

112387



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Prevalencia de colonización gastrointestinal por Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en población pediátrica hospitalizada en unidades de segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## TESIS

para obtener el grado de:

INFECTOLOGO PEDIATRA

PRESENTA

Dra. Gloria C. Huerta García

Concepto

Tutor: Dr. Fortino Solórzano Santos

Cotutor: Dra. Guadalupe Miranda Novales



IMSS

MEXICO, D. F.

2005

0347977



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).


El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

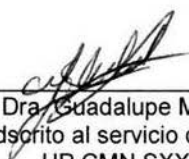
**Prevalencia de colonización gastrointestinal por  
Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro  
extendido (BLEEs) en población pediátrica hospitalizada en  
unidades de segundo nivel de atención del Instituto Mexicano  
del Seguro Social.**


**TESIS DE POSGRADO  
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN  
INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA**


Presenta:

  
\_\_\_\_\_  
Gloria Concepción Huerta García

  
\_\_\_\_\_  
Tutor. Dr. Fortino Solórzano Santos  
Director Médico.  
Hospital de Pediatría CMN SXXI

  
\_\_\_\_\_  
Co-Tutora. Dra. Guadalupe Miranda Novales  
Médico adscrito al servicio de infectología  
HP CMN SXXI

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Georgina López Fuentes  
Directora de Educación Médica e investigación  
HP CMN SXXI

  
SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
U.N.A.M.

## ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Antecedentes	2
III.	Planteamiento del problema	6
IV.	Justificación	6
V.	Objetivos	7
VI.	Material y métodos a. Definición de variables	8
VII.	Descripción general a. Métodos microbiológicos	9
VIII.	Resultados	12
IX.	Discusión	17
X.	Conclusiones	21
XI.	Bibliografía	22

## **RESUMEN:**

Las bacterias han evolucionado en el tiempo apareciendo múltiples especies que han generado diversos mecanismos de resistencia para sobrevivir a los antimicrobianos.

Los patrones de resistencia han evolucionado a lo largo de los años reflejando los esquemas antimicrobianos más utilizados en el momento de la aparición de la resistencia. La presión ejercida por el uso indiscriminado de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación ha generado una diversidad de nuevas variantes de β-lactamasas, siendo capaces de hidrolizar oximino penicilinas y aztreonam (BLEEs)

Se desconoce la prevalencia de colonización gastrointestinal por enterobacterias productoras de BLEEs en la comunidad y en hospitales de segundo nivel de atención, contando, en la mayoría de los casos, con información obtenida de centros de referencia y unidades de terapia intensiva.

El objetivo de este trabajo fue conocer la frecuencia de colonización gastrointestinal por enterobacterias productoras de BLEEs en población pediátrica hospitalizada en unidades de segundo nivel de atención y algunos de los factores de riesgo relacionados.

## **MATERIAL Y METODOS.**

El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido de Mayo a septiembre de 2005. Se incluyeron en el estudio pacientes hospitalizados en tres diferentes Hospitales Generales de Zona (HGZ) de la Ciudad de México.

Se tomaron muestras de hisopado rectal a los pacientes al momento de su ingreso y posteriormente de manera semanal hasta su egreso, y en caso de tratarse de recién nacidos la primera muestra se recolectó a los 7 días de vida continuando con muestras semanales hasta su egreso.

Se realizó un estudio de prevalencia de colonización por enterobacterias productoras de BLEEs (transversal, observacional descriptivo), formándose dos grupos. 1. Pacientes con < 72 h de estancia hospitalaria y 2. Pacientes con estancia ≥ 7 días. Estudio de cohorte para el análisis de los factores de riesgo.

Se incluyeron pacientes de los Hospitales Generales de Zona Gabriel Mancera, Troncoso y Venados.

Todas las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias Gram negativas, oxidasa negativas, anaerobias facultativas, fermentadoras de glucosa, móviles o inmóviles) se identificaron por técnicas bioquímicas convencionales (API 20E). La producción de BLEEs se confirmó utilizando tiras E.

## **RESULTADOS:**

Se incluyeron en total 209 pacientes, en 5.7% de los pacientes del grupo 1 se encontró colonización por estos microorganismos en la primera muestra analizada y en el grupo 2 la frecuencia fue de 56.5% (p<0.001). El servicio con mayor población de pacientes colonizados correspondió a cuneros. Hubo una relación directa entre la colonización y el tiempo de estancia intrahospitalaria y en el grupo 2 se encontró asociación entre el uso de beta-lactámicos durante la hospitalización y la presencia de colonización intestinal por enterobacterias productoras de BLEEs

## **CONCLUSIONES:**

La frecuencia de colonización intestinal por enterobacterias productoras de BLEEs en pacientes pediátricos al momento de su ingreso al hospital (5.7%) supera la reportada en otras partes del mundo.

Se tiene un porcentaje elevado colonización por enterobacterias productoras de BLEEs en población pediátrica con 7 días o más de estancia hospitalaria, e incrementa directamente con el tiempo de estancia.

La frecuencia de colonización intestinal es mayor por adquisición nosocomial que la adquirida en la comunidad.

Las unidades de recién nacidos son las áreas hospitalarias de mayor riesgo de infecciones cruzadas.

## ANTECEDENTES

Las bacterias evolucionan en forma constante apareciendo especies que crean diversos mecanismos de resistencia para sobrevivir a los antimicrobianos. Estos mecanismos de resistencia son producto de la adquisición de elementos genéticos por conjugación, transformación o transducción. <sup>(1,2)</sup>

Durante los años 70-80s la resistencia en bacilos aerobios Gram negativos era un grave problema, que se resolvió, parcialmente, en la década de los 90's con el surgimiento de una gama de antibióticos dirigidos contra estos microorganismos (aminoglucósidos, penicilinas de amplio espectro, monobactámicos, carbapenémicos, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y fluoroquinolonas). Los patrones de resistencia a lo largo de los años reflejan los esquemas antimicrobianos más utilizados en el momento de la aparición de la resistencia. <sup>(3)</sup>

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen el grupo de antimicrobianos más antiguo y con mayor relevancia clínica, en este grupo se incluyen las penicilinas naturales y semisintéticas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. <sup>(4)</sup> Existen tres principales mecanismos de resistencia a esta familia de antibióticos: (1) reducción de la afinidad de los fármacos por su receptor, PBP (proteínas fijadoras de penicilina) que ocurre en bacterias Gram positivas y negativas; (2) alteración en la permeabilidad de la membrana externa que evita el paso de los  $\beta$ -lactámicos en bacterias Gram negativas y (3) mediante la producción de  $\beta$ -lactamasas, enzimas que inactivan antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por hidrólisis del anillo beta-lactámico. <sup>(5)</sup> Esta información puede estar codificada en genes cromosómicos, en transposones o plásmidos, siendo este último el mecanismo de resistencia más común para este grupo de fármacos. <sup>(6)</sup>

