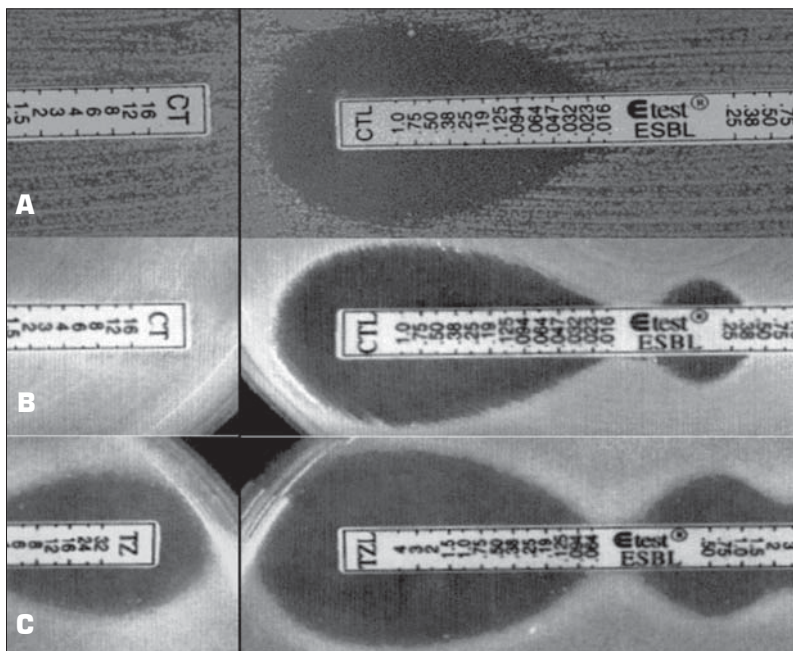
Figura 1



Expresión de una BLEE tipo SHV-12 en una cepa de *E. coli* aislada en Montería: método de aproximación de disco de Jarlier *et. al.* (22).

Figura 2

Tiras Etest ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden). **A.** La reducción de la CIM de ceftazidima mayor o igual a 3 diluciones en la presencia de clavulonato se interpreta como una prueba positiva para BLEE. La figura muestra una cepa de *E. coli* aislada en Montería. **B.** La tira Etest ESBL, en ocasiones, es difícil de interpretar por la baja producción de enzima y por la zona fantasma. **C.** La deformación de las elipses de inhibición también son un problema para la interpretación de la prueba, el clavulonato de la ceftazidima/clavulonato se difunde dentro del agar e interfiere con la lectura de la CIM para la mitad de la tira que contiene ceftazidima solo.



Pruebas automatizadas para la detección de BLEE. Existen pruebas confiables el sistema Micro-Scan® ESBL plus (Dade Behring, Ca, USA) permite confirmar las BLEE en *Klebsiella* sp y *E. coli*. También esta disponible la tarjeta Vitek® ESBL (Biomerieux, Durham, NC, USA), que permite la detección inicial de β -lactamasas por la resistencia a cualquier cefalosporina de amplio espectro y el reporte de resistencia extendida a todas las cefalosporinas (14, 26, 34).

Tanto en las pruebas de tamizaje como las de confirmación de BLEE, no debe usarse un solo antibiótico como representante del grupo de las cefalosporinas, ya que existen BLEE que hidrolizan preferentemente un antibiótico y otro no. En este sentido, algunos autores (22) han sugerido que la resistencia a ceftazidima se considere como un importante marcador de BLEE. Sin embargo, aunque esto podría aplicarse para Norte América y Europa (9) donde la mayoría de microorganismos productores de BLEE son resistentes a este antibiótico (BLEE tipo TEM), recientemente en estas zonas han sido encontrados microorganismos productores de BLEE que hidrolizan más eficientemente cefotaxima que ceftazidima (BLEE tipo CTX-M) (9, 35). Estas últimas se encuentran al parecer mayoritariamente distribuidas en Suramérica (36, 37).

Métodos bioquímicos para la identificación de BLEE. Uno de los procedimientos para confirmar las BLEE es el isoelectroenfoco (IEF), el análisis del perfil de antibióticos y la cinética enzimática. El IEF permite conocer el punto isoelectro (pI) de las BLEE, su limitación actual se debe a la existencia de diferentes BLEE con pI idéntico (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm> 02/08/2005). No obstante, conjuntamente con el análisis del fenotipo de sensibilidad antibiótica es importante para la caracterización de estas enzimas. Las BLEE tipo TEM poseen valores de pI entre 5.2 y 6.5, las SHV entre 7 y 8.2 y las CTX-M entre 7.6 y 9. Las BLEE tipo PER poseen pI similares al de las BLEE tipo TEM (9).

