

Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido

Patricia Díaz Q^{1a}, Helia Bello T^{1b}, Mariana Domínguez Y^{1b}, Natalia Trabal F^{1c}, Sergio Mella M², Raúl Zemelman Z^{3d}, Gerardo González R^{1e}.

*Resistance to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin among nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamases*

Background: *Klebsiella pneumoniae* is a pathogenic bacterium frequently isolated from nosocomial samples, specially the subspecies *pneumoniae*, with extensive antibiotic resistance profiles, including third generation cephalosporins, aminoglycosides and quinolones. This is specially true for those strains producing extended spectrum beta lactamases (ESBL). **Aim:** To investigate the susceptibility to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin and the presence of some aminoglycoside modifying enzyme (AMEs) among nosocomial strains of *K pneumoniae* subspecies *pneumoniae* producing ESBL. **Material and methods:** The antibiotic resistant patterns and the level of resistance (minimal inhibitory concentration, MIC) of 100 strains, isolated from several hospitals of different Chilean cities, were determined. The presence of some aminoglycosides modifying enzyme (AMEs) was investigated by PCR. **Results:** Sixty five percent of strains were resistant to gentamicin, 47% were resistant to amikacin and 29% were resistant to ciprofloxacin. The most frequent AMEs genes detected were the *aac(6)-Ib* gene (6'-N-Acetyltransferase type Ib enzyme) in 69% of strains, conferring resistance to amikacin, kanamycin, tobramycin, and neomycin, and the gene *aac(3)-IIa* (3-Acetyltransferase type 3-IIa enzyme), in 36% of strains, conferring resistance to gentamicin. **Conclusions:** Among nosocomial strains of *K pneumoniae* subspecies *pneumoniae* isolated from Chilean hospitals, there is an association between the production of ESBL and the resistance to others antimicrobial agents, especially aminoglycosides. Nevertheless, 71% of isolates are susceptible to ciprofloxacin (Rev Méd Chile 2004; 132: 1173-8).

(Key Words: Aminoglycosides; Antibiotic resistance, bacterial; *Klebsiella pneumoniae*)

Recibido el 23 de marzo, 2004. Aceptado en versión corregida el 4 de agosto, 2004.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT #1020454.

¹Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. ²Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. ³Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile.

⁴Bioquímico. ⁵Bioquímico, Magíster en Microbiología. ⁶Licenciada en Biología. ⁷Químico Farmacéutico. Master Science in Public Health. ⁸Licenciado en Biología, Magíster en Microbiología, Doctor en Ciencias Biológicas

Correspondencia a: Gerardo González R. Grupo de Investigación en Resistencia a Antibióticos (GIRA), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Teléfono: 56-41-203237. Fax: 56-41-245975. E-mail: ggonzal@udec.cl

Klebsiella pneumoniae, y en especial la subespecie *pneumoniae*, es un bacilo Gram negativo que se aísla frecuentemente de cuadros infecciosos del tracto respiratorio y vías urinarias, infecciones intraabdominales y bacteremias, principalmente en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos y sometidos a terapia con antibióticos de amplio espectro¹. Entre las enterobacterias, *Klebsiella* es el género que más se ha asociado con la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y, a su vez, *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* ha llegado a ser la especie bacteriana en la cual se ha aislado y descrito el mayor número de estas enzimas², por lo que se considera a este microorganismo como su principal reservorio a nivel hospitalario³. La importancia de las cepas hospitalarias de *K pneumoniae* productoras de BLEE radica en sus amplios patrones de resistencia a los antibióticos^{4,5}, que incluyen a cefalosporinas de tercera generación y, además, estas cepas con frecuencia poseen también resistencia a otros grupos de agentes antibacterianos de gran importancia clínica, como son los antibióticos aminoglicósidos y las quinolonas⁶. Las BLEE han surgido como consecuencia de mutaciones puntuales sucesivas en los genes de β -lactamasas de reducido espectro, como son las enzimas TEM-1, TEM-2, SHV-1 y OXA⁷, siendo su sustrato específico las penicilinas, las cefalosporinas (excepto cefamicinas) y los monobactámicos, ocasionando un problema terapéutico de notables dimensiones a nivel hospitalario.

Las BLEE clásicamente se han descrito como codificadas en elementos extracromosomales. Estos genes, y los que codifican la resistencia a otros antimicrobianos, pueden residir en el mismo plásmido conjugativo y, por lo tanto, se transmiten juntos de un microorganismo a otro, confirmando el perfil de resistencia antibiótica múltiple⁸.

