

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE BANDAS PLASMÍDICAS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTE AISLADAS DE DIFERENTES CENTROS HOSPITALARIOS DE MEDELLÍN, COLOMBIA

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND PLASMIDIC PATTERN OF MULTI-RESISTANCE *Klebsiella pneumoniae* IN ISOLATES FROM DIFFERENT HOSPITALS IN MEDELLÍN, COLOMBIA

María Elena Vásquez¹, Margarita Correa², Johana Estrada², Laura Castañeda² y María Néifer Moreno³

Resumen

Klebsiella spp, en particular *Klebsiella pneumoniae*, es causa importante de infección nosocomial. Este microorganismo es con frecuencia resistente a numerosos antibióticos, incluyendo las recientes oxy-imino-cefalosporinas, mediante la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Se recolectaron 32 aislamientos de *K. pneumoniae*, resistentes por lo menos a tres grupos diferentes de antibióticos, en cuatro hospitales de tercer nivel de complejidad de la ciudad de Medellín, con el fin de biotipificarlos, establecer su perfil de sensibilidad y determinar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y su patrón de bandas plasmídicas. La identificación bioquímica y las pruebas de sensibilidad se determinaron en el sistema Micro Scan. La producción de BLEE se detectó por el método de sinergismo de doble disco, y el perfil de bandas plasmídicas se determinó con el kit plasmid minipreparation de QIAGEN y se observó por electroforesis.

Los resultados demostraron que *K. pneumoniae* nosocomial es más frecuente en salas pediátricas (48.8%, 14/32). Las pruebas de susceptibilidad mostraron que 100% de los aislamientos son resistentes a piperacilina y ampicilina y sensibles a ciprofloxacina, ofloxacina, cefotetan e imipenem. La sensibilidad para los demás antibióticos probados fue variable. El 18.8% de los aislamientos presentó sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación. Se identificaron nueve biotipos diferentes, aunque 81% de los 32 aislamientos pertenecieron sólo a tres biotipos. Se observó alto porcentaje de aislamientos productores de BLEE (65.6%). El perfil de bandas plasmídicas mostró ocho patrones diferentes y una banda común. Estos resultados hacen necesario incrementar políticas de control en el uso de antibióticos para limitar la presión selectiva en la flora intrahospitalaria en las instituciones estudiadas.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, multirresistencia, β -lactamasas de espectro extendido, biotipo, perfil de bandas plasmídicas.

Abstract

Klebsiella spp, and in particular *K. pneumoniae*, is an important cause of nosocomial infection. In many occasions this microorganism is resistant to several antibiotics, including the new oxy-imino-cephalosporins, by means of extended-spectrum β -lactamase's production (ESBL). Thirty-two isolates of *K. pneumoniae*, resistant at least to three different groups of antibiotics, were collected in four hospitals of high level complexity in Medellín (Colombia). The isolates were bio-typed, their susceptibility profile and production of β -lactamase of extended spectrum, as well as the plasmid band pattern determined. The biochemical identification and the susceptibility test were done in the Micro Scan system. The productions of ESBL was done using the QIAGEN micro-preparation plasmid kit, and evaluated by agarosa gel electrophoresis.

The results showed that nosocomial infection by *K. pneumoniae* is having a higher frequency in pediatric wards (48.8%, 14/32). The susceptibility test showed that all the isolates were resistant to piperacillin and ampicillin and susceptible to

Recibido: marzo de 2003; aprobado para publicación: junio de 2003.

¹ Recibido: marzo de 2003; aprobado para publicación: junio de 2003. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. E-mail: evasquez@catios.udea.edu.co.

² Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia, Medellín. E-mail: mcorrea@quimbaya.udea.edu.co.

³ Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. E-mail: neifer@catios.udea.edu.co.

ciprofloxacin, ofloxacin, cefotetan and imipenem. The susceptibility to the other tested antibiotics was variable. The isolates showed a susceptibility of 18.8% to the cephalosporins of third generation. Several new bio-types were identified, although 81% of the 32 analyze isolates belonged to only three bio-types. A high percentage of isolates expressing ESBL was observed (65.6%). The plasmid band profile showed eight different patterns and one common band. These results show the necessity of increasing the regulations for the control and use of antibiotics, so the selective pressure of the intra hospital flora would be restricted.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, multiresistent, extended spectrum β -lactamase, biotype, plasmidic band profiles.

INTRODUCCIÓN

Klebsiella spp, en particular *Klebsiella pneumoniae*, es causa importante de infección nosocomial (Abott, 1999). Las infecciones por *K. pneumoniae* se presentan en cualquier parte del cuerpo, pero la mayor incidencia ocurre en los tractos urinario y respiratorio. La población de alto riesgo para adquirir estas infecciones son los pacientes inmunocomprometidos, los neonatos, los pacientes con cirugía previa, y con diabetes y cáncer, presentándose mayor riesgo en aquellos con hospitalización prolongada que reciben terapia antimicrobiana con antibióticos de amplio espectro y tratamiento en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Hansen *et al.*, 1999; Podschun y Ullmann, 1998).

Este microorganismo es con frecuencia resistente a numerosos antibióticos, incluyendo las recientes oxy-imino-cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona, cefpirome y cefepime) y aztreonam, por adquisición de plásmidos que codifican la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Chevalier *et al.*, 2000; Drusano, 1998; Li y Lin, 2000; Kokler *et al.*, 1999; Nordmann, 1998; Pitout *et al.*, 1998). Entre los bacilos gramnegativos entéricos, las especies de *Klebsiella* son las que con mayor frecuencia exhiben resistencia múltiple a antibióticos (Sirot *et al.*, 1991).