Métodos moleculares para la identificación de BLEE. Se aplican cuando ha sido confirmado el fenotipo de BLEE. Entre ellas esta la de PCR fáciles de realizar y están bien estandarizadas, algunas permiten la secuenciación del producto. Son las más importantes actualmente para la identificación de las BLEE (38), estas técnicas utilizan "cebadores" específicos para detectar mutaciones puntuales bajo ciertas condiciones estrictas de laboratorio. Permiten la identificación de todas las BLEE existentes especialmente las más prevalentes en Latinoamérica como TEM, SHV y CTX-M.

Otras técnicas moleculares han sido introducidas recientemente como la técnica de PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*) o análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción con diferentes enzimas del producto de PCR, es utilizada principalmente con la familia SHV (39). La técnica PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*) el producto de PCR es digerido con endonucleasas con apertura de las hebras de ADN y la electroforesis de los fragmentos amplificados (40). La técnica RSI-PCR (*Restriction Site Insertion*) o amplificación con cebadores que crean lugares de restricción próximos al extremo 3' o LCR (*Ligase Chain Reaction*) para la caracterización de las BLEE tipo SHV (41). Se ha propuesto la utilización de la PCR en tiempo real para la detección y caracterización de las BLEE tipo SHV. En esta técnica se utilizan sondas marcadas con diferentes fluorocromos según el tipo de mutación (42).

Sin embargo, dado el alto número de variantes BLEE ninguna de estas técnicas asegura la identificación final de las BLEE al menos que se realice la secuenciación de las enzimas, que continua siendo el método de referencia para la identificación plena de las BLEE (14, 43).

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE LAS BLEE

La producción de BLEE por parte de diversos patógenos de importancia clínica constituye un importante problema en los pacientes hospitalizados debido a las implicaciones clínicas, terapéuticas y económicas (17, 18), en este sentido recientemente un estudio realizado en Israel demostró que existe un incremento de 9.620 dólares por cada paciente sobre los costos de hospitalización atribuidos a los pacientes infectados por gérmenes productores de BLEE (44). La aparición inicial de las BLEE en Europa oriental probablemente se debió a que las cefalosporinas de tercera generación fueron inicialmente introducidas para la utilización clínica en esta zona geográfica, pero en poco tiempo su uso se extendió y conllevó a la emergencia de las BLEE en el mundo (45, 46).

Al parecer la primera BLEE reportada en Latinoamérica fue SHV-5 en 1987, en una cepa de *K. pneumoniae* en Chile (47), en el mismo año se describieron las enzimas SHV-2 y SHV-5 en Argentina producida por cepas de *K. pneumoniae* en una unidad de cuidados intensivos (UCI) de Buenos Aires

(48). En 1989 también en Argentina se produjo un brote causado por *S. typhimurium* en donde murieron 80 niños por infecciones graves como bacteriemias y meningitis, este microorganismo era productor de una nueva BLEE CTX-M-2 (49). A principios de los 90s, otra nueva BLEE fue descubierta también en Argentina PER-2 (50) y la cual es también frecuentemente detectada en cepas de *E. cloacae*. En 1997 fue encontrada una nueva BLEE la CTX-M-8 en Brasil en cepas de *Enterobacter* sp y *Citrobacter amalonaticus* aisladas de pacientes hospitalizados en UCIs de Río de Janeiro (51). Además, nuevos tipos de BLEE se han reportado en esta región como la enzima TLA-1 encontrada por primera vez en México a finales de los 90s en un aislamiento de *E. coli* (52). La enzima GES-1 fue encontrada en un aislamiento de *K. pneumoniae* de una paciente pediátrica en la Guayana francesa (53), y BES-1 de un aislamiento de *S. marcescens* de un hospital de Río de Janeiro (54). En Colombia en 2003 fue descrita CTX-M-12 producida por cepas de *K. pneumoniae* (55). En 2005 en Uruguay fue identificada TEM-144 en un aislamiento de *S. enterica* (56).

Las BLEE son un problema de salud pública con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil (57, 58). La producción de BLEE en estos países mostraron variaciones marcadas de un país a otro, con rangos entre un 5% a 73% (58) (Tabla 2). Las enzimas más comúnmente encontradas en Latinoamérica son SHV-2, SHV-4, SHV-5, CTX-M-2, CTX-M-8 y PER-2 (47-48, 59) (Tabla 3).

