

# Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela, entre 2007 y 2009

Ana González\*  
Beatriz Nieves\*\*

\*Licenciada en Bioanálisis. Magister *Scientiae* en Microbiología Clínica. Doctorado en Ciencias Médicas Fundamentales (Mención Microbiología). Laboratorio de investigaciones en Bacteriología "Roberto Gabaldón". Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

\*\*Licenciada en Bioanálisis. Magister *Scientiarum*. Doctorado en *Philosophus Scientiarum*. Laboratorio de investigaciones en Bacteriología "Roberto Gabaldón". Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

**Correspondencia:** Dra. Ana Carolina González Romero. Laboratorio de investigaciones en Bacteriología "Roberto Gabaldón" Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Sector Campo de Oro. Edificio Gonzalo González Mérida 5101, Mérida, Venezuela. Teléfono: 0058-274-2403515. Correo electrónico: caro60005@hotmail.com

## RESUMEN

**Introducción:** el incremento en la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas es un grave problema para el tratamiento de las infecciones a nivel mundial. Sin duda uno de los factores que ha contribuido a este incremento, es la gran plasticidad que poseen para adquirir genes que le confieren resistencia a los antimicrobianos. **Objetivo:** determinar los patrones y genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de dos unidades del Hospital Universitario de los Andes Mérida. Venezuela en 2007 y 2009. **Materiales y Método:** evaluaron 39 cepas de *K. pneumoniae* aisladas en la unidad de alto riesgo neonatal y unidad de cuidados intensivos de adultos. La sensibilidad antimicrobiana se determinó mediante la prueba de difusión del disco y por E-test. La detección de los genes *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*, *arma*, *rmt*, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se realizó por PCR y posterior secuenciación. **Resultados:** el 100% de las cepas aisladas en 2007 portaban el gen *aac(6)-Ib*, mientras que el 57% de las cepas aisladas de la misma unidad y de la unidad de cuidados intensivos de adultos en el año 2009 portaban los genes de resistencia *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*. La resistencia a quinolonas se observó en el 88,8% de las cepas aisladas de la y portaban el gen *qnrB*. **Conclusiones:** la resistencia a los aminoglucósidos en las cepas aisladas en la unidad de alto riesgo neonatal estuvo mediada por los genes genes *aac(3)-IIa* y *aac(6)-Ib*. Mientras que la resistencia a quinolonas se presentó en las cepas aisladas de la unidad de cuidados intensivos de adultos mediadas por el gen *qnrB*. **MÉD.UIS. 2016;29(2):21-30.**

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*. Factores R. Quinolonas. Resistencia a Medicamentos.

## Aminoglycoside and quinolone resistance in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from two units of intensive care unit of the University of the Andes Hospital, Merida, Venezuela between 2007 and 2009

## ABSTRACT

**Introduction:** aminoglycoside and quinolone resistance is serious problem for the treatment of infections worldwide. Without doubt one of the factors that has contributed to the increase in the resistance in enterobacteria, is the great plasticity that possess the bacteria of this family to acquire genes that confers resistance to antimicrobials. **Objective:** to determine the patterns of resistance to aminoglycosides and quinolones in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from two intensive care units of the Universidad de los Andes, Merida, Venezuela. **Methods:** weevalvated with 39 *K. pneumoniae* strains isolated in neonatal high risk unit and adult intensive

care unit. Antibiotic susceptibility was tested by the disk diffusion method and by the E-test method. Detection of *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*, *arma*, *rmt*, *qnrA*, *qnrS* *qnrB* genes was carried out by PCR and subsequently sequenced. **Results:** 100 % of the strains isolated in 2007 were carriers of the gene *aac(6)-Ib*, while 57% of the strains isolated from the same unit and the in the year 2009 were carriers of resistance genes *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*. The resistance to quinolones were observed in the 88.8% of the strains of *Klebsiella* isolated from the AICU and were carriers the *qnrB* gene. **Conclusions:** the resistance to aminoglycosides in strains isolated in the neonatal high risk unit was mediated by genes *aac(3)-IIa* and *aac(6)-Ib*. While the resistance to quinolones was presented in the strains isolated from the adult intensive care unit mediated by the *qnrB* gene. **MÉD.UIS. 2016;29(2):21-30.**

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*. R Factors. Quinolones. Drug Resistance.