Muchas bacterias gramnegativas poseen alguna  $\beta$ -lactamasa mediada cromosómicamente, que probablemente ayuda a la bacteria a encontrar un nicho cuando existe competencia con otras bacterias que producen  $\beta$ -lactamasas naturalmente. La primera  $\beta$ -lactamasa fue identificada en un aislamiento de *Escherichia coli* en 1940. La primera  $\beta$ -lactamasa mediada por plásmidos en bacterias Gram negativas fue TEM-1, descrita en 1965, esto ocurrió en una cepa de *E. coli* aislada de un hemocultivo de una paciente llamada **Temoneria**, en Grecia. Debido a la característica de ser mediada por plásmidos su diseminación fue rápida a otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* <sup>(7)</sup>. Al mismo tiempo otra  $\beta$ -lactamasa

mediada por plásmido, SHV (variable sulfhidrilo) se encontró en *K. pneumoniae* y *E. coli*. En consecuencia se desarrollaron antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como las oximino-cefalosporinas que fueron ampliamente utilizadas en infecciones nosocomiales graves, que favorecieron una rápida emergencia de microorganismos resistentes a estos antibióticos. La presión ejercida por el uso indiscriminado de estos antibióticos ha generado una diversidad de nuevas variantes de  $\beta$ -lactamasas las cuales presentan mutaciones en la secuencia genómica que ha permitido extender el espectro de acción hacia otros sustratos. <sup>(8)</sup> La primera  $\beta$ -lactamasa capaz de hidrolizar estos compuestos se describió en 1985 en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada en Alemania y se designó SHV-2, y debido a que esta enzima y enzimas subsecuentes eran activas contra  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido recibieron el nombre de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE). <sup>(7, 9, 10, 11, 12, 13)</sup>

Las  $\beta$ -lactamasas se han clasificado de acuerdo a su habilidad para inactivar su sustrato, su susceptibilidad a los inhibidores como clavulanato, sulbactam y tazobactam y por su estructura primaria (clases moleculares A-D). <sup>(5, 6, 14)</sup> cuadro 1. Los microorganismos Gram negativos producen una mayor variedad de  $\beta$ -lactamasas que los Gram positivos, esta diversidad ha provocado múltiples esquemas de clasificación, utilizándose actualmente la clasificación propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros que se basa en los sustratos a los que se dirigen, y su susceptibilidad al ácido clavulánico. <sup>(14)</sup>

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS  $\beta$  LACTAMASAS

GRUPO	TIPO DE ENZIMA	INHIBICIÓN POR CLAVULANATO	CLASE MOLECULAR	No. DE ENZIMAS	EJEMPLOS
1	Cefalosporinasa	No	C	57	<i>Enterobacter cloacae</i> , MIR-1 (P)
2 a	Penicilinasas	Sí	A	20	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (A)
2 b	Espectro amplio	Sí	A	16	SHV-1 (A), TEM-1 (P)
2 be	Espectro extendido	Sí	A	81	<i>Klebsiella oxytoca</i> K1 (C), TEM-3 (P), SHV-2 (P)
2 br	Resistentes a inhibidor	Disminuida	A	13	TEM-30 (P)
2 c	Carbenicilinasas	Sí	A	15	AER-1 (C), PSE-1 (P), CARB-3 (P)
2 d	Cloxacilinasas	Si	D o A	21	<i>Streptomyces cacaoi</i> (C), OXA-1 (P)
2 e	Cefalosporinasa	Sí	A	19	<i>Proteus vulgaris</i> (C), FEC-1 (P)
2 f	Carbapenemasa	Sí	A	3	IMI-1 (C), NMC-A (C), Sme-1 (C)
3	Carbapenemasa	No	B	15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1 (C), IMP-1 (P)
4	Penicilinasas	No		7	<i>Bulkholderia cepacia</i> (C), SAR-2 (P)

C, Cromosómico; P, Plásmido; A, Ambos

Las BLEEs se han encontrado virtualmente en todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

La diseminación de la resistencia puede ser por cuatro mecanismos: (I) clonal, donde una sola clona bacteriana puede volverse resistente por mutación o herencia de un solo plásmido que codifica la resistencia a uno o varios antimicrobianos; (II) por

transferencia, cuando un organismo puede heredar un plásmido resistente que se ha diseminado en especies diferentes; (III) mixta, donde existe una combinación de los mecanismos anteriores.; (IV) transposición, la que resulta de la distribución de un tipo fijo de determinantes de resistencia ( $\beta$ -lactamasas) que pueden estar presentes en un elemento transportable como plásmidos, transposones o secuencias de inserción. <sup>(5, 6, 8, 13, 14, 15, 16)</sup> Todos estos mecanismos solos o en combinación contribuyen en la diseminación de patrones de resistencia similares en un área hospitalaria, varios servicios del mismo hospital e incluso en diferentes hospitales de una misma ciudad o ciudades <sup>(17, 18)</sup>

Los microorganismos productores de BLEEs son capaces de inactivar cefalosporinas de tercera generación (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, y ceftizoxime) y monobactámicos siendo únicamente susceptibles a carbapenémicos, amikacina, quinolonas, cefepime (cefalosporina de 4ª generación) o  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como piperacilina / tazobactam y ticarcilina / clavulanato, <sup>(19)</sup> pero frecuentemente, las especies bacterianas no solo contienen  $\beta$ -lactamasas, también exhiben deleciones de porinas reduciendo su permeabilidad a antimicrobianos como mecanismo de resistencia sinérgico a la presencia de BLEEs.

Los pacientes se pueden colonizar a nivel intestinal por estos microorganismos productores de BLEEs durante hospitalizaciones, convertirse en portadores por periodos prolongados y posteriormente contribuir a su diseminación intra y extrahospitalaria. <sup>(20)</sup>

Se ha realizado diferentes estudios para conocer la prevalencia de colonización gastrointestinal en pacientes hospitalizados por enterobacterias productoras de BLEEs y determinar los factores de riesgo asociados para que esta se presente, los resultados son diversos (11.9-59%), en su mayoría realizados en unidades de cuidados intensivos <sup>(21, 22, 23)</sup> y enfocados en los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli*, siendo la primera la que con mayor frecuencia presenta este mecanismo de resistencia (54% vs. 40%). <sup>(22, 23, 24, 25)</sup>

Dentro de los factores de riesgo propuestos están la presión antimicrobiana selectiva particularmente producida por cefalosporinas de 3ª generación, específicamente ceftazidima, <sup>(26)</sup> así como la estancia intrahospitalaria prolongada, uso de antimicrobianos, nutrición parenteral, presencia de catéter urinario o arterial, ventilación mecánica y estancia en unidades de cuidados intensivos <sup>(24, 27)</sup>



Se ha demostrado que en unidades de tercer nivel la diseminación de la resistencia antibiótica entre las cepas de *K. pneumoniae* BLEEs positivas (SHV-5) se produce por mecanismos de transferencia genética clonal y horizontal. <sup>(28)</sup> Se tienen reportes en México de brotes ocasionados por enterobacterias productoras de BLEEs, reportando mortalidad hasta del 62%, en los cuales se pudieron demostrar clonalidad de  $\beta$ -lactamasas SHV y TLA-1, <sup>(28, 29, 30, 31, 32)</sup> pero no se precisa en estos estudios la frecuencia y la influencia de la colonización gastrointestinal.