También se han identificado estos genes en otros elementos genéticos, denominados integrones, que contienen un sistema de recombinación sitio específica que permite integrar y expresar genes de resistencia localizados en estructuras denominadas *cassettes* genéticos de resistencia⁹. Así, por ejemplo, se han informado genes que codifican β -lactamasas que hidrolizan oxacilina y carbapenémicos^{10,11}. Los integrones también se pueden ubicar en plásmidos conjugativos, por lo que actualmente constituyen otra fuente de diseminación de genes de BLEE y de aquellos que codifican otras resistencias¹².

Debido a que las cefalosporinas de tercera generación, junto a los antibióticos aminoglicósidos y las quinolonas constituyen las terapias antiinfecciosas de elección en el tratamiento de infecciones producidas por bacilos Gram negativos aeróbicos, el objetivo de este trabajo fue investigar la actividad de gentamicina, amikacina y ciprofloxacina; además de la presencia de genes de enzimas modificantes de antibióticos aminoglicósidos en cepas hospitalarias de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de BLEE.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas bacterianas. En este estudio se incluyeron 100 cepas de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas (25 de tracto respiratorio, 23 de orina, 17 de sangre, 7 de heridas, 6 de líquido ascítico y 22 de origen desconocido) en hospitales de diversas ciudades de Chile entre los años 1997 y 2003. La distribución de las cepas fue: 44 aisladas en hospitales de Santiago, 4 de Talca, 29 de Concepción, 15 de Talcahuano, 3 de Coronel, 3 de Lota y 2 de Puerto Montt. Las cepas se mantuvieron a -70°C , en una mezcla 2:1 de cultivo de 18-24 h y glicerol 50% v/v.

Patrones y niveles de resistencia a gentamicina (GEN), amikacina (AMK), y ciprofloxacina (CIP): Estos parámetros fueron determinados por el método de difusión en agar y por dilución seriada en agar, respectivamente. Las recomendaciones y puntos de corte para definir resistencia bacteriana a los antibióticos ensayados fueron las indicadas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards*^{13,14}. Se utilizaron como cepas controles *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Detección de genes de enzimas modificantes de aminoglicósidos (EMA): Se realizó por RPC, utilizando partidores específicos para cada gen (Tabla 1)¹⁵⁻¹⁷. Se pesó los genes de las EMA más frecuentemente encontrados en cepas de enterobacterias¹⁸: *aac(3)-IIa*, *acc(6)-Ib*, *ant(2'')-Ia*, *ant(3'')-Ia* y *aph(3')Ia*. La RPC se realizó utilizando 2,5 μL de una mezcla de dNTPs 10x (1,25 mM de cada uno: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1,5 μL de cada partidor (25 pM), 2,5 μL de tampón de RPC 10x, 1,25 μL de MgCl_2 (50 mM), 5,6 μL de agua destilada estéril (SDW), 0,15 μL de *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μL) y

Tabla 1. Partidores específicos utilizados en la pesquisa de genes de enzimas modificantes de antibióticos aminoglicósidos

Gen	Partidores	Secuencia nucleotídica 5' → 3'	Referencia
<i>aac(3)-IIa</i>	aacC2 F	CGCTAAACTCCGTTACC	15
	aacC2 R	TAGCACTGAGCAAAGCC	
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	16
	aac(6')-Ib R	CCCGCTTTCTCGTAGCA	
<i>ant(2'')-Ia</i>	aadB F	CGTCATGGAGGAGTTGGACT	Este trabajo
	aadB R	CGCAAGACCTCAACCTTTTC	
<i>ant(3'')-Ia</i>	aadA F	ATGAGGGAAGCGGTGATCGCC	17
	aadA R	TCTTCCAAGTATCTGCGCGC	
<i>aph(3')-Ia</i>	aphA1 F	ATTCAACGGGAAACGTCTTG	Este trabajo
	aphA1 R	AACAGGAATCGAATGCAACC	

10 µL del templado de ADN. El templado se preparó de acuerdo a lo descrito por Reyes y col¹⁹.

Los productos de RPC se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1% a 100 V en tampón TAE 0,5x (0,4 M Tris-HCl, 0,02 M Na₂EDTA.2H₂O, 0,2 M acetato de sodio, 1,02 M ácido acético), y se visualizaron en un transiluminador de luz UV, luego de ser teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/L). Las condiciones de la RPC fueron: un ciclo de 96°C por 30 s, 55°C por 1 min y 70°C por 3 min, seguido de 25 ciclos de 96°C por 15 s, 55°C por 30 s y 70°C por 3 min y una extensión final a 70°C por 5 min.