---

**¿Cómo citar este artículo?:** González A, Nieves B. Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela, entre 2007 y 2009. MÉD.UIS. 2016;29(2):21-30.

---

## INTRODUCCIÓN

El uso continuo e indiscriminado de los antimicrobianos en los hospitales y la falta de control para su uso por la población en general, ha llevado a la selección de microorganismos resistentes y por tanto, al incremento en la dificultad en el tratamiento de las infecciones por estos<sup>1</sup>. La resistencia a los aminoglucósidos ha sido reportada frecuentemente ligada a la de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya que las enzimas modificadoras suelen estar codificadas en plásmidos que portan genes codificadores de  $\beta$ -lactamasas<sup>2,3</sup>. La gentamicina es un aminoglucósido ampliamente utilizado para el tratamiento de las infecciones nosocomiales, como lo reportan varios estudios, los cuales describen brotes epidémicos causados por cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a este fármaco, con capacidad de diseminación horizontal mediante plásmidos conjugativos que pueden portar otros determinantes de resistencia<sup>4-6</sup>.

La resistencia a los aminoglucósidos puede presentarse por tres mecanismos principales: resistencia ribosómica, transporte insuficiente y modificación enzimática del antibiótico, siendo este último el mecanismo principal. Dicha resistencia es producida por diversas enzimas como acetilasas, adenilasas y fosfatasas, las cuales modifican los grupos hidroxilos o aminos en los residuos amiciclitol del antibiótico, originando un compuesto que tiene baja afinidad por el ribosoma bacteriano<sup>7</sup>. También se han descrito distintos genes responsables de la metilación postranscripcional del ARN ribosómico (*arma*, *rmt* o *npmA*) con una prevalencia moderada y geográficamente dependiente. En este estudio, la resistencia observada suele ser de alto nivel a todos los aminoglucósidos, excepto neomicina<sup>8</sup>.

Por otra parte, se ha observado que la incidencia de resistencia a las fluoroquinolonas también se ha incrementado en los últimos años en todas las especies bacterianas. Dicha resistencia se ha descrito, principalmente, en aislamientos nosocomiales. Desde 1998 se empezaron a describir mecanismos de resistencia de origen plasmídico, como la protección de la diana por proteínas *Qnr*, la modificación de las quinolonas por la acetiltransferasa *aac(6')-Ib-cr*, o las bombas de expulsión activa *QepA* y *OqxAB*<sup>9-12</sup>. La resistencia de los aminoglucósidos y quinolonas en las enterobacterias se ha convertido en un grave problema para el tratamiento de las infecciones causadas por estas bacterias en las unidades de cuidados intensivos en los hospitales a nivel mundial<sup>13-15</sup>. Debido a la escasa información en Venezuela acerca de la presencia de estos determinantes en cepas hospitalarias de enterobacterias, se propuso el presente estudio para determinar los diferentes patrones de resistencia a los aminoglucósidos y quinolonas, así como los genes que los codifican en las cepas de *K. pneumoniae* resistentes aisladas de dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de los Andes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 39 cepas de *K. pneumoniae* multiresistente aisladas de pacientes hospitalizados en las unidades de Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) y del medio ambiente durante los periodos de febrero a junio de 2007 y junio a noviembre de 2009, así como cepas de *K. pneumoniae* aisladas en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA), durante el periodo comprendido entre junio y noviembre de 2009 en el Hospital Universitario de los Andes. Como criterio de inclusión se consideró la

selección de todas las cepas de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas aisladas de ambos periodos en las diferentes unidades de cuidados intensivos y se excluyeron aquellas que presentaron un perfil de sensibilidad.

Se incluyeron cinco cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos hospitalizados en la UARN durante los meses de febrero y marzo de 2007 a consecuencia de un brote, así como siete cepas obtenidas durante el muestreo microbiológico que se realizó en la unidad para determinar la posible fuente de infección<sup>6</sup>. También se incluyeron cuatro cepas de *K. pneumoniae* aisladas posteriormente durante el mismo periodo.

