

Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina)

Luis Alberto Trupia^a, Analia Mollerach^a, José Alejandro Di Conza^b, Marcela Radice^b, Viviana Mugna^a, Emilce Méndez^a y Gabriel Osvaldo Gutkind^b

^aHospital J.M. Cullen. Santa Fe. Argentina. ^bCátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires. Argentina.

INTRODUCCIÓN. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son la principal causa de resistencia a las oximiinocefalosporinas y monobactamas en enterobacterias. La mayoría de las BLEE derivan de TEM o SHV, sin embargo se ha incrementado la incidencia de otras familias como CTX-M, OXA y PER. En Argentina, CTX-M-2 es la BLEE más frecuente en enterobacterias. Esta situación particular, diferente a la del hemisferio norte, ha motivado el estudio de nuevas estrategias diagnósticas que permitan detectar la mayor parte de las BLEE de nuestra región.

MÉTODOS. La detección microbiológica de las BLEE se realizó comparando los métodos de sinergia de doble disco, discos de cefotaxima y ceftazidima con y sin el agregado de ácido clavulánico (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) y discos de cefotaxima y ceftazidima en placas de agar Müller-Hinton suplementado con clavulanato de litio (MH-cla). Las betalactamasas fueron caracterizadas mediante isoelectroenfoque, perfil de hidrólisis y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa. **RESULTADOS.** Sobre 575 enterobacterias, el 14% fueron resistentes a oximiinocefalosporinas. En 31 aislados resistentes se detectaron dos tipos diferentes de BLEE: grupo CTX-M-2 (28) y PER-2 (3). El método de sinergia presentó menor sensibilidad en la detección de BLEE que los otros dos métodos. Con ellos se detectó la presencia de BLEE en todos los aislados empleando discos de cefotaxima, sin embargo no ocurrió lo mismo al emplear discos de ceftazidima.

CONCLUSIÓN. El método microbiológico que emplea MH-cla con disco de cefotaxima tuvo una sensibilidad y especificidad equivalentes a la técnica de confirmación propuesta por el NCCLS para la detección de las BLEE empleando el mismo antibiótico.

Palabras clave: Oximiinocefalosporinas. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Detección de BLEE.

Comparison of three microbiological methods for detection of expanded-spectrum betalactamases in *Enterobacteriaceae* isolated in Santa Fe (Argentina)

INTRODUCTION. Expanded-spectrum betalactamases (ESBLs) are the main source of resistance to oxymino cephalosporins and monobactams in *Enterobacteriaceae*. Most of them derive from TEM or SHV, however the incidence of other families like CTX-M, OXA and PER has increased. In Argentina, the most frequent ESBL in *Enterobacteriaceae* is CTX-M-2. This specific circumstance, which differs from the situation in the Northern Hemisphere, motivated us to study new diagnostic strategies for the detection of ESBLs in our region. **METHOD.** Microbiological ESBL detection was performed by double-disk synergy tests, cefotaxime and ceftazidime disks with and without clavulanic acid (NCCLS), and cefotaxime and ceftazidime disks in Müller-Hinton agar supplemented with lithium clavulanate (MH-cla). Betalactamases were characterized by isoelectric focusing, hydrolysis profile and PCR amplification.

RESULTS. Among 575 clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, 14% were oxymino cephalosporin-resistant. Two different ESBLs were detected in 31 resistant strains: CTX-M-2 (28) and PER-2 groups (3). The double-disk synergy test was the least sensitive method for ESBL detection. ESBLs were detected by the other two methods in all isolates with the use of cefotaxime disks, but not with ceftazidime disks. **CONCLUSION.** The microbiological method employing MH-cla with cefotaxime disks had a sensitivity and specificity comparable to the referral test using the same antibiotic proposed by the NCCLS for the detection of ESBLs.

Key words: Oxymino cephalosporins. Expanded-spectrum betalactamases (ESBL). ESBL detection methods.