En 1990 más de 90% de los aislamientos de *K. pneumoniae* en el mundo fueron resistentes a cefalosporinas y aminoglicósidos (Li y Lin, 2000). En Europa, Norteamérica, Asia, región del Pacífico, África y Oceanía se han descrito muchos patrones de resistencia múltiple a antibióticos en *K. pneumoniae*, así como también la producción de BLEE (Arakawa *et al.*, 2000; Arlet *et al.*, 1994; Bradford *et al.*, 1994; Branger *et al.*, 1998; Brun-Buisson *et al.*, 1987; Decré *et al.*, 1998; Eltahawy,

1997; George *et al.*, 1995; Gouby *et al.*, 1994; Li y Lin, 2000; Parasakthi *et al.*, 1999; Sirot *et al.*, 1991, 1992; Yagi *et al.*, 2000; Yung-Fong Liu *et al.*, 1998). La primera fase del proyecto Artemis, un estudio global de vigilancia in vitro de la resistencia, con la participación de diez países latinoamericanos, reportó que entre 40 y 60% de las cepas de *K. pneumoniae* son resistentes a las nuevas penicilinas, a las cefalosporinas de segunda y tercera generación, así como también a los inhibidores de las β -lactamasas (Orrantia *et al.*, 1998). En nuestro país, la sensibilidad reportada para *K. pneumoniae* es muy variable para cefalosporinas de tercera generación (62 a 77%), amikacina (65 a 95%) y aztreonam (60 a 74%) (Castañeda *et al.*, 2000; Crespo y Vélez, 1998, 2000; Robledo y Robledo, 1999). Estos datos sugieren la presencia en nuestro medio de *K. pneumoniae* resistente a múltiples antibióticos, lo cual es el reflejo local del problema creciente en el ámbito mundial.

La resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *K. pneumoniae* es mediada principalmente por plásmidos, casi todos agrupados como β -lactamasas TEM o SHV, que portan adicionalmente genes de resistencia a otros medicamentos tales como aminoglicósidos, cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim y tetraciclinas, hecho que limita la elección de terapias alternativas.

K. pneumoniae es, entre los gramnegativos, la especie que con mayor frecuencia se reporta como productora de BLEE (Eltahawy, 1997; Hori *et al.*, 1993; Jacoby y Han, 1996; Jacoby y Medeiros, 1991). La colonización por cepas de *K. pneumoniae* multirresistente productoras de BLEE es un fenómeno complejo que involucra diferentes mecanismos, tales como diseminación

de varias cepas epidémicas, de plásmidos o de genes de resistencia, o diseminación concurrente de cepas, plásmidos y genes (Eisen *et al.*, 1995; Gouby *et al.*, 1994; Jacoby y Han, 1996; Jacoby y Medeiros, 1991; Liu *et al.*, 1998; Papanicolaou *et al.*, 1990; Shannon *et al.*, 1998; Yung-Fong Urban *et al.*, 1994).

La detección *in vitro* de la expresión de BLEE es difícil con la utilización de métodos convencionales de susceptibilidad, porque muchas de las cepas resistentes a los β -lactámicos más utilizados como cefotaxime y ceftriaxona son reportadas como sensibles (Emery y Weymouth, 1997; Katsanis *et al.*, 1994), por lo que es necesario utilizar métodos específicos para la detección de estas enzimas, tales como la prueba de sinergismo de doble disco, el E-test o la prueba de tercera dimensión (Horii *et al.*, 1993; Livermore, 1995; Vercauteren *et al.*, 1997).

La habilidad para rastrear o involucrar a *K. pneumoniae* en brotes nosocomiales se ha convertido en un problema para los laboratorios clínicos. La utilización de varios métodos de tipificación para establecer si una serie de aislamientos bacterianos están relacionados es de utilidad para estudios epidemiológicos de brotes y dispersión nosocomial de cepas. La tipificación con sistemas de identificación fenotípicos, disponibles comercialmente, tales como el perfil de sensibilidad a antibióticos y los patrones de actividad metabólicos, no son satisfactorios para discriminar entre los aislamientos, a menos que un marcador o perfil poco común esté presente; por lo que se hace necesaria la utilización de técnicas basadas en el estudio genético. El análisis del perfil de bandas plasmídicas es, en estos casos, de mucha aplicabilidad, ya que permite obtener una evaluación epidemiológica útil para determinar diferencias o semejanzas entre los aislamientos sometidos a estudio; sin embargo, ninguno de estos métodos permite determinar origen clonal (Arbeit, 1999; Jalaluddin *et al.*, 1998; Liu Yue *et al.*, 1997; Podschun y Ullmann, 1998).

En Colombia, y en particular en Medellín, son pocos los trabajos realizados para estudiar el com-

portamiento del fenómeno de multirresistencia de este importante patógeno nosocomial (Castañeda *et al.*, 2000; Crespo y Vélez, 1998, 2000; Robledo y Robledo, 1999; Sánchez *et al.*, 1998). Como hemos visto, durante las últimas décadas han emergido en el mundo cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes que producen BLEE, y la emergencia de dichas cepas tiene importantes implicaciones clínicas y terapéuticas. Por lo anterior nos propusimos caracterizar fenotípicamente y determinar el perfil de bandas plasmídicas de aislamientos de *K. pneumoniae* multirresistentes provenientes de diferentes centros hospitalarios de Medellín, mediante la biotipificación de los aislamientos, el establecimiento del patrón de susceptibilidad, la determinación de la producción de β -lactamasas de espectro extendido y la definición del perfil de bandas plasmídicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos. Entre octubre de 1999 y agosto de 2000 se recolectaron 32 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes por lo menos a tres grupos diferentes de antibióticos, no duplicados (un aislamiento por cada paciente), en cuatro hospitales de tercer nivel de complejidad de la ciudad de Medellín: Universitario San Vicente de Paúl (HUSVP), Pablo Tobón Uribe (HPTU), General de Medellín (HGM) y Clínica Las Américas (CLA). Siete de los aislamientos se obtuvieron a partir de sangre, diez de orina, dos de catéter, uno de bilis, tres de esputo, dos de lavado bronquial, cinco de material purulento, uno de sonda gástrica y uno de lavado peritoneal. De los aislamientos estudiados no fueron considerados, para el presente estudio, la información clínica ni su interpretación como infección, colonización o contaminación. Los aislamientos se obtuvieron a partir de pacientes que se encontraban en diferentes salas: dos en unidad renal, catorce en sala de pediatría (lactantes), uno en unidad de trasplantes, dos en sala de cirugía, tres en unidad de cuidados intensivos (UCI), siete en sala de medicina interna y tres en unidad de cuidados especiales (UCE) (tabla 1).