Dos años después, de junio a noviembre de 2009, se realizó un nuevo muestreo en la UARN con los mismos criterios de selección para evaluar la evolución del brote, aislándose 14 cepas de *K. pneumoniae* de la sangre de los neonatos hospitalizados. Así mismo, con la finalidad de detectar la posible diseminación de cepas de *K. pneumoniae* multirresistente a otras unidades del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, también se incluyeron en este estudio nueve cepas con el mismo patrón de resistencia aisladas de pacientes ingresados en la UCIA de junio a noviembre de 2009<sup>16</sup>.

El procesamiento de las muestras y el estudio microbiológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica “Dr. Roberto Gabaldón”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia; y el estudio Molecular en el Laboratorio de Biomedicina Experimental (LABIOMEX) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.

La sensibilidad a los antimicrobianos se corroboró mediante la prueba de difusión de disco-placa en agar Mueller-Hinton. Los antibióticos probados fueron los siguientes: a) Quinolonas: ácido nalidíxico (30 µg BD BBL TM), ciprofloxacina (5µg BD BBL TM); b) Aminoglucósidos: gentamicina (10µg. BD BBL TM), amikacina (30µg. BD BBL TM), tobramicina (30µg. BD BBL TM), se utilizó como cepa control a *Escherichia coli* ATCC 25922. La concentración mínima inhibitoria se determinó por E-test (BioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones de la casa comercial; la sensibilidad de las cepas en estudio se interpretó mediante la aplicación de los puntos de corte del *Clinical Laboratory Standards Institute* (2013)<sup>17</sup>.

## CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCÓSIDOS Y QUINOLONAS

El aislamiento de ADN se realizó resuspendiendo en un tubo *eppendorf* una colonia de *K. pneumoniae* proveniente de un cultivo fresco en agar MH (no mayor de 18 horas) en 500 µl de agua destilada estéril. Se mezcló bien la solución y se colocó en baño María a ebullición por diez minutos. Luego se centrifugó a 12 000 rpm por diez minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo *eppendorf* de un mL y se almacenó a -20°C para su uso. Las mezclas de reacción de PCR para la caracterización de los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib* y metilasas (*armA*, *rmtA*, *rmtB*) y los de resistencia a quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*), se realizó en un volumen final de 25µL, que contuvo 13µL de agua destilada estéril, nueve microlitros de Econotaq<sup>R</sup> PLUS (Master mix), un µL de cada primer (un micromol) y un microlitros de ADN. Se utilizaron como controles positivos cepas previamente caracterizadas y como control negativo el empleo de una mezcla de los componentes de la reacción sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen. La amplificación de los distintos genes se llevó a cabo con los cebadores específicos y las siguientes condiciones (Ver Tabla 1).

Para detectar los productos de la amplificación se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa (Agarose for Routine Use, Sigma-Aldrich, USA) al 1% durante 60 minutos, a 100 voltios. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio (un µg/mL) en agua destilada. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN resultante, se utilizó un marcador de peso molecular con bandas de concentración definida *Gene Ruler*<sup>TM</sup>100bp DNA Ladder plus (MBI Fermentas). Los patrones resultantes se visualizaron por tansiluminación utilizando el Gel Doc EZ Imager con el software ImageLab (Bio-Rad) que permite visualizar las bandas en un ordenador y documentarlo fotográficamente.

## SECUENCIACIÓN

La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI3730XL Analyzer (AB Applied Biosystems) previa purificación del ADN amplificado obtenido en la PCR. Se utilizaron los cebadores de cada PCR a una concentración de diez micromol. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa

SeqMan analyse software DNA y la página web BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool)<sup>21</sup>.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico descriptivo por medio del programa estadístico SPSS para Windows versión 19, efectuando tablas de distribución de frecuencias y porcentajes simples de las variables objeto de investigación.

## RESULTADOS

En este estudio se trabajó con un total de 39 cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes aisladas de

neonatos y medio ambiente de la UARN así como también de pacientes hospitalizados en la UCIA en diferentes periodos de tiempo. El 100% de cepas aisladas de la UARN en 2007, se mostraron resistentes a los antibióticos betalactámicos, especialmente a las cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos con fenotipo de  $\beta$ LEE (+) además, se mostraron resistentes a los aminoglucósidos; antibióticos utilizados en el tratamiento empírico en la unidad. El 100% de las cepas aisladas en el 2007 eran resistentes a gentamicina y tobramicina con concentración mínima inhibitoria elevadas entre 128 y 64  $\mu$ g/ml, respectivamente, siendo estas cepas portadoras del gen *aac(3)-IIa* (Ver Tabla 2).

