

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas

Dr. Adalberto Águila,¹ Lic. Robert Bernedo,² Dra. Alina Llop,³ Dra. Margarita Ramírez,³ Dra. Laura Bravo,⁴ Ing. Anabel Fernández⁵ y Lic. Yudith Ledo⁶

RESUMEN

Se analizaron 41 cepas de *Escherichia coli*, aisladas en niños menores de 5 años con diarreas agudas, procedentes de las diferentes provincias del país. Fueron probados 4 importantes determinantes fenotípicos: sorbosa, sorbitol, enterohemolisina y la serología de O157: H7, para seleccionar las cepas de la categoría enterohemorrágica o productora de toxina shiga. De igual modo fueron caracterizadas por el método de biotipaje y de susceptibilidad antimicrobiana. El uso de las pruebas fenotípicas mostró 6 cepas con características presuntivas, de estas, 4 mostraron mayor probabilidad de pertenecer a la categoría productora de toxina shiga. En el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana las cepas mostraron elevada resistencia, sobre todo para la ampicilina y el trimetropin-sulfametoxazol. Otro hallazgo de interés fueron los valores de resistencia y de susceptibilidad intermedia obtenidos para el augmentin, aztreonam y ceftriaxona. Se alcanzaron 12 patrones de resistencia antimicrobiana y de ellos 10 resaltaron por ser multirresistentes.

Palabras clave: *Escherichia coli* enterohemorrágica, sorbitol negativa, toxina shiga, STEC, enterohemolisina, susceptibilidad antimicrobiana, microbiología.

Escherichia coli (*E. coli*) es uno de los agentes enteropatógenos bacterianos más aislados, responsable de 40 a 50 % de los casos de diarreas agudas. La infección se transmite por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y los alimentos contaminados.^{1,2}

Las cepas de *E. coli* productoras de diarreas se clasifican en 6 categorías: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica o productora de toxina shiga (STEC, siglas en inglés), *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteroagregativa y *E. coli* enteroadherente con sus variantes de adherencia localizada y adherencia difusa.²

Hace más de 2 décadas la categoría STEC fue considerada como un patógeno emergente, que clasifica como un microorganismo zoonótico porque forma parte de la flora intestinal de varios animales, entre ellos rumiantes y domésticos. Se ha asociado a brotes y casos esporádicos de diarreas, que traen consigo en una parte de la población afectada (10 %) la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico.³

El serotipo O157:H7 es el prototipo de la categoría STEC al que se le atribuyen la mayoría de los grandes brotes. Estas infecciones han experimentado un crecimiento exponencial a partir de su primer reporte en 1982 en los EE.UU., que

¹ Especialista de I Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

² Licenciado en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

³ Doctora en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. IPK

⁴ Doctora en Ciencias. IPK

⁵ Ingeniera Química. IPK.

⁶ Licenciada en Microbiología. IPK.

afecta a personas sobre todo en edades extremas de la vida.⁴

La Organización Mundial de la Salud ha lanzado múltiples llamados sobre la importancia de promover y adoptar estrategias en la prevención y el control de las infecciones por este microorganismo.⁴ Con este trabajo se pretende demostrar la factibilidad del empleo de 4 pruebas fenotípicas para mejorar la precisión del diagnóstico presuntivo de la categoría STEC, así como brindar información que contribuya a conocer el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana, de las cepas de *E. coli* entéricas aisladas en niños menores de 5 años en Cuba.

MÉTODOS

Se realizó un estudio en enero de 2006 a 41 cepas de *E. coli* con el diagnóstico presuntivo de STEC y se conservaron en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Enfermedades Diarreas Agudas (EDA) del IPK. Las cepas procedían de los diferentes Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE) del país y fueron aisladas de niños menores de 5 años con EDA. Otros datos clínicos epidemiológicos señalan que fueron recolectadas de casos aislados y durante el período comprendido de enero a octubre de 2005.

