

Relación genética de aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en un hospital de la Habana, Cuba.

Leonora González-Mesa, María de los Ángeles González-Leyva,* Ángela Mariana Zayas-Tamayo,** Marah Curbelo -Álvarez, Yainelis Garrido- Nicot.

Centro de Neurociencias de Cuba,* Universidad de La Habana, **Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Recibido: 7 de julio de 2017.

Aceptado: 14 de agosto de 2017.

Palabras clave: *Escherichia coli*, Infección hospitalaria, Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), relación genética.

Key words: *Escherichia coli*, hospital infection, Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL), genetic relation.

RESUMEN. *Escherichia coli* productora de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) es un patógeno multiresistente causante de infecciones asociadas al cuidado de la salud (IACS) se aísla con mayor frecuencia en áreas de cuidados intensivos y quirúrgicas. El objetivo de este estudio fue determinar la relación genética de *E. coli* productora de BLEE procedentes de un Hospital de La Habana, Cuba. Se realizó un estudio retrospectivo donde fueron analizados 328 aislados clínicos de *E. coli* colectados en el 2014. La susceptibilidad a los antimicrobianos se determinó mediante el método de difusión con discos y fue confirmada la presencia de BLEE por doble difusión con discos, los genes portadores de enzimas BLEE por reacción en cadena de la polimerasa y la relación genética mediante electroforesis de campo pulsante. El fenotipo BLEE fue detectado en 35 aislados de *E. coli*, de estos 14 fueron portadores del gen *bla*_{TEM}, cuatro del *bla*_{SHV} y 18 *bla*_{CTX-M}. La relación genética en la sala de Medicina Interna mostro cuatro genotipos de los cuales dos clones están genéticamente relacionados (similitud > 80 %), en la sala de urología se detectaron nueve genotipos de un total de 12 aislados y en la Unidad de Cuidados Intensivos ocho genotipos de 10 aislados, en estas dos últimas salas los genotipos no están relacionados. El genotipo encontrado con mayor frecuencia fue CTX-M. Este es el primer informe que muestra la diversidad genotípica de *E. coli* productora de BLEE en La Habana, lo que sugiere una potencial transmisión cruzada; destacando la necesidad de implementar estrategias de control para prevenir la diseminación de estas enzimas en este hospital.

ABSTRACT. *Escherichia coli*, a producer of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) is a multiresistant pathogen responsible for health-care-associated infections (IACS), is isolated more frequently in areas of intensive care and surgery. The objective of this study was to determine the genetic relation of ESBL-producing *E. coli* recovered in a Hospital in Havana, Cuba. A retrospective study was conducted which were analyzed 328 clinical isolates *E. coli* collected in 2014. Antibiotic susceptibility was determined by standard disk diffusion and was confirmed the presence of ESBL using double disk diffusion test, the presence of genes by Polymerase Chain Reaction and genetic relation through pulsed-field electrophoresis. The ESBL were detected in 35 *E. coli* isolates, of these 14 strains carried the *bla*_{TEM} genes, four *bla*_{SHV} genes and 18 *bla*_{CTX-M} genes. The genetic relation in the Internal Medicine ward showed four genotypes of which two clones are genetically related (similarity > 80 %) in the urology ward were detected nine genotypes of a total of 12 isolates and the Intensive Care Unit ward were detected eight genotypes of a total 10 isolates in these last two wards isolates were genetically unrelated. The most frequent genotype was CTX-M. This is the first report showed genotypic diversity of ESBL-producing *E. coli* in Havana, suggesting potential cross-transmission thus highlighting the need for implementing control strategies to prevent dissemination of these enzymes in this one hospital.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es el agente etiológico más frecuente en infecciones del tracto urinario y una de las principales causas de meningitis neonatal, además de ocasionar infecciones intestinales, en el sitio quirúrgico, infección de la piel y tejidos blandos, neumonía, bacteriemia, etc.¹ El aislamiento de *E. coli* portadora de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (Ec-BLEE) tanto en la comunidad como en el hospital se ha convertido en un problema creciente, responsable de la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados.²

Los fenotipos más comunes de Beta-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) surgen de mutaciones puntuales en los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} o *bla*_{CTX-M} que alteran el centro activo de la enzima.³ Estas enzimas hidrolizan las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y el aztreonam. Son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam) las cefamicinas y los carbapenemicos; además los plásmidos que codifican las BLEE portan genes de resistencia a otras familias de antimicrobianos como aminoglucosidos, fluoroquinolonas y sulfonamidas, por tal motivo el fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente y el tratamiento de las infecciones producidas por estas cepas presenta mayor dificultad.⁴