Identificación bioquímica. La identificación bioquímica de los aislamientos se realizó en el siste-

Tabla 1. Origen, procedencia, biotipos, producción de BLEE y perfil de bandas plasmídicas de 32 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos, provenientes de cuatro centros hospitalarios de Medellín

N.º de aislamiento	Origen	Hospital/sala	Sexo	Biotipo	BLEE	Perfil plasmídico
2	Material purulento	HUSVP/un. renal	F	7774437-0	Negativo	3
36	Material purulento	HUSVP/med. interna	M	6774437-2	Positivo	5*
21	Sangre	HGM/med. interna	M	7654437-2	Positivo	3
17	Orina	HUSVP/un. de transplantes	F	7754427-0	Negativo	4*
13	Sangre	HPTU/UCI	F	7754437-2	Negativo	3
22	Sangre	HGM/pediatría	M	7754437-2	Positivo	3
37	Lavado peritoneal	HUSVP/un. renal	M	7754437-2	Positivo	3
19	Espuito	HUSVP/UCI	M	7754437-2	Positivo	6*
32	Orina	CLA./pediatría	M	7754437-2	Negativo	8*
33	Orina	CLA./pediatría	F	7754437-2	Negativo	5*
7	Catéter	HUSVP/pediatría	ND	7754437-2	positivo	5*
41	Sangre	CLA./pediatría	F	7754437-2	negativo	3
28	Bilis	HPTU/UCE	ND	7770437-2	positivo	9*
18	Espuito	HUSVP/cirugía	F	7774427-2	negativo	2
14	Sangre	HGM/cirugía	F	7774435-2	positivo	2
15	Aspirado gástrico	HGM/pediatría	M	7774435-2	positivo	2
20	Sangre	HGM/pediatría	ND	7774435-2	positivo	2
23	Orina	HGM/pediatría	ND	7774435-2	positivo	2
24	Orina	HPTU/med. interna	M	7774435-2	positivo	2
38	Material purulento	HPTU/med. interna	F	7774435-2	positivo	9*
27	Orina	HPTU/med. interna	M	7774437-2	negativo	3
30	Lavado bronquial	HPTU/med. interna	M	7774437-2	positivo	4*
35	Espuito	HUSVP/UCE	M	7774437-2	negativo	4*
11	Sangre	HUSVP/pediatría	F	7774437-2	positivo	4*
26	Orina	HPTU/UCE	F	7774437-2	positivo	4*
25	Lavado bronquial	HPTU/UCI	M	7774437-2	positivo	6*
31	Orina	HPTU/med. interna	M	7774437-2	positivo	7*
3	Catéter	HUSVP/pediatría	ND	7774437-2	negativo	7*
8	Material purulento	HPTU/pediatría	ND	7774437-2	positivo	7*
12	Material purulento	HUSVP/pediatría	F	7774437-2	negativo	6*
34	Orina	HUSVP/pediatría	M	7774437-2	positivo	9*
40	Orina	HPTU/pediatría	M	7774437-2	positivo	9*

ND: no determinado; *: perfil único.

ma automatizado MicroScan (Dade International Inc., West Sacramento, CA, USA). Se utilizó el Combo 20 (Neg Combo Type 20 B 1017-119), que analiza veinticuatro pruebas de identificación.

Pruebas de sensibilidad. La sensibilidad a veintinueve antibióticos se determinó en el sistema Mi-

croScan (Dade International Inc., West Sacramento, CA, USA). Se utilizó el Neg Combo Type 20 B 1017-119. Los antibióticos que se analizaron fueron: cefazolina, cefalotina, cefotetan, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, cefepime, piperacilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulanato,

piperacilina/tazobactam, tobramicina, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ofloxacina, imipenem, trimetoprim/sulfa. Para determinar la sensibilidad o resistencia a estos agentes antimicrobianos se utilizan los criterios de punto de corte recomendados por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio (NCCLS) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

Determinación de β -lactamasas de espectro extendido. La producción de BLEE se detectó por el método de sinergismo de doble disco según Thomson y Sanders (Thomson y Sanders, 1992). A partir del aislamiento primario se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de caldo Mueller-Hinton. El medio se incubó a 37 °C hasta alcanzar una turbidez igual a la del tubo N.º 0.5 de la escala de MacFarland y luego se sembró en forma uniforme sobre una caja de petri que contenía agar Mueller-Hinton. Se pusieron dos discos, uno que contenía 30 μ g de ceftazidima y otro que contenía 20:10 μ g de amoxicilina:clavulanato, separados por una distancia de 20 mm, y se incubó 24 horas a 37 °C. La presencia de BLEE se determina por el aumento de la zona de inhibición alrededor del disco de la cefalosporina hacia el disco que contiene el clavulanato (figura 1).

