

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Determinación de β -lactamasas de espectro ampliado y de espectro extendido, en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas de pacientes del Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), por medio del Método de Difusión en Disco.

Cristian Alexander Lemus Estrada

Químico Biólogo

Guatemala octubre del 2004

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Determinación de β -lactamasas de espectro ampliado y de espectro extendido, en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas de pacientes del Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), por medio del Método de Difusión en Disco.

Informe de Tesis

Presentado Por

Cristian Alexander Lemus Estrada

Previo a Optar al Título de

Químico Biólogo

Guatemala octubre del 2004

INDICE

I Resumen	1
II Introducción	3
III Antecedentes	5
1 Generalidades	5
2 Antibióticos Betalactámicos	7
3 β-Lactamasas	14
4 Interacciones BLEA y BLEE con β-lactámico.....	19
5 Identificación de Resistencia Microbiana	22
6 Importancia del Control de la Resistencia Antimicrobiana	24
IV Justificación	26
V Objetivos	27
VI Materiales y Métodos	28
1 Universo y Muestra	28
2 Materiales	28
3 Métodos	30
VII Resultados	36
VIII Discusión de Resultados.....	42
IX Conclusiones	48
X Recomendaciones	49
XI Bibliografía	50

I Resumen

La resistencia bacteriana es un problema creciente, especialmente en las enterobacterias como lo son *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Para identificar el grado de resistencia de éstas bacterias se determinó la presencia o ausencia de β -lactamasas de espectro ampliado y extendido por medio del método de difusión en disco. Al mismo tiempo se determinó la resistencia hacia otros antibióticos no β -lactámicos, se relacionó el grado de resistencia de las β -lactamasas de espectro extendido hacia otros antibióticos dentro del centro asistencial en estudio y se determinó y clasificó el origen hospitalario de las cepas en estudio que presentaron β -lactamasas de espectro ampliado y espectro extendido.

Para poder determinar la presencia o ausencia de las β -lactamasas en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, se utilizó el método de difusión en disco. Se colocó en el antibiograma los discos de cefalosporinas de 3^a generación (cefotaxima y ceftazidima), próximos a un disco de amoxicilina-ácido clavulánico.

Los discos de cefotaxima, amoxicilina-ácido clavulánico y ceftacidima, se colocaron a una distancia de 2.5 centímetros uno de otro en forma lineal en el orden anteriormente mencionado en un tiempo no mayor a los 15 minutos, sobre una placa de agar Mueller-Hinton previamente estriada en tres direcciones con un hisopo de algodón, no tóxico y estéril, impregnado con la bacteria a analizar (*Klebsiella pneumoniae* o *Klebsiella oxytoca*), que se encontraba en solución salina a una concentración de 0.5 de Macfarland. Las placas se incubaron por un período de 24 horas a 35⁰ C, cumplido el tiempo de incubación se procedió a la determinación de cepas con β -lactamasas en forma visual, clasificando como productoras de β -lactamasas de espectro extendido a todas aquellas que presentaron una deformación del halo entre el disco de la cefalosporina de 3^a generación y el disco de amoxicilina-ácido clavulánico (efecto huevo); y las que no presentaron ninguna deformación en los halos de inhibición se clasificaron como cepas productoras de β -lactamasas de espectro ampliado.

El programa computarizado WHONET permitió el manejo de información que se obtuvo de las distintas cepas recolectadas y analizadas en el estudio, con dicha información se pudo determinar la resistencia de las cepas hacia otros antibióticos no β -lactámicos, la resistencia de las cepas con β -lactamasas de espectro extendido hacia otros antibióticos y la clasificación y determinación del origen hospitalario de las cepas que mostraron β -lactamasas de espectro extendido y ampliado.

Los resultados obtenidos muestran que el 98 % de las cepas recolectadas pertenecen a *Klebsiella pneumoniae* y el 2% pertenecen a *Klebsiella oxytoca*. Se presentó una resistencia del 42% por parte de cepas que presentan BLEEs y el 52% pertenecen a las cepas con BLEAs. El área hospitalaria con mayor nivel de resistencia por parte de cepas con BLEEs fue pediatría, que mostró un 50% de resistencia por parte de éstas cepas. La familia de antibióticos no β -lactámicos que fue mayormente afectada fue la de los aminoglucósidos.

Analizando los resultados se concluyó que el método de difusión en disco, es un método sencillo, eficaz y aplicable a cualquier laboratorio para determinar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Los antibióticos no β -lactámicos que se ven mayormente afectados cuando hay presencia de β -lactamasas de espectro extendido son los de la familia de los aminoglucosidos. El área hospitalaria con los mayores niveles de resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae* con β -lactamasas de espectro extendido es pediatría.

II Introducción

El género *Klebsiella spp.* agrupa bacilos gram negativo, inmóviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. *Klebsiella pneumoniae* es la especie típica de este género. La mayor incidencia de infecciones debidas a especies de *Klebsiella* durante la última década refleja un aumento de infecciones nosocomiales en pacientes debilitados o inmunosuprimidos y una tendencia a adquirir mayor resistencia a antibióticos.

Una mala terapia puede ser a veces fatal en pacientes que reciben antibióticos inapropiados, creando una multirresistencia de patógenos gram negativo, la cual requiere un gran control.

Las β -lactamasas son enzimas que se encuentran generalmente codificadas por elementos móviles tales como plásmidos, transposones o integrones. Dentro de las β -lactamasas tenemos a las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), las cuales permiten la hidrólisis de sustratos como las cefalosporinas de primera generación y las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales permiten la hidrólisis de cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Estas enzimas son las más comúnmente producidas por *Klebsiella spp.* y *E. coli*, pero también pueden encontrarse en otras bacterias gram negativo.

Muchos laboratorios clínicos no prestan la debida atención a las β -lactamasas y la forma de detectarlas. Sin embargo esto es de gran importancia ya que mediante la detección de las mismas y la adecuada interpretación del resultado, se dará una respuesta apropiada al clínico y de esta forma, se prevendrá la rápida diseminación de patógenos que las poseen.

Para la detección de las β -lactamasas se utilizó el método de doble disco, en el cual se colocaron los discos de cefotaxima (CXT), amoxicilina-clavulánico (AMC) (inhibidor) y ceftazidima (CAZ). Si la cepa en estudio produjo una β -lactamasa, se observó una deformación del halo producido por las cefalosporinas, conocido como “efecto huevo”, y toma distintas formas que dependen de la droga ensayada, el inhibidor y la distancia de los discos, se colocaron a una distancia de 2.5 centímetros entre los centros de cada disco.

Este estudio permitió determinar la presencia o ausencia de β -lactamasas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* , al mismo tiempo se evidenció el grado de resistencia adquirido por estas bacterias hacia otros antibióticos no β -lactámicos dentro del Hospital de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.

Los resultados obtenidos fueron procesados en el programa WHONET, que es un programa estadístico utilizado por la Organización Panamericana de la Salud para estudiar la resistencia bacteriana. Dichos resultados permitieron reforzar el programa de vigilancia de la resistencia microbiana en el laboratorio microbiológico del Hospital General de Enfermedad Común del IGSS. Al mismo tiempo se clasificó las salas hospitalarias de donde fueron aisladas *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* con β -lactamasas de espectro ampliado y de espectro extendido. Esto fue de gran utilidad para un mejor control y uso adecuado de los antibióticos por parte del clínico en dicho centro hospitalario para evitar el aumento de la resistencia adquirida a los antibióticos por bacterias nosocomiales.

III Antecedentes

1 Generalidades

1.1 Familia Enterobacteriaceae

Uno de los grupos importantes de bacterias que se encuentran en el tubo digestivo es la familia Enterobacteriaceae o bacterias entéricas. En este grupo encontramos algunos parásitos como *Shigella* y *Salmonella* otros oportunistas o patógenos ocasionales como *Proteus* y *Klebsiella*, y otros más esencialmente saprofitos que normalmente habitan en el intestino y sólo bajo condiciones muy excepcionales producen enfermedad. En este último grupo se encuentran *Escherichia* y *Enterobacter*.

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son bacilos gramnegativos (0.5 por 1 a 3 μm) inmóviles o móviles, con flagelos peritricos. Se desarrollan bien en medios artificiales y todas las especies forman ácido o ácido y gas a partir de la glucosa (1).

De modo típico, los miembros de las Enterobacteriaceae producen colonias relativamente grandes, de color gris opaco, secas o mucoides en agar sangre de carnero característica que sugiere cepas capsuladas de *Klebsiella spp.*

Así, miembros de las Enterobacteriaceae pueden estar incriminados virtualmente en cualquier tipo de enfermedad infecciosa y ser recuperados de cualquier muestra recibida en el laboratorio. Los pacientes inmunocomprometidos o debilitados son en extremo susceptibles a infecciones adquiridas en el hospital, después de colonización con cepas ambientales o luego de procedimientos invasores como cateterismo, broncoscopía, colposcopía o biopsias quirúrgicas en las cuales se traumatizan o cortan membranas mucosas.

Los microbiólogos deben estar alerta ante la posibilidad de la aparición de Enterobacteriaceae resistentes a múltiples antibióticos. La resistencia a antibióticos puede aparecer en aislamientos clínicos previamente susceptibles por la transferencia de plásmidos conocidos como factores R o plásmidos R. Las bacterias entéricas gram negativo por lo común poseen un gran plásmido R único que codifica la resistencia para diversos antibióticos. Un porcentaje cada vez mayor de cepas de los géneros

Enterobacter, *Serratia*, *Klebsiella* y *Providencia*, poseen β -lactamasas inducibles que proporcionan resistencia cruzada a muchos antibióticos β -lactámicos (2).

1.2 Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* fue denominado así por Edwin Klebs un microbiólogo alemán de fines del siglo XIX. El bacilo, ahora conocido como *Klebsiella*, también fue descrito por Carl Friedlander y durante muchos años el “bacilo de Friedlander” fue bien conocido como causa de una neumonía grave y a menudo fatal. La *K. pneumoniae* es la especie típica de este género.

Deben sospecharse especies de *Klebsiella* cuando se recuperan grandes colonias con una consistencia mucóide en medios de aislamiento primario. En agar MacConkey, de forma típica las colonias son grandes, mucóides y rojas, habitualmente con la difusión del pigmento rojo hacia el agar circundante, lo que indica fermentación de lactosa y producción de ácidos. Sin embargo, no todas las cepas son mucóides y algunas especies de *Enterobacter* pueden parecerse mucho a especies de *Klebsiella* son inmóviles y no descarboxílan ornitina, características que son positivas para la mayoría de las especies de *Enterobacter*. Muchas cepas de *Klebsiella* hidrolizan urea lentamente, produciendo un color rosado pálido en el pico de flauta del agar-urea de Christensen. La mayoría de las cepas son indol-negativas; las indol-positivas se denominan *Klebsiella oxytoca*. Ciertas cepas no producen estas reacciones clásicas, lo que lleva a la denominación de varias especies adicionales. Por ejemplo, las cepas indol-positivas y ornitina-positivas se denominan *Klebsiella* grupo 47.

La *Klebsiella pneumoniae* se recupera con mayor frecuencia de muestras clínicas y puede causar una forma clásica de neumonía primaria. La *Klebsiella pneumoniae* se halla poco a menudo en la orofaringe de personas normales (tasa de portadores de alrededor de 1-6%); sin embargo, es posible hallar una prevalencia de hasta 20% en pacientes internados.

