

Detección de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* productoras de β -lactamasas de espectro extendido mediante el sistema DIRAMIC

Estrella Álvarez-Varela, Angela Zayas-Tamayo, Idania Castillo-Castillo, Leonora González-Mesa* y Rolando Contreras-Alarcón.

Dirección de Diagnóstico Microbiológico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. *Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Avenida 23 No. 21425 entre Calles 214 y 222, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de octubre de 2009.

Aceptado: 2 de febrero de 2010.

Palabras clave: β -lactamasas de espectro extendido, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, antibióticos, susceptibilidad, resistencia, sensibilidad.
Key words: extended-spectrum β -lactamases, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, antibiotics, susceptibility, resistance, sensitivity

RESUMEN. En los últimos años, se ha incrementado el interés por las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las cepas que expresan este fenotipo son capaces de hidrolizar un amplio grupo de antibióticos, incluidas las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, por lo que constituyen un reto terapéutico de difícil abordaje. Este mecanismo les confiere a las bacterias un grado de resistencia variable a los oximino-betalactámicos, se manifiesta en un aumento de la concentración mínima inhibitoria, que permanece en el intervalo de sensibilidad. Puede pasar inadvertido en el laboratorio, pero se manifiesta en el paciente, en el que no hay actividad de la droga y por lo tanto, se presenta una falla terapéutica. De ahí, la gran importancia de perfeccionar su detección a nivel del laboratorio de microbiología. En este trabajo, se comparó el sistema DIRAMIC con el método de sinergia de doble disco modificado (DDD) para la detección fenotípica de BLEE. Se estudiaron 175 aislados clínicos, 132 *Escherichia coli* y 43 *Klebsiella spp.*, provenientes de tres hospitales de Ciudad de La Habana, recolectados de junio de 2008 a junio de 2009. De un total de 42 (24 %) aislados que presentaron fenotipo de BLEE por el método de DDD, el sistema DIRAMIC fue capaz de detectar 39 (22,3 %). En tres aislados, el fenotipo de BLEE solo fue detectado por DDD, los cuales resultaron falsos negativos por DIRAMIC. El 72,6 % de los aislados (127) fueron negativos por ambos métodos. Los métodos empleados tuvieron un desempeño similar, para un 92,85 % de correspondencia. El DIRAMIC mostró una sensibilidad del 92,85 % y una especificidad del 95,48 % con respecto al método de DDD.

ABSTRACT. In the past few years there has been an increasing interest about extended-spectrum betalactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae*. The organisms of this phenotype develop the ability to hydrolyze many classes of antibiotics, including third generation cephalosporins and aztreonam. They confer variable level of resistance to oxyimino-betalactams, it is shown to increase in minimum inhibitory concentration (MIC) value, remaining sensitive *in vitro*. These enzymes could be undetected in the laboratory, but it does affect the patient, because there is no activity of the drug and therefore, can cause therapeutic failure. Hence, the accurate laboratory detection is very important. For this research the DIRAMIC system was compared with the modified double-disc synergy test (DDD) for the detection of ESBL. A total of 175 clinical isolates, 132 *Escherichia coli* and 43 *Klebsiella spp.*, from three hospitals of the Havana city, during the period June 2008 - June 2009, were studied. In 42 (24 %) positive isolates for ESBL detected by DDD, 39 (22.3 %) isolates were identified by the DIRAMIC system. In three isolates, the ESBL phenotype was only detected by DDD, DIRAMIC reported as false negative. The 72.6 % of the isolates (127) were negative for both methods. Both tests had the similar performance, shown in 92.85 % of correspondence. The DIRAMIC system exhibited 92.85 % sensitivity and 95.48 % specificity for ESBL detection compared to DDD.