En las pruebas de identificación y caracterización de la categoría STEC, se utilizaron controles positivos y negativos, procedentes del Servicio de Fisiopatología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires- Argentina: cepa HS sin factores de virulencia y EDL933 verotoxigénica O157: H7 (Stx1 y Stx2 positiva, productora de la enzima enterohemolisina EHEC-hly).

Las cepas fueron sembradas por agotamiento en placas de Agar Mc Conkey y a partir de cultivos puros se procedió a la confirmación fisiológica y bioquímica de la especie.⁵

Para la determinación del género y la especie se procedió según establece el manual para pruebas bioquímicas de enterobacterias.⁶ El sustrato sorbitol fue utilizado como prueba preliminar en la búsqueda del serotipo O157:H7.⁷

Se determinaron los biotipos primarios de *E. coli* más frecuentes en el estudio, siguiendo el esquema de *Crichton* y *Old* en 1993.^{5,8}

En la determinación de cepas productoras de ECEH-hly se utilizó la técnica descrita por *Beutin* y otros,⁹ en placas con el medio agar glóbulos rojos lavados (AGRL).⁴

A partir de cultivos jóvenes se realizó la siembra en AGRL. Transcurridas las primeras 3 o 4 h de incubación se efectuó la primera lectura, para descartar las cepas que produjeron α -hemólisis. Se realizó una segunda y tercera lecturas a las 24 y 48 h para determinar la producción de β -hemólisis.⁴

Para efectuar la búsqueda del serotipo O157:H7 en el estudio se empleó el método de aglutinación en lámina descrito por *Blanco* y otros.¹⁰ Fueron preparadas las suspensiones bacterianas y después de un tratamiento térmico se enfrentaron a los antiseros correspondientes.⁴

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron desarrolladas de acuerdo con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en el documento M100-S16 correspondiente al método de difusión en disco. Para garantizar la calidad de esta prueba se emplearon las cepas de colección siguientes: *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.¹¹

RESULTADOS

Durante la confirmación de la especie, 6 cepas (14,63 %) no fermentaron lactosa y 4 (9,75 %) no decarboxilaron lisina. Fueron ratificadas más tarde como miembros de la especie mediante pruebas bioquímicas complementarias (fermentación de xilosa y la utilización del acetato como fuente de carbono).

Al enfrentar las cepas de *E. coli* a los sustratos fenotípicos sorbitol y sorbosa, se determinó que 24 (58,53 %) no fueron capaces de utilizar sorbitol, mientras que 17 (41,47 %) sí lo hicieron.

TABLA 1. Resultados de la determinación de los marcadores fenotípicos en las cepas de *E. coli*. N= 41

Cepas que lo expresan (%)	Sorbitol negativa	Sorbosa negativa	Marcadores fenotípicos				Enterohemolisina	Serología O157:H7
			Biotipos					
	24 (58,53)	(0)	6 8 (19,51)	13 6 (14,63)	16 8 (19,51)	otros 19 (46,35)	6* (14,63)	(0)

* De ellas 4 no fermentaron el sorbitol, por tanto, 4 cepas reunieron 2 de las características distintivas de *E. coli* enterohemorrágica.

TABLA 2. Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* del estudio. N= 41

Antimicrobiano	R		Categoría I		S	
	No. de cepas	%	No. de cepas	%	No. de cepas	%
Amoxicilina - Ácido clavulánico (AUG)	10	24,39	5	12,19	26	63,42
Ampicilina - Sulbactam (SAM)	8	19,51	2	4,87	31	75,62
Aztreonam (ATM)	4	9,75	3	7,31	34	82,94
Ampicilina (AMP)	41	100	0	0	0	0
Ceftriaxona (CRO)	2	4,87	3	7,31	36	87,82
Tetraciclina (TE)	12	29,26	17	41,48	12	29,26
Gentamicina (CN)	1	2,43	0	0	40	97,57
Trimetropim - Sulfametoxazol (SMX)	19	46,34	1	2,43	21	51,23
Ciprofloxacina (CIP)	2	4,87	1	2,43	38	92,7
Cloranfenicol (C)	2	4,87	1	2,43	38	92,7
Ácido nalidíxico (NA)	5	12,19	2	4,87	34	82,94

R= resistente; I= susceptibilidad intermedia; S= sensible.