Esta colonización puede resultar la fuente de las infecciones respiratorias que en general ocurren en pacientes con condiciones debilitantes como alcoholismo, diabetes mellitus y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La neumonía tiende a ser

destruccion, con extensa necrosis y hemorragia que da como resultado la produccion de un esputo que puede ser espeso, mucoso y de color rojo ladrillo o fluido y “como gelatina de grosella”. En casos graves es posible observar abscesos de pulmon, enfermedad cavitaria cronica, hemorragia interna y hemoptisis. Con frecuencia se presenta pleuritis, lo que explica que se halle dolor pleural en un 80% de los pacientes.

La *Klebsiella pneumoniae* puede tambien causar una variedad de infecciones extrapulmonares, entre ellas enteritis y meningitis (en lactantes), infecciones urinarias (en ninos y adultos) y septicemia. La mayor incidencia de infecciones debidas a especies de *Klebsiellas* durante la ultima decada probablemente refleje un aumento de infecciones nosocomiales en pacientes debilitados o inmunosuprimidos y una tendencia a mayor resistencia a antibioticos. Virtualmente todas las cepas clinicas contienen factores R y por lo general son resistentes a ampicilina y carbencilina. Las especies de *Klebsiella* estan ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tubo digestivo de humanos y animales. Con su tendencia a alojar plasmidos de resistencia a antibioticos, pueden preverse infecciones con cepas resistentes a multiples antibioticos (2).

2. Antibioticos Betalactamicos

Se emplea esta denominacion para englobar a penicilinas y cefalosporinas que tienen en comun el anillo betalactamico, el cual puede ser hidrolizado por algunos microorganismos capaces de segregar una enzima: β -lactamasa.

El anillo betalactamico esta unido por una parte, a un anillo tiazolico en las penicilinas y a un anillo de dihidrotiazina en las cefalosporinas y, por otra parte, a una cadena lateral cuyas variantes permiten obtener distintos tipos de penicilina o cefalosporinas con caracteristicas o cualidades diferentes.

Todas estas conquistas de la quimica se obtuvieron sucesivamente a partir de la sintesis del acido 6-amino penicilánico o del acido 6-amino cefalosporánico.

Pero el avance de la química ha permitido la síntesis de nuevos betalactámicos con un solo anillo con cadenas laterales, que le otorgan importantes acciones antibacterianas. Son los novedosos antibióticos Monobactámicos (3).

2.1 Penicilinas

La penicilina está constituida químicamente por un núcleo básico, ácido 6-aminopenicilánico, común a los diferentes tipos y con un grupo prostético variable de acción antibacteriana y un grupo opuesto que otorga solubilidad.

Para abordar el conocimiento de los numerosos integrantes de la familia penicilínica se han propuesto distintas clasificaciones según el modo de obtención: naturales, biosintéticas, semisintéticas con diferentes subgrupos o bien destacando cualidades especiales de la acción antibacteriana.

Nuestra clasificación, discutible por cierto, sigue en líneas generales las marcaciones ideadas por distintos investigadores que tratan de ensamblar las semejanzas químicas y las acciones antibacterianas de los fármacos. No obstante las síntesis de nuevos compuestos o aquellos con diferencias mínimas pueden descolocar la sistematización (3).

2.1.1 Clasificación de las Penicilinas

1^{er} grupo: Penicilina G (estándar).

2^o grupo: Meticilina/Nafcilina-Isoxazolil penicilina (antiestafilocócica).

3^{er} grupo: Ampicilina-Carbencilina (espectro amplio).

4^o grupo: Acilureido-penicilinas.

5^o grupo: Amidino-penicilinas.

6^o grupo: Temocilina.

2.2 Cefalosporinas

G. Brotzu, en 1948 aisló el hongo *Cephalosporium acremonium*. Este hongo produce las cefalosporinas P, N y O. A partir de la cefalosporina C se obtiene ác. 7-amino cefaloporámico (estructura química fundamental que da lugar a un gran número de cefalosporinas). Sustituciones en los carbonos 3 y 7 originan diversas cefalosporinas. Al igual que las penicilinas, las cefalosporinas se obtienen en forma semisintética (3-5).

La década de los 70 fue promisoría para la investigación de las cefalosporinas, con el descubrimiento de numerosas cefalosporinas aplicadas de inmediato a la clínica, como fueron cefazolina (1972), cefoxitín (1972), cefuroxima (1978). Pero hay numerosas cefalosporinas más, algunas todavía en el banco de pruebas experimental o clínico con posibilidades inmediatas o mediatas de empleo terapéutico (3).

Su estructura química es similar a la de las penicilinas (PNC), tienen un anillo lactámico igual al de la PNC, pero además tienen uno distinto, que es el anillo dihidrotiazídico, que da la posibilidad de hacer sustituciones para obtener nuevos compuestos en 2 sitios: carbono 7 y carbono 3. Las sustituciones en el carbono 7 producen cambios en el espectro de acción de las cefalosporinas, la incorporación de ciertos grupos en este carbono origina compuestos resistentes a las β -lactamasas. Sustituciones en el carbono 3 van a generar diferencias en la farmacocinética, lo que hace que algunas cefalosporinas puedan ser administradas por vía oral, mientras otras sólo se pueden administrar vía parenteral (4,5).

Esta irrupción de drogas cefalosporínicas en continuo ascenso exige una clasificación para su mejor manejo docente y clínico. Se han dividido, según la secuencia histórica, en cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación y/o acciones antibacterianas, (clasificación de O'Callaghan). No obstante en el momento actual, se le otorga mayor importancia a la capacidad de resistir o no a las β -lactamasas de los microorganismos, de modo que esta cualidad condiciona en gran parte la clasificación adaptada por O'Callaghan (3).

2.2.1 Mecanismo de Acción

No hay diferencias entre el mecanismo de acción de las PNC y el de las cefalosporinas, que consiste en la interferencia de la biosíntesis de los mucopéptidos que van a constituir la pared bacteriana. Estos son antibióticos bactericidas que tienen un mecanismo de acción ideal porque actúan sobre estructuras presentes en las bacterias y no en las células del organismo. Tienen un amplio espectro de acción (gram positivo y gram negativo). Las cefalosporinas se clasifican en generaciones de acuerdo al tiempo que han estado disponibles para el uso clínico, existen cuatro generaciones (4,5).

2.3 Clasificación de las Cefalosporinas

2.3.1 Primera Generación

Actividad sobre microflora gram positivo: estreptococos, estafilococos (incluyendo al aureus); excluye a enterococo (sensible a la amoxicilina y a los aminoglucósidos)
 Bacilos Gram negativo: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*. Reducida actividad frente a anaerobios.

Las cefalosporinas de 1ª generación son: cefadrina, cefalexina, cefadroxilo y cefazolina. Tienen el mismo espectro de acción, sus diferencias radican en la farmacocinética (4,5).

Por su forma de administración :

Cefazolina: sólo parenteral., Cefradina: vía oral, buena absorción gastrointestinal, Cefalexina: Sólo se puede administrar vía oral, Cefadroxilo: sólo se puede administrar vía oral, pero tiene la ventaja de tener la vida media más larga. Esto en términos prácticos significa que, a diferencia de la otras que se dan vía oral que se tienen que dar 3 ó 4 veces al día, se debe dar sólo dos veces al día (3-5).

2.3.1.1 Indicaciones

Infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones urinarias, porque las cefalosporinas tienen excreción renal, por lo que se concentran en la orina, y además no tienen biotransformación, por lo que van a estar activas en la orina. Neumonías neumocócicas (excluye la *K. pneumoniae* *H. influenzae*). Profilaxis quirúrgica en cirugía ortopédica, torácica y abdominal (4,5).

2.3.2 Segunda Generación

Mantienen la actividad anti gram positivo. Mejor actividad sobre Enterobacteriáceas, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* (4).

Las cefalosporinas de 2ª generación son: Cefoxitina, (dentro de su espectro de acción incluye microbiota anaeróbica), Cefuroxima, (sólo se administra vía parenteral. La cefuroxima axetil es una sal que sí se puede administrar vía oral), Cefaclor, Cefoxitina, (tiene acción sobre los anaerobios), Cefprozil, Cefamandol, Cefonicid (3-5).

Loracarbef: se puede denominar también como una cefacidina, que es otra familia de antibióticos.

La mayoría se dan por vía parenteral, menos la cefuroxima axetil y el Loracarbef (3,4).

2.3.3 Tercera Generación

Tienen mayor actividad anti gram negativo que gram positivo, la única que mantiene la actividad anti gram positivo es la Cefotaxima (1ª cefalosporina de 3ª generación) (4,5).

Las cefalosporinas de 3ª generación son: Cefotaxima (Clofaram), Cefoperazona Ceftriaxona, Ceftizoxima, Ceftazidima y Cefixima.

Todas se dan exclusivamente por vía parenteral a excepción de la **cefixima** que también se puede dar vía oral (3-5).

2.3.3.1 Indicaciones

Meningitis por gram negativo, infecciones genito-urinarias, sepsis pélvica o abdominal, osteomielitis y artritis séptica (*S. aureus*), neumonía (Cefotaxima), gonorrea (*N. gonorrhoeae*, productor de penicilinasas) (4,5).

2.3.4 Cuarta Generación

Las cefalosporinas de cuarta generación son: cefepima y cefpirome.

Estable frente a β -lactamasas.

Actividad sobre cocos gram positivo (excluye a *S. aureus* resistente a meticilina) y sobre enterobacteriaceas (4,5).

2.3.4.1 Indicaciones

Infecciones graves por bacilos gram negativo, de piel, tejidos blandos, óseos y articulares (4,5).

2.4 Betalactámicos de Nuevas Estructuras

2.4.1 Carbapenem

Es un grupo de antibióticos obtenidos originalmente de *Streptomyces cattleya* y *Streptomyces olivaceus*, con características farmacológicas y antibacterianas de especial interés clínico.

El primer fármaco de aplicación terapéutica fue tienamicina (imipenem), seguido con posterioridad por meropenem. Se han obtenido otros carbapenem: ácido olivánico, carpetimicina, asprenomicina, pluracidomicina, especialmente inhibidores de β -lactamasas pero de menor potencia antibacteriana (3).

2.4.2 Monobactámicos

Los antibióticos monobactámicos constituyen un nuevo grupo de betalactámicos desarrollados a partir del año 1981, cuya característica química es la estructura monocíclica.

Actualmente se conocen 11 compuestos monobactámicos aunque la aplicación clínica sólo se han desarrollado para aztreonam (3).

2.4.3 Inhibidores de β -lactamasas

La destrucción del antibiótico provocada por las β -lactamasas es una preocupación creciente de la investigación médica que abrió un nuevo recurso terapéutico mediante la síntesis de fármacos capaces de inhibir a las β -lactamasas.

La característica ideal de un inhibidor de β -lactamasas sería poseer un espectro de actividad muy amplio contra distintas β -lactamasas producidas por bacterias gram

positivo y gram negativo. Por otra parte son de interés médico otras características, como compatibilidad fisicoquímica con el antibiótico, similar perfil farmacocinético, limitadas reacciones adversas y mínimo efecto tóxico aditivo con el antibiótico. Dentro de los inhibidores de las β -lactamasas están: Ácido Clavulánico, Sulbactam. Dentro de las combinaciones posibles de inhibidores con antibióticos están: Sulbactam + Ampicilina, Amoxicilina + Sulbactam, Amoxicilina + Ácido clavulánico, Ticarcilina + Ácido clavulánico, Cefoperazona + Sulbactam y Piperacilina + Tazobactam (3).

3. β -Lactamasas

Las β -lactamasas se encuentran en una amplia variedad de especies bacterianas gram positivo y gram negativo. Pueden ser exoenzimas secretadas desde la pared bacteriana (bacterias gram positivo) mientras otras están en el espacio periplasmático (habitualmente bacterias gram negativo). Las enzimas pueden estar localizadas en los cromosomas bacterianos o en los plásmidos que pueden transferirse de una bacteria a otra.

