

Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacter* spp.

E. BERTONA¹, M. RADICE^{2*}, C. H. RODRÍGUEZ³, C. BARBERIS³,
C. VAY³, A. FAMIGLIETTI³, G. GUTKIND²

¹Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica, área Bacteriología Clínica, Escuela de graduados, Junín 956 CP 1113.

²Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 CP 1113.

³Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Córdoba 2150 CP1113.

*Correspondencia. E-mail: mradice@ffybu.uba.ar

RESUMEN

Enterobacter spp. es un patógeno intrahospitalario que presenta múltiples mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Se caracterizaron fenotípica y genotípicamente las diferentes β -lactamasas presentes en 27 aislamientos consecutivos e ininterrumpidos de *Enterobacter* spp. (25 *Enterobacter cloacae* y 2 *Enterobacter aerogenes*). También se evaluó la habilidad de diferentes métodos fenotípicos para detectar β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en estos microorganismos. En 15/27 aislamientos (63%) se observó resistencia a las cefalosporinas de tercera generación. En 12 de los aislamientos resistentes se detectó un alto nivel de producción de cefalosporinasa cromosómica, siendo 6 de ellos también productores de PER-2. Dicha resistencia en los 3 aislamientos restantes se debió exclusivamente a la presencia de BLEE, PER-2 en 2 de ellos y CTX-M-2 en un caso. Sólo CTX-M-2 se detectó con todas las cefalosporinas probadas en los ensayos de sinergia, utilizando el método de difusión, mientras que cefepima mejoró la detección de PER-2 en 7/8 aislamientos productores de esta BLEE, 4/8 utilizando la prueba de doble disco y 7/8 comparando discos de cefepima con y sin el agregado de ácido clavulánico. El método de dilución empleado solo detectó 1/9 BLEE al comparar las cefalosporinas con y sin el agregado de inhibidor.

Palabras clave: *Enterobacter* spp., β -lactamasas de espectro extendido, cefepima

SUMMARY

Phenotypic and genotypic characterization of resistance to third-generation cephalosporins in *Enterobacter* spp. *Enterobacter* spp. are becoming increasingly frequent nosocomial pathogens with multiple resistance mechanism to β -lactam antibiotics. We carried out the phenotypic and genotypic characterization of β -lactamasas in 27 *Enterobacter* spp. (25 *Enterobacter cloacae* y 2 *Enterobacter aerogenes*), as well as the ability of different extended spectrum β -lactamase (ESBL) screening methods. Resistance to third generation cephalosporins was observed in 15/27 (63%) isolates. Twelve resistant isolates produced high level chromosomal encoded AmpC β -lactamase; 6 of them were also producers of PER-2. Resistance to third generation cephalosporins in the remaining 3 isolates was due to the presence of ESBLs, PER-2 in 2 cases, and CTX-M-2 in the other. Only CTX-M-2 production was detected with all tested cephalosporins using diffusion synergy tests, while cefepime improved ESBLs detection in 7/8 PER-2 producers, 4/8 in the inhibitor approximation test and 7/8 with double disk test using cefepime containing disk with and without clavulanic acid. Dilution method, including cephalosporins with and without the inhibitor detected 1/9 ESBLs producers.

Key words: *Enterobacter* spp., expanded-spectrum β -lactamasas, cefepime

INTRODUCCIÓN

El género *Enterobacter* incluye 14 especies o biogrupos clasificados de acuerdo a características bioquímicas y similitudes genómicas (1). Mientras que *E. cloacae* y *E. aerogenes* son aislados habitualmente como patógenos intrahospitalarios, otras especies como *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter tayloreae* (actualmente *Enterobacter cancerogenus*), *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter absuriae* son patógenos humanos poco frecuentes (19). La resis-

tencia a los antibióticos β -lactámicos en este género, y en muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, usualmente es mediada por la producción de enzimas con capacidad de hidrolizar dichos antibióticos y probablemente por alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa; y en ciertos casos, la combinación de estos mecanismos (9).

Enterobacter spp., igual que otras enterobacterias como *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* y *Providencia rettgeri* producen β -lactamasas cromosómicas inducibles denomi-

nadas Amp-C, no inhibidas por ácido clavulánico y otros inhibidores de β -lactamasas (9). Los microorganismos productores de estas enzimas son resistentes a las aminopenicilinas con y sin los inhibidores de β -lactamasas y a las cefalosporinas de primera generación. La resistencia a cefoxitina varía entre las distintas especies y a las cefalosporinas de tercera generación depende del nivel de expresión de la enzima cromosómica. En algunos casos la hiperproducción de estas enzimas puede otorgar resistencia a dichas cefalosporinas (6).