En Colombia la prevalencia de BLEE de acuerdo con Villegas *et al* (19) se encuentra por enzima del 40%. Adicionalmente, estudios realizados en la costa atlántica colombiana han mostrado prevalencias del 37.6% en *Enterobacteriaceae* y del 47.6% en los nofermentadores (38% en *P. aeruginosa* y 63% en *A. baumannii*) (20, 72). En la zona andina colombiana se han encontrados prevalencias más bajas entre un 10-13% para *E. coli* y del 30% para *K. pneumoniae* (21).

En América del Norte, la prevalencia de BLEE entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* se encuentra en un rango de 5-10% (*E. coli* 7.5% y *K. pneumoniae* 12.3%) (2). Los tipos de enzimas más frecuentes en esta región son TEM-26, TEM-6, TEM-10 y TEM-12 (45, 57, 73).

Tabla 2**Prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* en Latinoamérica (58)**

País	MICROORGANISMOS		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	β -lactamasa
Argentina	57%	5%	SHV-2, -5, CTX-M-2, PER-2
Brasil	38%	12%	CTX-M-8, SHV-5
Chile	73%	22%	SHV-5, -2
Colombia	44%	27%	SHV-5, -2, CTX-M-12
Costa Rica	32%	7%	SHV-5, -4
Ecuador	26%	27%	SHV-5, -4
Guatemala	52%	27%	SHV-5, -4
México	56%	28%	TLA-1, SHV-5, -12
Perú	*	63%	SHV-2, -5, -12
Uruguay	38%	7%	SHV-5, -2, TEM-144
Venezuela	63%	32%	SHV-5, SHV-2

* Mendes *et al.* (58) no reportaron prevalencia. Las enzimas SHV, CTX-M y PER son prevalentes en Latinoamérica (47-59).

En el Pacífico Occidental la prevalencia de BLEE es del 28.2% para *K. pneumoniae* y 14.2% para *E. coli* (2). Los tipos de BLEE predominantes son SHV-2, SHV-5, SHV-12, TOHO-2, PER-1, TEM-52 (74, 75).

Adicionalmente, la prevalencia de BLEE en Europa según lo informado por el SENTRY es del 22.6% para *K. pneumoniae* y del 5.3% para *E. coli*, estos datos son similares a lo informado en otros estudios europeos (74, 75). Es importante destacar que en Europa se encuentran prevalentemente las BLEE SHV-5, TEM-3, TEM-4, TEM-48 y CTX-M-4 (45, 76).

Las BLEE producidas por bacilos gram-negativos son debidas entre otras causas a la excesiva administración de las cefalosporinas de tercera generación (77, 78). Los factores de riesgo para la aparición de bacterias productoras de BLEE incluyen la administración previa de las cefalosporinas de amplio espectro y aminoglicosidos, estancia hospitalaria prolongada, estancia en UCI, cateterización urinaria y severidad de las infecciones (14, 79-83).

Epidemiología molecular de las BLEE. La tipificación molecular es indispensable en el control epidemiológico de las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE. La técnica más utilizada sigue siendo la electroforesis de campo pulsado (PFGE) y se le considera la prueba de oro para el seguimiento de los brotes causados por microorganismos productores de BLEE a nivel hospita-

rio por que permite demostrar la transmisión clonal de forma horizontal. Otros autores (84) han utilizado la rep-PCR y ERIC-PCR con cebadores arbitrarios que muestran secuencias palindromicas repetitivas del ADN, y han demostrado que los resultados son comparables con la PFGE ya que son reproducibles y con buena concordancia. En bacterias que poseen integrones de clase I recientemente se ha estudiado la posibilidad de utilizar este marcador como una técnica de tipificación y seguimiento (*integrontyping*) (85). También se han utilizado el *ribotyping* y la amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD) y el análisis multi-enzimático (86). El empleo de estas técnicas moleculares ha permitido establecer en muchos casos la fuente exacta de los brotes (87, 88).

La importancia de la genotipificación quedo demostrada con claridad en un brote hospitalario en el cual los métodos clásicos microbiológicos y epidemiológicos fueron débiles, comparados con las técnicas moleculares de seguimiento molecular epidemiológico (89). En resumen, actualmente la PFGE, rep-PCR y recientemente la tipificación por integrones (85) son indispensables para caracterizar brotes por gérmenes productores de BLEE, algunos son mas costosos que otros pero son imprescindibles para el estudio de estas infecciones.

