

Transferencia de β -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias

Magaly Sánchez U^{1a}, Helia Bello T^{1b}, Mariana Domínguez Y^{1b}, Sergio Mella M², Raúl Zemelman Z^{3d}, Gerardo González R^{1c}.

Transference of extended-spectrum β -lactamases from nosocomial strains of Klebsiella pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae

Background: *Klebsiella pneumoniae* is an important pathogenic bacterium, frequently isolated from nosocomial samples, that exhibits wide antimicrobial resistance profiles, including third generation cephalosporins (3GC), aminoglycosides and quinolones. The resistance to 3GC is mainly due to the synthesis of extended spectrum beta lactamases (ESBL), encoded by conjugative plasmids. **Aim:** To investigate the potential transference of resistance to 3GC from nosocomial strains of *K. pneumoniae* to other clinical strains of various species of Enterobacteriaceae. **Material and methods:** The mating experiments were carried out in liquid media and three nosocomial strains of *K. pneumoniae* were used as donors. These strains were ESBL-producers and resistant to, at least, one of the 3GC assayed. One strain of *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*, isolated from clinical specimens, were used as recipients. The presence of *bla* genes was investigated by PCR. **Results:** The three nosocomial strains of *K. pneumoniae* were able to transfer the resistance to 3GC and the genes encoding the ESBL to the susceptible recipient strains of enterobacteria. The frequency of transference was as high as 3.2×10^{-2} transconjugants/recipient cell when the strain of *Citrobacter freundii* was used as recipient. All transconjugants exhibited high level of resistance to the 3GC assayed. **Conclusions:** Strains of *K. pneumoniae* isolated from Chilean hospitals are able to disseminate the ESBL genes to clinical strains of others species of Enterobacteriaceae (Rev Méd Chile 2006; 134: 415-20).

(Key Words: Beta-lactamases; Drug resistance, bacterial; *Klebsiella pneumoniae*)

Recibido el 21 de abril, 2005. Aceptado el 20 de septiembre, 2005.

Trabajo financiado por proyectos FONDECYT #1980109 y #1020454.

¹Grupo de Investigación en Resistencia a Antibióticos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, ²Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción y ³Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad San Sebastián. Concepción. Chile.

^aLicenciado en Bioquímica

^bBioquímica, Magíster en Microbiología

^cLicenciado en Biología, Magíster en Microbiología, Doctor en Ciencias Biológicas

^dQuímico-Farmacéutico, Diplomado en Bacteriología, MSc Public Health

Correspondencia a: Helia Bello Toledo. Teléfono: 41 203237.
Fax: 41 245975. Casilla 160-C. E mail: hbello@udec.cl

Los antibióticos β-lactámicos son ampliamente utilizados, tanto a nivel hospitalario como en la comunidad, favoreciendo la selección de bacterias productoras de enzimas β-lactamasas, que son responsables de esta resistencia por hidrólisis del anillo β-lactámico del antibiótico¹. Trascendental importancia revisten las cepas productoras de β-lactamasas de espectro-extendido (BLEE), enzimas que tienen la capacidad de inactivar cefalosporinas de tercera generación (C3G), monobactámicos y, en menor grado, algunas cefalosporinas de cuarta generación¹⁻³. La mayoría de estas enzimas derivan de las β-lactamasas TEM-1 y SHV-1 que, por mutaciones en los genes que las codifican, han originado enzimas con un perfil de sustrato más amplio^{2,4}. Estas cepas productoras de BLEE son seleccionadas, principalmente, en el ambiente hospitalario por el frecuente uso de cefalosporinas, especialmente de tercera generación^{1,5}. La mayor parte de las BLEE son inhibidas con ácido clavulánico, propiedad que se utiliza en el laboratorio para detectar la presencia de estas enzimas a través de distintas pruebas de sinergia⁶⁻⁹. En la actualidad, uno de los principales problemas hospitalarios es la resistencia bacteriana a antibióticos codificada en genes de ubicación extracromosómica, como aquellos que están localizados en plásmidos o elementos transponibles, debido a su potencial transferencia a otras cepas bacterianas susceptibles que circulan en el ambiente hospitalario¹⁰.

K. pneumoniae es uno de los bacilos Gram negativos resistentes a antibióticos más frecuentemente aislados de episodios infecciosos a nivel

hospitalario. Las cepas de esta especie presentan amplios y elevados niveles de resistencia, en especial a antibióticos de amplio espectro como son las C3G y antibióticos aminoglicósidos, siendo su principal mecanismo de resistencia la síntesis de BLEE y enzimas modificantes de aminoglicósidos¹¹⁻¹³.