Introducción

La resistencia mediada por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) continúa siendo la principal causa de resistencia a las oximiinocefalosporinas en enterobacterias. En gran medida las BLEE derivan de betalactamasas de amplio espectro, tipo TEM-1 y SHV-1¹, sin embargo surgieron nuevas familias como PER (-1 y -2)², las OXA

Correspondencia: Dr. G.O. Gutkind.
Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA.
Júnin, 956, Piso 8. 1113 Buenos Aires. Argentina.
Correo electrónico: ggutkind@ffyb.uba.ar

Manuscrito recibido el 21-9-2004; aceptado el 17-2-2005.

derivadas³ y las CTX-M derivadas, incluyendo en éstas a Toho (-1 y -2)⁴, que no están estrechamente relacionadas a TEM ni a SHV.

En Alemania, a comienzos de 1989, Bauerfeind describió aislados clínicos de *Escherichia coli* resistentes a cefotaxima productores de una BLEE no derivada de TEM ni SHV, a la que llamó CTX-M-1 en referencia a su potente actividad de hidrólisis sobre cefotaxima. Al mismo tiempo, en Argentina fueron aisladas distintas serovariedades de *Salmonella* con características de resistencia similares a la anterior. Las betalactamasas responsables de la resistencia a cefotaxima (CTX) observada mostraban un valor de punto isoelectrico (pI) alcalino, con una actividad de hidrólisis mayor sobre CTX respecto de ceftazidima (CAZ) y con sensibilidad a los inhibidores como sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico⁵. Esta enzima fue denominada CTX-M-2⁶. Actualmente, Argentina muestra una alta prevalencia de CTX-M-2 dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y, en menor proporción, otras BLEE como PER-2 y enzimas SHV derivadas⁷.

Hasta el momento, la familia CTX-M está integrada por más de 30 enzimas que pueden subclasificarse de acuerdo con la similitud en las secuencias de aminoácidos. La enzima CTX-M-2 pertenece al grupo que lleva el mismo nombre⁴. Las enzimas naturales de *Kluyvera ascorbata* presentan un alto grado de identidad con las enzimas del grupo CTX-M-2 (> 98%), por lo que han sido propuestas como posibles antecesoros de esta betalactamasa plasmídica⁸.

Debido a que existen notables diferencias entre las BLEE prevalentes en nuestra región y las del hemisferio norte de América y otras regiones del mundo, es necesario evaluar la capacidad de los distintos métodos para detectar las BLEE presentes en nuestra región.

En este trabajo se han identificado las BLEE presentes en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Proteus mirabilis*.

El objetivo principal fue investigar la presencia de las distintas BLEE en estas especies de enterobacterias y comparar tres métodos microbiológicos para su detección. Se estandarizó el método de placas con agar Müller-Hinton suplementado con clavulanato de litio y se comparó con métodos ya descritos, como la técnica de sinergia de doble disco y los discos de CTX y CAZ suplementados con el inhibidor propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{9,10}.

Métodos

Se estudiaron todos los aislados de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. mirabilis* de pacientes internados en diferentes sectores del Hospital J.M. Cullen de la ciudad de Santa Fe, Argentina, desde el mes de enero hasta junio de 2000. La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales. Para el estudio se incorporaron los aislados clínicos resistentes a CTX y/o CAZ, tomando como punto de corte el propuesto por el NCCLS¹⁰.

Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Se evaluó la sensibilidad a antibióticos por el método de difusión con discos y el método de dilución en agar, de acuerdo con lo establecido por el NCCLS^{10,11}. Los antibióticos utilizados en el método de difusión fueron: ampicilina (AMP), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), piperacilina (PIP), cefalotina (CEF), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP), gentamicina (GEN), ami-

kacina (AKN), trimetoprima + sulfametoxazol (TMS) y ciprofloxacino (CIP) (Laboratorio Britania, Argentina). Los antibióticos ensayados por el método de dilución fueron: ampicilina (Bagó) (AMP), ampicilina (Bagó)/clavulanato de litio (Roemmers) (AMC), piperacilina (John Wyeth) (PIP), cefalotina (Glaxo) (CEF), ceftazidima (CXT), cefotaxima (Hoechst Marion Roussel) (CTX), cefotaxima (Hoechst Marion Roussel)/clavulanato de litio (Roemmers) (CTX-cla), ceftazidima (Glaxo) (CAZ), ceftazidima (Glaxo)/clavulanato de litio (Roemmers) (CAZ-cla) e imipenem (Merck-Sharp and Dohme) (IMP).

Métodos microbiológicos para la detección de BLEE

1. *Método de sinergia de doble disco*. Se ensayaron discos de CTX (30 µg), CAZ (30 µg) y AMC (20/10 µg) dispuestos en una placa de agar Müller-Hinton de acuerdo con lo descrito en la bibliografía⁹. Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C en atmósfera aeróbica.

Los aislados que presentaron un ensanchamiento en la zona de inhibición comprendida entre los discos de CTX o CAZ y AMC se consideraron positivos para la presencia de BLEE.

2. *Ensayo confirmatorio de la presencia de BLEE (normas NCCLS)*. Se ensayaron discos estándar de CTX (30 µg) y CAZ (30 µg), y los mismos suplementados con 10 µg de clavulanato de litio en una placa de agar Müller-Hinton, siguiendo la metodología propuesta por el NCCLS¹⁰. Estos discos fueron preparados en el laboratorio agregando 10 µl de una solución de clavulanato de litio (1 mg/ml) a discos comerciales de las respectivas oximinocetolinas.

Se compararon los diámetros de halos de los discos ensayados con y sin el inhibidor de betalactamasas.

Un incremento mayor o igual a 5 mm en la zona de inhibición del disco que contiene el inhibidor de betalactamasas fue considerado positivo para la presencia de BLEE.

3. *Placas de agar Müller-Hinton suplementado con clavulanato de litio*. Se prepararon placas de Petri de 90 mm de diámetro con 25 ml de agar Müller-Hinton, suplementado con clavulanato de litio (Roemmers) (MH-cla) en una concentración final de 4 µg/ml, y placas con 25 ml de agar Müller-Hinton sin inhibidor de betalactamasas. En ambas placas se sembró un inóculo bacteriano equivalente en densidad a la escala 0,5 Mc Farland (10⁸ unidades formadoras de colonias [UFC]/ml) y se ensayaron discos de CTX (30 µg) y CAZ (30 µg) incubándose 18-24 h a 37 °C en aerobiosis. Luego se compararon los diámetros de halo de inhibición obtenidos en ambas placas por cada aislado estudiado. Un incremento mayor o igual a 5 mm en la zona de inhibición del disco ensayado en la placa suplementada con inhibidor fue considerado positivo para la presencia de BLEE.

Determinación del punto isoelectrico

Los extractos enzimáticos crudos se obtuvieron por cultivo en 50 ml de caldo triptea-soja suplementado con ampicilina 50 µg/ml e incubados 18 h a 37 °C, y luego se centrifugaron a 8.000 rpm durante 20 min a 4 °C con rotor SS-34 (Sorvall). La rotura de la envoltura celular se realizó mediante sonicado respetando las siguientes condiciones: 8 ciclos de 30 s cada uno con un *output* 4-5 en baño de hielo empleando un sonicador Vibra Cell (Sonic & Materials Inc., Estados Unidos). Posteriormente se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min a 4 °C con rotor SS-34 (Sorvall). La determinación del pI se realizó por el método de Mathew et al¹² en geles de poliacrilamida al 30% de amplio rango de pH³⁻¹⁰, utilizando un equipo LKB Multiphor II (Farmacia Sweden).