RESULTADOS

La mayoría de las cepas de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de BLEE fue resistente a gentamicina (65%), teniendo amikacina una mejor actividad. Sin embargo, el porcentaje de cepas resistentes a este último compuesto también fue alto, alcanzando a 47% de las cepas. En cambio, ciprofloxacina presentó una mayor actividad antibacteriana, manteniéndose más de 70% de las cepas susceptibles a este compuesto, finalmente todos los aislamientos fueron susceptibles a imipenem (datos no presentados). El nivel de resistencia a los compuestos antibacterianos, exhibidos por las cepas estudiadas, se presenta en la Tabla 2. Para los antibióticos aminoglicósidos se observó niveles de

resistencia moderados, con valores que fluctuaron entre ≤2 µg/ml y >1.024 µg/ml, encontrándose que para gentamicina los valores de CMI fueron más elevados, con una CMI₅₀ de 64 µg/ml y CMI₉₀ de 512 µg/ml; mientras que amikacina ejerció una mayor actividad antibacteriana con valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de 16 µg/ml y de 64 µg/ml, respectivamente. En cambio, el nivel de resistencia para ciprofloxacina fue más bajo, ya que su CMI₅₀ fue ≤1 µg/ml y la CMI₉₀ sólo alcanzó los 2 µg/ml.

Los genes de EMA detectados en las cepas estudiadas se muestran en la Figura 1. Los genes *aac(6')-Ib* y *ant(3'')-Ia* fueron los que se encontraron con mayor frecuencia, detectándose en 69% y 68% de las cepas, respectivamente. Con frecuencias menores se detectaron los genes *aph(3')-Ia* (55%) y *aac(3)-IIa* (36%). No se encontraron cepas que tuvieran el gen *ant(2'')-Ia*.

DISCUSIÓN

En este trabajo se investigó la actividad de gentamicina, amikacina y ciprofloxacina, antibióticos de frecuente uso a nivel hospitalario^{20,21} sobre cepas hospitalarias de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de BLEE.

Los aminoglicósidos estudiados demostraron tener menor actividad que ciprofloxacina, de hecho, la mayoría de los aislamientos fue resistente a gentamici-

Tabla 2. Actividad antibacteriana de gentamicina, amikacina y ciprofloxacina sobre cepas de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de BLEE

Antibiótico	Rango CMI*	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% de resistencia
Gentamicina	≤2->1.024	64	512	65
Amikacina	≤2-128	16	64	47
Ciprofloxacina	≤1-1.024	≤1	2	29

*CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml); CMI₅₀ y CMI₉₀: CMI que inhibe al 50% y al 90% de las cepas, respectivamente.

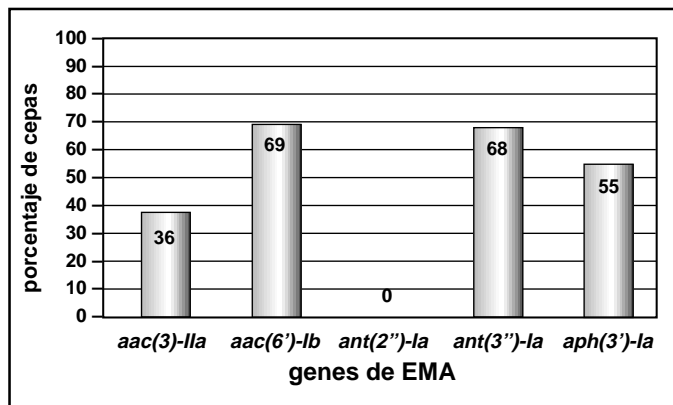


FIGURA 1. Distribución de genes de enzimas modificantes de aminoglicósidos (EMA) detectados en cepas de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de diversos hospitales de Chile.

na. Amikacina demostró tener mayor actividad antimicrobiana que gentamicina, con valores de CMI que variaron entre ≤2 µg/ml y 128 µg/ml, aun cuando casi el 50% de las cepas fue resistente a este compuesto. Un estudio realizado en Italia por Spanu y col⁶, describió esta diferencia de actividad, pero encontró frecuencias de cepas resistentes bastante menores a las obtenidas en este trabajo, además de valores de CMI₅₀ más bajos (4 µg/ml y 2 µg/ml para amikacina y gentamicina, respectivamente). Estudios realizados en España²² y Corea²³ informaron situaciones similares.