Determinación del perfil plasmídico. A partir de cada uno de los aislamientos conservados en con-

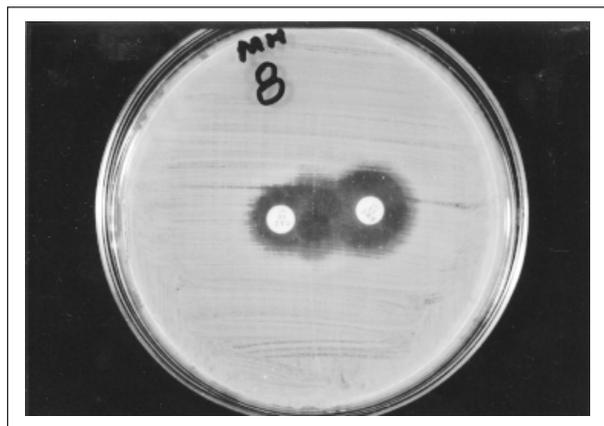


Figura 1. Prueba positiva de sinergismo de doble disco. El disco de la derecha contiene amoxicilina:clavulanato y el de la izquierda contiene ceftazidima. Se observa un aumento en la zona de inhibición alrededor del disco de la cefalosporina hacia el que contiene el clavulanato

gelación (-70 °C) se realizó un repique en agar Luria Bertani (LB) y se incubó 24 horas a 37 °C. Se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de caldo LB, con incubación a 37 °C toda la noche en agitación a 280 rpm. El DNA plasmídico se extrajo utilizando el kit plasmid minipreparation (QIAGEN, Crawley, UK). La concentración de DNA plasmídico se determinó en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 5. Las bandas plasmídicas fueron analizadas utilizando 4 μ g de DNA plasmídico de cada uno de los aislamientos por electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0.8% sumergida en buffer Tris-Borato-EDTA 0.5%, a 75 V, 300 mA por 3 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta. Para estimar el peso molecular de las bandas plasmídicas se utilizó como patrón *E. coli* V517 (Macrina *et al.*, 1978).

RESULTADOS

Patrón bioquímico. Los 32 aislamientos estudiados correspondieron a quince hombres, once mujeres y seis no determinados (neonatos). El 43.8% (14/32) de los aislamientos se obtuvo a partir de salas pediátricas, 21.9% (7/32) de salas de medicina interna, 9.4% (3/32) de UCI, 9.4% (3/32) de UCE, 6.2% de la unidad renal (2/32), 6.2% (2/32) de los aislamientos a partir de salas de cirugía y 3.1% (1/32) de la unidad de trasplantes.

La biotipificación demostró que 100% de los aislamientos fueron positivos para glucosa, rafinosa, lisina, citrato, sucrosa, esculina, melobiosa e inositol, y negativos para triptofano deaminasa, ácido sulfhídrico, indol, arginina, colistina y oxidasa, lo que permitió identificar claramente los aislamientos como *K. pneumoniae*.

Los biotipos se determinaron por variaciones en urea, adonitol, malonato, sorbitol, arabinosa, ornitina, voges-proskauer y beta galactosidasa. Se identificaron nueve biotipos diferentes entre los 32 aislamientos (tabla 1).

Con respecto al número de biotipos, el HUSVP presentó seis, seguido del HPTU con cuatro, el

HGM con tres y la CLA con uno. Los biotipos más frecuentes fueron: el 7774437-2 en 37.5% (12/32) de los aislamientos, en dos de las instituciones (siete aislamientos del HPTU y cinco del HUSVP; 50% provenía de salas pediátricas); el 7754437-2, encontrado en ocho aislamientos (25%) en las cuatro instituciones (sin embargo, fue el único biotipo hallado en CLA; 62.5% provenía de salas pediátricas); y el 7774435-2 en 18.8% (6/32), hallado en el HGM (4) y en el HPTU (2) (50% provenía de salas pediátricas). Los catorce aislamientos provenientes de salas pediátricas correspondieron a estos tres biotipos más frecuentes.

Patrón de susceptibilidad. Las pruebas de sensibilidad mostraron que 100% de los aislamientos fueron resistentes a piperacilina y ampicilina y sensibles a ciprofloxacina, ofloxacina, cefotetan

e imipenem. La sensibilidad para los demás antibióticos probados fue variable. Entre 18.75 y 34.4% de los aislamientos presentaron sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación, mientras que a las cefalosporinas de segunda y primera generación sólo fueron sensibles 18.75 y 9.4%, respectivamente. El 50% de los aislamientos fueron sensibles a los inhibidores ticarcilina/clavulanato y piperacilina/tazobactam, mientras que a ampicilina/sulbactam sólo lo fue 15.6%. La sensibilidad a los aminoglicósidos fue de 18.7% para tobramicina, 56.3% para gentamicina y 43.7% para amikacina. La sensibilidad a trimetoprim/sulfa fue 34.4% (tabla 2).