Para evidenciar la actividad enzimática de las betalactamasas, los geles se revelaron por el método yodométrico de Labia y Barthélémy¹³ utilizando de manera alternativa AMP (500 µg/ml) y CTX o CAZ (1.000 µg/ml) como sustrato⁵. Los puntos isoelectricos de las betalactamasas se estimaron mediante enzimas de pI conocido (TEM-1, SHV-5, CTX-M-2 y PER-2) y marcadores de pI comerciales (Farmacia).

Determinación del perfil de hidrólisis enzimático

Se evaluó la actividad enzimática de los extractos crudos por el método yodométrico, en placas de 150 mm de diámetro con 50 ml de agar almidón al 1,5% y 800 µl de una solución I₂/IK con los siguien-

tes antibióticos betalactámicos como sustrato: AMP (500 µg/ml), AMC (500/4 µg/ml), CEF (1.000 µg/ml), CTX (1.000 µg/ml), CAZ (1.000 µg/ml) e IMP (500 µg/ml). Se sembraron por triplicado 20 µl de cada extracto e incubaron las placas a 37 °C durante no menos de 30 min.

Detección de genes bla

Se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN plasmídico obtenido por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly modificado¹⁴. Los genes bla se amplificaron utilizando como cebadores los que se detallan en la tabla 1 con el siguiente protocolo: 5 min a 95 °C, 30 ciclos (1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de annealing a 52 °C, 1,5 min de extensión a 72 °C) y 10 min finales de extensión a 72 °C.

Resultados

Aislados clínicos y resistencia

Sobre un total de 575 aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* recuperadas en el período en estudio, el 14% (79 aislados) resultó resistente a oximiinocefalosporinas, tanto en los ensayos de susceptibilidad por difusión como por dilución. La distribución de especies y el porcentaje de resistencia a estas sustancias se muestran en la tabla 2.

Todos los aislados resistentes a oximiinocefalosporinas lo fueron para CTX, pero no todos lo fueron para CAZ. No se detectaron aislados resistentes a CAZ y sensibles a CTX, ni resistentes a carbapenemes. En ningún caso se observó resistencia a CXT.

Métodos microbiológicos para la detección de BLEE

Se analizaron 31 aislados resistentes a oximiinocefalosporinas: *K. pneumoniae* (18), *P. mirabilis* (12) y *E. coli* (1) seleccionados al azar, con diferencia en el perfil de resistencia a antibióticos no betalactámicos.

El método de sinergia de doble disco utilizando la combinación CTX/AMC detectó la producción de BLEE en el aislado de *E. coli* y en todos los aislados de *K. pneumoniae*, pero falló en 2 de los 12 aislados de *P. mirabilis*. Utilizando la combinación CAZ/AMC se detectó la producción de BLEE en 12 de los 18 aislados de *K. pneumoniae*, y también falló en el aislado de *E. coli* y en todos los aislados de *P. mirabilis*.

Aplicando el método propuesto por el NCCLS y utilizando discos de CTX/CTX-cla se detectó la presencia de BLEE en todos los aislados estudiados, mientras que CAZ/CAZ-cla la detectó en 16 de los 18 aislados de *K. pneumo-*

niae, 2 de los 12 para *P. mirabilis* y falló en la detección de *E. coli*.

La placa de MH-cla y discos de CTX reveló la presencia de BLEE en todos los aislados; sin embargo, utilizando el disco de CAZ sólo se detectó la presencia de BLEE en 16 de los 18 aislados de *K. pneumoniae* y en 1 de los 12 aislados de *P. mirabilis* (tabla 3).

Perfil de hidrólisis enzimático

Los extractos crudos de todas las especies analizadas revelaron una potente actividad de hidrólisis frente a AMP, CEF y CTX. La mayor parte de los aislados de *P. mirabilis* no presentaron actividad hidrolítica frente a CAZ. En ningún aislado se comprobó actividad de hidrólisis frente a AMC o IMP (datos no mostrados).