Las β -lactamasas pueden ser constitutivas: presentes en ausencia del antibiótico a menudo en grandes cantidades, o inducibles: producidas solo después que la bacteria ha tomado contacto con el antibiótico.

Estas enzimas bacterianas heterogéneas rompen el anillo β -lactámico de penicilinas y cefalosporinas para inactivar al antibiótico (2,3).

Algunas enzimas afectan de forma predominante a las penicilinas; otras, a las cefalosporinas, mientras que otras más poseen actividad más amplia.

La presencia de β -lactamasas puede detectarse con rapidez, indicando de forma temprana que los aislamientos no responderán a los antibióticos β -lactámicos en cuestión (3).

3.1 Adquisición de β -lactamasas Plasmídicas

Este tipo de enzimas se encuentra generalmente codificado por elementos móviles tales como plásmidos, transposones o integrones. De los cuatro tipos de β -lactamasas que componen la clasificación de Ambler (A, B, C, y D) han sido descritas en plásmidos. Sin embargo, las más ampliamente distribuidas son las enzimas de espectro ampliado (grupo 2b de Karen Bush) TEM-1, TEM-2, SHV-1 y sus derivados de espectro extendido (grupo 2be de Karen Bush) TEM-3, SHV-2, etc, todas ellas pertenecen a la clase A de Ambler.

Existen diferentes estructuras de ADN (plásmidos, transposones e integrones) que intervienen en la diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Los plásmidos tienen la capacidad de transferirse entre bacterias de la misma especie o entre distintas especies y géneros. Esto los convierte en excelentes herramientas para la diseminación de resistencias. En general los plásmidos, sobre todo en aislamientos de Argentina, codifican para más de un mecanismo de resistencia. Este hecho determina que en un evento de transferencia, la bacteria receptora adquiera en bloque todos los mecanismos de resistencia que porta dicho plásmido.

Los transposones son fragmentos de ADN que pueden escindirse de su ubicación en la estructura de ADN que los contiene (plásmidos o cromosomas) y se pueden integrar en otra estructura de ADN. Por ejemplo un transposon puede desprenderse de un plásmido e integrarse al cromosoma bacteriano o viceversa. Este mecanismo da la posibilidad, por ejemplo, que mecanismos de resistencia cromosómico que no son transferibles pasen a un plásmido y a través de este a otra bacteria. Un ejemplo de este fenómeno lo constituyen las β -lactamasas tipo AMP-C que tienen codificación cromosómica en *Enterobacter spp*, *C. freundii*, *Serratia spp*, *M. morgani* y *Providencia spp*, pero que con la ayuda de transposones pudieron pasar a plásmidos y a través de estos alcanzar géneros bacterianos como *Klebsiella spp*. Donde no se las encuentra naturalmente. Además los transposones pueden ser conjugativos por sí mismos.

Los integrones son elementos de ADN que pueden estar en el cromosoma bacteriano, dentro de plásmidos o incluso formar parte de transposones. Estas estructuras se comportan como sitios calientes de inserción de cassettes de ADN.

Estos cassettes de ADN pueden codificar para mecanismos de resistencia a antibióticos. Cualquiera de las estructuras de ADN vistas anteriormente que posea un integrón, tendrá potencialmente la capacidad de incorporar secuencialmente genes de resistencia a distintos antimicrobianos (6).

Todos estos mecanismos de transferencia de genes son particularmente comunes en las enterobacterias y constituyen una de las formas más frecuentes de adquisición de resistencia a los antimicrobianos dentro de los miembros de esta familia (2).

3.2 β -lactamasas de Espectro Ampliado (BLEA)

TEM-1, TEM-2 Y SHV-1 son las BLEA plasmídicas más comúnmente distribuidas en bacilos gram negativo que pertenecen al grupo 2b del esquema de Bush.

Las BLEAs hidrolizan eficientemente aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina) y carboxipenicilinas (carbencilina y ticarcilina), esta hidrólisis se traduce en resistencia fenotípica a esas drogas en la mayoría de los casos. La resistencia a otros substratos como las cefalosporinas de primera generación, las acilureidopenicilinas y la combinación de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, sólo se observa cuando este tipo de enzima se hiperproduce. Autores como Livermore recomiendan evitar el uso de cefalosporinas de 1ª generación o acilureidopenicilinas en microorganismos productores de este tipo de BLEA, sensibles a estas drogas, a no ser que se trate de infecciones bajas, no complicadas, del tracto urinario donde la enzima no alcanza a protegerlos de la elevada concentración de antimicrobiano.

Prácticamente todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* producen cromosómica y constitutivamente bajos niveles de una BLEA (SHV-1) y los de *Klebsiella oxytoca* una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), (K1). Esto hace muy difícil establecer la prevalencia de BLEAs plasmídicas en este género ya que la resistencia conferida por este tipo de enzimas es muy similar a su resistencia natural (6).

3.3 β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE)

Las BLEE son enzimas que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, y monobactames.

En EEUU y Europa, estas enzimas suelen ser derivadas de las β -lactamasas de amplio espectro más comunes como las de tipo TEM-1 y TEM-2 o SHV-1. Solo unas pocas mutaciones en el gen que codifica a la enzima, convierte una BLEA en una BLEE. Estas mutaciones amplían el espectro de las enzimas extendiéndolo a las nuevas cefalosporinas y los monobactames, pero generalmente se acompañan de una pérdida importante de su eficiencia hidrolítica. Este hecho da como resultado en la mayoría de los casos niveles de resistencia muy bajos que no siempre elevan la concentración inhibitoria mínima (CIM) de estas drogas por encima del punto de corte de resistencia recomendado por el NCCLS, complicando su detección en el laboratorio clínico. En los últimos años se están realizando enormes esfuerzos para encontrar una metodología capaz de detectar desde el laboratorio este tipo de resistencia. Esto se debe a que frecuentemente, se han observado fallas de tratamiento con cefalosporinas de tercera generación (C3G) de microorganismos productores de BLEE a pesar de la sensibilidad *in vitro* mostrada por estas drogas (6).

3.4 Hiperproducción de SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* y de K1 en *Klebsiella oxytoca*

Las β -lactamasas SHV-1 y K1 se expresan en forma constitutiva de bajo nivel en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, respectivamente. Estas dos enzimas, en cepas salvajes, confieren una resistencia muy similar, afectando solamente a las aminopenicilinas (amoxicilina y ampicilina) y a las carboxipenicilinas (carbencilina y ticarcilina). A diferencia de lo que ocurre con la β -lactamasa cromosómica tipo AMP-C de *Enterobacter* spp o *Serratia* spp, SHV-1 y K1 no son inducibles, por lo tanto no se puede derreprimir. El aumento en los niveles de enzima producido se alcanza por un mecanismo distinto a la derrepresión y se denomina hiperproducción.

La hiperproducción de SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae* es poco frecuente. Cuando se produce, en general, es debida a la existencia de varias copias del gen dentro del cromosoma o cambios en el promotor del gen que codifica para la enzima. Este último fenómeno asociado a disminución de la permeabilidad de la membrana externa puede ocasionar un aumento considerable de la CIM para ceftazidima y piperacilina-tazobactam, pero es poco frecuente.

La diferencia principal entre SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* y K1 (OXY-1 y OXY-2) de *Klebsiella oxytoca* es la actividad de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) que ubica a esta última dentro del grupo 2be de Karen Bus. Cuando OXY-1 u OXY-2 se hiperproducen confieren al aislamiento un fenotipo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación y monobactames muy particular, son resistentes a todas las penicilinas y resistentes o moderadamente resistentes a cefotaxima y ceftriaxona pero totalmente sensibles a ceftazidima. Además, tampoco confieren resistencia a CXT y a los carbapenemes. La hiperproducción de esta enzima está provocada por mutaciones en el promotor del gen que codifica para la β -lactamasa. Como consecuencia de estas mutaciones la cantidad de enzima producida aumenta en general más de 100 veces. Este tipo de mutaciones aparecen con frecuencia de 10 al 20% en Europa y se han comunicado selecciones al tratamiento con cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona y cefotaxima) pero con una frecuencia mucho menor que para *Enterobacter* spp.

Tanto SHV-1 como K1 son sensibles a los inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero en los aislamientos de *Klebsiella oxytoca* que presentan hiperproducción de K1 la combinación β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa tiene muy baja actividad (6).

4. Interacciones BLEA y BLEE con β -lactámicos

Cuando *Klebsiella pneumoniae* adquiere un plásmido con una BLEA en general se eleva mucho el nivel de resistencia a amino y carboxipenicilinas. El ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam son buenos inhibidores de este tipo de enzimas, pero el éxito de la inhibición varía ampliamente con el nivel de BLEA producido y el β -lactámico a ser protegido. Las combinaciones más efectivas son piperacilina/tazobactam y cefaperazona sulbactam, esto se debe a que combinan débiles substratos, fáciles de proteger como piperacilina y cefoperazona, con potentes inhibidores. El ácido clavulánico también es un potente inhibidor, pero tiene la desventaja que esta asociado con penicilinas muy lábiles a este tipo enzimas, por lo tanto difíciles de proteger, como la amoxicilina y la ticarcilina. Las cefalosporinas y carbapenemes, que son resistentes a estas β -lactamasas conservan la actividad frente a bacterias productoras de BLEAs.

Se acepta internacionalmente que la presencia de una BLEE en cualquier microorganismo determina que el mismo se informe como resistente a las penicilinas, monobactames y todas las cefalosporinas inclusive las de tercera y cuarta generación independientemente de su sensibilidad “*in vitro*”. Todo esto llevo a la NCCLS a modificar los puntos de corte para cefalosporinas de tercera generación en el año de 1997, haciéndolos mucho más exigentes, pero esta modificación sólo alcanzó a *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*

En Argentina la realidad es muy particular, aproximadamente las dos terceras partes de la resistencia mediada por BLEE en *Klebsiella spp.* se debe a la producción de CTS-M-2. Esta enzima es una fuerte cefotaximasa perteneciente al grupo 2be de la clasificación de Karen Bush con muy poca actividad sobre ceftazidima y astreonam, inhibible por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Esta enzima sólo fue descrita en Argentina y algunas cepas de Paraguay y Uruguay. Se encuentra generalmente codificada en megaplásmidos transferibles de alto peso molecular (> 120 Kb). En casi la totalidad de los casos, estos plásmidos codifican, además para la síntesis de dos enzimas inactivantes de aminoglucósidos y otros mecanismos de resistencia característico: resistencia neta a gentamicina (casi siempre sin halo de inhibición) y

sensibilidad variable a amicacina con halos de inhibición alrededor de 14 mm. Fenotípicamente la resistencia mediada por CTX-M-2 varía ampliamente según la especie bacteriana en que se encuentre y según el aislamiento en particular. La presencia de esta β -lactamasa en distintos aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* confiere niveles de resistencia heterogéneos que van desde la franca resistencia de cefotaxima y ceftazidima, hasta cepas sensibles a ceftazidima y con resistencia intermedia a cefotaxima.