Tabla 3

**β -lactamasas de espectro extendido en la familia TEM, SHV, CTX-M
y otras nuevas familias de β -lactamasas**

β -LACTAMASA	MICROORGANISMO	PAÍS DE ORIGEN	AÑO DE AISLAMIENTO	CIM (μ G/ ML)				Ref
				CAZ	CTX	AZT	IMP	
TEM-3	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1984	64	32	16	< 0,5	60
TEM-6	<i>E. coli</i>	Alemania	1987	128	1	64	< 0,5	61
TEM-10	<i>K. pneumoniae</i>	EE.UU	1989	64	1	32	< 0,5	62
TEM-12	<i>E. coli</i>	EE.UU	1987	4	0,06	0,25	< 0,5	63
TEM-26	<i>K. pneumoniae</i>	EE.UU	1988	256	1	32	< 0,5	64
TEM-48	<i>K. pneumoniae</i>	Polonia	1995	128	32	128	< 0,5	76
TEM-52	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1997	64	32	16	> 0,5	65
TEM-144	<i>S. enterica</i>	Uruguay	2005	128	2	32	< 0,5	56
SHV-2	<i>K. ozaenae</i>	Alemania	1983	16	32	32	< 0,5	66
SHV-4	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1987	128	128	256	< 0,5	67
SHV-5	<i>K. pneumoniae</i>	Chile	1987	128	64	256	< 0,5	47
SHV-12	<i>K. pneumoniae</i>	Suiza	1996	> 128	32	> 128	< 0,5	68
CTX-M-2	<i>S. typhimurium</i>	Argentina	1989	2	256	32	< 0,5	49
CTX-M-4	<i>S. typhimurium</i>	Rusia	1998	2	512	32	< 0,5	69
CTX-M-8	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> <i>C. amalonaticus</i>	Brasil	1997	1	16	32	< 0,5	51
CTX-M-12	<i>K. pneumoniae</i>	Kenia	2000	0,5	32	2	< 0,5	70
TOHO-2	<i>E. coli</i>	Japón	1995	4	> 512	256	< 0,5	71
PER-2	<i>S. typhimurium</i>	Argentina	1993	64	64	64	2	50
TLA-1	<i>E. coli</i>	México	1998	> 256	> 256	> 256	1	52
BES-1	<i>S. marsecens</i>	Brasil	1999	4	64	512	< 0,5	54
GES-1	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1998	4	0,5	< 0,5	< 0,5	53

CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; AZT: aztreonam; IMP: imipenem.

ESTRATEGIAS PARA ENFRENTAR Y CONTROLAR LAS BLEE

Es importante que los clínicos reconozcan las diferentes clases y tipos de β -lactamasas existentes para que se les facilite entender los informes de los laboratorios clínicos sobre BLEE y también que la utilización de cefalosporinas de tercera generación ejerce una presión importante en las bacterias Gram negativas. Esto último genera un problema en Latinoamérica, ya que el 50% de las infecciones hospitalarias son tratadas con antibióticos beta-lactámicos y cerca del 70% de las infecciones de los pacientes extrahospitalarios son tratados con cefalosporinas, lo que sugiere la existencia de una fuerte presión selectiva en esta zona de América (90,91).

Un estudio de Paterson (92), informó que > 50% de las bacteriemias causadas por *K. pneumoniae* tratadas con cefalosporinas de tercera generación presentaron fallas terapéuticas en la respuesta clínica. De forma similar Emery *et al* (93), informaron que el 60% de los pacientes con bacteriemias causadas por *K. pneumoniae* y tratadas con ceftazidima o terapia combinada con aminoglicosidos fallecieron. En una reciente revisión (83) mostraron mortalidades entre el 6% y el 70% en diferentes estudios de pacientes principalmente con bacteriemias por *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Un informe de Urban *et al* (94) en un hospital de Nueva York asoció la disminución de BLEE en *K. pneumoniae* en un 44% en todo el hospital y 87% en la UCI con la restricción de las cefalosporinas de

tercera generación, pero se produjo un brote de *A. baumannii* resistente a imipenem. Meyer *et al* (85), informaron un brote que involucró a 155 pacientes, en el cual todos aquellos pacientes que recibieron terapia empírica con cefalosporinas de amplio espectro fallecieron. De igual forma Naumovski *et al* (96), comunicaron un brote entre 13 pacientes hospitalizados en una unidad oncológica de niños, de la cual dos pacientes fueron tratados con cefalosporinas de tercera generación y fallecieron.

De otra parte, Rice *et al* (97), informaron un brote causado por *K. pneumoniae* resistente a ceftazidima productora de BLEE tipo TEM-6 en un hospital de Cleveland que fue controlado con gran éxito por la sustitución de la terapia empírica de ceftazidima por piperacilina/tazobactam, esto conllevó a la rápida disminución de la incidencia de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a ceftazidima en ese hospital. La disminución en las tasas de resistencia a ceftazidima seguidas del cambio del uso de ceftazidima por piperacilina/tazobactam, también ha sido confirmada por otros investigadores (77, 82, 83, 95, 98).