INTRODUCCIÓN

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas codificadas por plásmidos, capaces de hidrolizar una amplia variedad de penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefalosporinas de espectro extendido y el aztreonam.¹ Estas enzimas están presentes en la mayor parte de las enterobacterias y se encuentran con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* y en *Escherichia coli*,^{2,3} aunque se han identificado también en otras especies de bacilos Gram negativos como *Proteus*, *Serratia* o *Salmonella spp.*

Mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos en los genes que codifican las β -lactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2, SHV-1) dieron lugar a las BLEE. Actualmente se conocen más de 200 variantes diferentes y otros tipos de beta-lactamasas: OXA, PER, AmpC, CTX-M.^{1,2} La actividad hidrolítica de las BLEE es inactivada por los inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, por cefamicinas y carbapenémicos.⁴

Las BLEE le confieren a la bacteria una resistencia de bajo nivel en cuanto a la concentración mínima

inhibitoria (CMI), que puede pasar inadvertida en el laboratorio, pero que se manifiesta en el paciente, en el que no hay actividad de la droga y por lo tanto, se presenta un fallo terapéutico.⁵ Su detección constituye un reto, ya que su presencia confiere resistencia a todos los β -lactámicos incluyendo aztreonam, aunque sean susceptibles *in vitro*, debido a las diferencias cuantitativas en la actividad de ciertas BLEE frente a determinados sustratos.

Las cepas bacterianas capaces de producir BLEE son multirresistentes, portan simultáneamente genes que confieren resistencia a otras familias de agentes antimicrobianos como los aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, cotrimoxazol y fluoroquinolonas.⁶ Representan un importante problema de salud que se ha incrementado y diseminado rápidamente en todo el mundo.⁷ La mortalidad asociada a infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE se considera entre el 6 y el 70 %.⁸

Los laboratorios clínicos de muchos países en el mundo tienen dificultades para su detección.⁷ Debido al gran volumen de muestras que se procesan en dichos laboratorios es necesaria la implementación de sistemas automatizados y otros métodos rápidos,^{9,10} que permitan un reconocimiento de la presencia de estos mecanismos de resistencia, e iniciar un plan racional para el control de las infecciones que pudieran producirse.¹¹

Los métodos confirmatorios fenotípicos de detección de BLEE se basan en la capacidad del ácido clavulánico para inhibir las β -lactamasas. También se han descrito otros métodos confirmatorios fenotípicos como el Etest ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden) en el que se emplean tiras de papel impregnadas con antibióticos. Una mitad contiene el antibiótico (ceftazidima, cefotaxima o cefepima) en concentración decreciente y la otra mitad el mismo antibiótico más el ácido clavulánico, también en concentración decreciente.¹² Varios sistemas automatizados como Vitek (BioMérieux, Hazelwood, Mo), MicroScan (Dade Behring) y BD Phoenix (Becton Dickinson Biosciences) disponen de paneles o tarjetas de pocillos específicamente diseñados para el reconocimiento de enterobacterias productoras de BLEE. Estos pocillos contienen diluciones estandarizadas de cefalosporina sola y cefalosporina más ácido clavulánico,¹³ pero son sistemas muy costosos para ser utilizados en la rutina.

Los métodos moleculares permiten la caracterización específica del tipo de BLEE. Estos brindan una valiosa información epidemiológica adicional que hace posible conocer cómo se realiza la diseminación de los diferentes microorganismos y diseñar estrategias efectivas para el control de las infecciones.³

El sistema para el Diagnóstico Rápido Microbiológico (DIRAMIC) detecta el crecimiento bacteriano utilizando principios fotométricos. Permite determinar la sensibilidad antimicrobiana en cuatro horas y diagnosticar a partir de la muestra directa la infección urinaria e identificar a *Escherichia coli* si fuera este el agente causal con una sensibilidad y especificidad superior al 85 %.^{14,15}

El propósito de este trabajo fue la evaluación del desempeño del sistema DIRAMIC en la detección de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE, en comparación con el método de detección fenotípica de referencia, el de sinergia de doble disco modificado.¹⁶

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se estudiaron 175 aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, provenientes de muestras clíni-

cas de pacientes del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas y los hospitales William Soler y Pediátrico del Cerro, desde junio de 2008 hasta junio de 2009. Las muestras fueron obtenidas de pacientes con infecciones de heridas quirúrgicas, secreciones vaginales, hemocultivos e infecciones del tracto urinario.