En el Hospital de Pediatría de CMN Siglo XXI, IMSS, hospital de referencia de múltiples hospitales generales de zona, a partir de 1997 se ha encontrado un incremento en los aislamientos de enterobacterias productoras de BLEEs en de pacientes con infecciones nosocomiales. En el año 2003 alrededor del 50-70% de las cepas de enterobacterias fueron productoras de BLEEs de origen nosocomial. <sup>(Datos no publicados)</sup> Hasta el momento no se ha precisado si la elevada frecuencia de estas cepas es debido a procesos de selección por el uso de antimicrobianos de amplio espectro en el Hospital o bien por la presión ejercida por el uso de antibióticos en los Hospitales Generales de Zona, de donde son referidos pacientes que requieren su ingreso al Hospital de Pediatría.

La colonización gastrointestinal por estas enterobacterias en pacientes hospitalizados se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de brotes e infecciones nosocomiales, y se adquiere, en la mayoría de las ocasiones, de la biota residente del hospital. <sup>(33, 34)</sup> El tipo de microorganismos que colonizan intestino al momento del ingreso difieren de los microorganismos que se encuentran colonizando tubo digestivo en pacientes hospitalizados por un periodo mayor a 3 días, tiempo requerido para adquirir la biota hospitalaria tanto para colonización como el desarrollo de infecciones.

En los neonatos se sabe que el tracto digestivo es estéril al momento de nacer y se coloniza paulatinamente a una velocidad que depende del tipo de alimentación y el ambiente en el que se desarrolla. <sup>(35)</sup> En el caso de que permanezcan hospitalizados adquieren microbiota que es en su mayoría nosocomial, consideración que debe tomarse en cuenta debido a que se trata de un grupo de pacientes con mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones. El riesgo de infecciones por microorganismos nosocomiales se incrementa cuando la hospitalización se prolonga por más de una semana. <sup>(35)</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Aun cuando se ha estudiado ampliamente la incidencia de infecciones nosocomiales por enterobacterias productoras de BLEEs y se tiene incluso el conocimiento de los factores de riesgo asociados, estos estudios, en su mayoría, se limitan a centros de referencia y a unidades de terapia intensiva. Se desconoce cuál es la prevalencia de colonización gastrointestinal en pacientes hospitalizados en unidades de segundo nivel de atención. Siendo la colonización gastrointestinal la principal fuente de diseminación de estos microorganismos.<sup>(33,34)</sup>

Por lo anterior nos formulamos las siguientes interrogantes.

1. ¿Cuál es la prevalencia de colonización gastrointestinal por enterobacterias productoras de BLEEs en pacientes hospitalizados en unidades de segundo nivel de atención de la ciudad de México en las Primeras 72 h de estancia intrahospitalaria?
2. ¿Cuál es la prevalencia de colonización gastrointestinal por enterobacterias productoras de BLEEs en pacientes hospitalizados en unidades de segundo nivel de atención de la ciudad de México que permanecen por más de 7 días de estancia?

## **JUSTIFICACIÓN**

La emergencia de microorganismos productores de BLEEs ha incrementado en todo el mundo. Se han identificado pacientes con colonización gastrointestinal por estos microorganismos al momento de brotes nosocomiales, pero en México no se conoce la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs como comensales intestinales en los pacientes provenientes de la comunidad y que posteriormente requieren ser hospitalizados, lo que limita el implemento de estrategias que reduzcan el riesgo la transmisión horizontal de estos microorganismos, evitando así la diseminación entre pacientes del mismo hospital y a los hospitales de referencia.

Se tiene conocimiento del uso elevado de cefalosporinas de tercera generación en el manejo de infecciones comunitarias en los Hospitales de segundo nivel de las Delegaciones 3 y 4 del D.F. La práctica anterior hace suponer que la frecuencia de colonización intestinal por enterobacterias productoras de BLEEs pueda ser elevada y el riesgo de brotes de infecciones intrahospitalarias por estas cepas esté latente en estos Hospitales.

Por otra parte aunque se ha sugerido la modificación de la flora intestinal cuando hay hospitalización prolongada, se desconoce cual es la prevalencia de este cambio en recién nacidos que permanecen más de una semana después de su nacimiento.

#### **OBJETIVOS**

1. Conocer la frecuencia de colonización gastrointestinal por enterobacterias productoras de BLEEs en pacientes hospitalizados en unidades de segundo nivel de atención de la ciudad de México, diferenciando los casos de adquisición comunitaria de las de origen nosocomial.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

2. En los pacientes colonizados se analizaron algunos de los factores de riesgo asociados.
  - a. Tiempo de estancia intrahospitalaria
  - b. Uso de antimicrobianos durante la estancia intrahospitalaria
  - c. Servicio en el que se encuentra hospitalizado

## **MATERIAL Y METODOS.**

### UNIVERSO DE ESTUDIO.

- Tres Hospitales de segundo nivel de atención de las Delegaciones 3 y 4 del Distrito Federal.
- Pacientes de 1mes a 16 años en las primeras 72 h de estancia intrahospitalaria
- Neonatos que nacieron en el mismo nosocomio en el que permanecieron hospitalizados por 7 días o más
  - Cepas de enterobacterias aisladas de coprocultivo

### PERIODO DE ESTUDIO

Mayo del 2005 a septiembre de 2006

### TIPO DE ESTUDIO

- Observacional descriptivo. De prevalencia. Transversal
- Estudio de Cohorte, para el análisis de factores de riesgo

## **DEFINICIÓN DE VARIABLES**

### **VARIABLE DEPENDIENTE**

- COLONIZACIÓN GASTROINTESTINAL POR ENTEROBACTERIA PRODUCTORA DE BLEEs.

Presencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp; *Enterobacter* spp; *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp. productoras de una enzima capaz de hidrolizar  $\beta$ -lactámicos, incluyendo oxiamino-cefalosporinas y aztreonam, en muestra de coprocultivo.

- ↓ CMI  $\geq 2$  para ceftazidima y tira E positiva (Métodos microbiológicos).  
Cualitativa. Nominal dicotómica: SI/NO.

### **VARIABLES INDEPENDIENTES**

- SERVICIO PEDIÁTRICO AL QUE SE HOSPITALIZÓ: Cualitativa nominal dicotómica: Sala general/ Terapia intensiva
- Tiempo de estancia intrahospitalaria: Días de estancia hospitalaria. Cuantitativa de intervalo.

Uso de  $\beta$ -lactámicos: Cualitativa nominal dicotómica: SI/NO

### **VARIABLES GEOGRÁFICAS**

- GENERO: NOMINAL DICOTÓMICA: Femenino/ Masculino

- EDAD: Edad en años. Cuantitativa de intervalo

## **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO**

Se seleccionaron pacientes de tres Hospitales Generales de Zona de las Delegaciones 3 y 4 del IMSS en el Distrito Federal: Hospital Gabriel Mancera, Hospital de Venados y Hospital de Troncoso en los que se reciben pacientes de todas las edades pediátricas.