Tabla 1. Cebadores y condiciones utilizadas para la caracterización de los genes *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*, metilasas y *qnr*

PCR	Cebadores	Secuencias (5'-3')	Condiciones	Tamaño Producto (pb)	Referencias
Quinolonas	qnrA-F qnrA-R	5-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3 5-GATCGGCCAAAGGTTAGGTCA-3	95°C5'/95°C45''52°C45'',72°C 45''/72°C 10'/4°C. 30 ciclos	344	labadene y cols., 2008
	qnrB-F qnrB-R	5-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3 5-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3	95°C5'/95°C45'',52°C45'',72°C45''/ 72°C 10'/4°C. 30 ciclos	546	labadene y cols., 2008
	qnrS-F qnrS-R	5- ACGACATTCGTCAACTGCAA-3 5-TAAATTGGCACCTGTAGGC-3	95°C5'/95°C45'',52°C45'',72°C45''/ 72°C 10'/4°C. 30 ciclos	978	labadene y cols., 2008
Aminoglucósidos	aac(6)-Ib-F aac(6)-Ib-R	5-CATGACTGAGCATGACCTT-3 5-GAAGGGTTAGGCATCACT-3	95°C5'/95°C45'',52°C45'',72°C45''/ 72°C 10'/4°C. 30 ciclos	528	Leflon y cols., 2004
	aac(3)-IIa-F aac(3)-IIa-R	5-CAATAACGGAGGCAATTCG-3 5-GATTATCATTGTCGACGG-3	95°C5'/95°C45'',55°C45'',72°C45''/ 72°C 10'/4°C. 30 ciclos	868	Leflon y cols., 2004
	armA-F	5-CAAATGGATAAGAATGATGT-3	95°C5'/95°C45''55°C45'',72°C 45''/72°C 10'/4°C. 30 ciclos	776	Yan y cols., 2004
	armA-R	5-TTATTTCTGAAATCCACT-3			
	rmtA-F	5- CTAGCGTCCATCCTTTCTC-3	95°C5'/95°C45'',55°C45'',72°C45''/ 72°C 10'/4°C. 30 ciclos	635	Yan y cols., 2004
	rmtA-R	5-TTTGCTTCCATGCCCTTGCC-3			
	rmtB-F	5-ATGAACATCAACGATGCCCT-3	95°C5'/95°C45'',55°C45'',72°C45''/ 72°C 10'/4°C. 30 ciclos	769	Yan y cols., 2004
	rmtB-R	5- CCTTCTGATTGGCTTATCCA-3			

Fuente: Autores

Las 14 cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes aisladas de la sangre de los neonatos durante el 2009 mostraron antibiogramas diferentes a las cepas aisladas en el 2007 y en su mayoría con fenotipo de  $\beta$ LEE (+). También se mostraron resistentes a los aminoglucósidos, donde el 57% era resistente a gentamicina, amikacina y tobramicina, siendo portadoras de los genes *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa*. Además, es importante señalar que tres cepas eran portadoras del gen *armA*, siendo dos de estas, a su vez portadoras del gen *aac(6')-Ib* (Ver Tabla 2).

Por otro lado, el 88,8% de las cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes aisladas de pacientes con sepsis y neumonía hospitalizados en la UCIA eran productoras de  $\beta$ LEE. Adicionalmente, se observó que el 77,7% de las cepas eran resistentes a los tres aminoglucósidos probados, portando los genes *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa* (Ver Tabla 2).

En relación a la resistencia observada en ambas unidades a las quinolonas, el 100% de las cepas aisladas de la UARN en los dos periodos 2007 y 2009 se mostraron sensibles; mientras que el 88,8% cepas de *Klebsiella* aisladas de la UCIA se mostraron resistentes a las quinolonas con concentración mínima inhibitoria elevadas para ácido nalidíxico y ciprofloxacina; y portaban el gen *qnrB*. (Ver Tabla 3). Es importante destacar que ninguna de las cepas aisladas de ambas unidades en los dos periodos de tiempo portaba los genes de resistencia *qnrA*, *qnrS*, *rmtA* y *rmtB*.