Las estrategias en algunos hospitales de EE.UU como el hospital universitario de Cleveland, comienzan extra-hospitalariamente con el uso de ampicilina/sulbactam en la mayoría de las infecciones, así, la infección urinaria se trata con ampicilina y gentamicina (comunicación personal de los autores). A nivel nosocomial, las infecciones pulmonares y abdominales se tratan con piperacilina/ tazobactam. El uso de las cefalosporinas está bien limitado, solo se utilizan ceftriaxona en las meningitis y cefepime en fiebres neutropénicas. En este hospital, cuando el laboratorio reporta un germen productor de BLEE se utilizan los carbapenems en primera instancia y como segunda opción piperacilina/ tazobactam, cefepime es usado cuando se tiene un germen productor de enzimas AmpC como *Enterobacter* y *Serratia*. Es importante aclarar que EE.UU no posee tasas altas de microorganismos productores de BLEE como las de Colombia y Latino América.

Los reportes en la literatura no son concluyentes para determinar si la restricción de las cefalosporinas de tercera generación es suficiente para controlar las infecciones causadas por organismos productores de BLEE (99). Variables como la endemicidad de organismos productores de BLEE en los hospitales puede incrementar los índices de mor-

talidad cuando antibióticos β -lactámicos son usados (99). La consecuencia de la endemicidad de los aislamientos de gram-negativos productores de BLEE podría deberse al cambio de régimen terapéutico empírico de imipenem, quinolonas, o β -lactámicos en combinación con inhibidores de β -lactamasas. Este cambio de régimen ha ocasionado la emergencia de resistencia en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* a carbapenems (12). Otros autores consideran que es útil el uso de cefepime como estrategia eficaz en el tratamiento de las infecciones causadas por gérmenes productores de BLEE como *E.coli* y *K. pneumoniae* ya que desde el punto de vista fármaco-dinámico mantiene mejor actividad que piperacilina & tazobactam (100). No obstante, reemplazar las cefalosporinas de tercera generación por cefepime (82) se podría en cierta forma cambiar de problema y en corto tiempo se tendría una epidemia de microorganismos productores de AmpC. Adicional a este aspecto, existe la preocupación, en Colombia sobre el uso de cefepime para tratar gérmenes productores de BLEE, debido a la importante prevalencia que existe de bacterias con enzimas tipo CTX (72, 82, 101). También es importante tener en cuenta que en Colombia ya coexisten gérmenes productores de carbapenemasas (102), y para combatirlos se tienen solamente el resurgimiento de los "viejos" antibióticos como las polimixinas y sinergias inusuales como rifampicina e imipenem (103, 104).

En Colombia sin embargo, no existen estudios sobre experiencias de abordar este problema con sustitución y/o rotación de antibióticos, cohortes con estudios controlados que demuestren cual sería la mejor opción en nuestro medio. Desconocemos si el cambio de piperacilina/ tazobactam, y cefepime por las cefalosporinas de tercera generación podría resultar beneficioso, ni como se encuentra la prevalencia de BLEE en la comunidad ni mucho menos sabemos si existe movilidad de elementos genéticos entre las bacterias aisladas de animales, alimentos y humanos.

CONCLUSIONES

Las BLEE son una sana respuesta de los microorganismos a un ambiente hostil y es una de las causas de la emergencia de las BLEE por el excesivo uso a nivel hospitalario de las cefalosporinas de tercera

generación. A nivel de laboratorio, existen un buen desarrollo con las técnicas de detección y es posible conocer de cerca los genes de resistencia. No obstante, el tratamiento de los gérmenes productores de BLEE es controvertido y su significancia clínica todavía no es clara (100, 105), sin embargo, parece existir un consenso de los expertos para el control de las BLEE en los siguientes puntos: i. restricción de cefalosporinas de tercera generación ii. carbapenems como la terapia de elección para el tratamiento de los gérmenes productores de BLEE iii. uso combinado de beta-lactámicos con inhibidores de β -lactamasas iiiii. uso de cefepime para microorganismos productores de AmpC. La aplicación de estas medidas influirá sin duda en un descenso marcado de la prevalencia de las BLEE en Colombia, la pregunta es, ¿cuando empezamos?