Se incluyeron los niños que requirieron hospitalización y los neonatos que hubieran nacido en los hospitales seleccionados y que permanecieron por 7 días o más.

Se recolectó información demográfica, diagnóstico de ingreso, días de estancia intrahospitalaria y antibióticos utilizados en los últimos tres meses.

A cada paciente se le tomó hisopado rectal al ingreso y posteriormente de manera semanal hasta su egreso. En caso de tratarse de neonatos, que hubieran nacido en el hospital, la primera muestra se colectó al cumplir una semana de estancia y posteriormente cada 7 días hasta el egreso.

Se excluyeron a los pacientes que hubieran permanecido hospitalizados en una unidad de referencia en los tres meses anteriores al ingreso y a los pacientes en periodo posquirúrgico mediato que involucrara tubo digestivo.

## **MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

El hisopo rectal se colocó en medio de transporte de Stuart y fueron procesadas el mismo día en laboratorio del HP CMN SXXI. La muestra fue sembrada en agar MacConkey con 2mg/L de ceftazidima siguiendo las recomendaciones de la CLSI <sup>(36)</sup> para la búsqueda inicial de enterobacterias productoras de BLEEs (EBLEEs), e incubada a 37°C durante 24 h. Se seleccionó una colonia con morfología diferente de cada cepa lactosa positiva; a las lactosa negativas se les realizó prueba de la oxidasa seleccionando para el estudio solo las que fueran negativas para esta prueba. La identificación de género y especie se realizó por el método semi-automatizado API 20-E. Las cepas cuya identificación bioquímica correspondió a la familia *Enterobacteriaceae* fueron almacenadas en caldo soya tripticasa y glicerol al 20% a -20°C hasta su procesamiento para la confirmación de la presencia de BLEEs.

**DETERMINACIÓN DE BLEEs:** Después de la recuperación posterior al almacenamiento de cada cepa, de un cultivo temprano, se seleccionó una colonia que fue inoculada en solución salina al 0.09% ajustando el inóculo al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Con un hisopo de algodón se sembró una caja con agar Müller Hinton por estría cruzada. Se colocó una tira E en cada caja realizando la identificación de acuerdo a los descrito

por Cormican y cols<sup>(37)</sup>. Extremo TZ: ceftazidima 0.5-32 $\mu$ g/mL / Extremo TZL ceftazidima + ácido clavulánico TZL 0.064-4 $\mu$ g/mL (figuras 1-4).

Se consideró cepa productora de BLEEs cuando el extremo TZ tenía una CMI  $\geq$  1mg/L (fig. 1) y existió una relación TZ/TZL  $\geq$  8 (Fig. 1-4), o la presencia de zona fantasma o deformación de la elipse en el extremo TZ. (Fig. 2 y 3)

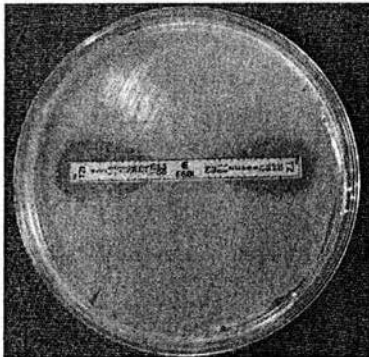


Fig. 1. TZ > 1mg/L + TZ/TZL >8.

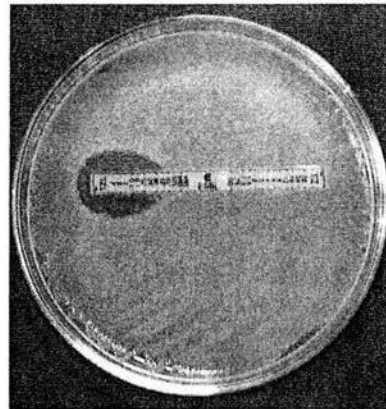


Fig. 2. TZ > 1mg/L + TZ/TZL >8.

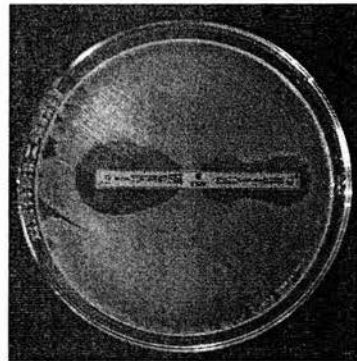
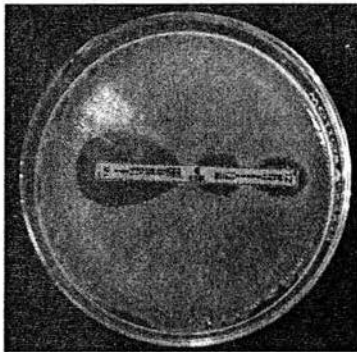


Fig.3 y 4. Deformación de la elipse en el extremo TZ

Únicamente las cepas en las que se confirmó la presencia de BLEEs fueron incluidas en el análisis.

Para diferenciar la prevalencia de colonización intestinal por EBLEEs de adquisición comunitaria de aquellas de adquisición nosocomial se establecieron dos grupos de estudio. Para el análisis de cepas de origen comunitario se incluyeron los niños a los que se les tomó muestra con hisopado rectal a su llegada al hospital o con menos de 72 h de estancia en el mismo. Para considerar origen nosocomial se incluyeron recién nacidos y pacientes de otras edades que permanecieran por más de 7 días en el hospital

En este estudio se investigaron como factores de riesgo para desarrollar colonización intestinal por EBLEEs: 1) Días de estancia intrahospitalaria, edad del paciente, estancia en unidades de terapia intensiva y uso previo de  $\beta$ -lactámicos.

El análisis de prevalencia de colonización intestinal se realizó con un diseño transversal. El estudio de factores de riesgo para el desarrollo de dicha colonización se llevó a cabo utilizando metodología de estudio de cohorte, considerando la colonización por EBLEEs como desenlace.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La medida de tendencia central se expresaran en medias con rango intercuartilar 25-75. Las variables demográficas y clínicas fueron analizadas con SPSS versión 10.0. Se utilizó prueba U de Mann-Whitney para variables continuas no paramétricas; ANOVA para comparación de medias entre tres o mas grupos (hospitales y servicio de hospitalización); y Chi-cuadrada (o prueba exacta de Fisher si la frecuencia esperada en cualquiera de las celdas de la tabla de contingencia era  $< 5$ ) para el análisis de variables categóricas. Todas las pruebas fueron de dos colas. Siendo significativa si la  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Se incluyeron 209 pacientes distribuidos de la siguiente manera: 65 pacientes del HGZ Gabriel Mancera, 66 pacientes del HGZ Troncoso y 78 pacientes del HGZ Venados.