## DISCUSIÓN

Numerosos estudios han explorado la relación entre el consumo de un antibiótico y la resistencia a este. Sin embargo, la existencia simultánea de distintos mecanismos de resistencia en las llamadas bacterias multirresistentes podría promover el fenómeno de co-selección, mediante el cual el uso de un antimicrobiano de alto consumo en el hospital seleccionaría subpoblaciones de bacterias resistentes a otros fármacos de estructura química diferente<sup>22</sup>. Los hospitales venezolanos no han estado ajenos a esta situación, por lo que el conocimiento de los mecanismos de resistencia, así como la ubicación de los genes implicados en dicha resistencia, proporcionan antecedentes importantes para entender la situación actual de la resistencia en el país, especialmente, si se consideran antibióticos de frecuente uso a nivel hospitalario como son las quinolonas, aminoglucósidos y los  $\beta$ -lactámicos.

El principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos es la producción de enzimas modificantes (acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas), las cuales han generando diferentes patrones de resistencia cada una. La coexistencia de más de una de estas genera patrones de resistencia a aminoglucósidos que dificultan la interpretación del antibiograma<sup>23,24</sup>. También se han descrito alteraciones en la dianas a nivel ribosómico o por metilación del 16s ARN, mediados en este último caso, por genes que codifican las metilasas de tipo *arm* o *rmt*<sup>25,26</sup>.

En este estudio se detectó resistencia a los aminoglucósidos, grupo de antibióticos utilizados en el tratamiento empírico en las unidades. Las cepas aisladas en el 2007 en la UARN mostraron el fenotipo de resistencia GEN<sup>R</sup>, TOB<sup>R</sup>, siendo portadoras del gen *aac(3)-IIa*<sup>6</sup>. Por otro lado, el 57% las cepas aisladas de la misma unidad en el año 2009 mostraron el fenotipo de GEN<sup>R</sup>, TOB<sup>R</sup>, AK<sup>R</sup> y portaban los genes de resistencia *aac(6)Ib* y *aac(3)IIa*, al igual que el 77,7% de las cepas de *Klebsiella* aisladas de la UCIA. Resultado que coincide con lo reportado en otros estudios como el realizado por Guzmán y cols<sup>4</sup> donde reportan una frecuencia del 72% para el fenotipo de resistencia (amikacina, tobramicina, kanamicina y gentamicina); este fenotipo es poco usual y su presencia puede sugerir que en las cepas existía una combinación de las enzimas AAC(6) I Y AAC(3)I.

Neonakis y cols.,<sup>27</sup> reportan que cuando existe esta asociación de enzimas se produce una combinación de amplio espectro capaz de inactivar a casi todos los aminoglucósidos disponibles, lo que coincide con los resultados de este estudio. Esta asociación es posible puesto que estas enzimas se pueden encontrar en plásmidos, asociadas a transposones e integrones y, ocasionalmente, pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano.

En otros estudios realizados en el Hospital Universitario de los Andes se han reportado que la resistencia de bacilos gramnegativos no fermentadores como *Acinetobacter* sp. a los aminoglucosidos, se ha ubicado en porcentajes que van de 25 a 100%<sup>28</sup>. En un trabajo llevado a cabo en el mismo centro hospitalario, se identificó un brote epidémico causado por *Acinetobacter* 13TU:RUH 1139, que resultaron portadores del gen que codifica para la enzima aph -(3')-VIa, lo cual explicó, en gran parte la resistencia observada ante amikacina, gentamicina y kanamicina<sup>29</sup>.

**Tabla 2. Fenotipos y enzimas modificadoras de aminoglucósidos y metilasas detectados en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los recién nacidos y adultos con infección nosocomial en la UARN y UCIA durante febrero-junio 2007 y junio-noviembre 2009**