En este trabajo, se evaluó la transferencia de resistencia a C3G y de genes que codifican BLEE desde cepas hospitalarias de *K. pneumoniae* a otras enterobacterias aisladas de diversos productos patológicos.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas bacterianas. Como cepas dadoras se utilizó tres cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, de acuerdo al método de detección de estas enzimas recomendado por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)¹⁴ y que eran susceptibles a ácido nalidixico (Concentración Mínima Inhibitoria [CMI] ≤4 µg/ml) y resistentes a, al menos, una C3G o aztreonam (Tabla 1). Todas estas cepas producían BLEE y poseían los genes *bla_{TEM}* *bla_{SHV}* y dos de ellas, además, el gen *bla_{CTX-M}*. Las cepas fueron aisladas de secreción bronquial o herida, durante el año 2000, en tres hospitales chilenos. Como cepas receptoras se utilizaron cuatro cepas de enterobacterias aisladas de diferentes productos patológicos: *Citrobacter freundii* CF-1 (orina), *Salmonella typhimurium* Sal-53 (coprocultivo), *Serratia marcescens* S-25 (secreción bronquial) y *Escherichia coli* EC-151 (hemocultivo). A partir de estas cepas se obtuvo mutantes resistentes a ácido

Tabla 1. Características de las cepas bacterianas usadas en los experimentos de conjugación

Cepas bacterianas	Categoría*	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml) de:						Amplificación por RPC de genes <i>bla</i> :			BLEE
		CTX	CAZ	CFP	CTR	ATM	AN	TEM	SHV	CTX-M	
<i>K. pneumoniae</i> 283	D	128	8	512	256	16	≤4	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 295	D	64	8	512	512	16	≤4	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 329	D	64	256	128	256	1.024	≤4	+	+	-	+
<i>C. freundii</i> (Cf-1)	R	≤2	≤2	≤2	≤4	≤2	≥1.024	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> (Sal-21)	R	≤2	≤2	≤2	≤4	≤2	≥1.024	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i> (S-25)	R	≤2	≤2	≤2	≤4	≤2	≥1.024	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (Ec-151)	R	≤2	≤2	≤2	≤4	≤2	≥1.024	-	-	-	-

*D: cepa dadora; R: cepa receptora; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CFP: cefoperazona; CTR: ceftriaxona; ATM: aztreonam; AN: ácido nalidixico.

nalidixico (CMI >1.024 µg/ml), por el método de Szybalsky¹⁵. Además, estas cepas no eran productoras de β-lactamasas (Tabla 1). En los ensayos de susceptibilidad se utilizó como control la cepa *E. coli* ATCC 25922 y, como control positivo de la producción de BLEE, la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603. En el estudio de los genes *bla* del tipo TEM, SHV y CTX-M, se empleó como control la cepa *K. pneumoniae* UC-168 (donada por el Dr. Marcelo Galas del Instituto «Dr. Carlos Malbrán», Argentina), que posee los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}. Todas las cepas fueron mantenidas a -70°C en un mezcla 2:1 de caldo tripticasa y glicerol 50% (v/v).

Detección de BLEE. La detección de las enzimas BLEE se realizó de acuerdo al método de detección recomendado por el NCCLS¹⁴. Este método consiste en realizar un antibiograma con discos de cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg) y cefpodoxima (30 µg) solos y en combinación con 10 µg de ácido clavulánico, los que comercialmente fueron obtenidos de la empresa Oxoid Ltd. La presencia de BLEE se visualiza cuando se produce un aumento en los halos de inhibición de ≥5 mm en los discos de antibióticos que contienen ácido nalidixico.

Actividad antibacteriana. El nivel de resistencia de las cepas fue determinado por el método de dilución seriada en agar (CMI), de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS¹⁴, utilizando cefotaxima (Laboratorio Chile), ceftazidima (Glaxo-Wellcome), cefoperazona (Laboratorio Chile), ceftriaxona (Roche), aztreonam (Bristol-Myers) y ácido nalidixico (Merck).