Agradecimientos

Los autores no poseen ningún conflicto de interés con compañía farmacéutica alguna. Este trabajo hace parte del entrenamiento (fellowship) otorgado a S. Mattar, por la Universidad de Córdoba, para la investigación sobre resistencia a antibióticos en Case Western Reserve University, Cleveland OH. A Michael Jacobs MD, Ph.D, de University Hospital of Cleveland por sus valiosos comentarios y críticas a este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Paterson D, Bonomo R. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical Up-date. Clin Microbiol Rev 2005;18:657-686.
2. Turner P. Extended-spectrum- β -lactamases. Clin Infect Dis 2005;15 (Suppl 4):273-275.
3. Gardner P, Smith D, Beer H, Moellering R. Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. Lancet 1969;2:774-776.
4. Pitton J. Mechanism of bacterial resistance to antibiotics. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1972;65:15-93.
5. Knothe H, Shah V, Kremery M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftioxin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983;11:315-317.
6. Jacoby G. β -lactamase nomenclatura. Antimicrob Agent Chemother 2006;50:1123-1129.
7. Ambler R, Coulson A, Frere J, Ghuyens J, Joris B, Forsman M, Levesque R, Tiraby G, Waley S. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. Biochem J 1991;276:269-270.
8. Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordman P. Metallo- β -Lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005;18:306-325.
9. Jacoby G, Munoz S. The new β -lactamases. N Engl J Med 2005;352:380-391.
10. Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-1233.
11. Brown S, Amyes S. OXA β -Lactamases in *Acinetobacter baumannii*: the story so far. J Antimicrob Chemother 2006;57:1-3.
12. Thomson J, Bonomo R. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!. Current Opinion in Microbiology 2005;8:518-524.
13. Weldhagen G. Integrons and β -Lactamases a novel perspective on resistance. Internal J Chemother 2004;23: 556-562.
14. Pfaller M, Sagreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum- β -lactamasas. Clin Infect Dis 2006; 42:S153-S163.
15. Hujer M, Hamza N, Hujer M, Perez F, Helfand S, Bethel C. Identification of a new allelic variant of *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -Lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2941-2948.
16. Fournier P, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Plos Genet 2006; 2:1-10.
17. Paterson D, Yu V. Extended spectrum β -lactamases: a call for improved detection and control [editorial]. Clin Infect Dis 1999; 29:1419-1422.
18. Bantar C, Famiglietti A, Goldberg M. Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group. Int J Infect Dis 2000;4:85-90.
19. Villegas M, Correa A, Perez F, Miranda M, Zuluaga T, Quinn J. Colombian Nosocomial Resistance Study Group. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49:217-222.
20. Espinal P, Martínez P, Bustos A, Guijarra E, Marín A, Máttar S. Fenotipos de resistencia en cepas productoras de BLEE de origen nosocomial en dos Hospitales del Caribe Colombiano. Infectio [Resumen]. 2004;8:142.
21. Villegas MV. 2004. Epidemiology of nosocomial gram (-) bacteria in Colombia: an update. 3rd International Symposium on Antimicrobial Resistance. Cartagena, 2004.
22. Jarlier V, Fournier N, Philippon A. Extended broad-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.
23. Puerta H, Cantillo C, Consuegra C, Coronel W, Alvis N, Mattar S. Capacidad de los laboratorios de microbiología clínica de cartagena para detectar microorganismos productores de β -lactamasa de espectro extendido. *Infectio* 2005;9:123-130.
 24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Informational 8th ed. Supplement M100-S15 document M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Informational. 6th ed. Approved standard M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
 26. Tzelepi E, Sofianou G, Loukova V, Kermeroglu 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.
 27. Thompson K, Sanders C. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: Comparison of the double-disk and three-dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877-1882.
 28. Bradford P, Urban C, Mariano N, Projan S, Rahal J, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:563-569.
 29. Rice L, Carias L, Hujer A, Bonfede M, Hutton R, Huyen C, Bonono R. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:362-367.
 30. M'Zali F, Chanawong A, Kerr K, Birkenhead D, Hawkey P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:881-885.
 31. Carter M, Oakton K, Warner M, Livermore D. detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid combination disk method. *J Clin Microbiol* 2000;38: 4228-4232.
 32. Thomson K, Sanders C, Moland E. Use of microdilution panels with and without β -lactamase inhibitors as a phenotypic test for β -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1393-1400.
 33. Cormican M, Marshall S, Jones R. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol* 1996;34:1880-1884.
 34. Sanders C, Peyret M, Moland E, Shubert C, Thomson K, Boyufgras J, Sanders W Jr. Ability of the VITEK 2 advanced expert system to identify β -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2000;38:570-574.
 35. Oliver A, Perez J, Coque T, Baquero F, Cantón R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:616-620.
 36. Bonnet R, Sampaio J, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1936-1942.
 37. Bauerfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernest S, Casellas J. Sequence of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:509-513.
 38. Nuesch M, Hachler F. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the Etest. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996;15:398-402.
 39. Arlet G, Brami G, Decrere D, Flippo A, Galtot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterization by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol [Letter]* 1995;134:1498-1500.
 40. M'Zali F, Gascoyne-Binzi D, Heritage J, Hawkey P. Detection of mutations conferring extended-spectrum β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 1996;37:797-802.
 41. Kim J, Lee H. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1860-1864.
 42. Hammond D, Schooneveldt J, Nimmo G, Huygens F, Giffard P. *bla*_{SHV} Genes in *Klebsiella pneumoniae*: Different Allele Distributions Are Associated with Different Promoters within Individual Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49:256-263.
 43. Bradford P. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*_{SHV} genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 2960-2963.
 44. Schwaber M, Navon S, Kaye K, Ben R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and Economic Impact of Bacteremia with Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agent Chemother* 2006;50:1257-1262.
 45. Bradford P. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemiology, and detection of this important resistant Threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:933-951.
 46. Coelho J, Woodford N, Afzal M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agent Chemother* 2006; 50: 756-758.
 47. Gutmann L, Ferré B, Goldstein F, Rizk N, Pinto E, Acar J, Collatz E. SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:951-956.
 48. Casella J, Goldberg M. Incidence to strains producing extended spectrum β -lactamases in Argentina. *Infection* 1989;17:434-436.
 49. Bauernfeind A, Casellas J, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Pohnisch T, Schweighart S, Wilhelm R. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992;20:158-163.
 50. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, Ang O, Bal C, Casellas J. Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2'} which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:616-620.
 51. Bonnet R, Sampaio J, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1936-1942.
 52. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada M, Garza R, Lara L, Ledesma L. TLA-1, a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob agents Chemother* 2000; 44:997-1003.
 53. Poirel L, Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:622-632.
 54. Bonnet R, Sampaio J, Chanal C, Sirot D, Champs C, Viallard J, Labia R, Sirot J. A Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3061-3068.
 55. Villegas M, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, Casellas J, Ayala J, Lolans K, Quinn J. CTX-M-12 β -Lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:629-631.