Cepa Nº	Fecha	Sala	Muestra	CMI (µg/ml)			Fenotipo			Enzimas		
				GEN	AK	TOB	GEN	TOB	AK	AAC(3)IIA	AAC(6)IB	ArmA
1(20)	18/02/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
2(21)	19/02/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
3(22)	19/02/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
4(23)	19/02/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
5(24)	21/02/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
6(G.jabón)	27/02/2007	Depósito	Ambiente	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
7(T.jabón)	27/02/2007	UARN (t)	Ambiente	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
8(A.jabón)	27/02/2007	UARN (A)	Ambiente	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
9(B.jabón)	27/02/2007	UARN (B)	Ambiente	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
10 Manos	27/02/2007	Personal	Personal	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
11 Lavabo	27/02/2007	UARN (A)	Ambiente	≥ 128 (R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
12 Manilla	27/02/2007	UARN (A)	Ambiente	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
13 (259)	07/04/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤2(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
14 (263)	09/05/2007	UARN (T)	Sangre	≥ 256(R)	≤16(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
15 (268)	11/05/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 256(R)	≤16(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
16 (270)	16/06/2007	UARN (A)	Sangre	≥ 256(R)	≤16(S)	≥64(R)	R	R	S	+	-	-
17 (79)	18/06/2009	UARN (A)	Sangre	≤2(S)	64(R)	≥64(R)	S	R	R	-	+	-
18 (88)	19/06/2009	UARN(A)	Sangre	≥ 128(R)	64(R)	≥128(R)	R	R	R	-	-	+
19 (123)	21/06/2009	UARN(A)	Sangre	≥ 256(R)	64(R)	≤2(S)	R	S	R	+	-	-
20 (162)	25/06/2009	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
21 (164)	28/06/2009	UARN (A)	Sangre	≥64(R)	64(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
22 (218)	29/06/2009	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	64(R)	≥64(R)	R	R	R	-	+	+
23 (220)	13/07/2009	UARN (A)	Sangre	≥64(R)	64(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
24 (228)	17/07/2009	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	256(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
25 (234)	27/07/2009	UARN(B)	Sangre	≥64(R)	128(R)	64(R)	R	R	R	+	+	-
26 (416)	15/08/2009	UARN(T)	Sangre	≥ 256(R)	≥ 128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
27 (577)	20/08/2009	UARN (A)	Sangre	≥64(R)	≥64(R)	≥64(R)	R	R	R	-	+	+
28 (578)	23/08/2009	UARN (A)	LCR	≥ 256(R)	≥ 256(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
29 (580)	09/09/2009	UARN(T)	Sangre	≥64(R)	≥ 128(R)	≥128(R)	R	R	R	+	+	-
30 (620)	11/10/2009	UARN (A)	Sangre	≥ 128(R)	≤16(S)	≥64(R)	R	S	R	+	-	-
31 (09)	03/07/2009	UCIA	SB	≤2(S)	≥64(R)	≥64(R)	S	R	R	-	+	-
32 (016)	05/07/2009	UCIA	Sangre	≤1.5(S)	≤2(S)	≤1.5(S)	S	S	S	-	-	-
33 (022)	07/07/2009	UCIA	Sangre	≥ 256(R)	≥ 128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
34 (023)	21/07/2009	UCIA	Sangre	≥ 128(R)	≥ 128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
35 (025)	28/07/2009	UCIA	Sangre	≥64(R)	≥64(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
36 (028)	04/08/2009	UCIA	SB	≥ 128(R)	≥ 256(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
37 (040)	13/08/2009	UCIA	Sangre	≥64(R)	≥ 128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
38 (041)	16/11/2009	UCIA	SB	≥ 128(R)	≥ 128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-
39 (044)	25/11/2009	UCIA	Sangre	≥ 256(R)	≥ 128(R)	≥64(R)	R	R	R	+	+	-

GEN: Gentamicina, AK: Amikacina, TOB: Tobramicina, AAC(3) Acetiltransferasa (3), AAC(6): Acetiltransferasa (6), ARMA: Metilasas de tipo armA, CMI: Concentración Inhibitoria Mínima (S): Sensible, (R): Resistente. UCIA: Unidad de Cuidados Intensivos Adultos, UARN (A): Unidad de Alto Riesgo Neonatal sala A, UARN (B) Unidad de Alto Riesgo Neonatal sala B, UARN (T): Unidad de Alto Riesgo Neonatal Terapia, SB: Secreción Bronquial, LCR: Líquido Cefalorraquídeo

Fuente: Autores

**RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS Y QUINOLONAS EN CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AISLADAS EN DOS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES MÉRIDA, VENEZUELA, ENTRE 2007 Y 2009**

MAYO-AGOSTO

**Tabla 3. Fenotipos de resistencia a quinolonas y genes *qnrB* detectados en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los recién nacidos y adultos con infección nosocomial en la UARN y UCIA durante febrero-junio 2007 y junio-noviembre 2009**