PER-2 es otra BLEE encontrada en Argentina, a diferencia de CTX-M-2 tiene fuerte actividad ceftacidimasa y es el segundo miembro de una nueva familia de enzimas. El otro miembro de la familia, PER-1, fue descrito en Turkía y muestra similar perfil de sustratos, hidroliza muy eficientemente ceftazidima y astreonam y en menor medida a cefotaxima, cefepime, y cifbutem. La actividad sobre cifbutem diferencia PER-2 de la mayoría de las BLEE. La resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en aislamientos productores de esta enzima, es inequívoca, superando los puntos de corte tanto para ceftazidima como para cefotaxima, su prevalencia en *Klebsiella spp.* es de aproximadamente el 12%. Hasta la actualidad se encontró codificada siempre en plásmidos de alto peso molecular (> 120 Kb) transferibles por conjugación. PER-2 presenta un perfil de inhibición muy particular, además de ser inhibida por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, sufre una fuerte inhibición por cefotaxima e imipenem que se refleja en el antibiograma al colocar próximos un disco de cefalosporina de tercera generación y uno de cefotaxima o imipenem. La inhibición enzimática producida por estas drogas agranda el halo de la cefalosporina de tercera generación, observándose un efecto similar al producido por el disco de amoxicilina-ác-clavulánico o el de ampicilina-sulbactam sobre la cefotaxima con la mayoría de las BLEE (efecto huevo).

En Argentina las BLEE tipo SHV representan aproximadamente el 21% de las enzimas hidrolizantes de cefalosporinas de tercera generación encontradas en *Klebsiella spp.* Los miembros de esta familia que se describieron en Argentina fueron SHV-2 (11%), y SHV-5 (10%). Hasta el momento no se han detectado en Argentina BLEE pertenecientes a la familia TEM, hecho que resulta muy extraño, teniendo en cuenta la amplia difusión que tiene TEM-1 en la familia *Enterobacteriaceae*.

Todas las BLEE plasmídicas detectadas en *Klebsiella spp.* son sensibles a la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Pero el fenotipo observado en productores de BLEE cuando se ensayan combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, varía considerablemente entre individuos de la misma especie y sobre todo depende de la cantidad de enzima sintetizada. La actividad de las combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas en los aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE de Argentina, es muy pobre. Menos del 5% de los mismos presenta sensibilidad a ampicilina-sulbactam, amoxicilina-clavulánico o ticarcilina-clavulánico. La actividad de las combinaciones más potentes, piperacilina tazobactam y cefoperazona-sulbactam es un poco más alta, con porcentajes de actividad que ronda el 25% de las cepas con resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

Como ya hemos visto, la presencia de una BLEE en enterobacterias puede determinar falla de tratamiento de infecciones severas con cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactames a pesar de parecer sensibles por el antibiograma. La correcta detección de este mecanismo de resistencia en los aislamientos clínicos es, por lo tanto una gran responsabilidad del laboratorio de microbiología. El nivel de dificultad para detectar este mecanismo de resistencia depende especialmente del tipo de β -lactamasa que se trate. Es particularmente difícil en EEUU o Europa donde predominan las BLEE tipo TEM o SHV. Esto se debe a la baja actividad hidrolítica que este tipo de enzimas tienen sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Este hecho determina que los aislamientos productores puedan mostrar sensibilidad a estas drogas en el antibiograma a pesar de poseer el mecanismo de resistencia. En la actualidad existe una gran variedad de métodos para la detección de β -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Hay métodos basados en la actividad hidrolítica de estas enzimas. Dentro de estos el más sencillo es el que se basa en el antibiograma. La actividad hidrolítica de estas enzimas sobre las cefalosporinas de espectro extendido y monobactames determinan, en general, la resistencia a estas drogas en el antibiograma. Como vimos antes, esto no siempre presenta resistencia neta en el antibiograma. Teniendo en cuenta este hecho y después de muchos estudios, el NCCLS proporcionó nuevas recomendaciones con respecto a los puntos de corte a

utilizar en la detección de BLEE en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Estos nuevos puntos de corte son mucho más exigentes y aumentan considerablemente el nivel de detección de aislamientos clínicos con este tipo de enzimas. Las drogas recomendadas son : cefotaxima, ceftriaxona, ceftaxidima, cefpodoxima y aztreonam. Cuanto más de estas drogas se utilicen en el antibiograma mayor será la probabilidad de detectar cepas productoras de bajos niveles de BLEE. Estudios realizados en Argentina indican que los mejores detectores de estas enzimas son los discos de cefotaxima, ceftriaxona o cefpodoxima. Contrariamente a lo observado en EEUU, ceftazidima y aztreonam presentan muy pobre sensibilidad en la detección de BLEE en Argentina (6).

5. Identificación de Resistencia Microbiana

5.1 Antibiograma

El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad a uno o varios antibióticos de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección. En efecto, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales.

El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como puede adaptarse la antibioterapia empírica, revisarse regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptarse ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales.

Hay pues un doble interés: Terapéutico y epidemiológico (7).

5.2 Cuándo Realizar un Antibiograma

Siempre que una toma bacteriológica de finalidad diagnóstica haya permitido el aislamiento de una bacteria considerada responsable de la infección.

Establecer esta responsabilidad exige una colaboración entre el bacteriólogo y el clínico. En efecto, en ciertas circunstancias, el microbiólogo no podrá determinar con certeza que el aislamiento de una bacteria exige un antibiograma, sin los datos clínicos que le aporta el médico. Por ejemplo, una bacteria no patógena puede ser responsable de la infección de un enfermo inmunodeprimido o en un lugar determinado del organismo. La presencia de signos clínicos puede ser también determinante para la realización de un antibiograma (por ejemplo: la infección urinaria con un número reducido de gérmenes) (7).

5.3 Interpretación del Antibiograma

Ciertos mecanismos de resistencia se expresan débilmente *in vitro*, cuando se inscriben en el ADN bacteriano. Su expresión en el organismo, en donde las condiciones en cuanto a medios son diferentes, expondría al riesgo de fracaso terapéutico. Para evitar esto, el antibiograma debe ser interpretado de manera global a fin de descubrir, a través de la comparación de las respuestas para cada antibiótico, un mecanismo de resistencia incluso débilmente expresado. Así, gracias a la interpretación, una cepa que aparece como falsamente sensible será categorizada como intermedio (I) o resistente (R). (Ejemplo: Una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE puede aparecer sensible *in vitro* a las cefalosporinas de tercera generación. El resultado de Sensible (S), debe ser corregido a Intermedio o Resistente, ya que la utilización de estos antibióticos correría el riesgo de provocar un fracaso terapéutico (7).

6. Importancia del Control de la Resistencia Antimicrobiana

Estudios realizados en hospitales de diferentes lugares del mundo, han revelado un aumento de los aislamientos de Enterobacterias resistentes, entre ellas se menciona muy a menudo la presencia de *Klebsiella spp.* como uno de los patógenos que a incrementado su resistencia a los antibióticos (8-13).

Este incremento en los aislamientos de *Klebsiella* multirresistente, ha desencadenado una serie de serias infecciones, del tracto urinario, respiratorio, piel, tejido blando y septicemias, el cual ha puesto a los centros hospitalarios en una difícil situación; ya que éstas cepas pueden propagarse dentro de las diferentes unidades de los hospitales, así como también fuera de éstos, y diseminarse en la población en general; provocando de esta forma un mayor incremento de este tipo de *Klebsiella* (12,14-16).

Las unidades hospitalarias que presentan ó han reportado un incremento de resistencia a los antibióticos por parte de *Klebsiella spp.*, son unidad de cuidados intensivos, pediátrías, nefrologías y salas de cirugía; estas unidades, tienen a su cargo a personas de un alto riesgo, ya que muchas de ellas están inmunosuprimidas, como es el caso de recién nacidos, enfermos de cáncer y personas que han recibido algún trasplante ó fueron sometidas a cirugías, las cuales los expone a la adquisición de una infección nosocomial por parte de estas cepas multirresistentes (10,11,14,17-21).

La actividad antimicrobiana por parte de antibióticos tales como penicilinas y cefalosporinas ha decrecido en los últimos años, dentro de los hospitales, los niveles de resistencia presentados en los estudios realizados son alarmantes, los cuales proveen evidencia completa de la necesidad de un monitoreo y un uso racional de los antibióticos (22-25).

El mecanismo de resistencia que se asocia a miembros del género *Klebsiella*, es el mediado por β -lactamasas. En diferentes lugares del mundo se ha reportado que este mecanismo es el causante de la resistencia adquirida por parte de este tipo de bacterias. Esto infiere un serio problema en la salud de la población debido al alto índice de *Klebsiellas* productoras de β -lactamasas que es reportado en un gran número de países especialmente en países europeos. Nuestra región no está exenta de este tipo de problema ya que se han obtenido resultados muy preocupantes en lugares como Brasil, Argentina y México. Donde la resistencia llega a 56.6%, 69% y 31.0% respectivamente (25-33).

La resistencia bacteriana esta emergiendo en América Latina y es un problema que favorece la adquisición de infecciones en la comunidad, tanto hospitalarias como extrahospitalarias. Esto requiere una extensiva vigilancia especialmente en las áreas de la salud, que son quienes necesitan estar informados sobre el creciente problema que se está suscitando en la región (34).

Un componente esencial de cualquier programa de control lo constituye el uso apropiado de los antibióticos. El uso indiscriminado en humanos, animales y en la agricultura, ejerce una presión selectiva y determinan la emergencia de la resistencia a los mismos. Se impone, pues, pensar en mejores estrategias de control. Una nueva perspectiva de la diseminación de estas bacterias y la resistencia a los antibióticos, tiene que ser tomada muy en cuenta por los clínicos, microbiólogos y epidemiólogos, ya que presenta un problema real para la salud de los países en vías de desarrollo (35).

IV Justificación

La importancia de la resistencia a los antibióticos radica en un aumento de la morbilidad, mortalidad, dificulta el tratamiento a los pacientes e incrementa significativamente los costos asistenciales, ya que la necesidad de tratar infecciones por bacterias resistentes ha estimulado el uso empírico de medicamentos de última generación, cuyo costo es veinte veces o más que los tradicionales.

La resistencia microbiana se ve aumentada por el uso indiscriminado de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades en humanos y el incremento en la utilización de estos productos en la industria agropecuaria y ganadera, de igual manera la falta de regulaciones sanitarias adecuadas y la venta libre de medicamentos antimicrobianos favorecen el consumo indebido de estos productos, así como también el desconocimiento de la epidemiología de la resistencia bacteriana local y regional, lo cual no permite proponer medidas sobre el uso racional de los antimicrobianos.

En Guatemala, hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para la determinación de β -Lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y de espectro extendido (BLEE), por medio de la metodología de difusión en discos (Kirby-Bauer).

Esta metodología es una herramienta de mucha utilidad, de bajo costo y al alcance de cualquier laboratorio, por medio de la cual se puede determinar la resistencia adquirida de bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* en cualquier aislamiento realizado.

Actualmente se utiliza la prueba para la determinación de la sensibilidad de estas bacterias a los antibióticos por medio de un mono disco el cual muchas veces puede revelar falsa sensibilidad a cefalosporinas principalmente de 3^a generación; dando interpretaciones erróneas al clínico y por ende falla del tratamiento.

Por lo anterior se considera necesario poner en evidencia el grado de resistencia que han adquirido las bacterias a los distintos antibióticos usados en nuestro medio, específicamente a cefalosporinas de 1^a, 2^a, y 3^a generación.

V Objetivos

1. Objetivo General

Determinar la presencia o ausencia de β -lactamasas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, por medio del método de difusión en disco.

2. Objetivos Específicos

- a) Determinar resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos, (quinolonas, aminoglucósidos y sulfamidas) en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.
- b) Relacionar la resistencia de β -lactamasas de espectro extendido hacia otros antibióticos dentro del Hospital de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.
- c) Determinar y clasificarlas según el origen o área hospitalaria la presencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* con β -lactamasas de espectro ampliado y extendido.
- d) Utilizar el programa computarizado WHONET para el manejo de resultados.