La epidemiología de Ec-BLEE en adultos está bien documentada a nivel mundial.⁵ En La Habana no se han informado estudios sobre la incidencia de *E. coli* productora de BLEE causando infecciones endémicas y epidémicas. La prevalencia de estos fenotipos detectada en los hospitales de La Habana ha aumentado de un 3,8 % en el año 2004 a un 51,7 % en 2011, con una alta incidencia (53,3 %) en los pacientes ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos.⁶⁻⁸ Las enzimas TEM, SHV y CTX-M habían sido descritas en estudios previos en cuatro hospitales de La Habana.⁶ Sin embargo no hay información sobre la relación genética de los aislados clínicos de Ec-BLEE causante de infecciones hospitalarias. El objetivo del presente estudio fue caracterizar los genes *bla* que codifican BLEE y determinar la relación genética en *E. coli* productoras de BLEE, colectados en el período de junio a diciembre del 2014 de pacientes adultos hospitalizados en un Hospital de La Habana, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos. Se estudiaron un total de 328 aislamientos clínicos no duplicados procedentes de muestras clínicas recibidas del Laboratorio de Microbiología de un Hospital en La Habana, durante el período de junio a diciembre de 2014. Las muestras fueron colectadas de pacientes adultos hospitalizados con infecciones respiratorias, en el torrente sanguíneo, tracto urinario y heridas quirúrgicas admitidas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) en la sala de Medicina Interna y en la sala de Urología. Los aislados fueron identificados mediante pruebas bioquímicas convencionales.⁹ Durante el estudio se utilizaron las siguientes cepas controles: *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 control positivo.

Susceptibilidad antimicrobiana. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevaron a cabo mediante el método de difusión con discos, siguiendo los lineamientos para enterobacterias del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, siglas en inglés).¹⁰ Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulánico (30/10µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg). Los aislados también se ensayaron contra antibióticos no betalactámicos, incluyendo amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1,25 µg/23,75 µg).

Detección fenotípica de BLEE. Se realizó en todos los aislamientos que mostraron resistencia al menos a una de las cefalosporinas de tercera, cuarta generación y el monobactam aztreonam, utilizando la prueba de sinergia de disco doble como se describió anteriormente.¹¹ Después de una incubación durante la noche a 37 °C, una ampliación de la zona de inhibición entre un disco de betalactámico y el que contiene el inhibidor de beta-lactamasa es indicativo de la presencia de BLEE (Ec-BLEE).

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los aislados de Ec-BLEE. Todos los aislados de *E. coli* caracterizados fenotípicamente como positivos para BLEE fueron analizados por PCR. Para la extracción del ADN plasmídico, los aislados de *E. coli* se cultivaron durante la noche en caldo de triptona soja a 37 °C. El ADN plasmídico se purificó de acuerdo con el método de lisis alcalina de Kado y Liu.¹² La amplificación por PCR se realizó usando GoTaq DNA polimerasa (Sigma). Para determinar la presencia de los tipos de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} se utilizaron cebadores y condiciones descritas previamente.¹³ (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores utilizados para identificar el genotipo BLEE de aislados clínicos de Ec-BLEE.

Tipo de gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplificado (pb)
TEM - 1 F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	860
TEM - 2 R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	
SHV - 1 F	CAGCGAAAAACACCTTG	471
SHV - 2 R	TCCCGCAGATAAATCACCA	
CTX-M - 1 F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593
CTX-M - 2 R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	

Ec-BLEE: *E. coli* portadora de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

Tipificación molecular de los aislados Ec-BLEE. El ADN genómico de todos los Ec-BLEE se realizó mediante electroforesis en gel de campo pulsado (ECP) después de la digestión con *Xba*I (New EnglandBioLabs, Reino Unido) según procedimiento previamente descrito por López-Cánovas (2006).¹⁴ Usando cámara miniCHEF del Sistema Guefast 06® (Neuronic SA, Cuba). Los minigeles fueron teñidos con solución de bromuro de etidio y fotografiados con una cámara digital (Sony DSC707). El análisis de los perfiles obtenidos por ECP y la construcción del dendograma fueron realizados mediante análisis computarizado, utilizando el software GuefaScan® (NeuronicSA, Cuba),¹⁵ acorde con él en el índice de coincidencia de Dice,¹⁶ el cual se calcula mediante la siguiente ecuación: $D = S_{xy} / nx + ny$ Donde: S_{xy} es la similitud entre las cepas x y y , n_{xy} es el número de bandas en común en los dos perfiles de DNA, y n_x y n_y son los números de bandas exhibidas por las cepas x y y respectivamente y el análisis de cluster de las matrices de similitud se calculó utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Las cepas que presentaron índice de similitud igual o mayor al 80 % se consideraron genéticamente relacionadas.¹⁷