Cepa Nº	Fecha	Muestra	Sala	CMI (µg/ml)		CIP	NA	Gen <i>qnrB</i>
				NA	FENOTIPO CIP			
1 (24)	18/02/2007	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
2 (25)	19/02/2007	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
3 (26)	19/02/2007	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
4 (27)	19/02/2007	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
5 (28)	21/02/2007	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
6(G. jabón)	27/02/2007	Ambiente	Depósito	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
7(T. jabón)	27/02/2007	Ambiente	UARN (T)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
8(A. jabón)	27/02/2007	Ambiente	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
9(B. jabón)	27/02/2007	Ambiente	UARN (B)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
10 Manos	27/02/2007	Personal	Personal	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
11 Lavabo	27/02/2007	Ambiente	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
12 Manilla	27/02/2007	Ambiente	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
13 (263)	09/05/2007	Sangre	UARN (T)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
14 (268)	11/05/2007	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
15 (270)	16/06/2007	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
16 (273)	20/07/2007	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
17 (79)	18/06/2009	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
18 (88)	19/06/2009	Sangre	UARN(A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
19 (123)	21/06/2009	Sangre	UARN(A)	≤1.5 (S)	≥0.06(S)	S	S	-
20 (162)	25/06/2009	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
21 (164)	28/06/2009	Sangre	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
22 (218)	29/06/2009	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
23 (220)	13/07/2009	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
24 (228)	17/07/2009	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
25 (234)	27/07/2009	Sangre	UARN(B)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
26 (416)	15/08/2009	Sangre	UARN(T)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
27 (577)	20/08/2009	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
28 (578)	23/08/2009	LCR	UARN (A)	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
29 (580)	09/09/2009	Sangre	UARN(T)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
30 (620)	11/10/2009	Sangre	UARN (A)	≤1.5(S)	≤0.06(S)	S	S	-
31 (09)	03/07/2009	SB	UCIA	≥64(R)	≥64(R)	R	R	+
32 (016)	05/07/2009	Sangre	UCIA	≤2(S)	≤0.06(S)	S	S	-
33 (022)	07/07/2009	SB	UCIA	≥64(R)	≥16(R)	R	R	+
34 (023)	21/07/2009	Sangre	UCIA	≥128(R)	≥64(R)	R	R	+
35 (025)	28/07/2009	Sangre	UCIA	≥64(R)	≥64(R)	R	R	+
36 (028)	04/08/2009	SB	UCIA	≥64(R)	≥128(R)	R	R	+
37 (040)	13/08/2009	Sangre	UCIA	≥128(R)	≥128(R)	R	R	+
38 (041)	16/11/2009	Sangre	UCIA	≥64(R)	≥128(R)	R	R	+
39 (044)	25/11/2009	Sangre	UCIA	≥128(R)	≥128(R)	R	R	+

NA: Ácido Nalidíxico, Cip: Ciprofloxacina, CMI: Concentración Inhibitoria Mínima (S): Sensible, (R): Resistente  
Fuente: Autores

En el presente trabajo, es importante destacar que tres cepas aisladas de la UARN durante el año 2009 eran portadoras del gen *armA*, dos de estas portaban también el gen *aac(6')Ib* y presentaron el fenotipo de resistencia GEN<sup>R</sup>, TOB<sup>R</sup>, AMK<sup>R</sup>. Otros reportes describen la asociación entre metiltransferasas y  $\beta$ LEE, siendo especialmente notable el caso de *ArmA* y *RmtB* con CTX-M-3<sup>30</sup>. En este estudio se detectó la asociación de *ArmA* con  $\beta$ -lactamasas CTX-M-15 y CTX-M-2. La frecuencia de genes que codifican metiltransferasas en *K. pneumoniae* fue baja (7,6%) en este trabajo, lo que coincide con estudios reportados en Taiwan y Shanghai, donde se han registrado prevalencias de 0,4 % y 3,4 % respectivamente<sup>31</sup>.