VI Materiales y Métodos

1. Universo y Muestra

1.1 Universo

Pacientes del Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.

1.2 Muestra

385 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, obtenidas de pacientes con infección por estas bacterias.

2. Materiales

2.1 Equipo

- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Computadora
- Estereóscopo
- Estufa
- Incubadora
- Nefelómetro
- Refrigeradora
- Vortex

2.2 Reactivos

- Aislamiento bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*
- Agar tripticasa soya
- Estándar 0.5 de McFarland
- Discos con antibióticos de Cefalosporinas de 1^a, 2^a y 3^a generación
- Discos con inhibidores de las β -lactamasas
- Discos con ampicilina, imipenem, cefoxitin, gentamicina, ciprofloxacina, amicasina y trimetropinsulfametoxazol.
- Placas de agar, Mueller-Hinton
- Placas de agar sangre.

2.3 Instrumentos

- Hisopos de algodón estériles
- Asas de nicromo
- Mecheros
- Pinzas o dispensadores multidiscos
- Reglas o plantillas para medir diámetro de zonas de inhibición

2.4 Cristaleria

- Tubos con rosca (13 x 100 mm)
- Erlenmeyers
- Cajas de petri
- Beakers
- Varillas de vidrio

3. Métodos

3.1 Prueba de Susceptibilidad de Difusión en Discos (Bauer-Kirby)

3.1.1 Preparación del Inóculo

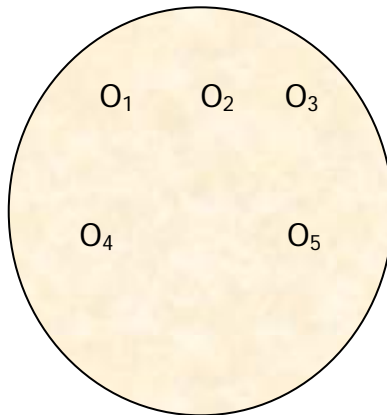
De un cultivo puro en una placa de agar sangre se tocó la superficie de cuatro a cinco colonias de la bacteria en estudio con un asa de alambre, se transfirió lo recolectado en el asa a un tubo que contenía 5 ml de solución salina estéril, se agitó vigorosamente en una mezcladora giratoria mecánica. Empleando luz adecuada, se observó el tubo contra un fondo negro como contraste hasta alcanzar el estándar (0.5 de Macfarland). Se sumergió un hisopo de algodón, no tóxico, estéril, en un periodo no mayor a 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez en el tubo que contenía el inóculo y se rotó varias veces, ejerciendo una presión firme sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso de líquido.

Se inoculó la superficie seca de una placa de Mueller-Hinton, a temperatura ambiente pasando el hisopo en tres direcciones por toda la superficie del agar, rotando la placa aproximadamente 60° para asegurar una distribución pareja del inóculo. Se colocó la tapa de la placa y se esperó no más de 15 minutos para que la superficie del agar se secase, antes de colocar los discos de antibiótico.

3.1.2 Colocación de Discos

Se colocaron los discos impregnados con el antibiótico sobre la superficie del agar mediante una pinza, de la siguiente forma:

1. Cefotaxima
2. Amoxicilina- ácido clavulánico
3. Ceftacidima
4. Cefoxitin
5. Ampicilina



Se presionó con suavidad los discos sobre el agar para permitir un contacto uniforme, porque parte de la droga difunde casi inmediatamente. Los discos deben tener una distribución pareja sobre el agar, de modo que se colocaron a una distancia de 2.5 cm de centro a centro.

Se colocaron las placas de forma invertida y se incubaron a 35°C en incubadora con aire ambiente durante 24 horas.

3.1.3 Medición de Diámetros de Inhibición (Detección de BLEAs)

Los halos de inhibición se observaron claramente al cabo 24 horas. Se midió cuidadosamente las zonas de inhibición alrededor del disco de ampicilina, mediante un escalímetro con aproximación al milímetro; el diámetro del disco está incluido en esta medición.

Para la detección de las BLEAs se utilizó el criterio de susceptible, moderadamente susceptible, intermedio o resistente con referencia a los lineamientos publicados.

3.1.4 Prueba Tridimensional de Doble Disco (Detección de BLEEs)

Se colocó en el antibiograma los discos de cefalosporinas de 3^a generación (cefotaxima y ceftazidima), próximos a un disco de amoxicilina-clavulánico.

Si la cepa en estudio produjo una BLEE, se observó una deformación del halo producido por la cefalosporina de tercera generación (ver figura 1). Este fenómeno es conocido como “efecto huevo” y toma distintas formas dependiendo del inhibidor sobre la BLEE en cuestión y sobre todo de la distancia a la que son colocados los



Figura 1. Prueba de doble difusión con discos. Ampliación de los halos de inhibición de la cefotaxima, ceftazidima y el aztreonam debido a la inhibición de la β -lactamasa plasmídica de espectro ampliado por la acción del ácido clavulánico contenido en el disco de amoxicilina/ácido clavulánico (en el centro del antibiograma).

discos. La distancia para la colocación de los discos fue de 2.5 cm de centro a centro.

3.1.5 Control de Calidad

Se utilizó *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700600 como cepa de referencia para la utilización de los diferentes lotes de antibióticos y placas de agar antes de realizar la prueba, así como el control de las temperaturas de los distintos equipos utilizados.

3.1.6 Procesamiento de Datos

Se analizó cada una de las muestras en estudio, clasificándolas en productoras o no productoras de β -lactamasas. De esta forma se sacaron porcentajes de las dos distintas especies de *Klebsiella* en estudio. Estos datos fueron procesados en un computador por medio del programa WHONET, que es un programa estadístico utilizado por la Organización Panamericana de la Salud para estudiar la resistencia bacteriana, que permitió analizar datos epidemiológicos del enfermo y las características del germen en estudio.

3.2 Diseño de Investigación

3.2.1 Tipo de Análisis

- Descriptivo

3.2.2 Tipo de Muestreo

- Por cuota (por conveniencia) No probabilístico

3.2.3 Tipo de Estudio

- Prospectivo, transversal

3.2.4 Nivel de confianza

- 1.96

3.2.5 Varianza

- 0.25

3.2.6 Límite de Error

- 0.05

3.2.7 Número de Muestra

- 385

3.2.8 Fórmulas para el Diseño Estadístico

NC = Nivel de Confianza

Intervalo de confianza 95%

$$Z_{(1-\alpha/2)} = 1.96 \text{ (NC)}$$

σ^2 = Varianza

$$\sigma^2 = pq$$

Suponer la máxima variación posible

$$p = 0.5$$

$$q = 0.5$$

$$\sigma^2 = 0.25$$

Límite de error en la Estimación.

$$\Delta = 0.05$$

Número de muestra

$$n = NC^2 \times \sigma^2 / \Delta^2$$

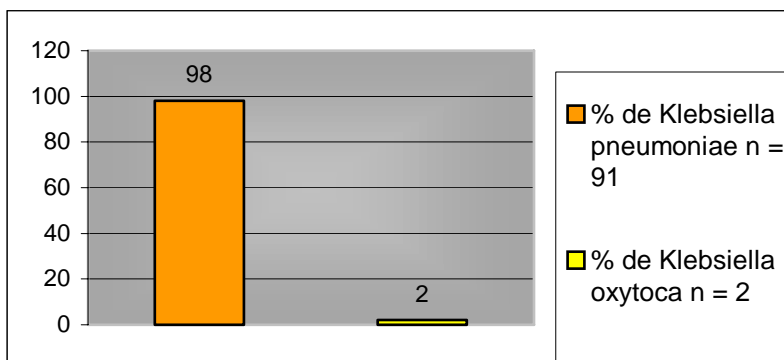
$$n = (1.96)^2 \times (0.25) / (0.05)^2$$

$$n = 385$$

VII Resultados

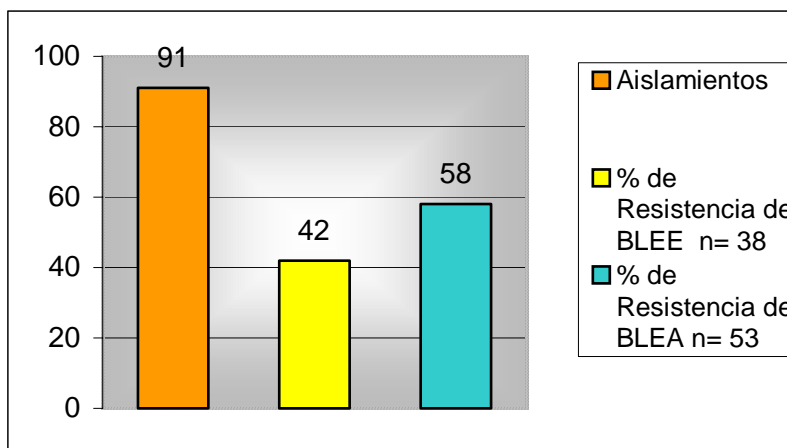
En la Gráfica No. 1 se observa distribución en porcentajes de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, que corresponden a un total de muestras analizadas de 93 cepas.

Gráfica No. 1



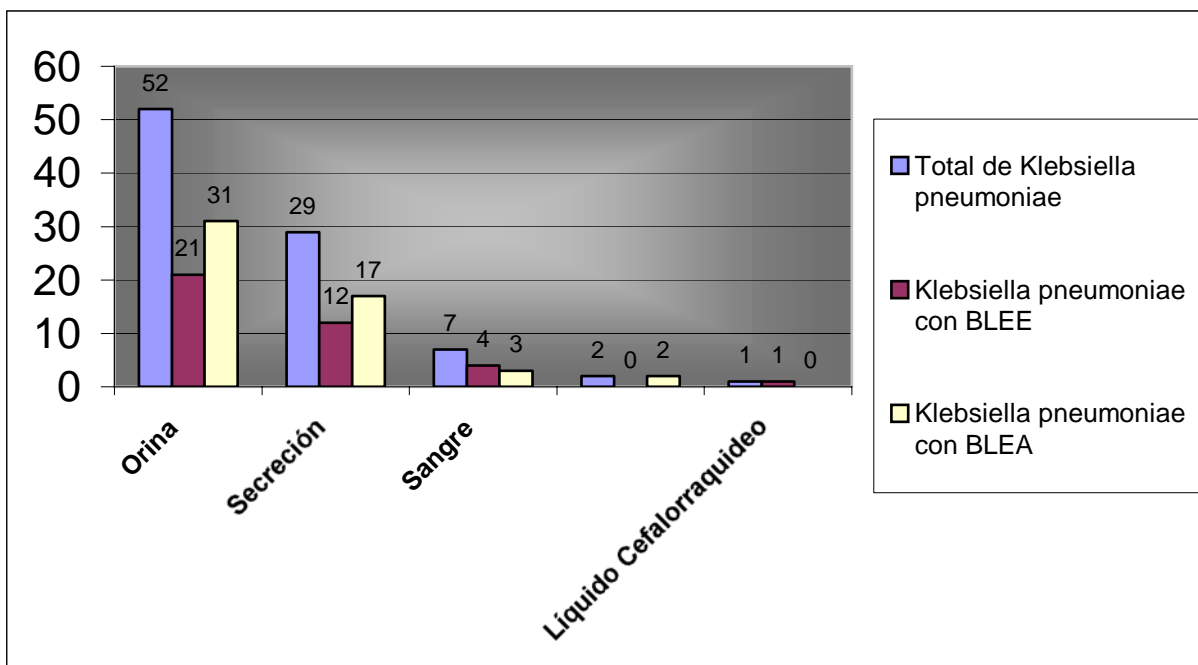
En la Gráfica No. 2, se expone el número de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, y la distribución en porcentajes de resistencia que éstas presentaron con BLEEs y BLEAs. Respectivamente.