Por otro lado, es notable la diseminación a nivel mundial de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias productoras de enzimas cromosómicas inducibles, mecanismo que ya fue descrito en nuestro medio a finales de los años 90 (14, 16). Estas β -lactamasas confieren resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación y monobactámicos. Escapan a su acción las cefamicinas y los carbapenemes, y son fácilmente inhibidas por ácido clavulánico y otros inhibidores relacionados (5).

Distintos estudios realizados en nuestro país, han demostrado que las BLEEs prevalentes en la mayoría de las enterobacterias son CTX-M-2 y PER-2. Un bajo porcentaje corresponde a las β -lactamasas derivadas de SHV, que junto con las derivadas de TEM, son las más comúnmente halladas en enterobacterias en Europa y EEUU (3-5, 7, 15).

El objetivo de este trabajo fue investigar los mecanismos enzimáticos responsables de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en aislamientos clínicos de *Enterobacter* spp., así como caracterizar las β -lactamasas presentes y comparar diferentes métodos fenotípicos de detección de la presencia de BLEEs en este género.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se estudiaron 27 aislamientos únicos, sucesivos e interrumpidos de *Enterobacter* spp. recuperados de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas "José de San Martín", en el período de Junio a Diciembre del año 1999. La identificación de género y especie se realizó según la metodología convencional. Los microorganismos fueron conservados a -20 °C, en agar cerebro-corazón con glicerol al 20%.

Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó por el método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones del NCCLS (actualmente CLSI) (11). Se incluyeron los siguientes antibióticos: amoxicilina (AMX), amoxicilina/ác. clavulánico, (2:1) (AMC), piperacilina (PIP), piperacilina/tazobactam (PTZ) (tazobactam en concentración constante de 4 μ g/ml), cefalotina (CTN), cefoxitina (FOX), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoperazona (CPZ), cefepima (FEP), aztreonam (AZT), imipenem (IMI), meropenem (MER), ciprofloxacina (CIP) y gentamicina (GEN). Para la detección de microorganismos productores de BLEE se incluyeron CTX, CAZ y FEP combinados con concentraciones constantes de ácido clavulánico (2 μ g/ml). Se confirmó fenotípicamente su presen-

cia cuando la CIM de alguna de las cefalosporinas utilizadas con el inhibidor, presentó un descenso de por lo menos tres diluciones, con respecto a la cefalosporina sola.

Detección fenotípica de la presencia de β -lactamasas inducibles

Se realizó un ensayo de doble disco, empleando discos conteniendo FOX (30 μ g) (Laboratorio Britania), ácido clavulánico (10 μ g) y ácido 6-amino-penicilánico (6APA) (60 μ g) colocados a 2 cm de distancia borde a borde de discos conteniendo CTX (100 μ g), sobre placas de agar Mueller-Hinton inoculadas con 10^8 microorganismos/ml. Los discos conteniendo ácido clavulánico y 6APA fueron preparados en el laboratorio. La inducción fue interpretada como un achatamiento en el halo de inhibición del disco de CTX en la zona adyacente a los discos conteniendo los distintos inductores. Los discos conteniendo 100 μ g de CTX fueron preparados en el laboratorio debido a que la mayoría de las cepas no presentaban halo de inhibición para este antibiótico empleando los discos comerciales de CTX (30 μ g).

Detección de la presencia de BLEEs por difusión en agar

Se realizó el ensayo de detección de la presencia de BLEE en 15 aislamientos que resultaron resistentes a alguna de las cefalosporinas ensayadas. Se emplearon discos conteniendo CTX (30 μ g) y CAZ (30 μ g) solos, y con el agregado de 10 μ g de ácido clavulánico, CTXC y CAZC, de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS para la detección de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella* spp. (12). Se incluyó en el ensayo los discos de FEP (30 μ g) y FEP-ácido clavulánico (FEPC) (30 μ g/10 μ g), para evaluar su utilidad en la detección de BLEE en microorganismos productores de enzimas AmpC inducibles.

Se realizó también otro ensayo de sinergia, colocando discos de CTX (30 μ g) y FEP (30 μ g) a 20 mm de un disco de AMC (20/10 μ g) (8).