Por otra parte ninguna cepa fue capaz de fermentar la sorbosa (tabla 1).

Al aplicar el esquema de *Crichton* y *Old* se encontró que los biotipos que resultaron más frecuentes fueron: el 6, 8 y el 13 (tabla 1). Un pequeño grupo de cepas no pudieron ser clasificadas.

La serología demostró que ninguna de las cepas ensayadas aglutinó con los antisueros O157:H7.

Del total de cepas estudiadas, 6 (14,63 %) produjeron el fenómeno de la β -hemólisis en el medio especial AGRL. Al relacionar los resultados de la producción de β -hemólisis con el sorbitol, se encontró que 4 produjeron β -hemólisis y no utilizaron el sorbitol, mientras que 2 fueron productoras de β -hemólisis y fermentaron el sorbitol.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad se dividieron en 3 categorías, tomando en cuenta lo recomendado por las normas del CLSI (2006) (tabla 2).

Todas las cepas (100 %) mostraron resistencia a la ampicilina, mientras que 19 (46,34 %) la manifestaron frente al trimetropimsulfa-

metoxazol, los resultados para los 11 antibióticos ensayados se observan en la tabla 2. Ninguna fue resistente a todos los antimicrobianos probados y 16 (39,02 %) mostraron resistencia a 3 antibióticos o más (MR).

En el caso de las quinolonas, ácido nalidíxico y ciprofloxacina, se detectaron valores de resistencia y de susceptibilidad intermedia (tabla 2).

Ninguna cepa resultó sensible a menos de 3 antimicrobianos, 2 (4,87 %) lo fueron a 3 agentes, mientras que las 39 restantes (95,13 %) lo mostraron a 4 antibióticos o más.

En el estudio se revelaron porcentajes de resistencia y de susceptibilidad intermedia de gran interés para los antimicrobianos aumentin, aztreonam y ceftriaxonam (tabla 2).

Se obtuvieron 12 patrones de resistencia, entre ellos 10 expresaron MR. Los patrones de MR más frecuentes encontrados fueron: AMP-TE-SMX con 4 cepas (9,75 %), seguido del AUG-SAM-AMP-SMX con 2 (4,87 %), el resto estuvo integrado por una sola cepa.

DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas fueron heterogéneos, tal y como lo describe *Farmer* en sus trabajos.¹²

En los resultados del presente trabajo se obtuvieron 4 cepas que utilizaron lactosa pero no decarboxilaron lisina, este fenómeno no es muy frecuente en *E. coli* y se considera una atipicidad dentro de la especie. Se debe tener en cuenta que múltiples y excesivos pases a medios de cultivos, así como condiciones que generan estrés, pudieran inducir cambios en los microorganismos (mutaciones), los cuales traen consigo alteraciones en su expresión fenotípica.

Otra observación interesante correspondió a que 6 cepas decarboxilaron lisina pero no fueron capaces de utilizar lactosa. Se ha descrito que alrededor de 10 % de los miembros de la especie no fermenta lactosa y que la categoría ECEI se caracteriza por no fermentarla.¹³

Al analizar los resultados de la biotipificación, los más frecuentes coinciden con los obtenidos en el LNR de EDA del IPK (hasta este momento no publicados); donde se detecta al biotipo 6 como el de mayor incidencia. Este método es considerado muy útil, porque complementa la identificación y caracterización de la especie, por lo tanto, su empleo pudiera constituir una alternativa viable en la diferenciación de las categorías de *E. coli* entéricas.⁸