Gráfica No. 2



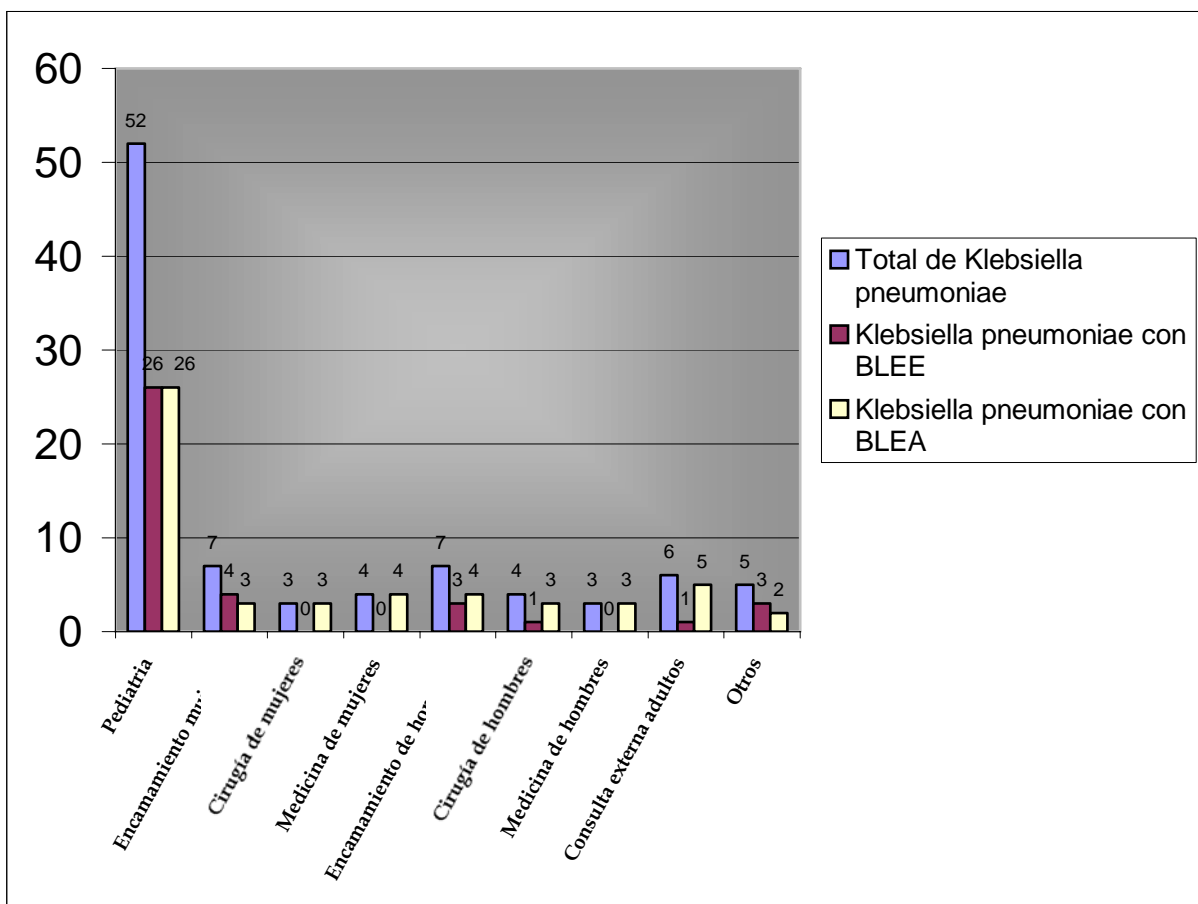
En la Gráfica No. 3 se observa la distribución de *Klebsiella pneumoniae*, en las distintas muestras analizadas en el estudio realizado, así como la distribución de resistencia de éstas cepas con BLEEs y BLEAs. Siendo las muestras de orina y secreción las que se presentaron en mayor número y por ende fueron las muestras en las cuales se distribuyó en mayor cantidad la resistencia con BLEEs seguidas de muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo, el esputo fue la única muestra trabajada en la cual no se presentaron cepas con resistencia por parte de BLEEs.

Gráfica No. 3



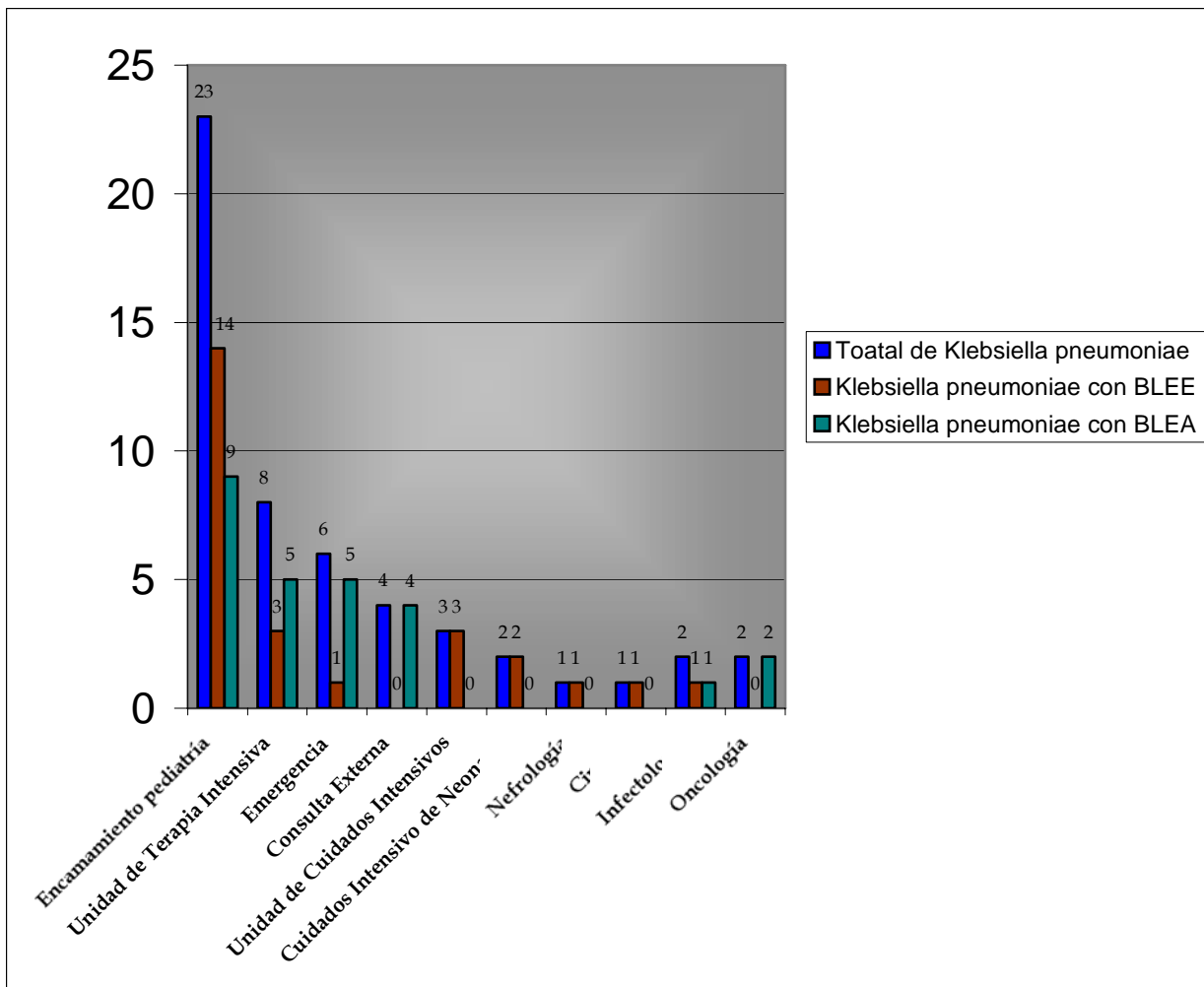
En la gráfica No. 4 se observa la distribución de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, así como también de cepas de ésta misma con BLEEs y BLEAs en las distintas salas analizadas del centro asistencial en mención, es preciso hacer resaltar que la distribución de BLEEs se encuentra en la mayoría de salas, Pediatría muestra los niveles más altos de cepas con BLEEs, en tanto las salas de Medicina de hombres, Medicina de mujeres y Cirugía de mujeres no muestran la presencia de estas.

Gráfica No. 4



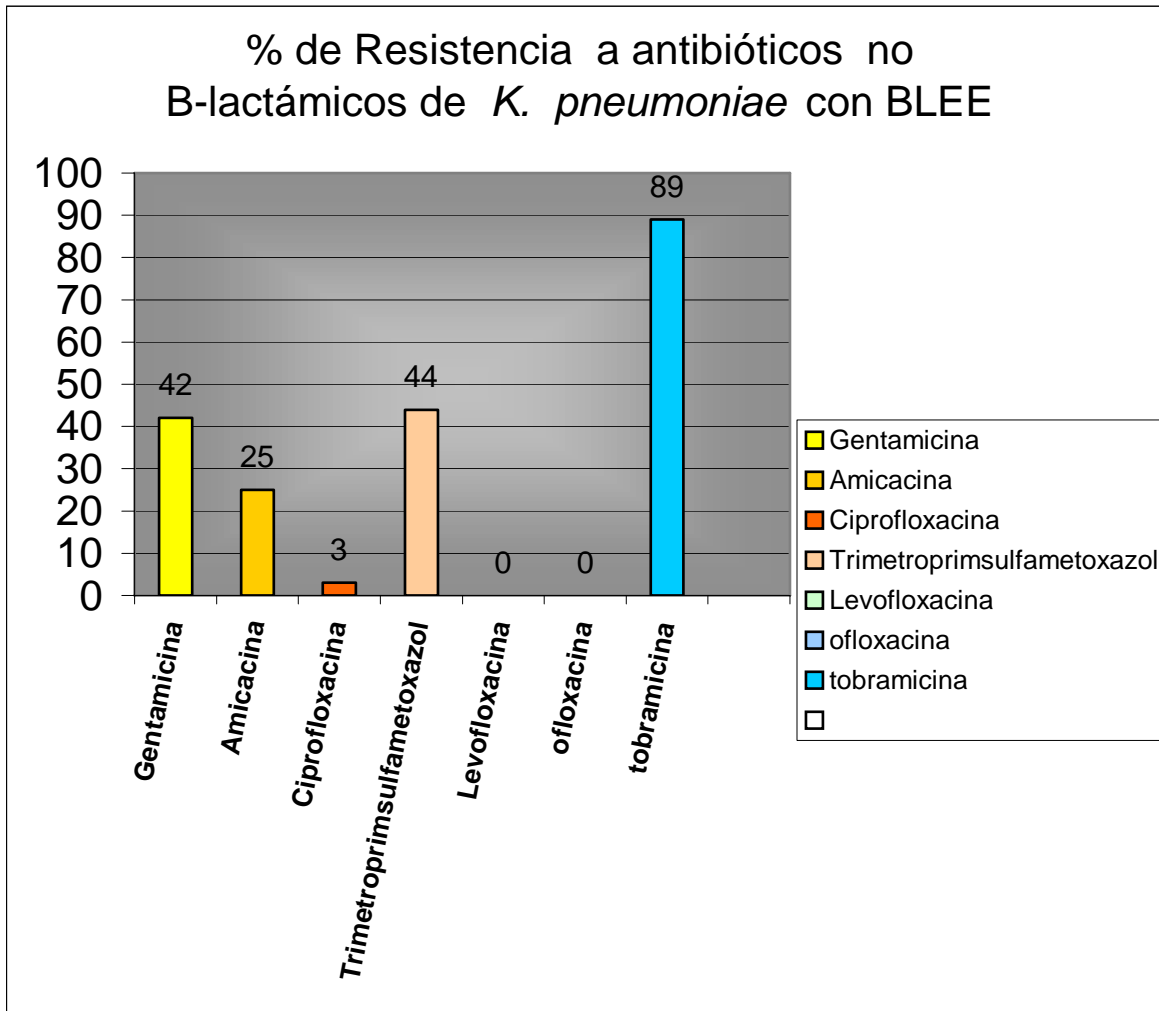
En la gráfica No. 5 presenta la distribución de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEEs y BLEAs en los diferentes servicios del área de pediatría, en ésta gráfica se puede notar que estas cepas se han diseminado en la mayoría de los servicios, en especial las cepas con BLEEs que se mantienen presentes en servicios de gran importancia, como los encamamientos y las unidades de cuidados intensivos, los únicos servicios donde estas bacterias no se han presentado son oncología y consulta externa.