Transferencia de genes de BLEE. Se realizó mediante conjugación en medio de cultivo líquido, de acuerdo a la metodología descrita por Arlet y col¹⁶. Para la selección de las cepas transconjugantes se utilizaron placas de agar cromogénico (Oxoid Ltd.), suplementadas con cefotaxima (9 µg/ml) y ácido nalidixico (600 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Detección de genes de β-lactamasas. La detección de los genes *bla* de las diferentes familias de β-lactamasas, se realizó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RPC), de acuerdo a los protocolos señalados para cada pareja de partidores (Tabla 2). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizados en un transiluminador de luz UV.

RESULTADOS

Las tres cepas de *K. pneumoniae* fueron resistentes a cefotaxima, ceftriaxona, cefoperazona y aztreonam y sólo una de ellas presentó resistencia a ceftazidima (Tabla 1). Los niveles de resistencia a cefoperazona (128-512 µg/ml) y ceftriaxona (256-512 µg/ml) fueron mayores que los obtenidos para cefotaxima (64-128 µg/ml). Todas las cepas de enterobacterias utilizadas como bacterias receptoras, presentaron susceptibilidad a las C3G y en ninguna de ellas se detectó la presencia de BLEE (Tabla 1).

Tabla 2. Partidores utilizados en la amplificación de los genes *bla* que codifican β-lactamasas de las familias TEM, SHV y CTX-M

Partidores	Secuencia nucleotídica 5' - 3'	Tamaño del producto de RPC (pb)	Referencias
<i>bla</i> _{TEM} (321)	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC	526	17
<i>bla</i> _{TEM} (846)	TTATCCGCCTCCATCCAGTC		
<i>bla</i> _{SHV} (1)	GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCCG	1.018	18
<i>bla</i> _{SHV} (2)	TCTTTCCGATGCCGCCGAGTCA		
<i>bla</i> _{SHV} (F)	CTGGGAAACGGAAGTGAATG	309	*
<i>bla</i> _{SHV} (R)	GGGGTATCCCGCAGATAAAT		
<i>bla</i> _{CTX-MA}	CGCTTTGCGATGTGCAG	550	19
<i>bla</i> _{CTX-MB}	ACCGCGATATCGTTGGT		

*Bello H et al. 42nd ICAAC. Libro de resúmenes C2-1879, página 116; 2002.

La frecuencia de transferencia de los genes *bla* varió entre $7,8 \times 10^{-7}$ y $3,2 \times 10^{-2}$ transconjugantes/célula receptora, para el par conjugante formado por las cepas K329 y Sal-53 y K283 y Cf-1, respectivamente. La mayor frecuencia de transferencia de resistencia a C3G y aztreonam se observó hacia la cepa de *C. freundii* Cf-1, con las tres cepas de *K. pneumoniae* utilizadas como cepas dadoras, con valores que fluctuaron entre $4,2 \times 10^{-4}$ y $3,2 \times 10^{-2}$ transconjugantes/célula receptora, utilizando como dadoras las cepas de *K. pneumoniae* K329 y K283, respectivamente. La menor frecuencia de transferencia se obtuvo cuando se usó como receptora la cepa de *S. typhimurium* Sal-53, con valores que fluctuaron entre 10^{-4} y 10^{-7} transconjugantes/célula receptora (Tabla 3).

Hacia todas las cepas receptoras, se transfirieron los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} desde las cepas *K. pneumoniae* K283 y K295 y *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} desde la cepa *K. pneumoniae* K329. Los valores de CMI para las C3G en todas las cepas transconjugantes aumentaron considerablemente respecto de las respectivas cepas receptoras y, en la mayoría de los casos, correspondieron a valores de CMI que indican resistencia (Tabla 4). En las cepas transconjugantes la CMI de las C3G y aztreonam aumentó de 2 a 512 veces el valor de CMI observado con las cepas receptoras y existió correspondencia con el valor de CMI observado para las cepas dadoras.

En todas las cepas transconjugantes se obtuvo sinergia con ácido clavulánico, lo que indicó la

presencia de una BLEE, de acuerdo al método recomendado por el NCCLS (2000)⁸. Estos resultados son concordantes con los estudios genéticos, puesto que en las cepas transconjugantes se detectó, mediante RPC, los genes *bla*_{CTX-M} o *bla*_{SHV}.