Cepas controles

Se utilizó como control negativo la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y como control positivo la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Se utilizaron los discos de antibióticos de ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftazidima y ácido clavulánico (30 y 10 μ g), cefotaxima y ácido clavulánico (30 y 10 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ceftaxima (30 μ g), cefepima (30 μ g), aztreonam (30 μ g) y amoxicilina y ácido clavulánico (20 y 10 μ g) (OXOID). Se incluyeron los antibióticos cefepima y ceftaxima con el objetivo de detectar la posible presencia de β -lactamasas tipo AmpC.¹ El criterio utilizado para detectar la posible presencia de la enzima AmpC fue que el aislado fuera sensible a cefepima y resistente a ceftaxima.¹⁶

La identificación de las cepas incluidas en el estudio, se realizó mediante el sistema estandarizado para la identificación de enterobacterias, API 20E (API Biochemical Identification Kits, bioMérieux).

Métodos fenotípicos para la detección de BLEE

Se emplearon simultáneamente el método de doble difusión con discos y el sistema DIRAMIC.

Método de sinergia de doble disco modificado

Se basa en la modificación del método descrito originalmente por Jarlier y cols. en 1988.¹⁷ Se utilizaron placas de agar Müeller-Hinton, previamente inoculadas con una suspensión bacteriana. Sobre la placa se colocaron discos que contenían ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ceftaxima (30 μ g), cefepima (30 μ g) y aztreonam (30 μ g) a una distancia de 25 mm del centro, donde se dispuso un disco convencional de amoxicilina con ácido clavulánico (20 y 10 μ g). Las placas se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C. Los aislados donde se observó un ensanchamiento en el halo de inhibición en la zona comprendida entre los discos de las cefalosporinas y la amoxicilina-ácido clavulánico se consideraron positivos para la presencia de BLEE.¹⁸ Se utilizó un inóculo de 0,5 McFarland y los resultados se evaluaron de acuerdo con los criterios establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).¹⁹

Sistema DIRAMIC

Está constituido por un sensor a microflujo continuo y una bomba peristáltica que detecta los cambios turbidimétricos en el medio. Está integrado por un módulo de medición y un *software*, que se encarga de la medición e interpretación del urocultivo y del antibiograma, maneja los datos y realiza el control de todos los procesos. Se calculan los porcentajes de inhibición para cada antibiótico y de acuerdo con el nivel obtenido, se adjudica el criterio de sensible, resistente o intermedio, para inhibiciones comprendidas entre el 60 y el 100 %.¹⁴ Se consideró que hubo producción de BLEE solo cuando se detectó resistencia y sensibilidad a la cefalosporina con el inhibidor.

RESULTADOS

Del total de aislados clínicos (175), 132 correspondieron a *Escherichia coli* (75,4 %) y 43 a *Klebsiella spp.* (24,6 %).

El método de DDD detectó 42 (24 %) aislados con fenotipo de BLEE; 35 *Escherichia coli* (83,3 %) y 7 *Klebsiella spp.* (16,6 %). De ellos, el DIRAMIC detectó 39 (22,3 %)

aislados con fenotipo de BLEE; 32 *Escherichia coli* (76,2 %) y 7 *Klebsiella spp.* (16,6 %).

Un total de 127 (72,6 %) aislados fueron negativos por ambos métodos.

Se detectaron en general 9 resultados discordantes. Se observaron tres resultados negativos por DIRAMIC que fueron positivos por DDD y seis resultados positivos por DIRAMIC que fueron negativos por DDD (Tabla 1).