Gráfica No. 5



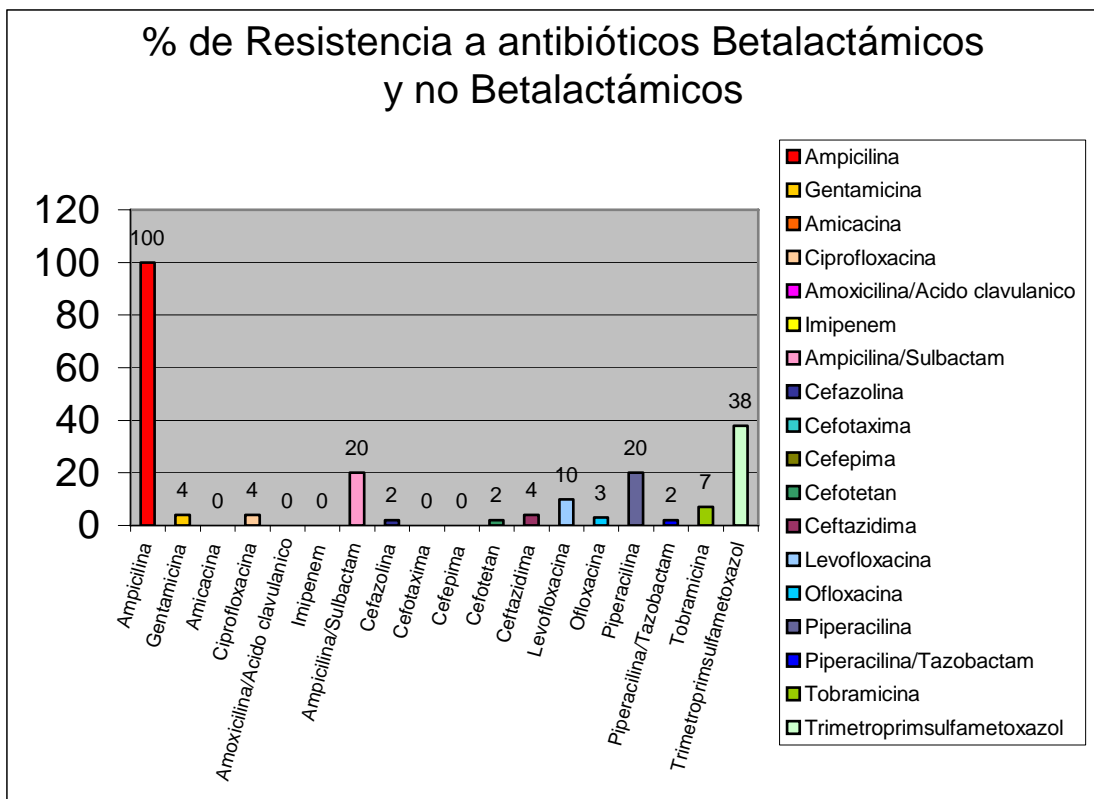
En la gráfica No. 6 se observa el perfil de resistencia por parte de cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEEs, hacia algunos antibióticos no Betalactámicos.

Gráfica No. 6



En la gráfica No. 7 se observa el perfil de resistencia por parte de cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEAs, antibióticos Betalactámicos y no Betalactámicos.

Gráfica No. 7



VIII Discusión de Resultados

El impacto que muestra la resistencia antimicrobiana hoy por hoy, es de niveles alarmantes y es uno de los problemas a nivel de salud pública de carácter emergente. Conocer los niveles de resistencia de las distintas bacterias dentro de los centros hospitalarios es ahora una necesidad, debido a que la alta morbi-mortalidad que conlleva la resistencia antimicrobiana, además de que los costos debido a la misma son tan grandes que ponen en estado de alerta ante un colapso a las instituciones hospitalarias. Las enterobacterias son de las bacterias más comunes en los hospitales y conocer su presencia y resistencia dentro de los centros hospitalarios ayuda en el control y prevención de este problema creciente.

La producción de enzimas inactivantes (β - lactamasas) de antibióticos, por parte de las enterobacterias es común y su búsqueda se ha vuelto más compleja. Estas mismas β -lactamasas que con frecuencia sufren variaciones genéticas hacen que los sustratos blanco se amplíen y de esta manera acrecientan la resistencia a los antibióticos. Las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) son enzimas que inactivan sustratos penicilínicos y algunas veces logran inactivar cefalosporinas de primera y segunda generación, estas se presentan naturalmente en *Klebsiella sp*, y pueden ser transferidas por medio de plásmidos a bacterias que no las poseen. Las B-lactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas más especializadas que las BLEA ya que inactivan no solo sustratos penicilínicos, sino también a todas la cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta generación y aztreonam.

Esto implica la disminución de opciones terapéuticas, lo que conlleva al uso de medicamentos mucho más potentes que los que se tienen a disposición actualmente, teniendo como consecuencia el incremento en el costo del tratamiento y exponiendo a las bacterias a crear variantes de resistencia con la utilización de estos antibióticos, agravando de esta forma el problema que se tiene actualmente.

La importancia de la identificación de BLEE en las bacterias, radica en que muchas veces lleva corresponsabilidad a otras familias bacterianas, debido al intercambio de material genético por medio de plásmidos, por el cual se transfieren los mecanismos de resistencia expandiendo a una mayor escala el problema creciente de resistencia bacteriana.

En la Gráfica No.1 se presenta la cantidad de muestras analizadas, que corresponden a la cantidad de cepas recolectadas en un período de 6 meses. En el presente estudio el tipo de muestreo fue por conveniencia según el diseño estadístico elaborado para el mismo, es por este motivo que se eligió este tiempo para la recolección de las muestras. En la distribución de las dos cepas escogidas como se observa en la gráfica, hay una diferencia muy marcada entre la cantidad de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, esto se debe a que por naturaleza *Klebsiella pneumoniae* tiene una mayor diseminación natural en el hombre y en especial en un centro hospitalario de donde fueron recolectadas, ya que existen las condiciones apropiadas para el desarrollo de ésta bacteria.

En la Gráfica No. 2 la distribución en *Klebsiella pneumoniae* con betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), como las de espectro extendido (BLEE), muestra el grado de resistencia presente en ésta bacteria, lo cual es indicativo del grado de resistencia en el centro hospitalario de donde fueron recolectadas. La resistencia presentada por parte de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), como se puede apreciar en la gráfica es un porcentaje alto, esto quiere decir que las cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEEs, se han diseminado en gran número en las personas que se encuentran recluidas en el centro hospitalario en estudio; este resultado es de gran importancia para el programa de vigilancia epidemiológica de este centro debido a que el gran porcentaje de resistencia presentado es un factor que se debe tomar en cuenta para el control de este tipo de cepas multirresistentes y de esta forma evitar una mayor diseminación tanto en los distintos servicios del centro hospitalario como en la población en general.

La resistencia mostrada por parte de las betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) en *Klebsiella pneumoniae* es una resistencia natural de éstas a las penicilinas, y se comportan con sensibilidad variable para cefalosporinas de primera y segunda generación, esto indica que las bacterias con BLEAs no han adquirido ningún tipo de multirresistencia a los antibióticos con los cuales se les combate en las infecciones causadas a la población que acude al centro hospitalario de donde fueron recolectadas, lo que implica que no se recomienda la utilización de antibióticos de últimas generaciones como primera elección para el tratamiento de personas con infecciones por parte de estas bacterias.

En la Gráfica No. 3 se observa la distribución de *Klebsiella pneumoniae* por el tipo de muestra analizado, se observa que hay una mayor cantidad de bacterias en las muestras de orina, seguido por las de secreción y las de sangre que son las tres más importantes ya que en estas se concentra la mayor cantidad de muestras. Este resultado es normal que se presente, debido a la misma naturaleza de las *Klebsiella pneumoniae* ya que estas tienen una mayor tendencia a causar infecciones en las vías urinarias de las personas, en las secreciones las *Klebsiella pneumoniae* se encuentran en aquellas personas que están cateterizadas, las condiciones que presentan los catéteres en especial en un centro hospitalario son ideales para que estas se desarrollen y causen muchas infecciones intrahospitalarias, y por último las muestras de sangre, que provienen de personas con septicemias en las cuales *Klebsiella pneumoniae* no es muy frecuente pero pueden llegar a causar infecciones como es el caso de esta distribución según el tipo de muestras. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* que presentan BLEEs la mayoría se encuentra en las muestras de orina, seguido por secreciones, y por sangre, es de gran importancia hacer esta comparación debido a la distribución presentada, ya que con estos datos se tendrá una noción de donde se encontrarán y con una mayor probabilidad de que aparezcan cepas multirresistentes, y con esta información se puede tener un control adecuado de cepas resistentes. Lo anterior no es motivo para descuidar la fuente del resto de muestras, aunque sea poco frecuente la aparición de *Klebsiella pneumoniae*, se puede presentar bacterias con multirresistencia, esto se hace evidente en la gráfica donde se presentó una muestra de Líquido Cefalorraquídeo, la cual contenía una *Klebsiella pneumoniae* con BLEE.

En la gráfica número 4 se presenta la distribución de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEEs y BLEAs y el número de aislamientos de ésta en cada uno de los servicios del Hospital, resaltando con gran importancia el servicio de pediatría en el cual se obtuvieron la mayor cantidad de aislamientos y por ende una elevada resistencia por parte de cepas con BLEEs, esto es debido a que este hospital es de referencia para el servicio de pediatría, como se puede apreciar en la gráfica la mayoría de servicios presentan cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEEs, los niveles que se presentan no es tan grande como pediatría debido que el servicio de pediatría está totalmente separado de los demás servicios

hospitalarios evitando de esta forma una mayor propagación de cepas con BLEEs dentro del centro asistencial, sin embargo la diseminación de ésta cepas ha abarcado la mayoría de los servicios, a excepción de cirugía de mujeres, medicina de mujeres y medicina de hombres en los cuales no se han presentado resistencia por parte de estas bacterias. En la consulta externa se ha encontrado pacientes que han sido afectados por este tipo de cepas resistentes, es de gran importancia este resultado debido a que estas cepas pueden estar propagándose dentro de la población en la comunidad en la cual la presión antibiótica es menor que a nivel hospitalario; debido a esto es de suma importancia para el comité de vigilancia epidemiológica del hospital dar seguimiento a este tipo de casos, en primer lugar para hacer un descarte de si esta persona adquirió la bacteria dentro del hospital en mención o si es una cepa que fue adquirida de otro centro asistencial o es una cepa multirresistente que se ha propagado dentro de la población, lo cual representaría un problema muy grave para la salud en general.