La mediana de edad fue de 17 días (Liq 8 días-12 meses); 49.3% de los pacientes incluidos correspondieron al sexo femenino. La mediana de estancia intrahospitalaria de los 209 pacientes fue de 7 días (Liq 1-12), difiriendo significativamente entre el hospital de G. Mancera y los otros dos hospitales incluidos. (P= 0.027). Cuadro 2

CUADRO 2. VARIABLES DEMOGRÁFICAS					
	TOTAL	MANCERA	TRONCOSO	VENADOS	VALORES DE P
No pacientes (%)	209	65 (31.1)	66 (31.6)	78 (37.3)	
Sexo femenino (%)	103 (49.3)	35 (53.8)	34 (51.5)	57 (46)	P= 0.279
Edad en días(M, Iq)	17 (8-360)	360 (30-780)	11 (7-90)	10 (7-45)	P= 0.140
Estancia hospitalaria en días (M, Iq)	7 (1-12)	1 (1-9)	7.5 (2.75-12)	7 (7-15.2)	P= 0.035

M: Mediana; Iq: intervalo intercuartilar 25-75.

Distribución por servicio fue: 46.8% (98) se encontraron hospitalizados en cuneros; 6.2% (13) en escolares y adolescentes; 32.5% (68) en lactantes y 14.3% (30) en unidades de cuidados intensivos. Cuadro 3

CUADRO 3. DISTRIBUCIÓN POR SERVICIOS					
		MANCERA	TRONCOSO	VENADOS	
Cuneros (%)	98/209 (46.8)	12/65 (18.46)	40/66 (60.6)	46/78 (58.9)	P < 0.05
Escolares y adolescentes (%)	13 (6.2)	4/65 (6.1)	6 (9.0)	3 (3.8)	
Lactantes (%)	68 (32.5)	39/65 (60)	12 (18.1)	17 (21.7)	P < 0.05
Terapia (%)	30 (14.3)	10 (15.3)	8 (12.1)	12 (15.3)	

A 87/209 pacientes se les tomó una muestra al ingreso (GRUPO 1), 13/87 tuvieron 2 ó mas muestras. En 5/87 (5.7%) pacientes se encontró EBLEEs en la primera muestra de coprocultivo y en 8/13 (61.5%) se aisló una o más EBLEEs en muestras posteriores (2 pacientes con 2 microorganismos), encontrando incremento



significativo en el riesgo de colonización al completar 7 días de estancia. (RR 10.7 IC95% 9.2, 12.1).

A 122 pacientes se les realizó la primera muestra a los 7 días (Grupo 2), 56.5% (69/122) se encontraban colonizados por una EBLEEs o más en la muestra inicial. Se realizó una segunda o tercera muestra en 29/122, 10/29 que tuvieron aislamiento en la 1ª muestra mantuvieron o se adicionaron otras EBLEEs durante la estancia hospitalaria, 12/29 (41.3%) que no estaban colonizados al inicio tuvieron aislamiento en las muestras siguientes y 6/29 (20.6%) permanecieron sin aislamiento hasta su egreso. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupo 1 y 2. (p < 0.001, RR 11.3 (IC 95% 10.4, 12.2)). Cuadro 4.

	<b>Grupo 1</b>	<b>%</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>%</b>
<b>N (209)</b>	87		122	
<b>Colonizados 1ª</b>	5	<b>5.7</b>	69	<b>56.5</b>
<b>Colonizados 2ª</b>	8/13	<b>61.5</b>	12/29	<b>41.3</b>
<b>Sin aislamiento hasta egreso</b>	5/13	<b>38.4</b>	6/29	<b>20</b>

La frecuencia de colonización por hospitales en ambos grupos de pacientes fue similar. En los tres hospitales existió diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de colonización al ingreso con respecto a la frecuencia de colonización al completar 7 ó más días de estancia hospitalaria. Cuadro 5

CUADRO 5. FRECUENCIA DE COLONIZACIÓN POR HOSPITALES			
	COLONIZADOS (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	
MANCERA	4 /46 (8.6)	6/19 (31.5)	P=0.015 RR 3.6 (2.4-4.7)
TRONCOSO	0/19 (0)	31/47 (65.9%)	P < 0.001
VENADOS	1/22 (4.5)	32/56 (57.1)	P < 0.001 RR 12.6 (10.5, 14.6)
	P = 0.849	P = 0.038	
RR: Riesgo relativo; IC 95%			

El porcentaje de colonización por servicios: 1) Cuneros: 65.3% (64/98); 2) Escolares y adolescentes: 7.6% (1/13); 3) Lactantes 7.3% (5/68); y 4) Unidades de cuidados intensivos: 13.3% (4/30), encontrando diferencia significativa entre cuneros con respecto al resto de los servicios ( $p < 0.001$ ). Cuadro 6

CUADRO 6. FRECUENCIA DE COLONIZACIÓN POR SERVICIOS					
	CUNEROS (%)	ESCOLARES Y ADOLESCENTES	LACTANTES	TERAPIA	VALORES DE P
COLONIZADOS	64/98 (65.3)	1/13 (7.6)	5/68 (7.3)	4/30 (13.3)	P< 0.001
		SALAS COMUNES (%)		TERAPIAS	
COLONIZADOS		70/179 (39.1)		4/30 (13.3)	P= 0.025 RR 3.00 (1.9, 4.09)

Las enterobacterias productoras de BLEEs aisladas fueron *Klebsiella pneumoniae* (64.2%), seguida por *Enterobacter spp* (21.1%), *Escherichia coli* (8.7%), y otros 6%. En los pacientes del grupo 1 predominó *Klebsiella spp.* (44.4%), seguida por *Enterobacter spp.* (38.8%) y *E. coli* (16.6%). Las enterobacterias aisladas en el grupo 2 correspondieron, por orden de frecuencia a *Klebsiella spp.* (74.4%), *Enterobacter spp.* (16.5%), *E. coli* (7.8%), *E. zakazakii* (3.2%) Y *K. oxytoca* (2%). Cuadro 7.