Se determinó la sensibilidad y especificidad del sistema DIRAMIC en la detección de BLEE, en comparación con la DDD, en general y por gémenes (Tabla 2).

El método de DDD detectó la posible presencia de β -lactamasas tipo AmpC en nueve aislados (siete *Escherichia coli* y dos *Klebsiella spp.*). Estos fueron sensibles a cefepima y resistentes a cefoxitina. Este comportamiento el sistema DIRAMIC lo detectó solo en cuatro aislados (dos *Escherichia coli* y dos *Klebsiella spp.*).

DISCUSION

En los últimos años, se aprecia un aumento en el número de bacterias con resistencia a varios grupos de antibióticos. Entre ellas resaltan por su frecuencia de aislamiento, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, productoras de β -lactamasas de espectro extendido.^{1,8,11,20,21}

Se hace muy necesaria la identificación correcta en el laboratorio de las enterobacterias productoras de BLEE con el objetivo de brindar una adecuada atención al paciente y tomar medidas para el control de la infección con el fin de evitar la diseminación de estos gémenes.³

La estrategia más comúnmente utilizada en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación de estas enzimas son las pruebas fenotípicas, sin embargo, estas pueden ser problemáticas porque, en muchos casos, no se alcanzan los puntos de corte de sensibilidad o resistencia establecidos para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación.¹¹ Debido a sus diferentes propiedades enzimáticas, los productores de BLEE se diferencian en sus capacidades para hidrolizar específicamente los antibióticos betalactámicos.^{3,5} Otro factor que dificulta su detección puede ser la producción de diferentes tipos de β -lactamasas por parte de un mismo organismo.^{1,7}

La sensibilidad y la especificidad del sistema DIRAMIC, en comparación con el método de referencia empleado, fue de 92,85 y 95,48 % respectivamente. Estos resultados pueden considerarse satisfactorios al confrontarlos con otros trabajos en los que se comparan diferentes métodos automatizados usando DDD como referencia.^{10,12,13}

Wiegand y cols.,¹⁰ estudiaron 150 cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* y compararon los métodos Phoenix, VITEK 2 y MicroScan para la detección de BLEE. Ellos encontraron una sensibilidad del 99, 86 y 84 %, respectivamente para dichos sistemas automatizados.

Las discrepancias entre el DIRAMIC y el método de referencia se manifestaron en nueve aislados (Tabla 1). Tres de ellos fueron negativos por DIRAMIC y positivos por DDD. En uno de los aislados, el resultado fue intermedio (medianamente susceptible) para cefotaxima y

Tabla 1. Resultados discrepantes obtenidos con el DIRAMIC en comparación con la DDD.

Organismo	DDD					DIRAMIC					
	AMC	CRO	CAZ	CTX	ATM	CRO	CTX	CTX+AC	CAZ	CAZ+AC	
1 <i>Escherichia coli</i>	-	R	R	R	R	+	R	R	S	R	S
2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	R	R	R	R	+	R	R	S	R	S
3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	R	R	R	R	+	R	R	S	R	I
4 <i>Escherichia coli</i>	-	R	R	R	R	+	R	R	S	R	S
5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	R	R	R	R	+	R	R	S	I	S
6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	R	R	R	R	+	R	R	S	R	S
7 <i>Escherichia coli</i>	+	I	R	I	R	-	R	S	S	S	S
8 <i>Escherichia coli</i>	+	R	R	R	R	-	R	S	S	S	S
9 <i>Escherichia coli</i>	+	R	R	S	R	-	R	I	S	S	S

AMC Amoxicilina y ácido clavulánico. CRO Ceftriaxona. CAZ Ceftazidima. CTX Cefotaxima. CAZ + AC Ceftazidima y ácido clavulánico. CTX + AC Cefotaxima y ácido clavulánico. R Resistente. S Sensible. I Intermedio. + BLEE positivo. - BLEE negativo.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad del sistema DIRAMIC en la detección fenotípica de BLEE, según los microorganismos estudiados, en comparación con la DDD.