DISCUSIÓN

Las BLEE son enzimas que inactivan C3G y aztreonam, cuya codificación genética está mediada por plásmidos conjugativos^{1,10}, hecho que ha permitido que las BLEE sean diseminadas hacia bacilos Gram negativos susceptibles, especialmente en el ambiente hospitalario. En este sentido, las cepas de *K. pneumoniae* han tenido un importante rol, ya que ellas han sido catalogadas como el principal reservorio de genes de BLEE y otros genes de resistencia que pueden transferir a cepas susceptibles²⁰. Los resultados obtenidos en este estudio permiten confirmar estas aseveraciones, ya que fue posible transferir por conjugación la resistencia a C3G y aztreonam desde todas las cepas hospitalarias de *K. pneumoniae* usadas como dadoras hacia las cepas de diferentes especies de enterobacterias usadas como receptoras. Este estudio constituye una evidencia de la transferencia de genes de BLEE entre cepas de especies de bacilos Gram negativos aisladas en centros hospitalarios chilenos. Los resultados fueron corroborados con los estudios genéticos de RPC, ya que se detectó los genes *bla* en todas las

Tabla 3. Características de las cepas transconjugantes y frecuencia de transferencia

Par conjugante	Frecuencia de transferencia*	Amplificación por RPC de genes <i>bla</i> :			
		TEM	SHV	CTX-M	BLEE
K283 x Cf-1	$3,2 \times 10^{-2}$	+	-	+	+
K283 x Sal-53	$6,5 \times 10^{-4}$	+	-	+	+
K283 x S-25	$4,9 \times 10^{-3}$	+	-	+	+
K283 x Ec-151	$2,0 \times 10^{-2}$	+	-	+	+
K295 x Cf-1	$2,7 \times 10^{-2}$	+	-	+	+
K295 x Sal-53	$4,4 \times 10^{-5}$	+	-	+	+
K295 x S-25	$8,1 \times 10^{-5}$	+	-	+	+
K295 x Ec-151	$9,7 \times 10^{-3}$	+	-	+	+
K329 x Cf-1	$4,2 \times 10^{-4}$	+	+	-	+
K329 x Sal-53	$7,8 \times 10^{-7}$	+	+	-	+
K329 x S-25	$9,3 \times 10^{-5}$	+	+	-	+
K329 x Ec-151	$5,1 \times 10^{-4}$	+	+	-	+

*transcojugantes/célula receptora

Tabla 4. Nivel de resistencia de las cepas transconjugantes

Trans- conjugantes	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml) de:					
	CTX	CAZ	CFP	CTR	ATM	AN
K283 x Cf-1	64	8	512	512	32	>1.024
K283 x Sal-53	256	8	1.024	512	16	>1.024
K283 x S-25	128	4	256	256	32	>1.024
K283 x Ec-151	128	8	512	256	32	>1.024
K295 x Cf-1	64	4	512	512	16	>1.024
K295 x Sal-53	128	16	512	1.024	16	>1.024
K295 x S-25	64	8	256	256	32	>1.024
K295 x Ec-151	64	4	512	512	32	>1.024
K329 x Cf-1	64	16	128	512	512	>1.024
K329 x Sal-53	64	512	256	256	1.024	>1.024
K329 x S-25	128	256	128	256	256	>1.024
K329 x Ec-151	64	256	256	256	512	>1.024

CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CFP: cefoperazona; CTR: ceftriaxona; ATM: aztreonam; AN: ácido nalidixico.

cepas receptoras. Además, se confirmó que los genes *bla_{SHV}* amplificados correspondieron a una BLEE de esta familia, ya que al realizar un RFLP del producto de RPC con la enzima *NheI*, éste fue positivo. Esto sólo ocurre si el gen *bla_{SHV-1}* ha sufrido una mutación puntual en el codón 238 de la secuencia nucleotídica de esta enzima, dando origen a una BLEE¹⁸. Por otra parte, se comprobó que las cepas transconjugantes recibieron una BLEE, ya que todas ellas dieron positiva la prueba de sinergia con ácido clavulánico, recomendada por el NCCLS para la detección de este tipo de enzimas^{8,14}.

En los casos en que el gen *bla_{SHV}* no fue transferido (*K. pneumoniae* K283 y K295), éste correspondió al gen *bla_{SHV-1}*, que tiene una ubicación cromosomal en la mayoría de las cepas de *Klebsiella* spp²¹.