Al relacionar el perfil de sensibilidad con los biotipos se encontró que los biotipos más sensibles fueron el 7774437-0 (17/21 antibióticos) y el 7754427-0 (16/21), que corresponden a un ais-

Tabla 2. Susceptibilidad in vitro a diferentes antibióticos de 32 aislamientos de *K. pneumoniae* multiresistente provenientes de cuatro centros hospitalarios de Medellín

Antimicrobiano	Resistente		Sensible		Sensibilidad intermedia	
	#	%	#	%	#	%
Cefazolina	29	90.60	3	9.40	–	–
Cefalotina	28	87.50	2	6.25	2	6.25
Cefotetan	–	–	32	100.00	–	–
Cefuroxima	26	81.25	6	18.75	–	–
Ceftazidime	4	12.50	10	31.25	18	56.25
Cefotaxime	3	9.40	9	28.10	20	62.50
Ceftriaxona	5	15.60	11	34.40	16	50.00
Cefpodoxima	7	21.80	6	18.80	19	59.40
Cefepime	3	9.40	21	65.60	8	25.00
Tobramicina	24	75.00	6	18.70	2	6.30
Amikacina	14	43.70	14	43.70	4	12.50
Gentamicina	14	43.70	18	56.30	–	–
Ciprofloxacina	–	–	32	100.00	–	–
Ofloxacina	–	–	32	100.00	–	–
Ticarcilina/clavulanato	15	46.90	17	53.10	–	–
Ampicilina/sulbactam	25	78.10	5	15.60	2	6.30
Piperacilina/tazobactam	16	50.00	16	50.00	–	–
Imipenem	–	–	32	100.00	–	–
Piperacilina	32	100.00	–	–	–	–
Ampicilina	32	100.00	–	–	–	–
Trimetoprim/sulfa	21	65.60	11	34.40	–	–

lamiento en cada uno de estos biotipos. El 100% de los aislamientos pertenecientes al biotipo 7754437-2 mostró resistencia a cefalosporinas de primera generación. Los tres aislamientos provenientes de la CLA pertenecientes a este biotipo muestran un perfil de sensibilidad idéntico, con resistencia no sólo a cefalosporina de primera generación sino a tobramicina, gentamicina y todos los inhibidores, con sensibilidad a cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación y sensibilidad intermedia a amikacina.

Cuatro de los seis aislamientos provenientes del HGM, pertenecientes al biotipo 7774435-2, presentaron el mismo perfil de sensibilidad a los antibióticos analizados: resistentes a cefalosporinas de primera y segunda generación, tobramicina, amikacina y trimetoprim/sulfa, sensibles a gentamicina y con sensibilidad intermedia del 100% a cefalosporinas de tercera generación y del 83.3% a cefepime.

Seis biotipos fueron resistentes a cefazolina, cinco a cefalotina, cinco a cefuroxima, cuatro a tobramicina, cuatro a ampicilina/sulbactam y tres a trimetoprim/sulfa. No se encontró ninguna relación entre los biotipos y el tipo de muestra a partir de la cual se obtuvieron los aislamientos.

Determinación de la producción de BLEE. En la determinación de BLEE (tabla 1) se encontró que 65.6% (21/32) de los aislamientos son positivos y 34.4% (11/32) negativos. En los aislamientos provenientes de pediatría se vio que 64.6% (9/14) producen estas enzimas, así como 85.7% (6/7) de los provenientes de medicina interna, 66.6% (2/3) de los de UCE y 66.6% (2/3) de los de UCI. De los provenientes tanto de la unidad renal como de cirugía, 50% son productores de BLEE.

Al relacionar estos datos con los biotipos se encontró que en el biotipo 7774437-2 producen estas enzimas el 66.6%, en el biotipo 7754437-2 las produce el 50% y en el biotipo 7774435-2 el 100%.

En relación con las instituciones se observó que 81.8% (9/11) de los aislamientos provenientes del

HPTU son productores de BLEE, 50% (6/12) en el HUSVP y 100% (6/6) en el HGM, mientras que en la CLA todos los aislamientos son negativos para BLEE.

Determinación del perfil de bandas plasmídicas.

La determinación del perfil de bandas plasmídicas demostró que los 32 aislamientos tienen ocho perfiles diferentes en cuanto al número de bandas, distribuidos entre dos y nueve bandas plasmídicas (figura 2). Al analizar estos hallazgos se observó que en los perfiles de dos y tres bandas éstas siempre presentan el mismo corrido electroforético, mientras que los de cuatro a nueve presentaron patrones de migración diferentes (únicos). Los perfiles se distribuyeron así: seis aislamientos (18.8%), dos bandas; siete (21.9%), tres bandas; cinco (15.6%), cuatro bandas; tres (9.4%), cinco bandas; tres (9.4%), seis bandas; tres (9.4%), siete bandas; uno (3.1%), ocho bandas; cuatro (12.5%), nueve bandas. Todos los aislamientos mostraron una banda común que corre a la altura de la banda de 5.5 Kb del marcador de peso molecular.

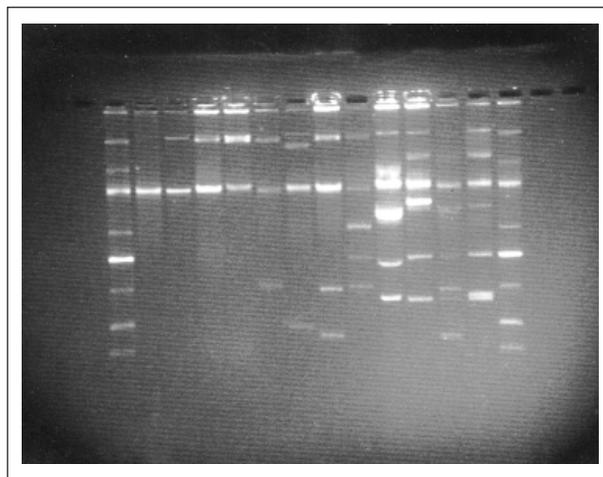


Figura 2. Perfil de bandas plasmídicas. Carril 1 y 14: marcador de peso molecular (*E. coli* V517). Carriles 2-13: aislamientos de *K. pneumoniae* multirresistentes; carriles 2 y 3: aislamientos 14 y 15 con dos bandas plasmídicas; 4 y 5: aislamientos 2 y 21 con tres bandas; 6 y 7: aislamientos 35 y 11 con cuatro bandas, dos perfiles diferentes; 8 y 9: aislamientos 33 y 36 con cinco bandas, dos perfiles diferentes; 10: aislamientos 25 y 6 con seis bandas, dos perfiles diferentes; 11: aislamientos 3 y 7 con siete bandas, dos perfiles diferentes; 12: aislamiento 32 con ocho bandas; 13: aislamiento 40 con nueve bandas

Con respecto a la distribución de los perfiles de bandas plasmídicas por institución, el HUSVP presentó siete, el HPTU seis, la CLA tres y el HGM dos. Al relacionar el perfil de bandas con la producción de BLEE, se encontró que todos los aislamientos que presentaron el perfil de nueve bandas (4/32) producen estas enzimas, y en los restantes siete perfiles se encontraron aislamientos que producen o no estas enzimas.