DIRAMIC	P	N	FN	FP	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<i>Escherichia coli</i>	32	95	3	2	91,4 %	97,9 %
<i>Klebsiella spp.</i>	7	32	0	4	100 %	88,9 %
Total	39	127	3	6	92,85 %	95,48 %

P Positivos. N Negativos. FN Falsos negativos. FP Falsos positivos.

sensible para la combinación con el ácido clavulánico. Otro elemento a tener en cuenta es que los tres aislados fueron resistentes a ceftriaxona, lo que pudiera considerarse como un indicio de la posible presencia de BLEE. Teniendo en cuenta este comportamiento, resultados como estos pudieran considerarse no concluyentes por lo que deben ser comprobados.

También se detectaron seis aislados positivos por DIRAMIC y negativos por DDD (dos *Escherichia coli* y cuatro *Klebsiella* spp.). En todos los casos, estos aislados fueron resistentes a cefalosporinas de espectro extendido por DDD, (Tabla 1) sin embargo, no expresaron el fenotipo de BLEE por este método. Por el DIRAMIC los seis aislados fueron resistentes al menos a una de las cefalosporinas empleadas y sensibles a la combinación con el ácido clavulánico, cumpliendo el criterio empleado por el DIRAMIC para detectar que hay presencia de BLEE.

La capacidad de las técnicas fenotípicas empleadas puede haberse afectado por la presencia de BLEE junto a otras β -lactamasas, enmascarando el efecto del ácido clavulánico, o por la coexistencia de otros mecanismos de resistencia, como la disminución de la permeabilidad de la membrana al paso del antibiótico.³

Según lo establecido por la normativa del CLSI, la combinación simultánea de varias cefalosporinas aumenta la sensibilidad de detección de cualquier sistema. Sería recomendable en estudios futuros la incorporación de más cefalosporinas de tercera generación a los paneles de antibiograma del sistema DIRAMIC.

A su vez, la incorporación de cefepima más ácido clavulánico¹² podría aumentar la sensibilidad en la detección de BLEE en los casos de aislados en que coexistan otras β -lactamasas que hidrolicen otras cefalosporinas de tercera generación, pero no cefepima, como puede ser el caso de AmpC. En el caso de las enterobacterias productoras de AmpC, la cefepima constituye el sustrato que mejor detecta la presencia de estas enzimas.

En Cuba, se han realizado diferentes investigaciones, que aunque con carácter local, evidencian la presencia en los hospitales de bacterias productoras de BLEE, específicamente *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp.²²⁻²⁴ En un estudio multicéntrico, realizado en la Ciudad de La Habana por González y cols., en el que intervinieron fundamentalmente hospitales pediátricos, fueron colectadas 326 cepas, de las cuales 298 correspondieron a *Escherichia coli* y 28 a *Klebsiella* spp. Se observó el fenotipo de BLEE en 31 aislados de *Escherichia coli* (10 %) y 10 de *Klebsiella* spp. (36 %).²² Otro estudio de Fernández y cols. confirmó la presencia del fenotipo BLEE en 17 cepas de *Escherichia coli* para un 40,4 % y 11 cepas de *Klebsiella* spp. para un 35,4 % del total de cepas aisladas.²⁴

Las cepas productoras de BLEE son multiresistentes, puede que expresen una resistencia constitutiva, además de la adquirida, o que sean hiperproductoras de otras β -lactamasas cromosómicas o plasmídicas, muestran pequeñas diferencias entre sí a escala molecular que sin embargo, se traducen en cambios importantes en su actividad sobre los distintos sustratos. Estos procesos no se manifiestan a la vez, ya que también dependen de la velocidad de hidrólisis sobre los antibióticos. Todas estas circunstancias tienen consecuencias directas sobre la detección fenotípica por parte del laboratorio y es posible que en cuatro horas haya procesos que aún no se hayan expresado y por tanto, se requiera extender el tiempo de medición del sistema DIRAMIC, en estudios futuros, para aumentar su capacidad de detección.