Es importante destacar que la transferencia de los genes de β-lactamasas se realizó a frecuencias de transferencia tan elevadas como 10⁻² transconjugantes/célula receptora, especialmente hacia la

cepas de *C freundii*, lo que indicaría que el fenómeno de flujo de genes de resistencia entre las enterobacterias, es un evento que parece no ser ocasional entre las cepas hospitalarias. Además, se pudo observar que las cepas transconjugantes también recibieron genes que codifican enzimas modificantes de aminoglicósidos (datos no mostrados), hecho trascendental, ya que explicaría el origen de las cepas multiresistentes a los antibióticos a nivel hospitalario y la co-transferencia de resistencia a antibióticos β-lactámicos y aminoglicósidos.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten aportar una fuerte evidencia que apoya la transferencia horizontal de genes de resistencia desde cepas de *K. pneumoniae* aisladas de hospitales chilenos a otras cepas clínicas de enterobacterias, lo que contribuye a la diseminación de los genes que codifican las BLEE y, además, otros genes de resistencia a grupos de antibióticos diferentes de los β-lactámicos.

REFERENCIAS

- MEDEIROS AA. Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl 1): S19-45.
- JACOBY GA. Extended-spectrum β-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino β-lactam. En: *Infectious Disease Clinics of North America*, Vol 11 (4). F.C. Tenover and J.E. McGowan (Eds). W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1997; 875-87.
- ZEMELMAN C, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, GONZÁLEZ G, MELLA S, ZEMELMAN R. Activity of cefepime, cefotaxime, ceftazidime, and aztreonam against extended-spectrum-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae*

- and *Escherichia coli* from Chilean hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 41-3.
4. HERITAGE J, M'ZALI FH, GASCOYNE-BINZI D, HAWKEY PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 309-18.
 5. BAQUERO F, NEGRI NC, MOROSINI MI, BLÁZQUEZ J. Antibiotic selective environments. *Clin Infect Dis* 1998; 27(Suppl 1): S5-S11.
 6. JARLIER V, NICHOLAS MH, FOURNIER G, PHILIPPON A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to new β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
 7. HO PL, CHOW KH, YUEN KY, NG WS, CHAU PY. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 49-54.
 8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard*. 5th Edition. NCCLS document M7-A5. NCCLS, 2000. Wayne, Pennsylvania, USA.
 9. BELLO H, GONZÁLEZ G, DOMÍNGUEZ M, ZEMELMAN C, MELLA S, ZEMELMAN R ET AL. Detection of extended-spectrum β -lactamases produced by Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae* by two synergy methods. *J Chemotherapy* 2004; 16: 312-4.
 10. FACINELLI B, MONTANARI MP, CALEGARI L. Plasmid-specified aminoglycoside-modifying enzymes clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Epidemiol* 1985; 1: 48-53.
 11. BABINI GS, LIVERMORE DM. Antimicrobial resistance among *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 183-9.
 12. QUINTEROS M, RADICE M, GARDELLA N, RODRÍGUEZ MM, COSTA N, KORBENFELD D ET AL. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospital. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; 47: 2864-7.
 13. DÍAZ P, BELLO H, DOMÍNGUEZ M, TRABAL N, MELLA S, ZEMELMAN R ET AL. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1173-8.
 14. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5*. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Wayne, PA. 1999 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S9. Wayne PA: NCCLS, 1999.
 15. SZYBALSKI W, BRYSON V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. *J Bacteriol* 1952; 64: 489-99.
 16. ARLET G, ROUVEAU M, FOURNIER G, LAGRANGE PH, PHILIPPON A. Novel, plasmid-encoded, TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* conferring higher resistance to aztreonam than to extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2020-3.
 17. TENOVER FC, HUANG MB, RASHEED JK, PERSING DH. Development of PCR to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2729-37.
 18. NUESCH-INDERBINEN MT, HACHLER H, KAYSER FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolated by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 398-402.
 19. BONNET R, SAMPAIO JLM, LABIA R, DE CHAMPS C, SIROT D, CHANAL C ET AL. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1936-42.
 20. VERMA A, DESAI N, HANNON K, PHILPOTT-HOWARD J, HILL RLR. Intra- and inter-generic plasmid-mediated spread of cephalosporin and aminoglycoside resistance amongst *Klebsiella aerogenes* K41 and other enterobacterias. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 123-9.
 21. LIVERMORE DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.

Agradecimientos

Agradecemos a la señora Magda Hernández por su asistencia técnica, como también a los Laboratorios de Microbiología de los Hospitales Base de Lota, Base de Puerto Montt y Clínico Regional de Concepción, que gentilmente nos enviaron las cepas de *K. pneumoniae* utilizadas como dadoras en este trabajo y al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción por proporcionarnos las cepas de enterobacterias usadas como receptoras.