Distribución de BLEE en los aislados clínicos estudiados

Mediante isoelectroenfoque de las BLEE presentes en los extractos crudos y amplificación por PCR de los genes codificantes, pudieron caracterizarse dos tipos de BLEE: el grupo CTX-M-2 (28 aislados: 1 para *E. coli*, 16 para *K. pneumoniae* y 11 para *P. mirabilis*), con un pI 8,2 y PER-2

TABLA 1. Cebadores para el análisis por PCR de distintas betalactamasas

Nº	Cebadores ⁷	Secuencia (5' → 3')	Tamaño aproximado del amplión
1	bla _{PER-2} F	TGTGTTTTTCACCGCTTCTGCTCTG	0,9 kb
2	bla _{PER-2} R	CAGCTCAAACGATAAGCCGCTTG	0,9 kb
3	bla _{CTX-M} F	TTAATGATGACTCAGAGCATTG	0,9 kb
4	bla _{CTX-M} R	GATAACCTCGCTCCATTATTG	0,9 kb
5	bla _{SHV} F	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	0,6 kb
6	bla _{SHV} R	AGCAGGGCGACAATCCCCGCG	0,6 kb

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

TABLA 2. Resistencia de enterobacterias a oximiinocefalosporinas

Especies aisladas	Aislados estudiados	Aislados resistentes (%)
<i>E. coli</i>	418	18 (4)
<i>K. pneumoniae</i>	84	33 (39)
<i>P. mirabilis</i>	73	28 (38)
Total	575	79 (14)

TABLA 3. Comparación de diferentes métodos de detección de BLEE

Aislados (n)*	Nº de positivos/Nº total (% positivos)					
	Sinergia de doble disco		Discos CTX y CAZ frente a CTX y CAZ-cla		Placa MH-cla	
	CTX/AMC	CAZ/AMC	CTX/CTX-cla	CAZ/CAZ-cla	CTX	CAZ
<i>E. coli</i> (1)	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1
<i>K. pneumoniae</i> (18)	18/18	12/18	18/18	16/18	18/18	16/18
<i>P. mirabilis</i> (12)	10/12	0/12	12/12	2/12	12/12	1/12
Total (31)	29/31 (93)	12/31 (39)	31/31 (100)	18/31 (58)	31/31 (100)	17/31 (55)

*n: número de aislados resistentes estudiados.

BLEE: betalactamasas de espectro extendido; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico.

TABLA 4. Identificación molecular de BLEE

Aislados (n)*	pI				Genes bla	
	n*	AMP	CTX	CAZ	Grupo CTX-M-2	PER-2
<i>E. coli</i> (1)	1	5,4-8,2	8,2	-	(+)	(-)
<i>K. pneumoniae</i> (18)	16	5,4-8,2	8,2	-	(+)	(-)
	2	5,4	5,4	5,4	(-)	(+)
<i>P. mirabilis</i> (12)	11	5,4-8,2	8,2	-	(+)	(-)
	1	5,4	5,4	5,4	(-)	(+)

*n: número de aislados.
BLEE: betalactamasas de espectro extendido; AMP: ampicilina;
CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima;

(3 aislados: 2 para *K. pneumoniae* y 1 para *P. mirabilis*), con un pI 5,4 (tabla 4). La presencia de enzimas de pI 5,4 con actividad de hidrólisis frente a AMP pero no frente a CTX y CAZ probablemente se deba a la presencia de la betalactamasa de amplio espectro TEM-1, ampliamente distribuida en enterobacterias. Las amplificaciones realizadas fueron específicas para PER-2 (primers 1 y 2) y para el grupo CTX-M-2 (primers 3 y 4). No hubo amplificación de genes tipo SHV (primers 5 y 6) y no se detectó la presencia de más de una BLEE en un mismo aislado.

Discusión

La correcta elección de una o más cefalosporinas de espectro extendido para los ensayos de disco es de capital importancia a la hora de detectar la presencia de BLEE en aislados clínicos.