Los resultados alcanzados en este trabajo constituyen una evidencia de que el sistema DIRAMIC puede ser

utilizado para alertar al médico acerca de la presencia de cepas portadoras de BLEE, de forma rápida, sencilla y confiable. No obstante, será necesario utilizar como referencia otros métodos más exactos. Como las enzimas BLEE confieren grados variables de actividad contra las cefalosporinas de tercera generación,³ los autores consideran que es necesario determinar el tipo de BLEE presente, por lo que será recomendable realizar la caracterización molecular de las cepas estudiadas, con el objetivo de complementar esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A los especialistas y técnicos de los Laboratorios de Microbiología del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, los Hospitales William Soler y Pediátrico del Cerro por suministrar las cepas para llevar a cabo el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jacoby G, Muñoz S. The new β -lactamases. N Engl J Med. 2005;352(4):380-91.
2. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases Antimicrob Agents Chemother. 2003;47: 3554-60.
3. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implication for control. Clin Infect Dis. 2006;42:37-45.
4. Jacoby GA, Carreras I. Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:858-62.
5. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis. 2001;32:1162-71.
6. Peña C, Gudiol C, Tubau F, Saballs M, Pujol M, MA Domínguez, et al. Risk factors for acquisition of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalised patients. Clin Microbiol Infect. 2006;12:279-84.
7. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-686.
8. Peña C, Gudiol C, Calatayud L, Tubau F, Domínguez MA, Pujol M, et al. Infections due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamase among hospitalised patients: factors influencing mortality. Journal of Hospital Infection. 2008;68:116-122.
9. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemsick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and Vitek2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized- β -lactamases. J Clin Microb. 2007;45:2380-4.
10. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E and Seifert H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacteriaceae* by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. J Clin Microbiol. 2007;45(4):1167-1174.
11. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases. Clin Infect Dis. 2006;42 (Suppl 4):S153-63.
12. Linscott AJ and Brown WJ. Evaluation of Four Commercially Available Extended-Spectrum Beta-Lactamase Phenotypic Confirmation Tests. J Clin Microbiol. 2005;43:1081-1085.
13. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box ATA, Brisse S and Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol. 2002;40:3703-3711.

14. Contreras OR, Roura G, Novo F, Hernández S, Ramírez N, Ramírez I, *et al.* Equipment, kit and method for microbiological diagnosis. US Patent 09/420.074, WO9847999A1, 2003.
15. González I, Travieso F, González L, Alvarez E, Tillán G y Contreras R. Sistema DIRAMIC: Primer reporte multicéntrico de los resultados de los ensayos de susceptibilidad a antibióticos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2006;37(1):49-53.
16. Pitout JDD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3933-5.
17. 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;10:867-878.
18. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Incola F, Radice M, *et al.* Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37(1):57-66.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S19, Vol. 29, No. 3, 2009.
20. Bhavnani S. Outcomes evaluation of patients with ESBL and non-ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2006;54:231-236
21. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamases phenotype of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis.* 2001;32:94-103.
22. Hernández-Pedroso W, Ramos-Godínez A, Nodarse-Hernández R, Padrón-Sánchez A, De Armans-Moreno A. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev Cub Med Int Emerg.* 2006;5(1):256-64.
23. González Mesa L, Ramos Morí A, Nadal Becerra L, Morffi Figueroa J, Hernández Robledo E, Álvarez AB, *et al.* Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos de hospitales. *Rev Cubana Med Trop.* 2007;59(1).
24. Fernández López N, Vidal Rosell D, Aguiar A. Detección de enzimas beta-lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. aisladas de pacientes hospitalizados en el CIMEQ. *Investigaciones Medicoquirúrgicas.* 2008;3(1):68-68.