Enterobacteria aislada	Grupo 1	Grupo 2
<i>Klebsiella spp</i> (%)	8 (44.4)	86 (74.4)
<i>Enterobacter spp</i>	7 (38.8)	19 (16.5)
<i>Escherichia coli</i>	3 (16.6)	9 (7.8)
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>115</b>

Se aislaron 174 enterobacterias de 209 coprocultivos, en 78% de estos microorganismos se confirmó la producción de BLEEs por el método confirmatorio (Tira E), encontrando por especie una concordancia entre ambos métodos de 95.9% para el *Klebsiella spp*, 58.1% para *Enterobacter spp*, y 40% para *Escherichia coli*, lo que haría suponer que el escrutinio inicial de la adición de 2mg/L de ceftazidima a las placas de agar es insuficiente para seguir las recomendaciones de tratamiento y tamizaje para estos dos últimos géneros bacterianos. Cuadro 8

	McConkey 2mg/L Ceftazidima	Tira E + (% de confirmación)
<i>Citrobacter spp</i>	1	0 (0)
<b>*<i>Escherichia coli</i></b>	<b>30</b>	<b>12 (40)</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	28	14 (50)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2 (100)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5	4 (80)
<i>Enterobacter zakazakii</i>	5	5 (100)
<i>Enterobacter sp</i>	3	1 (33.3)
<b>*<i>Enterobacter spp</i></b>	<b>43</b>	<b>25 (58.1)</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	90	87 (96.6)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	5 (71.4)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	2	2 (100)
<b>*<i>Klebsiella spp</i></b>	<b>99</b>	<b>94 (94.9)</b>
<i>Serratia</i>	1	1 (100)
<b>Total</b>	<b>174</b>	<b>133</b>
° Total por Géneros		

Al realizar el análisis de factores de riesgo no encontramos diferencias significativas con respecto al sexo ( $p = 0.57$ ); no se encontró diferencia significativa entre el uso de  $\beta$ -lactámicos o la cantidad de  $\beta$ -lactámicos utilizados en los tres meses previos y durante la estancia hospitalaria en los pacientes colonizados del grupo 1; se encontró diferencia en las siguientes variables: servicio de estancia, siendo más frecuente encontrar pacientes colonizados en sala común que en unidades de terapias intensivas (RR 1.42 (IC 95% 2.5, 0.33),  $p = 0.025$ ) cuadro 5.

CUADRO 8. COMPARACION DE VARIABLES DEMOGRAFICAS ENTRE PACIENTES COLONIZADOS, POR GRUPOS						
	Grupo 1			Grupo 2		
	Colonizados	No colonizados	P	Colonizados	No colonizados	P
Edad (media)	22meses	34 meses	0.635	53 días	11 días	.043
Sexo femenino (%)	1/34 (2.9)	33/34 (97)		39/69 (56.5)	30/69 (43.4)	0.57
Días de estancia (media)	1.4	0.9	0.32	10.7	10.9	0.57
Uso de betalactámicos (%)	1/50 (2)	49/50 (98)	0.10	54/103 (52.4)	49/103 (47)	0.02 RR 1.10 (0.21, 1.98)

En los pacientes del grupo 2 se encontró asociación entre el uso de  $\beta$ -lactámicos durante la hospitalización y la presencia de colonización intestinal por enterobacteria-BLEEs ( $p= 0.02$ ) cuadro 8

## DISCUSIÓN

La importancia de conocer la prevalencia de colonización intestinal por gérmenes con mayor patogenicidad, virulencia o cambios en sus mecanismos de resistencia en pacientes hospitalizados, deriva de la necesidad de aplicar medidas preventivas en los Hospitales donde existe una mayor probabilidad de adquirir estos microorganismos y así evitar la aparición de infecciones nosocomiales o en su caso planear una terapia efectiva. La colonización intestinal asintomática por enterobacterias productoras de BLEEs (EBLEES) se ha descrito en múltiples estudios, la mayoría de ellos realizados durante brotes Nosocomiales, en donde se plantea la transmisión de clonas específicas entre servicios y entre pacientes.<sup>(24, 38, 39)</sup>: La información con respecto a la presencia de EBLEES en pacientes asintomáticos de la comunidad es aun limitado, aunque se considera que es un problema en incremento.

El presente trabajo fue diseñado para conocer en forma prospectiva el grado de colonización por EBLEES en pacientes que acuden de la comunidad a Hospitales de segundo nivel para hospitalizarse, lo que nos proporcionó una primera información respecto a la magnitud de la presencia de EBLEES a nivel comunitario; encontrándose una frecuencia del 5.7 % que puede considerarse mayor a la reportada en otros estudios a nivel mundial (1-3%); en los pacientes que permanecieron más de 7 días de hospitalización se observaron dos fenómenos interesantes, el primero fue que la frecuencia de colonizados fue del 55.8%, también por arriba de lo encontrado a nivel mundial, pero además los niños con permanencia más prolongada adquirieron cepa diferentes a las identificadas en el primer cultivo. La probabilidad de colonización intestinal por EBLEEs aumenta en relación directa con la estancia hospitalaria, con un incremento en el riesgo de colonización 3 veces mayor en los pacientes con  $\geq 7$  días de internamiento. En este grupo de pacientes la frecuencia fue de 56.5% en la primera muestra y 66.3 % en la segunda.

Los servicios con mayor proporción de pacientes con colonización intestinal por EBLEEs fueron los cuneros, donde se encontraba el mayor número de pacientes incluidos en este estudio, esto deriva del tipo de población atendida en los HGZ Troncoso y Venados que tienen una alta población de neonatos debido a que cuentan con una unidad tóco quirúrgica a diferencia del HGZ G. Mancera que carece del servicio de obstetricia. Los servicios en donde se atiende a esta población normalmente se encuentran con una alta densidad de pacientes, siendo insuficiente

el personal de salud encargado de su cuidado, y al desconocer que este problema existe, no se cuenta con medidas de aislamiento u otras de barrera para evitar la transmisión horizontal de estos microorganismos, a diferencia de las unidades de terapia intensiva que en su mayoría se encuentran con escasa cantidad de pacientes, ya que los que tienen patología compleja son derivados a hospitales de referencia. Además el hecho de que el tubo digestivo de los recién nacidos sea estéril al momento del nacimiento podría hacerlos más susceptibles a la adquisición de estos microorganismos ya que no se tiene biota que compita por el mismo nicho.

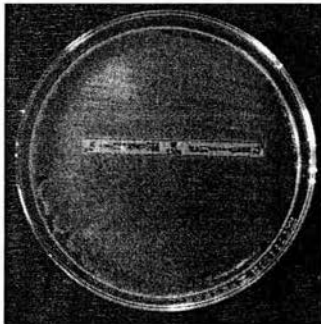
La EBLEEs más frecuentemente aislada fue *Klebsiella pneumoniae*, que se describe en la mayoría de los estudios de colonización e infección como agente nosocomial, llama la atención la proporción de *Enterobacter* spp que es mayor a *E. coli* siendo esto un hallazgo que no se ha reportado previamente.

Los factores de riesgo que encontramos en este estudio para el desarrollo de colonización intestinal no difieren de los reportados en la literatura mundial. En pacientes recién ingresados al hospital el uso de beta-lactámicos, no constituyó un factor de riesgo para adquirir colonización por EBLEEs; sin embargo sí hubo un mayor porcentaje de colonización que lo observado en otras partes del mundo (<sup>40, 41, 42</sup>) quizá debido a que en México los antimicrobianos de amplio espectro pueden ser adquiridos sin restricción alguna en las farmacias y son de indicación frecuente entre los médicos en la práctica pública y privada. Como se ha descrito en estudios previos (<sup>43</sup>) el uso de beta-lactámicos en pacientes hospitalizados sí fue un factor de riesgo para adquirir colonización intestinal por EBLEEs, difiriendo los porcentajes de colonización entre hospitales debido a que siguen recomendaciones diferentes para la indicación de antimicrobianos de amplio espectro, sin contar con políticas de restricción, siendo una practica habitual el indicar cefalosporinas de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación en los hospitales incluidos, (>60% de los pacientes en el grupo 2) además de que no se siguen otros lineamientos que se han desarrollado para evitar el surgimiento de microorganismos multirresistentes, lo que explica que la colonización haya sido mayor a la reportada, incluso en unidades de terapias intensivas en diversos estudios. (22, 23, 24,44, 45)

La mayoría de los reportes de colonización intestinal e infección por enterobacterias productoras de BLEEs mencionados previamente se enfocan principalmente a los géneros *Klebsiella* y *Escherichia*, sin reportarse la frecuencia de otros géneros de la

familia *Enterobacteriaceae*. En este estudio llama la atención la alta frecuencia de *Enterobacter* spp encontrada que supera la de *Escherichia coli*.