La presencia de BLEEs fue interpretada como un aumento en el halo de inhibición de la cefalosporina asociada al inhibidor \geq 5 mm con respecto a la cefalosporina sola, y/o observación de sinergia en el ensayo por aproximación de disco.

Determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las β -lactamasas

Los extractos enzimáticos se obtuvieron a partir de cultivos de los microorganismos en 50 ml de caldo cerebro-corazón con 100 μ g/ml de ampicilina, mediante ruptura ultrasónica en baño de hielo para evitar la desnaturalización proteica, utilizando un sonicador Vibra Cell (Sonic & Materials Inc, USA). El pI de las enzimas fue determinado por isoelectroenfoque analítico empleando geles de poliacrilamida de amplio rango (pH: 3-10) (10). Se empleó un equipo LKB 2117 Multiphor II (LKB Produkter AB, Suecia). Como patrones se incluyeron enzimas de pI conocido. Las β -lactamasas fueron reveladas por el método iodométrico en agar utilizando ampicilina (500 μ g/ml) (18). La inhibición de las enzimas se evaluó sumergiendo el gel en una solución 1mM de clavulanato de potasio y revelando posteriormente por el método iodométrico, empleando ampicilina 500 μ g/ml como sustrato (14).

Detección molecular de los genes codificantes de las β -lactamasas plasmídicas

De acuerdo a los resultados observados en los ensayos anteriores, se amplificaron los genes codificantes de las β -lactamasas empleando distintos pares de cebadores (5'-3') (GIBCO BRL, USA) *bla*TEM-1a: ATAAAATTCCTTGAAGACGAAA, *bla*TEM-1b: GACAGTTACCAAYGCTTAATCA, *bla*CTX-M-2 I:TTAATGATGACTCAGAGCATTC, *bla*CTX-M-2 II: GATACCTCGCTC-

Tabla 1. Valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM, en µg/ml) de distintos antimicrobianos en los 15 aislamientos resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (grupo II)

	AMX	AMC	PIP	PTZ	CTN	FOX	CTX	CTXC	CAZ	CAZC	CPZ	FEP	FEPC	AZT	IMI	MER	CIP	GEN
Eae15	512	256	512	256	> 512	256	256	256	256	128	256	16	4	256	0,25	0,063	32	512
Ecl 3	512	128	256	256	> 512	512	128	256	128	128	128	8	4	32	0,125	0,063	16	0,125
Ecl 6	512	128	256	128	> 512	64	256	512	128	128	64	4	4	16	0,125	0,016	0,002	0,125
Ecl 7	512	128	256	256	> 512	256	128	128	64	64	256	2	2	16	0,5	0,125	16	> 512
Ecl 9	512	256	256	256	> 512	128	128	128	128	256	128	4	4	32	0,125	0,032	16	0,125
Ecl 11	512	256	256	256	> 512	256	256	512	512	256	256	16	1	256	0,25	0,063	0,004	128
Ecl 16	512	256	512	256	> 512	256	128	256	256	128	256	16	4	256	0,125	0,063	32	256
Ecl 20	512	256	256	128	> 512	> 512	128	128	64	128	128	2	2	32	0,25	0,125	32	> 512
Ecl 21	512	128	64	32	> 512	> 512	32	32	32	32	64	2	1	32	0,125	0,063	64	512
Ecl 25	512	256	256	128	> 512	> 512	64	128	64	128	128	2	2	32	0,25	0,25	64	> 512
Ecl 28	512	256	256	128	> 512	> 512	128	128	64	128	256	2	2	64	0,25	0,25	64	> 512
Ecl 30	512	128	64	64	> 512	> 512	64	64	64	64	64	0,25	0,25	64	0,125	0,016	0,002	0,5
Ecl 35	512	256	256	256	> 512	> 512	512	512	> 512	512	> 512	32	16	512	0,25	0,016	32	> 512
Ecl 36	> 512	128	512	256	> 512	256	512	256	64	64	> 512	256	256	128	0,5	0,125	4	256
Ecl 37	512	256	32	16	> 512	> 512	16	8	8	8	16	0,5	0,5	4	0,25	2	2	0,5

Ecl: *Enterobacter cloacae*, Eae: *Enterobacter aerogenes*, AMX: amoxicilina, AMC: amoxicilina/ác. clavulánico, PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina/tazobactam, CTN: cefalotina, FOX: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CTXC: cefotaxima/ácido clavulánico, CAZ: ceftazidima, CAZC: ceftazidima/ácido clavulánico, CPZ: cefoperazona, FEP: cefepima, FEPC: cefepima/ácido clavulánico, AZT: aztreonam, IMI: imipenem, MER: meropenem, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina. En negritas se indican los valores intermedios y resistentes, para los antibióticos solos sin presencia de inhibidor.