56. Vignoli R, Cordeiro N, Garcya V, Mota M, Betancor L, Power P, Chabalgoity J, Schelotto F, Gutkind G, Ayala J. New TEM-Derived Extended-Spectrum- β -Lactamase and Its Genomic Context in Plasmids from *Salmonella enterica* Serovar Derby Isolates from Uruguay. *Antimicrob agent Chemother* 2006;50:781-784.
57. Winokur P, Canton R, Casellas J, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype of isolates from Europe the Americas and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis* 2001;32(Suppl 2):S94-S105.
58. Mendes C, Rossi A, Prado V, Zurita J, Robledo J, Guzman M, Colichon A, Sifuentes J, Pedreira W, Herrera M, Mejia-Villatoro C, Orantia R. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The resinet Group. summaries of the IDSA 37 Annual Meeting Philadelphia, PA, 1999; p57 [Abstract 99].
59. Mantilla J, Valenzuela E, Gil C, Leal A, Espinal P, Saavedra C, Olarte N. Caracterización molecular de *K. pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) del tipo CTX-M-12. *Infectio [Resumen]* 2004;8:143.
60. Brun C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistant to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987;2:302-306.
61. Baurnefeind A, Horl G. Novel R-factor borne beta-lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection* 1987;15:257-259.
62. Quinn J, Miyashiro D, Sham D, Flamm R, Bush K. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 1989;33:1451-1456.
63. Weber D, Sanders C, Bakken J, Quinn J. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 1990;162:460-465.
64. Rice L, Willey S, Papanicolaou G. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum-beta-lactamases at Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2193-2199.
65. Poyart C, Mugnier R, Quesees G, Berche R, Trieu-Cuot P. A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamases (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:108-113.
66. Kliebe C, Nies B, Meyer J, Tolxdorff R, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob agents Chemother* 1985;28:302-307.
67. Bure A, Legrand P, Arlet G, Jarlier V, Paul G, Philippon A. Dissemination in five french hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harboring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7:780-782.
68. Nuesch-Inderbinen M, Kayser F, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:943-949.
69. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko S, Tzouveleki L. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:1259-1262.
70. Kariuki S, Corkill J, Revathi G, Musoke R, Hart C. Molecular Characterization of a Novel Plasmid-Encoded Cefotaximase (CTX-M-12) Found in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2141-2143.
71. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1181-1186.
72. Martínez P, Mercado M, Máttar S. Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb Med* 2003;34:130-139.
73. Bradford P, Cherulin C, Idemyor V, Rasmussen B, Bush K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime hydrolyzing β -lactamases in single isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:761-766.
74. Paterson D, Mulazimoglu L, Casellas J, Ko W, Goznes H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme G, Klugman K, McCormack J, Yu V. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000;30:473-478.
75. Sader H, Pfaller M, Jones R, Doren G, Gales A, Winokur P, Kugler K. 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.
76. Gniadkowski M, Shneider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauerfeind A. Ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM and SHV-5 type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:514-520.
77. Bantar C, Vesco E, Heft C, Salamone F, Krayeski M, Gómez H, Coassolo M, Fiorillo A, Franco D, Arango C, Duret F, Oliva M. Replacement of Broad-Spectrum Cephalosporins by Piperacillin-Tazobactam: Impact on Sustained High Rates of Bacterial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:392-395.
78. Landman D, Chockalingam M, Quale J. Reduction in the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* following changes in a hospital antibiotic formulary. *Clin Infect Dis* 1999;28:1062-1066.
79. Rice L. Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum β -lactam antibiotics. *Pharmacotherapy* 1999; 19:120S-128S.
80. Patterson J, Hardin T, Kelly C, Garcia R, Jorgensen J. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:455-458.
81. Bantar C, Sartori B, Vesco E, Heft C, Saul M, Salamone F, Oliva M. A hospitalwide intervention program to optimize the quality of antibiotic use: impact on prescribing practice, antibiotic consumption, cost savings, and bacterial resistance. *Clin Infect Dis* 2003;37:180-186.
82. Owens R, Rice L. Hospital-based strategies for combating resistance. *Clin Infect Dis* 2006; 42: S173-S181.
83. Ramphal R, Ambrose P. Extended-spectrum β -lactamasas and clinical outcomes:current data. *Clin Infect Dis* 2006; 42:S164-S172.
84. Liu P, Wu W. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:19-28.
85. Turton J, Kauffmann M, Glover J, Coelho J, Warner M, Pike R et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kindom. *J Clin Microbiol* 2005;43:3074-3082.
86. D'Agata E, Venkataraman L, D'Girolami P, Weigel L, Samore M, Tenover F. The molecular and clinical epidemiology of enterobacteriaceae-producing extended-spectrum β -lactamase in a tertiary care hospital. *J Infect* 1998;36:279-285.