RESULTADOS

De los 328 aislamientos clínicos no duplicados se identificaron 97 como *E. coli* (29,5 %) y fueron confirmados fenotípicamente 32 (32,9 %) como productores de BLEE entre los cuales 10 (31,2 %) fueron de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de estos tres (9,3 %) con infecciones respiratorias y 7 (21,8 %) en el torrente sanguíneo. En la sala de Medicina Interna 10 (31,2 %) provenientes de pacientes con infección de heridas quirúrgicas y 12 (37,5 %) con infección del tracto urinario de la sala de Urología.

Todos los aislamientos de Ec-BLEE resultaron resistentes a cefotaxima, aztreonam y ceftriaxona 32 (100 %) mientras 31(97,0 %), 28 (87,0%) y 27 (84,0 %) fueron resistentes a ceftazidima, amoxicilina/ácido clavulánico y cefepima, respectivamente. La co-resistencia para amikacina 22 (68,7 %), gentamicina 29 (90,6 %), Trimetoprima / sulfametoxazol 28 (87,5%), ciprofloxacina 28 (87,5 %). Todas las cepas fueron completamente susceptibles al imipenem y meropenem (Tabla 2).

Tabla 2. Resistencia antimicrobiana de los aislados clínicos Ec-BLEE procedentes de un Hospital en La Habana, durante el período de junio a diciembre de 2014.

Antimicrobianos	Ec-BLEE (n = 32)	
	Nro.	Porcentaje (%)
amoxicilina/ácido clavulánico	28	87,0
ceftriaxona	32	100
ceftazidima	31	97,0
cefepima	27	84,0
cefotaxima	32	100
aztreonam	32	100
imipenem	0	0
meropenem	0	0
amikacina	22	68,7
gentamicina	29	90,6
ciprofloxacina	28	87,5
trimethoprim/sulfamethoxazole (1,25 µg/23,75 µg).	28	87,5

Ec-BLEE: *E. coli* portadora de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

Entre los aislados de Ec-BLEE se encontró que el gen bla_{CTX-M} es el más prevalente 17 (53,1 %) seguido de bla_{TEM} 14 (43,7 %) y bla_{SHV} 4 (12,5 %). El análisis de los productos de PCR mostró coexistencia de BLEE entre los aislados clínicos de *E. coli*, diez de los 32 aislamientos presentaron los genes bla_{CTX-M} y bla_{TEM} , uno de los 32 aislados tenía los genes bla_{CTX-M} y bla_{SHV} (aislamiento 32), uno de los 32 aislados tenía bla_{SHV} y bla_{TEM} (aislamiento 49) y uno de los 32 aislados tenía bla_{TEM} , bla_{CTX-M} y bla_{SHV} (aislamiento 34) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los genes en aislados clínicos Ec-BLEE.

Tipo de gen <i>bla</i>	Nro.	(%)
bla_{CTX-M}	17	53,1 %
bla_{TEM}	14	43,7 %
bla_{SHV}	4	12,5 %.
$bla_{CTX-M} + bla_{TEM}$	10	31,2 %.
$bla_{CTX-M} + bla_{SHV}$	1	3,1 %.
$bla_{SHV} + bla_{TEM}$	1	3,1 %.

El análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante ECP mostró un alto nivel de diversidad genética de los aislados clínicos de Ec-BLEE. Los 32 aislamientos analizados mostraron 29 pulsotipos diferentes excepto en tres aislados de Ec-BLEE (40, 43 y 44) pertenecientes a la sala de Medicina Interna con 80% de similitud. Los 10 aislados de Ec-BLEE en esta sala se agruparon en cuatro pulsotipos A-D: A (n = 2), B (n = 6), C (n = 1) y D (n = 1). En el pulsotipo B, los tres aislamientos que están estrechamente relacionados se agruparon en el subtipo B4; el aislado 40 no produce ninguna de las enzimas probadas en el presente estudio, el 43 fue productor de CTX-M y el aislado 44 coexisten las enzimas CTX-M y TEM. En la sala de Urología fueron detectados nueve pulsotipos (A-I) y cinco subtipos B1, B2 y C1, C2, C3 y en la Unidad de Cuidados Intensivos fueron detectados ocho pulsotipos (A-H) y dos subtipos A1, A2, los cuales no están relacionados genotípicamente. En los patrones de ECP de los 32 aislados clínicos de Ec-BLEE se observa la gran diversidad genética (Fig. 1)