La EHEC-hly, es un factor de virulencia que caracteriza a los serotipos de STEC y está codificada por un plásmido (pO157) de 60 MDa.^{2,13} En el presente trabajo se detectaron 6 cepas productoras de β -hemólisis, que revela la producción de esta enzima. Se han realizado trabajos donde se asocia la presencia de EHEC-hly con la producción de una o ambas citotoxinas: toxina Shiga 1 (Stx1) y toxina Shiga 2 (Stx2), factores de virulencia que confirman la categoría STEC. En algunos países de Europa se reporta que hasta 90 % de las cepas positivas a la ECEH-hly portaban y expresaban los genes (stx) que codifican para las toxinas Stx1 y Stx2.^{6,14}

Al relacionar la producción de ECEH-hly y la no utilización del sorbitol, se encontraron 6 cepas con al menos una de las características que conforman el diagnóstico presuntivo de STEC.

Numerosos estudios reportan que 95 % de *E. coli* O157:H7 no fermentan el sorbitol,¹⁰ en contraste, 94 % de *E. coli* pertenecientes a otros serotipos y categorías sí lo fermentan.^{12,13}

Es probable que las cepas de *E. coli* con características fenotípicas propias de la categoría STEC del presente estudio, pertenezcan a otros serotipos de la categorías denominados STEC no-O157, de los que se reportan en la actualidad más de 200 diferentes.⁴

El patrón AMP-TE-SMX que predominó, coincide con los resultados reportados por *Herrera* y otros¹⁵ en un estudio con muestras de 456 niños menores de 6 años de escuelas primarias y guarderías del estado de León (Guanajuato-México), que describieron el predominio de este patrón: ampicilina (52,63 %), tetraciclina (64,4 %) y trimetropin-sulfametoxazol (46,05 %). Solo no concuerdan los porcentajes obtenidos para la ampicilina y la tetraciclina (tabla 2), lo cual pudiera deberse entre otras causas, a la diferencia de las políticas trazadas en la dispensarización y el control de los antibióticos en cada país.¹⁵

La alta resistencia a la ampicilina encontrada, coincide con los obtenidos por *Omigie* y otros,¹⁶ así como con los reportados por *Aibinu* y otros en Nigeria.¹⁷

Frente al trimetropim-sulfametoxazol las cepas del ensayo mostraron valores de resistencia similares a los descritos por *Murray* y otros¹⁸ en una investigación realizada en Chile, Tailandia, Honduras, Costa Rica y Brasil, donde se reportaron niveles de 38 a 50 %.¹⁸

Los valores de MR en el presente estudio aparentemente fueron superiores a los obtenidos por *Herrera* y otros, quienes reportaron niveles de MR de 32,14 %. Teniendo en cuenta que estos investigadores consideraron MR a todas aquellas cepas resistentes a 5 antibióticos o más, se puede inferir que el porcentaje de MR debe ser mayor que el obtenido en nuestro trabajo.¹⁵

En diversas investigaciones se maneja el criterio de que cuando se reportan valores de resistencia por debajo de 10 o 15 %, estos antimicrobianos puede continuar formando parte de los que se sugieren para el uso clínico, por encima de estos valores se emite la alarma con la consiguiente recomendación de que no sean utilizados como primera línea de elección.^{19,20}

Se ha reportado un aumento gradual de la resistencia a quinolonas y paralelamente de la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).²¹ Se hace referencia a medicamentos muy utilizados en el tratamiento contra microorganismos gramnegativos. En Cuba los más usados son el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina. El primero es considerado de primera línea para enteritis causadas por *Shigella* spp. y otros enteropatógenos. La segunda hoy día es la más utilizada frente a los microorganismos gramnegativos. Quizás su mayor e irregular uso sean algunas de las causas que estén influyendo en el incipiente y gradual aumento de los niveles de resistencia y de susceptibilidad intermedia (tabla 2).