87. Cotton M, Wasserman E, Pieper C, Theron D, Tubbergh D, Campbell G, Fang FC, Barnes J. Invasive disease due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: the possible role of cockroaches. *J Hosp Infect* 2000;44:13-17.
88. Gailliot O, Maruejols C, Abachin E, Lecuru F, Arlet G, Simonet M, Berche P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1357-1360.
89. Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2005;11:22-29.
90. Bhavnani S, Hammel J, Forrest A, Jones R, Ambrose P. Relationships between patient- and institution-specific variables and decreased antimicrobial susceptibility of gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 2003;37:344-350.
91. Cosgrove S, Carmeli Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin Infect Dis* 2003;36:1433-1437.
92. Paterson D. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases. Implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;39:2206-2212.
93. Emery C, Weymouth L. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary medical center. *J Clin Microbiol* 1997;35:2061-2067.
94. Urban C, Meyer K, Mariano N, Rahal J, Flamm R, Rasmussen B, Bush K. Identification of TEM-26 β -lactamase responsible for a major outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:392-395.
95. Meyer K, Urban C, Eagan J, Berger B, Raha J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med* 1993;119:353-358.
96. Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro D, Patel M, Bush K, Singer S, Graves D, Palzkill T, Arvin A. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1991-1996.
97. Rice LB, Eckstein EC, DeVente J, Shlaes DM. Ceftazidime-resistance *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. *Clin Infect Dis* 1996;23:118-124.
98. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:53-58.
99. Rahal J, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal S, Maurer J, Mariano N, Marks S, Burns J, Dominick D, Lim M. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA* 1998; 280:1233-1237.
100. Petros A, O'Connell M, Roberts C, Wade P, Hendrick K, Sacne V. Systemic antibiotics fail to clear multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from a pediatric ICU. *Chest* 2001;119:862-866.
101. Martínez P, Espinal P, Bustos A, Mattar S. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería *MedUNAB* 2005; 8:15-22.
102. Martínez P, Máximo M, Máttar S. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productores de Metalo- β -lactamasas en el principal Hospital de Córdoba. *Infectio* 2005; 9:6-15.
103. Morales R. Terapia de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil Infect* 2003; 20 (Supl 1):S24-S27.
104. Falagas M, Kasiakou S. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old recent studies. *Critical Care* 2006;10: R27.
105. Paterson D, Singh N, Rihs J, Squier C, Rihs B, Muder R. Control of an outbreak of infection due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit. *Clin Infect Dis* 2001; 33:126-128.