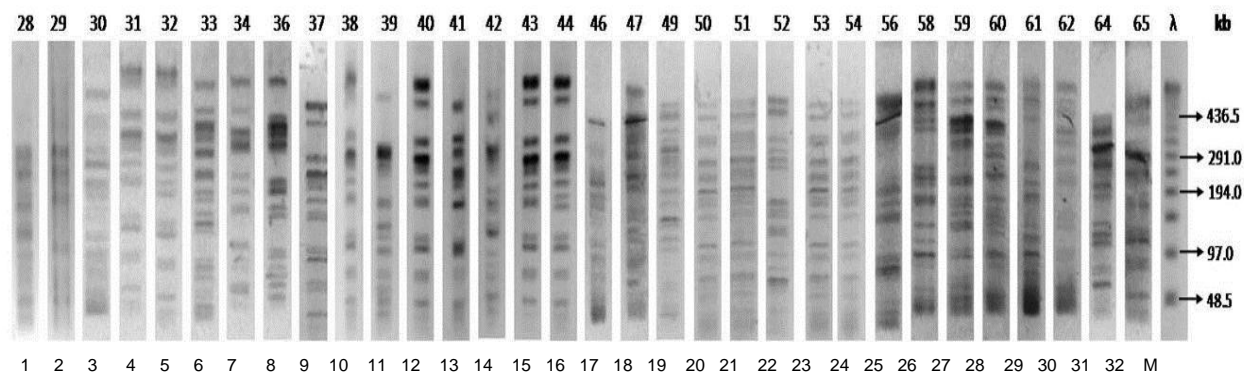


Fig.1. Electroforesis en gel de agarosa que visualiza el producto de la ECP correspondiente a la digestión enzimática con *Xba*I del ADN genómico de los 32 aislados clínicos de Ec-BLEE (Línea 1 a 32). Línea M, patrón de peso molecular concatémico de ADN del bacteriófago Lambda (λ).

DISCUSIÓN

La emergencia de aislados clínicos de Ec-BLEE es un desafío para la salud pública en el área de enfermedades infecciosas ya que reduce la eficacia terapéutica de los antimicrobianos, situación que ha sido informada en todo el mundo particularmente en América Latina.¹⁸⁻¹⁹ El presente estudio muestra la prevalencia de BLEE (32,9 %) en aislados de *E. coli* con altas tasas de resistencia para antimicrobianos utilizados como primera opción terapéutica en infecciones causados por estos microorganismos. En el año 2014 se llevó a cabo un estudio en La Habana en un hospital con similares características al del presente estudio y el resultado informó una alta prevalencia (53,7 %) de Ec-BLEE.²⁰ Los informes de prevalencia de diferentes tipos de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} en aislados Ec-BLEE es muy variable entre diferentes ciudades, países y regiones.²¹ En este estudio se encontró que la mayoría de los aislados presentaron el gen *bla*_{CTX-M} apoyando el reconocimiento de que la enzima CTX-M es el tipo de BLEE más prevalente en el mundo.²² En estudios previos se había informado la enzima TEM como la más prevalente en los aislados clínicos de *E. coli* causantes de infecciones intrahospitalarias. Sin embargo nuestro país al igual que en otras regiones del mundo como Europa del Este, América del Sur, Japón y la India el gen *bla*_{CTX-M} ha desplazado a otros genes que codifican para otras enzimas BLEE.²³ El análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante ECP mostró una gran variabilidad genética en la mayoría de los aislados, excepto para tres cepas de Ec-BLEE (40, 43 y 44) pertenecientes a la sala de Medicina Interna con 80 % de similitud pero con diferencias en los tipos de enzimas presentes. Esta situación sugiere la transferencia horizontal de los genes más que la diseminación de un clon específico, este fenómeno ha sido observada en estudios en los cuales los aislados clínicos no pertenecen a un brote.²⁴ Además, la ausencia de un perfil de ECP común entre los aislados clínicos excluye efectivamente un punto local de origen como fuente de brotes, favoreciendo en su lugar la importación de numerosas cepas dentro de la institución desde el ambiente extra hospitalario o la diversidad policlonal dentro de los reservorios de la institución.