Frente a ciprofloxacina, el comportamiento de las cepas fue diferente, ya que la mayoría de ellas continúa siendo susceptible a este antibiótico (71%), con valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de ≤1 µg/ml y 2 µg/ml, respectivamente, lo cual concuerda con resultados descritos en la literatura²⁴⁻²⁶. No obstante, Spanu y col⁶ informaron un valor de CMI₉₀ más elevado (32 µg/ml). Sólo se observó una cepa con elevado nivel de resistencia a este compuesto (CMI ≥512 µg/ml). La resistencia a ciprofloxacina, probablemente derive de mutaciones puntuales en los genes que codifican la ADN girasa o la topoisomerasa IV, aunque últimamente se ha descrito resistencia transferible en *K pneumoniae*^{27,28}.

La capacidad de las cepas de producir EMA se investigó determinando la presencia de los genes que las codifican y que, más frecuentemente, son detectados en las enterobacterias¹⁸. Se encontró que el gen *aac(6)-Ib* es el más frecuente en las cepas de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* incluidas en este trabajo (69%), seguido por el gen *ant(3'')-Ia* (68%); lo que concuerda con estudios previos^{19,26}. La presencia de estos genes media la resistencia a amikacina, tobramicina, dibekacina, 2'-N-etilnetilmicina, netilmicina, 5-episisomicina, sisomicina, espectinomicina y estreptomina^{18,29}. Además, el gen *aph(3')-Ia*, tercero en frecuencia de detección (55%), permite explicar la resistencia a kanamicina y neomicina que exhiben las cepas que lo tienen^{18,29}. Por otra parte, el gen *aac(3)-IIa*, detectado en 36% de las cepas, puede explicar en parte, la resistencia de este grupo de cepas a gentamicina, ya que la EMA por él codificada modifica a este antibiótico aminoglicósido, además de tobramicina, dibekacina, netilmicina y sisomicina²⁹.

Es interesante destacar que dentro de las cepas que poseían el gen *aac(6)-Ib*, algunas de ellas presentaron susceptibilidad intermedia a amikacina y resistencia a gentamicina; en estas cepas, sin

embargo no se encontraron genes que codificaran para EMA que modifiquen a gentamicina (*aac(3)IIa*, *ant(2'')-Ia*). Esto podría deberse, por una parte, a lo ya informado por Casin y col³⁰, quienes secuenciaron el gen *aac(6')-Ib* que tenían las cepas que presentaban estas características e informaron una mutación específica que da origen a esta alteración en el perfil de actividad de la enzima. Además, la resistencia a gentamicina puede explicarse por genes que no estuvieron incluidos en este estudio.

En este trabajo no se detectaron cepas de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae* que portaran el gen *ant(2'')-Ia*, lo que concuerda con lo informado por Reyes y col¹⁹. Interesantemente, White y col³¹ detectaron exclusivamente este gen como *cassette* genético de resistencia asociado a integrones en 7 cepas del género *Klebsiella*, y de éstas, 5 eran productoras de BLEE, indicando una asociación con este tipo de resistencia. En nuestro país, este gen también ha sido detectado en integrones, pero sólo en cepas de *Escherichia coli*¹⁹.

En los últimos años se ha observado un continuo aumento de aislamientos de enterobacterias, especialmente de *K pneumoniae* subespecie *pneumoniae*, productoras de BLEE y además resistentes a otras familias de antimicrobianos^{15,32}. Nuestros resultados confirman que en nuestro medio hay una evidente asociación entre producción de BLEE y resistencia a quinolonas y aminoglicósidos-aminociclitolos.

Desde el punto de vista clínico, estos resultados explican las escasas alternativas terapéuticas distintas a los carbapenémicos para el tratamiento de las infecciones severas producidas por cepas productoras de BLEE. Sin embargo, dada la descripción cada vez mayor de resistencia de estos últimos agentes^{33,34}, es práctico señalar, que al menos en determinados centros hospitalarios y en ciertas infecciones (tracto urinario) el uso de ciprofloxacina o amikacina, puede permitir, al menos en parte, disminuir el uso de carbapenémicos.