Se destaca que los cuatro aislamientos provenientes del HGM que tienen el mismo biotipo (7774435-2), el mismo patrón de sensibilidad y producen BLEE, poseen el mismo perfil de bandas plasmídicas (dos bandas). Con excepción de este caso, no se encontró ninguna relación entre el perfil de bandas plasmídicas con el patrón de susceptibilidad, con los biotipos, con el tipo de muestra, ni con las instituciones de las que provenían los aislamientos.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que *K. pneumoniae* nosocomial multirresistente es más frecuente en salas pediátricas (43.8%, 14/32) y que entre los biotipos determinados el 7774437-2 es el más común. Estos resultados son similares a los reportados por Sánchez (Sánchez *et al.*, 1998), pero a diferencia de ellos este trabajo muestra que el biotipo 7774437-2 es más frecuente en salas pediátricas (50%) que en quirúrgicas. El hecho de encontrar que los aislamientos provenientes de la CLA pertenecen al mismo biotipo (7754437-2), todos aislados a partir de salas pediátricas, con un patrón de sensibilidad idéntico y no productores de BLEE, a pesar del bajo número de cepas estudiadas en este lugar, hace suponer la posibilidad de un brote por la dispersión de una cepa epidémica en esta institución (los aislamientos se obtuvieron en un lapso de quince días). Es necesario estudiar el perfil genético de estos aislamientos para determinar su posible origen clonal.

Se observa que cuatro de los seis aislamientos provenientes del HGM, pertenecientes al biotipo 7774435-2, presentaron el mismo patrón de sensibilidad y el mismo perfil de bandas plasmídicas

(dos bandas) y todos son productores de BLEE. Es posible, a pesar del bajo número de cepas estudiadas en este lugar, que en esta institución se presente dispersión de cepas y de plásmidos que portan genes para la producción de estas enzimas. Es necesario hacer el análisis de las bandas plasmídicas por medio de cortes con enzimas de restricción y realizar ensayos de transformación para determinar si en los aislamientos analizados se presentan mecanismos de diseminación de resistencia por dispersión de plásmidos y estudiar el perfil genético para determinar posible origen clonal. Comparando un biotipo dado que se presenta en diferentes instituciones, se encontró que el mismo biotipo puede presentar o no producción de BLEE, excepto el 7774435-2, en el que todos producen BLEE. Los tres biotipos detectados en el HGM producen estas enzimas.

Teniendo en cuenta que en esta investigación se partió de aislamientos de *K. pneumoniae* multirresistente, fue imposible hacer comparaciones con los diferentes estudios de sensibilidad reportados para este microorganismo (Arakawa *et al.*, 2000; Arlet *et al.*, 1994; Bradford *et al.*, 1994; Branger *et al.*, 1998; Brun-Buisson *et al.*, 1987; Castañeda *et al.*, 2000; Crespo y Vélez, 1998, 2000; Decré *et al.*, 1998; Eltahawy, 1997; George *et al.*, 1995; Gouby *et al.*, 1994; Li y Lin, 2000; Orrantia *et al.*, 1998; Parasakthi *et al.*, 1999; Robledo y Robledo, 1999; Sirot *et al.*, 1991, 1992; Yagi *et al.*, 2000; Yung-Fong Liu *et al.*, 1998). Sin embargo, es importante destacar en este estudio que entre 18.75 y 34.4% de los aislamientos son sensibles a las cefalosporinas de tercera generación. No obstante, considerando que entre estas cefalosporinas, cefpodoxima es la que presenta mayor susceptibilidad *in vitro* a la hidrólisis por BLEE, ésta representa la verdadera sensibilidad para este grupo de antibióticos (18.8%). También se observa una disminución de la sensibilidad a los inhibidores de las β -lactamasas y a los aminoglicósidos. El 100% de los aislamientos es sensible a ciprofloxacina, ofloxacina, cefotetan e imipenem, y resistentes a piperacilina y ampicilina. La sensibilidad observada para cefotetan se debe probablemente a la estabilidad de las cefamicinas a la hidrólisis por BLEE.

El uso excesivo de cefalosporinas de espectro extendido en la práctica médica es el principal factor responsable de la aparición de BLEE en bacterias entéricas (Lakasai *et al.*, 2000; Livermore, 1995; Podschun y Ullmann, 1998). Estudios recientes en Europa de aislamientos hospitalarios de *K. pneumoniae* muestran que entre 14 y 16% son productores de BLEE (Burwen *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1992; Podschun y Ullmann, 1998). No obstante, el porcentaje de estas cepas puede ser mucho mayor, porque la prueba convencional de difusión de disco usada de rutina en el laboratorio no detecta la producción de BLEE debido a que aunque los MIC se incrementan y la zona de inhibición decrece, el punto de corte para resistencia no se alcanza (Emery *et al.*, 1997; Essack, 2000; Ferraro, 2001; Livermore, 1995; Vercauteren *et al.*, 1997). Con la aplicación de la prueba de sinergismo de doble disco para la detección de BLEE se encontró que 65.6% de los aislamientos son productores de estas enzimas. En concordancia con Tzelepi (Tzelepi *et al.*, 2000), se encontró que colocando el disco de cefalosporina a una distancia de 20 mm del disco que contiene clavulanato, se obtienen resultados más reproducibles que los discos puestos a una distancia de 30 mm.