CONCLUSIONES

El presente estudio informa una amplia diversidad genética de aislados clínicos de *E. coli* productoras de BLEE en un hospital en La Habana, con una mayor prevalencia del gen *bla*_{CTX-M} situación que merece una estrecha vigilancia; destacando la necesidad de implementar estrategias de control para prevenir la diseminación de estos aislados clínicos en el hospital.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pokhrel RH, Thapa B, Kafle R, Shah PK, Tribuddharat C. Co-existence of beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from Kathmandu, Nepal. BMC Research Notes. 2014; 7:694.
2. Rendón-Medina MA, Reyes Arcos A, Rosas Bello JB, Rodríguez-Weber F. Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y nitrofurantoína. Med Int Mex. 2012;28(5):434-39.
3. Bush K. New β -lactamases in Gram negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001; 32:1085-89.
4. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(4):933-51.
5. González Vélez AE, Díaz-Agero Pérez C, Robustillo Rodela A, Pita López MJ, Cornejo Gutiérrez AM, Pelayo Pedrero-Pérez, *et al.* Tendencia de la prevalencia de bacilos gramnegativos productores de betalactamasas de espectro extendido en un hospital universitario de Madrid. Med Clín. 2013;141:8-12.
6. González Mesa L, Ramos Morí A, Nadal Becerra L, Morffi Figueroa J, Hernández Robledo E, González Alemán M, *et al.* Identificación fenotípica y molecular de b-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):52-8.
7. García Castellanos T, Castillo Marshal A, Salazar Rodríguez D. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. Rev Cub Salud Pública. 2014;40(1):129-135.
8. Hernández Pedroso W, Ramos Godínez A, Nodarse Hernández R, Padrón Sánchez A, De Armas Moreno E. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias. 2006; 5(1):256-264.
9. Farmer JJ. *Enterobacteriaceae: introduction and identification*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1995:p.438-49.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document. 2013. M100-S23.
11. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988;10(4):867-78.
12. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981;145(3):1365-73.
13. Mabilat C, Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum beta-lactamases. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, (ed.). *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology. Washington, DC: 1995.p. 553-59.
14. López-Cánovas L, Bravo L, Herrera J, Riveron AM, Javer E, Sánchez A, *et al.* DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel. Electrophoresis. 2006;27:2857-2864.
15. Santos YM, Herrera JA, López L, Riverón AM, Rodríguez W. Manual de usuario del GuefastScan. 2007:p.1-29.
16. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 1945;26:297-302.
17. Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data Clustering: A Review. ACM Computing Surveys. 2000;31:264-323.
18. Merida-Vieyra J, De Colsa A, Calderon Y, Arzate P, Aquino A. First Report of Group CTX-M-9 Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Pediatric Patients in Mexico. PLoS One 2016;XI (12) [Consultada: 19 de diciembre 2016]. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168608>
19. Tejada-Llacsá PJ, Huaracaya JM, Melgarejo GC, Gonzales LF, Cahuana J, Pari RM, *et al.* Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. An Fac med. [Internet] 2015;76(2):161-66. [Consultada: 4 de agosto 2016]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.15381/anales.v76i2.11143>.
20. Trueba BS, Casares MH, Rivera FE, Rodríguez DS, Rodríguez, NL. Identificación y mecanismos de resistencia en aislamientos de *Escherichia coli* multidrogoresistentes en un hospital terciario. Rev Panam Infectol. [Internet] 2014;16(4):215-220 [Consultada: 10 de julio 2016]. Disponible en: <http://www.revistaapi.com>.
21. Bora A, Hazarika NK, Shukla SK, Prasad KN, Sarma JB, Ahmed G. Prevalence of bla_{TEM}, bla_{SHV} y bla_{CTX-M} genes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Northeast India. Indian J Pathol Microbiol. 2014; Apr-Jun; 57(2):249-54.
22. Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec JY, Raignon G, *et al.* Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. J Antimicrob Chemother. [Internet] 2014; 69(5):1231-7 [Consultada: 8 de enero 2015]. Disponible en: <https://doi:10.1093/jac/dkt519>.

23. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* [Internet] 2006;9(5):466-75 [Consultada: 30 de septiembre 2015]. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.mib.2006.08.011>.
24. Bai L, Wang L, Yang X, Wang J, Gan X, Wang W, *et al.* Prevalence and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic Patients in China. *Front Microbiol.* [Internet] 2017;8:144. [Consultada: 13 de junio 2017]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00144>.