La gran diseminación de mecanismos de resistencia en enterobacterias y el amplio predominio de CTX-M-2 en nuestro país obligó no sólo a modificar los puntos de corte de sensibilidad, sino también al desarrollo y la puesta a punto de métodos de detección con sustratos de hidrólisis que se ajustasen a esta particular situación epidemiológica molecular de las BLEE en nuestro medio.

El método de sinergia de doble disco demostró una buena sensibilidad cuando se combinó CTX y AMC, comparables a los obtenidos con los discos de CTX-cla propuestos por el NCCLS con valores de 93 y 100%, respectivamente. En este caso, la no detección mediante la técnica de sinergia de doble disco corresponde a dos aislados de *P. mirabilis*, siendo uno de ellos productor de la enzima PER-2, con actividad sobre CAZ en el perfil de hidrólisis de sustratos. Sin embargo, no ocurrió lo mismo cuando se utilizó la combinación CAZ y AMC o discos de CAZ-cla (NCCLS), donde pudo observarse un importante descenso en la sensibilidad (del 39 y el 58%, respectivamente).

Al investigar las BLEE presentes en los aislados de nuestra región siempre hubo correspondencia entre la amplificación para BLEE por PCR y la diferencia mayor o igual a los 5 mm en los diámetros de halo al utilizar las placas de MH/MH-cla con al menos uno de los antibióticos ensayados.

El disco de CTX en placas de MH-cla fue muy sensible respecto al disco de CAZ, y detectó la presencia de BLEE en todos los aislados de *P. mirabilis*, además fue equivalente a la combinación de discos de CTX/CTX-cla propuestos por el NCCLS. Para este mismo método, el disco de CAZ ensayado en placas de MH-cla tuvo una sensibilidad comparable a la combinación de discos CAZ/CAZ-cla y fue

más sensible que el test de sinergia de doble disco con CAZ y AMC.

En general, todos los métodos que utilizaron CTX como sustrato fueron más sensibles para la detección de las BLEE de nuestro medio, tal y como describieron Quinteros et al⁷.

Para la detección de las BLEE presentes en los aislados de *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* y *E. coli* de nuestra ciudad (predominantemente cefotaximasas), la placa de MH-cla y los discos de CTX mostraron una sensibilidad comparable a la de los discos de CTX-cla propuestos por el NCCLS, además de una elevada especificidad, ya que no se detectaron resultados falsos positivos al ensayarlos en aislados de este estudio sensibles a oximiinocefalosporinas y con resultados negativos para PCR dirigidas a los genes bla (considerados no productores de BLEE; datos no mostrados).

Finalmente, cabe destacar la presencia de la enzima PER-2 como única BLEE en *P. mirabilis*, dada la absoluta prevalencia de la enzima CTX-M-2 demostrada previamente en esta especie⁷.

Agradecimientos

El trabajo realizado en la UBA fue financiado por ANPCyT, SECyT y Beca Carrillo Oñativia al Dr. Gabriel Gutkind y por la Fundación Roemmers a la Dra. Marcela Radice.

Bibliografía

- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.
- Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of β -lactamase gen bla_{PER-2}, which encodes an extended spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:616-20.
- Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999;5: 865-79.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1-14.
- Rossi A, Lopardo H, Woloj M, Picandet MD, Mariño M, Galas M, et al. Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. *J Antimicrob Chemother.* 1995;36:697-702.
- Bauernfeind A, Stemmlinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. 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.* 1996;40:509-13.
- 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 Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2864-7.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamase of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3045-9.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10:867-78.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for disk antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7th ed. Approved standard, Document M2-A7. Wayne, Pennsylvania, EEUU, 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Approved standard, Document M7-A5. Wayne, Pennsylvania, EEUU, 2000.
- Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol.* 1975;88:557-84.
- Labia R, Barthélémy M. L'enzymogramme des beta lactamases: adaptation en gel de la methode iodometrique. *Ann Microbiol (Paris).* 1979;130B:295-304.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: Cold Spring Harbor; 1989.