Se encontraron cepas con halos de inhibición = 27 mm para el aztreonam y ceftriaxona. Según las normas del CLSI 2006 aquellas cepas incluidas en ese rango se consideran microorganismos con una gran probabilidad de producir BLEE. Esto sugiere que las cepas que mostraron resistencia y susceptibilidad intermedia frente a esos antimicrobianos, sean productoras de estas enzimas.¹¹

Además se detectó la existencia de cepas sensibles a estos 2 antimicrobianos y que tuvieron halos de inhibición entre 22 y 27 mm, lo cual pudiera corresponderse con la zona de inhibición de BLEE.¹¹ Investigaciones recientes llevadas a cabo por *Camacho* y otros²² en Venezuela revelaron que 22,3 % de los aislamientos de *E. coli* incluidos en su estudio fueron sospechosos de portar BLEE, los resultados del actual trabajo mostraron un comportamiento similar con 20 % de cepas con probabilidades de producir esta enzima. Esto tal vez se deba a la existencia de determinados clones de este enteropatógeno que puedan estar circulando e interrelacionándose entre los países miembros del área de Centroamérica y el Caribe.²³

El augmentin es un antibiótico de reciente y reservado uso en la práctica médica en Cuba, estos resultados mostraron valores de resistencia y de susceptibilidad intermedia superiores a los obtenidos en Francia por *Sotto* y otros, quienes reportaron 20,3 %.²⁴

Los niveles de resistencia alcanzados en la actualidad por cepas de *E. coli* para algunos antibióticos, pudiera indicar la presencia de plásmidos transferibles, los que por causa de la

presión selectiva ejercida mediante el uso indiscriminado de los antibióticos en algunas regiones del mundo, estén diseminando este fenómeno a otras donde su uso es limitado controlado.²⁴

Las cepas que mostraron resistencia a los antimicrobianos AUG, AZT, SAM y CRO, independiente de la categoría de la especie a la que pertenecen, resaltan por el reservado uso que se les concede en Cuba a estos agentes. Otro aspecto de interés constituyen los valores de susceptibilidad intermedia mostrados en el estudio, sobre todo porque estos antibióticos son de reciente introducción en la práctica médica y su uso es reservado para casos clínicamente complicados.

El empleo de las 4 pruebas fenotípicas insertadas en el flujograma de identificación, constituyó un elemento clave para llegar al diagnóstico presuntivo de STEC, para ratificar su factibilidad y valor práctico.

Los altos niveles de resistencia frente a la ampicilina y el trimetropim-sulfametoxazol sugieren que no sean considerados como de primera línea en el tratamiento de infecciones entéricas por *E. coli*. Los valores de resistencia y de susceptibilidad intermedia registrados para el augmentin, aztreonam y ceftriaxona deben ser tomados en cuenta para evitar el progresivo incremento y la diseminación de cepas MR en el país. La realización sistemática de las pruebas de susceptibilidad debe aportar a los sistemas de salud datos confiables y actualizados, que permitan guiar las terapias empíricas.^{16,25}

Study of phenotypical and antimicrobial susceptibility markers in enteric *Escherichia coli* strains

SUMMARY

Forty strains of *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age with acute diarraeas, coming from different provinces of the country, were analyzed. Four important phenotypical determinants were tested: sorbosa, sorbitol, enterohemolysin and O157: H7 serology, in order to select those strains from enterohemorrhagic or Shiga toxin-producing category. Likewise, they were characterized by biotyping and antimicrobial susceptibility methods. The use of phenotypical tests showed six strains with presumptive characteristics, four of which were most likely to be Shiga toxin-producing strains. In antimicrobial susceptibility test, the strains showed high resistance mainly to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Another interesting finding were intermediate resistance and susceptibility

values to augmentin, aztreonam and ceftriaxone. There were 12 antimicrobial resistance patterns of which 10 were multi-resistant.