Con las recomendaciones actuales de la CLSI para la búsqueda inicial de microorganismos productores de BLEEs (McConkey 2mg/L ceftazidima) solo en el 78% de estos microorganismos se confirmó la producción de BLEEs por el método confirmatorio (Tira E), encontrando una concordancia por especie de 94.9% para el *Klebsiella* spp, 58.1% para *Enterobacter* spp, y 40% para *Escherichia coli*, lo que haría suponer que el escrutinio inicial de la adición de 2mg/L de ceftazidima a las placas de agar es insuficiente para seguir las recomendaciones de tratamiento y tamizaje para estos dos últimos géneros bacterianos. Lo que llama la atención es que al realizárseles la prueba confirmatoria no fueron susceptibles a la cetazidima con y sin ácido clavulánico, la mayoría no presentaron halo de inhibición en ninguno de los dos extremos de la tira, lo que haría suponer que además tienen otros mecanismos de resistencia integrados en su genoma convirtiéndolas en un mayor reto terapéutico.



**Imagen 2. Microorganismos indeterminados en la producción de BLEEs**

Aún con el uso de  $\beta$ -lactámicos en todo el mundo, la distribución de las BLEEs está lejos de ser uniforme. En cepas de *K. pneumoniae* obtenidas durante 1997-1999, el porcentaje de expresión de BLEEs fue mayor en América latina (51.9%), Región Oeste del Pacífico (28.2%) y Europa (24.4%), encontrando los porcentajes más bajos en Estados Unidos (12.3%) y Canadá (4.9%). Para *E. coli*, de 17,000 aislamientos, la frecuencia de BLEEs fue: en América latina (18.1%), Región Oeste del Pacífico (14.2%), Europa (16.0%), Estados Unidos (7.5%) y Canadá (4.2%).<sup>(7)</sup>

La colonización por microorganismos multirresistentes es un prerrequisito para desarrollar infecciones sistémicas graves. La trascendencia en la detección de

portadores de microorganismos con este patrón de resistencia ha tomado importancia no solo en los pacientes hospitalizados sino también en población sana. <sup>(46)</sup> El incremento en la proporción de portadores en la comunidad aumenta el riesgo de que otros individuos se tornen portadores como consecuencia de la transmisión humano-humano o humano-ambiente <sup>(47)</sup>, incrementando el pool de genes resistentes y facilitando la adquisición de mecanismos de resistencia por bacterias susceptibles. <sup>(48)</sup> La reducción en la proporción de microbiota susceptible en la comunidad reduce la posibilidad de que la cantidad de bacterias resistentes en el ambiente nosocomial disminuya. <sup>(49)</sup>

El incremento en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema global que da como resultado un aumento en la mortalidad. Los pacientes con cepas productoras de BLEEs que reciben tratamiento empírico inadecuado tienen una mortalidad significativamente mayor (75%) comparada con los pacientes que reciben manejo antimicrobiano adecuado (28%,  $p= 0.02$ ) <sup>(50)</sup>, además de incrementar significativamente los costos. <sup>(46)</sup>

Las estrategias involucradas en la disminución del surgimiento de bacterias multiresistentes se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- 1) Control de antimicrobianos, que incluye optimizar la terapia profiláctica prequirúrgica, las opciones y duración del tratamiento empírico, mejorar las prácticas de prescripción antimicrobiana, establecer sistemas de monitorización para proveer retroalimentación acerca de los patrones de susceptibilidad de los microorganismos aislados y definir e implementar guías para uso de antimicrobianos
- 2) Control de infecciones: apego a las medidas estándar para el control de infecciones (lavado de manos, aislamiento de pacientes colonizados o infectados por microorganismos multiresistentes), incorporar la detección, prevención y control de resistencias bacterianas a las metas institucionales y desarrollar guías apropiadas para el tratamiento, traslado, egreso y reingresos de pacientes que se saben colonizados por microorganismos multiresistentes. En caso necesario contar con sistemas de detección rápida y control de brotes. <sup>(51)</sup>

Para disminuir la elevada frecuencia en resistencias bacterianas se requieren acciones agresivas y multifacéticas. Se necesita conocer los problemas y las necesidades locales, con el fin de dirigir el tratamiento en las infecciones nosocomiales. A pesar de las alternativas terapéuticas con las que se cuenta para el manejo de las infecciones por estos microorganismos (quinolonas, cefalosporinas de



cuarta generación o ureidopenicilinas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, carbapenémicos) existe un porcentaje no despreciable de fallas terapéuticas. (32, 42, 52, 53) lo que hace suponer que en poco tiempo, las infecciones por estos microorganismos puedan ser intratables.

#### **CONCLUSIONES:**

La frecuencia de colonización intestinal por EBLEEs en pacientes pediátricos al momento de su ingreso al hospital (5.7%) supera la reportada en otras partes del mundo.

Se tiene un porcentaje elevado colonización por EBLEEs en población pediátrica con 7 días o más de estancia hospitalaria, e incrementa directamente con el tiempo de estancia.

La frecuencia de colonización intestinal es mayor por adquisición nosocomial que la adquirida en la comunidad.

Las unidades de recién nacidos son las áreas hospitalarias de mayor riesgo de infecciones cruzadas.

Deben buscarse métodos de escrutinio efectivos y baratos para microorganismos productores de BLEEs de todos los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* dado que en este estudio lo recomendado por la CLSI solo fue efectivo para el genero *Klebsiella* spp.