CATTTATTG, *bla*PER2-a: TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG, *bla*PER2-b: AGCTC-AAACTGATAAGCCGCTTG. Como molde se utilizó ADN plasmídico obtenido por lisis alcalina de las cepas de *Enterobacter* spp. resistentes a cefalosporinas de tercera generación. La reacción de amplificación consistió en desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, "annealing" a 55 °C por 15 minutos (a los 6 minutos se agregó la *Taq* polimerasa) y un período de extensión de 6 minutos a 72 °C; seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C; y un período de extensión final de 20 minutos a 72 °C. Se empleó un termociclador Matercyclor 5330 (Eppendorf, Alemania). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados automáticamente en ambas cadenas empleando un secuenciador ABI PRISM 3700 DNA.

RESULTADOS

En el período analizado se recuperaron 27 aislamientos de *Enterobacter* spp., 25 correspondieron a *E. cloacae* y 2 a *E. aerogenes*. Todos ellos presentaron las resistencias naturales a AMX, AMC, CTN y FOX, y sensibilidad a los carbapenemes. Doce de los 27 aislamientos fueron sensibles a CTX (grupo I), mientras que 15 presentaron sensibilidad intermedia o fueron resistentes (grupo II). Los aislamientos del grupo I fueron sensibles a gentamicina y ciprofloxacina, excepto uno de ellos resistente a ciprofloxacina (datos no mostrados). Todos los microorganismos del grupo II, excepto uno, fueron también resistentes a CAZ, CPZ y AZT. Solo 5/15 presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a FEP. Las resistencias asociadas en este grupo fueron: ciprofloxacina en 12/15 y gentamicina en 10/15. En la tabla 1 se observan los valores de CIM de los antibióticos ensayados para los aislamientos del grupo II.

Cuando se analizaron los valores de CIM de CTX y CAZ en presencia de ácido clavulánico no se observó disminución de tres diluciones respecto de los valores obtenidos de la droga sola, no detectándose la presencia de BLEE por este método. La combinación FEP/ácido clavulánico permitió la detección de la presencia de BLEE en un solo caso (cepa Ecl 11, Tabla 1).

Mediante el ensayo de inducción realizado en los 15 aislamientos pertenecientes al grupo II, ésta fue detectada en 7 de ellos, mientras que en el resto la metodología fue insuficiente para poder diferenciar entre un mayor nivel de expresión de las enzimas cromosómicas y la sobreexpresión total de las mismas.

Utilizando el método de difusión propuesto por el NCCLS para *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis* para la detección de BLEE, se observó aumento del halo de inhibición en 1/15 aislamientos del grupo II empleando CTX o CAZ con el agregado de ácido clavulánico. En cambio, con FEPC se incrementó la detección en 8/15 aislamientos. Del mismo modo, cuando se empleó la prueba de doble disco se observó sinergia sólo en 1 de 15 aislamientos del grupo II enfrentando CTX a AMC y en 5 de 15 enfrentando FEP a AMC. En la tabla 2 se observan los resultados de los distintos ensa-

yos empleados para la detección de BLEE en los microorganismos del grupo II.

Todos los extractos enzimáticos excepto uno, presentaron bandas detectables en el isoelectroenfoque. Probablemente en dicho caso la actividad enzimática fuera menor al límite de detección del método iodométrico empleado en el revelado. El resto presentó enzimas de pl 5,4 y/o 8,2 activas frente a ampicilina 500 µg/ml. Todas las enzimas de pl 5,4 y sólo una de las de pl 8,2 fueron inhibidas por clavulanato. En el resto de los extractos la enzima de pl 8,2 no fue inhibida lo que sugiere la presencia de una enzima de tipo AmpC.

En la Tabla 2 se observan, también, los resultados de la caracterización fenotípica y genotípica de las β-lactamasas presentes en los microorganismos del grupo II.

DISCUSIÓN

La resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en los aislamientos de *Enterobacter* incluidos en este trabajo (15/27) fue similar a los niveles de resistencia informados por el Sistema Informático de Resistencia (SIR) donde se observó aproximadamente un 60% de resistencia a CTX y CAZ en el año 2000 (2). Igual a lo observado en otras enterobacterias, la resistencia asociada a antibióticos no β-lactámicos es más frecuente en aquellas cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación que en las sensibles (17). La frecuencia de aislamiento de las distintas especies del género *Enterobacter* se vio representada en la muestra analizada (Informe SIR 2001, www.aam.org.ar).