REFERENCIAS

- BRANGER C, LESIMPLE AL, BRUNEAU B, BERRY P, LAMBERT-ZECHOVSKY N. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital. *J Med Microbiol* 1998; 47: 201-9.
- WEST PWJ. Extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella* spp. *Br J Biomed Sci* 2000; 57: 226-33.
- RICE L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases. *CHEST* 2001; 119: 391-6.
- YANG Y, BHACHECH N, BRADFORD PA, JETT BD, SAHM DF, BUSH K. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 β -lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1671-6.
- ZEMELMAN R, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, GONZÁLEZ G, MELLA S, GARCÍA A. Activity of imipenem, third-generation cephalosporins, aztreonam and ciprofloxacin against multi-resistant Gram-negative bacilli isolated from Chilean hospitals. *J Antimicrob Agents* 1993; 32: 413-9.
- SPANU T, LUZZARO F, PERILLI M, AMICOSANTE G, TONIOLO A, FADDA G AND THE ITALIAN ESBL STUDY GROUP. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 196-202.
- BRADFORD PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
- BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for β -lactamases and correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
- BENNETT PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 1-4.
- NAAS T, NORDMANN P. OXA-type- β -lactamases. *Curr Pharm Desig* 1999; 5: 865-79.
- POIREL L, NAAS T, NICOLAS D, COLLET L, BELLAS S, CAVALLO JD ET AL. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron borne gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-7.
- MARTÍNEZ-FREJO P, FLUIT AC, SCHMITZ FJ, VERHOEF J, JONES ME. Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 686-9.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) 2002. *Methods for dilution antimicrobial*

- susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 5th Edition. NCCLS document M7-A5. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.*
14. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) 2002. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests approved standard. 7th Edition. NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.*
 15. MELANO R, CORSO A, PETRONI A, CENTRÓN D, ORMAN B, PEREYRA A ET AL. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 36-42.
 16. SENDA K, ARAKAWA Y, ICHIYAMA S, NAKASHIMA K, ITO H, OHSUKA S ET AL. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{MMP}*) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2904-13.
 17. MAZEL D, DYCHINCO B, WEBB VA, DAVIES J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1568-74.
 18. VAKULENKO S, MOBASHERY S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 430-50.
 19. REYES A, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, MELLA S, ZEMELMAN R, GONZÁLEZ G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 317-21.
 20. MELLA S, GARCÍA A, AGUILERA L, ZEMELMAN R. Antibióticos aminoglicósidos. Agrupación según su estructura química y actualización sobre alguna de sus propiedades. *Acta Microbiológica* 1993; 4: 5-13.
 21. MELLA S, ACUÑA G, MUÑOZ M, PERÉZ C, LABARCA J, GONZÁLEZ G ET AL. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infect* 2000; 17: 53-66.
 22. ARDANUY C, LIÑARES J, DOMÍNGUEZ MA, HERNÁNDEZ-ALLÉS S, BENEDÍ VJ, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1636-40.
 23. KIM YK, PAI H, LEE HJ, PARK SE, CHOI EH, KIM J ET AL. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1481-91.
 24. SHANNON K, STAPLETON P, XIANG X, JOHNSON A, BEATTIE H, EL BAKRI F ET AL. Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3105-10.
 25. SIU LK, LU PL, HSUEH PR, LIN FM, CHANG S, LUH KT ET AL. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: Clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4020-7.
 26. DEL SOLAR E, GARCÍA A, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, GONZÁLEZ G, ZEMELMAN R. Mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos en bacilos Gram negativos de hospitales chilenos. *Rev Méd Chile* 1995; 123: 293-7.
 27. RUIZ J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alteration, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1109-17.
 28. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, PASCUAL A, JACOBY GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-9.
 29. SHAW KJ, RATHER PN, HARE RS, MILLER GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57: 138-63.
 30. CASIN I, BORDON F, BERTIN P, COUTROT A, PODGLAJEN I, BRASSEUR R ET AL. Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 209-15.
 31. WHITE PA, MELVER CJ, RAWLINSON WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658-61.
 32. RAHAL JJ. Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem? *Clin Microbiol Infect* 2000; 6 (Suppl. 2): 2-6.
 33. MAHGOUB S, AHMED J, GLATT AE. Completely resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 477-9.
 34. OLIVER A. Resistencia a carbapenemas y *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 259-61.

Agradecimientos:

Agradecemos a la señora Magda Hernández y al señor Andrés Soto, por su asistencia técnica, como también a todos los laboratorios de los hospitales incluidos en este estudio, por enviarnos desinteresadamente las cepas analizadas en este trabajo.