#### **ASPECTOS ÉTICOS:**

Fue revisado y aprobado por la Comisión Nacional de Investigación con número de registro 2005/3603/0029

#### **RECURSOS:**

Este estudio se realizó con la participación de los departamentos de Infectología, el Laboratorio Clínico del Hospital de Pediatría, además de los servicios de pediatría de los tres HGZ involucrados. Este proyecto fue parcialmente financiado por fondos del FOFI.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Jenkins SG.** Mechanisms of Bacterial Antibiotic Resistance. *New Horiz* 1996; 4:321-332.
2. **Salyers AA, Amábile-Cuevas CF.** Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2321-2325.
3. **Tenover FC.** Development and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents: An Overview. *CIN* 2001;33(suppl 3);S108-15
4. **Medeiros AA.** Evolution and dissemination of (beta)-lactamases accelerated by generations of (beta)-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24(suppl 1): S19-S45.
5. **Spratt BG.** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994; 264:388-399.
6. **Ambler RP.** The structure on  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289:321-31
7. **Turner P.** Extended-Spectrum b-lactamases. *Clin Infec Dis* 2005;42;S273-5
8. **Rice LB, Yao JDC, Klimm K, et al.** Efficacy of different Beta-lactamases against an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1243-44.
9. **Sirot D.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *JAC* 1995;36(suppl A):19-34
10. **Jacoby GA, Medeiros AA.** More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1991;35:1697-704
11. **Philippon A, Labia R, Jacoby GA.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1131-6
12. **Philippon A, Arlet G, Lagrange PH.** Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994;13(supl 1):S17-9
13. **Sougakoff W, Goussard S, Gerband G, Courvalin P.** Plasmid mediated resistance to third generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicilinase genes. *Rev Infect Dis* 1988; 10:879:84
14. **Bush K, Jacoby G, Medeiros A.** A funcional classifications écheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.
15. **Jacoby GA.** Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oximino-beta-lactams. *Infect Dis Clin North Am.* 1997; 11:875-7.
16. **Lavy S.** Microbial Resistance to Antibiotics. *Lancet* 1982;10:83-6
17. **Hopkins JD, Flores A, Pla MP, Lester S, O'Brien TF.** Nosocomial Spread of an amikacina resistance gene on both a mobilized, noncunjugative plasmid and a conjugative plasmid. *Antimicrobial Agent Chemother.* 1991;35:1605-11
18. **Wiedemann B.** Mechanisms of antibiotic resistance and their dissemination of resistance genes in the hospital environment. *Infect Control.* 1983;4: 444-7
19. **Weinstein RA.** Antibiotic resistance in hospitals and intensive care units: The problem and Potential Solutions. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 24; 113-119.
20. **Bosi C, David-Regli A, Bornet C, Mallea M, Pages J, Bollet.** Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *JCM* 1999; 37:2165-2169.
21. **Nowakowska M, Rudy M, Zientara M.** Intestinal colonization of newborns treated in intensive care units by multiple drug resistant microorganisms. *Med Dosw Mikrobiol.* 2004;56:302-8

22. Boo NY, Ng SF, Lim VK. A case control study of risk factors associated with rectal colonization of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* sp. In newborn infants. *J Hosp Inf* 2005;61:68-74.
23. Duman N, Abacioglu H, Karaman M, Duman N, Ozkan H. Beta-lactam antibiotic resistance in aerobic commensal fecal flora of newborns. *Pediatr Int* 2005;47:267-73
24. Peña, C., M. Pujol, C. Ardanuy, A. Ricart, R. Pallares, J. Linares, J. Ariza, and F. Gudiol. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:53–58.
25. Franciczek R, Sobieszczanska B, Grabowski M, Mowszet K, Pytrus T. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from hospitalized and healthy children. *Folia Microbiol* 2003; 48:243-7
26. Rice LB, Willwy AH, Papanicolaou GA. Outbreak of ceftazidima resistance caused by extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2193-9.
27. Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med*. 1993;119:353-8
28. Miranda G, Castro N, Leaños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, Solórzano F, Silva J, Gatica R, Aguilar C, et al. Outbreak infection with extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Mexican hospital. *JCM* 2001; 39:3193-96.
29. Silva J, Aguilar C, Becerra Z et al. Extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of enterobacterias in México. *Microb Drug Resist*. 1999; 5:189-93.
30. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garze-Ramos U, Lara Lemus R, et al. TLA-1: a new plasmad-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:997-1003.
31. Silva J, Gatica R, Aguilar C. Outbreak infection with extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Mexican Hospital. *JCM* 2001 ; 39 : 3193-96.
32. Martinez AG, Alpuche AC, Anaya C, Alcantara CD, Ganoso C, Daza C, Mijares C, Tinoco Maxwell M, Heaney J, Howie JG, Noble S. General Practice fund holding: Observations on prescribing patterns and cost using the defined daily dose method. *BMJ* 1993; 307:1190-4
33. Gniadkowsiki M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) an ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:597-608.
34. Lucet JC, Regnier B. Enterobacteria producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase. *Pathol Biol* 1998;46:235-43
35. Rolfe RD: Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Rev Infect Dis* 6 (suppl 1):S73, 1984.
36. Clinical and Laboratory Standards institute. 2005. Approved standar M100-S15. Vol 25 No.1
37. Cormican M, Marshall S, Jones R. Detection of Extended-Spectrum b-lactamases (ESBL)-Producing Strains by E test ESBL Screen. *JCM* 1996;36:1880-4
38. De Champs, C., M. P. Sauvart, C. Chanal, D. Sirot, N. Gazuy, R. Malhuret, J. C. Baguet, and J. Sirot. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *JCM* 1989;27:2887–2890.

39. Hollander, R., M. Ebke, H. Barck, and E. von Pritzbuier. 2001. Asymptomatic carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase by patients in a neurological early rehabilitation unit: management of an outbreak. *J Hosp Infect* 2001;48:207–213.
40. Arpin C, Dubois V, Coulange L, Andre C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet JP, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Nov;47(11):3506-14.
41. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *JCM* 2004;42:769-75.
42. Moubareck C, Daoud Z, Hakim NI. Contrywide spread of community-and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15)-Producing *Enterobacteriaceae* in Lebanon. *JCM* 2005;43:3309-13
43. Patterson DL, Ko WC, Mohapatra S, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: impact of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in a global study of 216 patients. Presented at 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 28 to October 1, 1997
44. Desimoni MC, Esquivel GP, Merino LA. Colonización fecal por cepas fe *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en una Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:507-11
45. Singh, N., K. M. Patel, M. M. Leger, B. Short, B. M. Sprague, N. Kalu, and J. M. Campos. Risk of resistant infections with *Enterobacteriaceae* in hospitalized neonates. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21: 1029–1033.
46. Smith, D. L., J. Dushoff, E. N. Perencevich, A. D. Harris, and S. A. Levin. Persistent colonization and the spread of antibiotic resistance in nosocomial pathogens: resistance is a regional problem. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 2004;101:3709–3714.
47. Levin, B. R. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin Infect Dis* 2001; 3(Suppl. 3):S161–S169.
48. Canton, R. Coque M, Baquero F. Multi-resistant gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:315-325
49. Lipsitch, M., and M. H. Samore. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis* 2002;8:347–354.
50. Patterson JE. Extended spectrum beta-lactamases: a therapeutic dilemma. *Ped Infect Dis J* 2002; 21:957-9.
51. Goldmann DA, Weinstein RA, Wenzel RP, et al. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals: a challenge to hospital leadership. *JAMA* 1996; 275:234-240.
52. Zanetti G, Bally F, Greud G. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3442-7
53. Wong-Beringer A. Therapeutic Challenges associated with extended-spectrum,  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Pharmacotherapy* 2001; 21:583-92