Los resultados de este estudio demuestran alto porcentaje de cepas multirresistentes productoras de BLEE (65.6%), aun teniendo en cuenta que esta investigación partió de aislamientos multirresistentes.

Se encontraron ocho perfiles de bandas plasmídicas diferentes (entre dos y nueve bandas). Todos los aislamientos tienen una banda común que corre a la altura de la banda de 5.5 Kb del marcador de peso molecular. Es posible que esta banda plasmídica porte los genes de resistencia para piperacilina y ampicilina ya que todos los aislamientos son resistentes a estos antibióticos. En este estudio se observa alta variabilidad tanto en los patrones de sensibilidad como en los perfiles de bandas plasmídicas. Según Macrina (Macrina *et al.*, 1978), cada una de las bandas observadas en el marcador de peso molecular corresponde a diferentes plásmidos. Sin embargo, consideramos

necesario hacer el análisis de las bandas plasmídicas por medio de cortes con enzimas de restricción, para poder determinar si cada banda corresponde a un plásmido diferente, y realizar ensayos de transformación para evaluar el papel de estos plásmidos en el fenómeno de la resistencia en los aislamientos estudiados.

La prueba de sinergismo de doble disco (Essack, 2000) podría ser implementada como prueba tamiz en los laboratorios clínicos, para la detección de BLEE. Ésta es una técnica útil, de fácil realización y bajo costo. Sin embargo, sería conveniente realizar estudios que permitan la clasificación y caracterización de estas enzimas.

En Colombia, el estudio de aislamientos de *K. pneumoniae* en ambientes hospitalarios, en donde tiene mayor impacto el uso indiscriminado de los antibióticos, es poco (Castañeda *et al.*, 2000; Crespo y Vélez, 1998, 2000; Robledo y Robledo, 1999; Sánchez *et al.*, 1998). Los resultados de este trabajo muestran un panorama de lo que actualmente está sucediendo en las instituciones estudiadas. Llama la atención la circulación de cepas de *K. pneumoniae* con alta disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas, a los inhibidores de las β -lactamasas y a los aminoglicósidos, y la abundante producción de BLEE. Estos resultados demandan la necesidad de implementar, en estas instituciones, políticas de control en el uso de antibióticos para limitar la presión selectiva en la flora intrahospitalaria, vigilar la emergencia de nuevos fenotipos resistentes o la dispersión de nuevas cepas, para lo que se requiere la conformación y el fortalecimiento de los comités de infecciones hospitalarias o de los comités de vigilancia epidemiológica que lleven a cabo dicho control.

AGRADECIMIENTOS

A los hospitales: Universitario San Vicente de Paúl, Pablo Tobón Uribe, General de Medellín y Clínica Las Américas por su colaboración para la obtención de los aislamientos. A los doctores Patricia Sierra V., Edwin Patiño G. y Ómar Triana Ch. por su apoyo académico. A las auxiliares de

laboratorio Alba Lucía Gómez y Luz María Guerra por su apoyo logístico. A la ingeniera química Mariana Peñuela V. por su apoyo y colaboración.

REFERENCIAS

- Abbot S.** 1999. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* and *Serratia*. In: Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds.). *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 475-482.
- Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M, Shidarta N, Doi Y, Shibayama K, Yagi T, Kurata T.** 2000. Trends in antimicrobial-drug resistance in Japan. *Emerg Infect Dis* 6(6):572-575.
- Arbeit D.** 1999. Laboratory procedures for epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds.). *Manual of clinical microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 116-137.
- Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A.** 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 french hospitals. *J Clin Microbiol* 32:2.553-2.558.
- Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen B, Bush K.** 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 Ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 38:761-766.
- Branger C, Lesimple AL, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechoshy N.** 1998. Long-term investigation of clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital. *J Med Microbiol* 47:201-209.
- Brun-Buisson C, Legrand A, Philippon A.** 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet*, august 8.
- Burwen DR, Banerjee SN, Gaynes RP.** 1994. Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram negative bacilli in the United States. *J Infect Dis* 70:1.622-1.625.
- Castañeda CR, Crespo MP, Vélez JD.** 2000. Comportamiento in vitro de los bacilos gramnegativos resistentes a Ceftazidima (BNRCAZ): estudio de tres años en un hospital de tercer nivel. *Infectio* 4:36.
- Crespo MP, Vélez JD.** 1999. Perfil de *Klebsiella* y *Pseudomonas* multiresistentes en un hospital de tercer nivel. *Infectio*. 1.º Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Resumen F-8, 14 p.
- Crespo MP, Vélez JD.** 2000. Perfil de sensibilidad de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido contra antibióticos de amplio espectro. *Infectio* 4:36.
- Chevalier J, Pages JM, Eyraud A, Malléa M.** 2000. Membrane permeability modification is involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Communications* 274 (2):496-499.
- Decré D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bergogne-Bérézin E, Régnier B.** 1998. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 27:834-844.
- Drusano GL.** 1998. Infection in the intensive care unit: β -lactamase-mediated resistance among *Enterobacteriaceae* and optimal antimicrobial dosing. *Clin Infect Dis* 27(suppl 1):S111-S116.
- Eisen D, Russell EG, Tymms M, Roper EJ, Grayson ML, Turnidge J.** 1995. Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 33:713-717.
- Eltahawy ATAE.** 1997. Gramnegative bacilli isolated from patients in intensive care unit: prevalence and antibiotic susceptibility. *J Chemother* (6):403-410.
- Emery CL, Weymouth LA.** 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 35:2.061-2.067.
- Essack SY.** 2000. Laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-the need for a reliable, reproducible method. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 37:293-295.
- Ferraro MJ.** 2001. Should we reevaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis* 33 (suppl 3):S227-229.
- George AM, Hall RM, Stokes HW.** 1995. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* a novel gene, *ram A*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology* 141:1.909-1.920.
- Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despau E, Ramuz H.** 1994. Epidemiological study pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol* 32(2):301-305.
- Hansen DS, Mestre F, Alberti S, Hernández-Alles S, Álvarez D, Domenech-Sánchez A, Gil J, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ.** 1999. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin Microbiol* 37(1):56-62.
- Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wachsrrtayanku R, Kato N.** 1993. Plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad spectrum β -lactamases including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother* 37:984-990.
- Jacoby GA, Han P.** 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 34:908-911.
- Jacoby GA, Medeiros AA.** 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1.697-1.704.
- Jalaluddin S, Devaster R, Sheen R, Gerard M, Butzler JP.** 1998. Molecular epidemiological study of *Enterobacter aerogenes* isolates in a Belgian chemother hospital. *J Clin Microbiol* 36:1.846-1.852.
- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA.** 1994. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia*