Debido a que en la mayoría de servicios del centro asistencial en estudio presentan cepas con BLEEs, nos indica que dentro de muy poco todo el centro hospitalario presentará casos de multirresistencia por parte de estas bacterias, si no se tiene un programa de vigilancia epidemiológico eficiente, que tomé las medidas necesarias para identificar y controlar estos focos de propagación, de lo contrario los niveles de resistencia con este tipo de cepas se incrementarían provocando un problema de consecuencias graves para la salud tanto para la población del hospital como de la comunidad.

En los resultados presentados en la gráfica No. 5 para el servicio de pediatría se muestra las diferentes salas, en las cuales la presencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEEs están presentes en la mayoría, y en algunas de gran importancia se han reportado que en un cien por ciento de las muestras analizadas, pertenecen a cepas con BLEEs. La gran propagación que ha sufrido este servicio, como anteriormente se ha mencionado, es debido a que el centro asistencial es de referencia para pediatría, por este motivo atiende a un gran número de pacientes, haciendo que las diferentes salas se encuentren siempre llenas, provocando un hacinamiento en el servicio, facilitando la propagación de este tipo de bacterias dentro de los infantes y por ende su resistencia dentro

de las distintas salas del servicio. Los niveles de resistencia son alarmantes especialmente en salas de mucha importancia como lo son cuidados intensivos, cirugía y nefrología debido a que todos los aislamientos de estas salas presentan BLEE, las otras salas muestran porcentajes diferentes pero esto puede variar en el tiempo dadas las medidas de control que se tomen, principalmente porque se atiende a neonatos y niños los cuales por su corta edad los hace muy vulnerables a infecciones por parte de éste tipo de bacterias. El comité de vigilancia epidemiológico en conjunto con el laboratorio debe establecer un sistema de vigilancia de la resistencia y controlar cualquier evento inusual de resistencia.

En la gráfica No.6 se aprecia que el nivel más alto de resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae*, está dirigida hacia dos familias de antibióticos que son los aminoglucósidos (Gentamicina, Amicacina y Tobramicina) y Trimetroprim-sulfametoxazol. Dentro de los aminoglucósidos el que presenta una mayor resistencia es tobramicina, seguido de gentamicina y por último amicacina, esto quiere decir que *Klebsiella pneumoniae* ha estado en mayor contacto con los aminoglucósidos dentro del centro hospitalario por lo cual se ha incrementado los niveles de resistencia hacia estos antibióticos. Trimetroprim-sulfametoxazol es otro antibiótico que presenta una resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae*, presenta una mayor resistencia que gentamicina que es el segundo antibiótico de la familia de los aminoglucósidos con mayor porcentaje de resistencia, esto es indicativo del uso frecuente de éste fármaco dentro del centro asistencial en estudio. Las quinolonas (Ciprofloxacina, Ofloxacina y Levofloxacina) son los antibióticos que presentan los niveles de resistencia más bajos por parte de *Klebsiella pneumoniae* con BLEE.

En la Gráfica No. 7 se aprecia a los antibióticos betalactámicos y no betalactámicos y los niveles de resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae* con BLEA, se puede observar claramente que ampicilina muestra una resistencia del 100 % esto es debido a que *Klebsiella sp.*, tienen una resistencia por naturaleza hacia este antibiótico en particular, por

lo tanto es indicativo de una adecuada determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio.

En la serie de antibióticos presentado se puede distinguir que los fármacos con mayor nivel de resistencia son ampicilina/sulbactam, piperacilina y trimetroprimsulfametoxazol.

Haciendo una comparación de los niveles de resistencia entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* con BLEE y BLEA que se observan en los gráficos 6 y 7 se puede decir que cuando hay cepas que presentan BLEEs como mecanismos de resistencia, la familia de los aminoglucosidos son las que se ven más afectados por éstas enzimas, debido a que las bacterias han adquirido esta resistencia por el contacto frecuente a estos antibióticos o por la transferencia de resistencia de otras familias de enterobacterias por medio de plásmidos los cuales les confieren este tipo de defensa.

IX Conclusiones

1. El aislamiento más frecuente es *Klebsiella pneumoniae* .
2. El tamizaje con ceftazidima, amoxicilina-ácido clavulánico y cefotaxima permite la detección de β -lactamasas de espectro extendido.
3. Los aminoglucósidos son los antibióticos no betalactámicos que se ven más afectados cuando hay presencia de β -lactamasas de espectro extendido.
4. La presencia de *Klebsiella pneumoniae* con β -lactamasas de espectro extendido, está distribuida en todas las áreas del centro asistencial en estudio.
5. Pediatría es el área hospitalaria con los mayores niveles de resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae* con β -lactamasas de espectro extendido.
6. El tipo de muestra donde se aísla con mayor frecuencia *Klebsiella pneumoniae* con β -lactamasas de espectro extendido es la orina.

X Recomendaciones

1. Establecer un programa de vigilancia epidemiológico que controle este tipo de situaciones y que este coordinado conjuntamente con el laboratorio y el comité de vigilancia epidemiológico del Hospital.
2. Promover y facilitar estudios que permitan la identificación de los diferentes mecanismos de resistencia que presentan las enterobacterias para un mejor control de la multirresistencia bacteriana.
3. Crear un programa por el cual se difunda y se instruya al personal de salud sobre la importancia que tiene la resistencia mediada por las β -lactamasas y las alternativas que se tienen para evitar la creciente propagación de éstas.

XI Bibliografía

1. Pelczar M J, Reid R D, Chan E C S. Microbiología. 4. ed. México: McGraw-Hill 1989. 826p.
2. Koneman W E. Diagnóstico Microbiológico. 3. ed. Argentina: Médica Panamericana 1992. 881p.
3. Reno M B. Antibióticos. 5. ed. Argentina: Médica Panamericana 1993. 940p.
4. Cefalosporinas : <http://www.lafacu.com/apuntes/medicina/cefalosporinas/>
5. Rol de las cefalosporinas en la práctica diaria 1998. [www.funcei.org.ar/paginas/publicaciones/medicas/fasciculos_newsletters/cefalosporina_practica_diaria .htm](http://www.funcei.org.ar/paginas/publicaciones/medicas/fasciculos_newsletters/cefalosporina_practica_diaria.htm)
6. Galas M, Corzo A. Resistencia Antibacteriana en Argentina. Buenos Aires: Servicio Antimicrobianos INEI 2000.
7. El antibiograma: http://danival.org/microclin/antibiot/madre_antibiot.html
8. Kumarasinghe G. et. al. Antimicrobial Resistance Problem in an University Hospital. Pathology 1995; 27 (1): 67-70.p
9. Ahmad S. et. al. Urinary Tract Infection at a Specialist Hospital in Saudi Arabia. Bangladesh Med Res Counc Bull 1995; 21 (3): 8-95.p
10. Cristino J M. et. al. Multicenter Study of Isolated Microorganism Resistant to Antimicrobial in 10 Portuguese Hospitals in 1994. Acta Med Port 1996; 9 (4-6) 50-141.p
11. al-Mugeiren M M. et. al. Bacteriologic Profile and Drug Resistance in Pediatric Patients with Symptomatic Bacteriuria. Clin Ther 1996; 18 (2) : 295-300.p
12. Barsic B. et. al. Antibiotic Resistance Among Gramnegative Nosocomial in the Intensive Care Unit: Result of 6 year body site monitoring. Clin Ther 1997; 19 (4): 691-700.p
13. Akindele J A. et. al. Outbreak of Neonatal Klebsiella Septicemia: a review of antimicrobial sensitivities. Afr J Med Sci 1997; 26 (1-2): 3-51.p
14. Berghmans T. et. al. Epidemiology of Infection in the Adult Medical Intensive Care Unit of a Cancer Hospital. Support Care Cancer 1997; 5 (3): 40-234.p

15. Kesah C N. et. al. Prevalence, Antimicrobial Properties and Beta-lactamase Production of Haemolytic Enterobacteria in Patients with Diarrhoea and Urinary Tract Infection in Legos, Nigeria. *Cent Afr J Med* 1996; 42 (5): 50-147.p
16. Jones M E. et. al. Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Pathogens Associated with Skin and Soft Tissue Infections During 1997 from an International Surveillance Programme. SENTRY Participants Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18 (6): 8-403.p
17. Neu H C. Emergence and Mechanisms of Bacterial Resistance in Surgical Infections. *Am J Surg* 1995; 169 (5A Suppl): 13-20.p
18. Calva J J. et. al. Antimicrobial Resistance in Fecal Flora: longitudinal community based surveillance of children from urban México. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40 (7): 702-1699.p
19. Wilson A P. Emerging Antimicrobial in the Surgical Compromised Host. *J Chemother* 1999; 11 (6): 23-518.p
20. Beloborodova N V. et. al. Characteristics of Faeces Microflora in Children Treated in Intensive Care Units. *Antibiotic Khimiother* 1998 (8): 16-22.p
21. Babini G S. et. al. Antimicrobial Resistance Among *Klebsiella* spp. Collected from Intensive Care Units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 (2): 9-183.p
22. Barros J C. et. al. Evidences of Gentamicin Resistance Amplification in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Faeces of Hospitalized Newborns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999; 94 (6): 795-802.p
23. Bantar C. et. al. 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 (2): 85-90.p
24. Deguchi K. et. al. Antimicrobial Activities of sulbactam/ampicillin Against Clinically Isolated Microbial Strains. *Jpn J Antibiot* 1995; 48 (4): 47-529.p
25. Traub W H. et. al. Nosocomial Outbreak of Cross Infection due to Multiple Antibiotic Resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. *Chemotherapy* 2000; 46 (1): 1-14.p

26. Chenoweth C. et. al. Antimicrobial Resistance: implication for respiratori failure. *Curr Opin Pulm Med* 1997; 3 (2): 69-159.p
27. Bujdakova H. et.al. Study of Betalactam Resistanse in Ceftazidime resistant Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10 (2): 41-135.p
28. Saurina G, et. al. Antimicrobial Resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 (6): 8-895.p
29. Fluit A C. et. al. Antimicrobial Susceptibility and Frecuency of Occurrence of Clinical Blood Isolates in Europe from the SENTRY Antibmicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* 2000; 30 (3): 60-454.p
30. Benedic B. Developmet of Betalactam Antibiotic Resistance in Gramnegative Bacteria and the Impact of Resistance on Therapy. *Lijec Vjesn* 1999; 121 (7-8): 57-249.p
31. Rossi A. et. al. Red de Laboratorios para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos. Programa WHONET-Argentina: Resultados de cinco años de funcionamiento. *Res Antmic Amer* 2000; 1: 84-95.p
32. Sader H S. Jones R N. Resistencia a los Antimicrobianos de los Agentes Patógenos Causantes de Infecciones Nosocomiales y Comunitarias en América Latina: Reseña General de las Estadísticas de 1997. *Res Antmic Amer* 2000; 1: 54-73.p
33. Trucco A. et. al. Vigilancia de la Susceptibilidad Antimicrobiana de Cepas Causantes de Infecciones Invasivas en 11 Hospitales de Chile. *Res Antmic Amer* 2000; 1: 105-115.p
34. Guzman-Blanco M. et. al. Bacterial Resístanse to Antimicrobial Agents in Latin America. The Giant is Awakeking. *Infec Dis Clin North Am* 2000; 14 (1): 67-81,viii.p
35. Llop a. et. al. Resistencia a los Antimicrobianos y Vigilancia Microbiológica en Cuba. *Res Antmic Amer* 2000; 1: 116-123.p