Los 15 aislamientos resistentes a cefalosporinas de tercera generación correspondieron al grupo II. En 6 aislamientos de *E. cloacae* pertenecientes a dicho grupo se observó un alto nivel de expresión de la β-lactamasa cromosómica de pl 8,2 no inhibible por ácido clavulánico, capaz de conferir resistencia por sí misma a las cefalosporinas de tercera generación. En este estudio no se evaluó la participación de posibles alteraciones en la permeabilidad que contribuyan a la resistencia a dichos antibióticos. Algunos de ellos fueron a su vez, productores de la enzima TEM-1. El ensayo de inducción sólo fue positivo en dos de estos aislamientos no detectándose en el resto si correspondieron a altos niveles de expresión de la enzima o a mutantes totalmente sobreexpresadas. En este subgrupo la CIM de FEP osciló entre 0,25-16 µg/ml. En otros 6 aislamientos (5 *E. cloacae* y 1 *E. aerogenes*) en los que se observó alto nivel de producción de AmpC, también se detectó la presencia de PER-2. Esto coincide con comunicaciones nacionales previas en cuanto al tipo de BLEE predominante en *Enterobacter* spp. (13). En estos aislamientos, la CIM de FEP mostró un rango de 2-16 µg/ml, coincidiendo con los valores esperados para cepas productoras de esta enzima. En los tres aislamientos restantes del grupo II el mecanismo de

2. Bantar C, Famiglietti A, Goldberg M, Committee TA, Group. TNSPSP (2000) Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. *Int. J. Infect. Dis.* 4: 85-90.
3. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, *et al.* (1996) Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2} which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 616-620.
4. Bauernfeind A, Stemplinger Y, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM (1996) Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 509-513.
5. Bradford PA (2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 933-951.
6. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, *et al.* (2005) Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev. Argent. Microbiol.* 37: 57-66.
7. Galas M, Rapoport M, Pasterán F, Melano R, Petroni A, Ceriana P, *et al.* (1999) High distribution of CTX-M-2 beta-lactamases among *Klebsiella* spp. isolates in argentinean extended-spectrum beta-lactamase (esbla) surveillance program. 39 th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICCAC) Abstract 1474, pag. 165, San Francisco, California, USA.
8. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988) Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10: 867-878.
9. Livermore DM (1995) β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 557-584.
10. Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW (1975) The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J. General Microbiol.* 88: 169-178.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Sixth edition, Approved standard, Wayne, Pa., Estados Unidos de América .
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Eight edition, Approved standard, Wayne, Pa., Estados Unidos de América.
13. Pasteran F, Melano R, Galas M (1999) High proportion of extended spectrum beta-lactamases (esbla) among AmpC producers enterobacteria in Argentina. 39 th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICCAC) Abstract 1475, p. 166, San Francisco, California, USA.
14. Power P, Radice M, Barberis C, de Mier C, Mollerach M, Maltagliatti M, *et al.* (1999) Cefotaxime-hydrolysing β -lactamases in *Morganella morganii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 743-747.
15. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodríguez MM, Costa N, Korbenfeld D, *et al.* (2003) Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2864-2869.
16. Quinteros M, Radice M, Power P, Matteo M, Mollerach M, Conza JD, *et al.* (1999) Detection of extended-spectrum β -lactamases in microorganisms harboring an AmpC β -lactamase. International Congress on β -Lactamases, Abstract A27, L'Aquila, Italia.
17. Rodríguez C, Juárez J, de Mier C, Pugliese L, Blanco G, Vay C, *et al.* (2003) Resistencia a antibióticos en gram negativos aislados en unidades de cuidados intensivos. Análisis comparativo de dos períodos (1998-2001) *Medicina.* 63: 21-27.
18. Rossi A, Lopardo H, Woloj M, Picandet AM, Mariño M, Galas M, *et al.* (1995) Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. *J. Antimicrob. Chemother.* 36: 697-702.
19. Sanders E, Sanders C (1997) *Enterobacter*: a pathogen poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 220-241
20. Soussy C, Carret G, Cavallo J-D, Chardon H, Chidiac C (2000) Antibiogram committee of the french microbiology society. Report 2000-2001. *Pathol. Biol.* 48: 832-871.
21. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A (2000) Detection of extended-spectrum β -lac-tamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 542-546.