Key words: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, negative sorbital, Shiga toxin, STEC, enterohemolysin, antimicrobial susceptibility, microbiology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11:142-201.
- Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL. Microbiología y Parasitología Médicas. Ciudad de La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2001. p. 251-80.
- Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakria R, Wells JG, Bell BP, et al. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field electrophoresis and phage typing. J Clin Microbiol 1994;32:3013-7.
- Rivas M, Chinen I, Milwebsky E, Manfredi E, Deza N, Martínez E, et al. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR. Manual de Procedimientos. Buenos Aires-Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán"; 2005.
- Edwin M, Lennett EM. Manual de Microbiología. 3ra ed. Ciudad de La Habana: Edición Revolucionaria; 1982. p. 251-79.
- Ewing WA. Edwards and Swing's Identification of Enterobacteriaceae. 4ta ed. New York- Amsterdam- Oxford: Elsevier; 1986.
- Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pub Mex 2002;44:90-5.
- Crichton PB, Old CD. A miniaturized biotyping system for strains discrimination in *Escherichia coli*. Epidemiol Infect 1993;11:81-8.
- Beutin L, Prada J, Zimmerman S, Stephan R, Orskov Y, Orskov F. Enteromolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of *Escherichia coli* enteropathogenic (ECEP). Zbl Bakt Hyg A 1988;267:576-88.
- Blanco J, Blanco M. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, necrotoxigénicas, verotoxigénicas de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Diputación Provincial de Lugo; 1993.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M 100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2006.
- Farmer, JJ III. Enterobacteriaceae: introduction and identification, p. 438-449. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH ed., Manual of clinical microbiology, 6th ed. ASM Press, Washington, DC.; 1995.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiol 2004;2:123-40.
- Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. Med Microbiol Immunol 1994;183:13-21.
- Herrera L, Muñoz J, Medina H. *Escherichia coli* fecal resistente a antibióticos en niños sanos. ¿Inducción por uso de antibióticos? Rev Invest Clín 2002;54:108-12.
- Omigie O, Enweani IB, Ohenhen RE, Umolu IP, BenEdo-Osagie O. Bacteriological survey of wound infections in Benin City, Nigeria. Nig Ann Nat Sci 2006 (In press).
- Aibinu I, Adenipekun E, Odugbemi O. Emergence of quinolone resistance amongst *Escherichia coli* strains isolated from clinical infections in some Lagos state hospitals, in Nigeria. Nig J Health Biomed Sc 2004;3:73-8.
- Murray BE, Alvarado T, Kim KH, Vorachit M, Jayanetra P, Levine MM, et al. Increasing resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole among isolates of *Escherichia coli* in developing countries. J Infect Dis 1985;152:1107-13.
- OPS. Informe de Resistencia de las Américas. Geneva:PAHO/WHO/993; 1999.
- Jones R. Global Epidemiology of Antimicrobial Resistance among Community. Acquired and Nosocomial Pathogens: A Five-Year Summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). Semin Respir Crit Care Med 2004;24:121-34.
- Valverde A, Coque T, Sánchez P, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum- β lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004;42:4769-75.
- Camacho ML, Perozo MA, Castellano GM, Bermúdez NE, Harris SB. Métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Rev Soc Ven Microbiol 2004;24:132-9.
- Sotto A, De Boever C, Favor-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. J Clin Microbiol 2001; 39:438-44.
- Sherley M, Gardon DM, Collingon PJ. Evolution of multi-resistance plasmids in Australia clinical isolates of *Escherichia coli*. Microbiology 2004;150:1539-46.
- Blomberg B, Mwakagile D, Urassa W, Maselle S, Mashurano M, Digranes A, Harthug S, Langeland N. Surveillance of antimicrobial resistance at a tertiary hospital in Tanzania. BMC Public Health 2004;4:45.

Recibido: 20 de febrero de 2007. Aprobado: 9 de marzo de 2007.
Dr. Adalberto Águila Sánchez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" Autopista Novia del Mediodía, Km 6 ½, Ciudad de La Habana. Teléf.: 204 60 51. Fax: (537) 202 06 51. Correo electrónico: adalberto@ipk.sld.cu; adalberto@infomed.sld.cu