- coli* strains producing extended-spectrum b-lactamases. *J Clin Microbiol* 32:691-696.
- Kohler J, Dorso KL, Young K, Hammond GG, Rosen H, Kroop H, Silver LL.** 1999. *In vitro* activities of the potent broad-spectrum carbapenem MK-0826 (L-749,345) against broad-spectrum β -lactamase and extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 43(5):1.170-1.176.
- Lakasai Y, Severinom M, Perilli M, Amicosante G, Bonfiglio G, Stefani S.** 2000. First identification of an SHV-12 extended-spectrum b-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother* 45:349-351.
- Li L, Lin CK.** 2000. A novel large plasmid carrying multiple β -lactam resistance genes isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *J Appl Microbiol* 88:1.038-1.048.
- Liu PYF, Gur D, Hall LMC, Livermore DM.** 1992. Survey of the prevalence of β -lactamases amongst 1000 gram negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J Antimicrob Chemother* 30:429-447.
- Liu Y, Mee BJ, Mulgrave L.** 1997. Identification of clinical isolates of indole-positive *Klebsiella planticola* and genetic and molecular analysis of their β -lactamases. *J Clin Microbiol* 35:2.365-2.369.
- Livermore D.** 1995. b-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557-584.
- Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers D, McCowen S.** 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference. *Plasmid Molecules* 1:417-420.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** 2000. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S10. Wayne, PA, NCCLS.
- Nordmann P.** 1998. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 27(suppl 1):S100-S106.
- Orrantia RD, Silva H, Pontani D, Grupo de Estudio Artemis para América Latina.** 1998. El Proyecto Artemis. Un estudio sobre la actividad de algunos antibióticos de uso común para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio en diez países latinoamericanos. *Rev Panam Infectol* 2:68-75.
- Papanicolaou G, Medeiros AA, Jacoby GA.** 1990. Novel plasmid-mediated b-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino-and-methoxy b-lactamas in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2.220-2.229.
- Parasakthi N, Vadivelu J, Ariffin H, Lyer L, Palasubramanian S, Arasu A.** 1999. Epidemiology and molecular characterization of nosocomially transmitted multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Internat J Infect Dis* 4(3):123-128.
- Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC.** 1998. β -lactamases responsible for resistance to expanded spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 42(6):1.350-1.354.
- Podschun R, Ullmann U.** 1998. *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11(4):589-603.
- Robledo C, Robledo J.** 1993 Panorama de la resistencia a los antibióticos en Colombia. *Rev Panam Infectol* 3(supl 1):S26-S32.
- Sánchez MP, De Silva EM, Jaramillo AC, Hernández L, Ceballos G, Ruis MC.** 1998. Perfil plasmídico y transferencia de resistencia en *K. pneumoniae* nosocomial multiresistente a antibióticos. 1.º Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Resumen F-6, p. 14.
- Shannon K, Stapleton P, Xiang X, Johnson A, Beattie H, El Bakri F, Cookson B, French G.** 1998. Extended-spectrum b-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial outbreaks of infection in United Kingdom. *J Clin Microbiol* 36:3.105-3.110.
- Sirot D, De Champs L, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Sirot J.** 1991. Translocation of antibiotic resistance determinants including and extended spectrum b-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1.776-1.781.
- Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, Meyran M, Morel C, Pérez R, Quentiny C, Reverdy ME, Scheffel JM, Rosebaum M, Rezvani Y.** 1992. Resistence to Cefotaxime and seven other β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 36(8):1.677-1.681.
- Thomson KS, Sanders CC.** 1992. Detection of b-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1.877-1.882.
- Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglu UA, Tsakris A.** 2000. Detection of extended-spectrum b-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 38:542-546.
- Urban C, Meyer K, Mariano N, Rahal SS, Flamm R, Rasmussen BA, Bush K.** 1992. Identification of TEM-26 β -lactamase responsible for a mayor outbreak of Cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:392-395.
- Vercauteren EP, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goossens H.** 1997. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum b-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* in a Belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol* 35:2.191-2.197.
- Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y.** 2000. A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 184:53-56.
- Yung-Fong Liu P, Tung J-C, Ke S-C, Chen S-L.** 1998. Molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 36(9):2.759-2.762.