En América Latina se han reportado varios estudios donde se han detectado estas enzimas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, en Brasil se describe la enzima *RmtB* en cepas de *E. coli* y *Proteus mirabilis*, también se ha reportado la enzima *RmtD* en Chile en aislados de *Enterobacter cloacae* y *K. pneumoniae* y en Argentina, en cepas de *K. pneumoniae*<sup>32</sup>. En relación a la resistencia observada en ambas unidades a las quinolonas se puede decir que las cepas aisladas de la UARN en los dos periodos 2007 y 2009 se mostraron sensibles. Mientras que el 88,8% de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de la UCIA eran resistentes y presentaron concentración mínima inhibitorias (entre 64-128  $\mu$ g/mL) elevada a las quinolonas probadas, ácido nalidixico y ciprofloxacina.

Entre los DPRQ descritos en enterobacterias a nivel mundial y en América Latina, se encuentran las proteínas Qnr (A, S, B, C y D), las bombas de expulsión QepA y OqxAB y la variante de la aminoglucósido acetil transferasa AAC(6')-Ib, denominada AAC(6')-Ib-cr, capaz de acetilar ciprofloxacino y norfloxacino, además de amikacina, tobramicina y kanamicina<sup>33-39</sup>. Los determinantes QnrA, QnrB y QnrS han sido identificados mundialmente en varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y son frecuentemente relacionados a  $\beta$ LEEs, MBLs y a enzimas AmpC mediadas por plásmidos<sup>40-42</sup>. En este estudio, el 88,8% de las cepas de *Klebsiella* aisladas de la UCIA eran portadoras del gen *qnrB* y a su vez, portaban genes que codificaban  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M-2, CTX-M-15 y SHV-12.

Este es el segundo estudio realizado en el país donde se reportan la presencia de estos genes. El primero realizado por González y cols.<sup>43</sup>, quienes identifican los genes *qnrB* en el 4,7% de las cepas de

*Salmonella* aisladas de heces de pacientes pediátricos y muestras de carne de pollo, y el presente estudio que reportaba presencia de estos genes en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae* aisladas en la UCIA del Hospital Universitario de los Andes.

Con la proliferación de cepas multirresistentes, el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por *K. pneumoniae* es aún mayor, ya que al ser más difíciles de tratar, dan lugar a incrementos de las tasas de mortalidad, de las estancias hospitalarias y de los costos de atención. De allí la importancia de este estudio que se basa en dar a conocer la existencia simultánea de distintos mecanismos de resistencia en bacterias intrahospitalarias lo que promueve el fenómeno de co-selección, mediante el cual el uso de un antimicrobiano de alto consumo en el hospital seleccionaría subpoblaciones de bacterias resistentes a otros fármacos de estructura química diferente. Los hospitales venezolanos no han estado ajenos a esta situación, por lo que el conocimiento de los mecanismos de resistencia, así como la ubicación de los genes implicados en dicha resistencia, proporcionan antecedentes importantes para entender la situación actual de la resistencia en el país, especialmente, si se consideran antibióticos de frecuente uso a nivel hospitalario como son las quinolonas, aminoglucósidos y los  $\beta$ -lactámicos.

## CONCLUSIONES

Debido a la resistencia observada ante los aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de los Andes mediadas por los genes *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib*, *amrA* y *qnrB* respectivamente se concluye que es indispensable vigilar continuamente la diseminación genética de dicha resistencia en las unidades de alto riesgo del Hospital Universitario de los Andes. Por lo que se recomienda realizar estudios de vigilancia epidemiológica, con el fin de racionalizar el uso de antimicrobianos de amplio espectro basados en la epidemiología local y en los mecanismos de resistencia y realizar el seguimiento del comportamiento de la resistencia bacteriana a betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas en las diferentes áreas de atención de la salud del Hospital para así establecer medidas de prevención de la propagación de dichos mecanismos.



## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio cumple con las normas de Bioética y Bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología y las normas para la investigación biomédica con humanos del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## FINANCIAMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología en el marco del Programa de Estimulo a la Innovación e Investigación (PEII) N° 2012001234 por la financiación del estudio.

Al consejo de desarrollo científico humanístico y tecnológico (CDCHT) de la universidad de Los Andes. Proyecto código (FA-471-10-03-A).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso G, Narvaez P, Toba F, Gomes C, Pedroza R, Rodríguez V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 2005; 25(1)
- Lipsitch M, Matthew H. Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance: A population perspective. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(4):347-54
- Machado E, Coque T, Cantón R, Novais A, Sousa J, Baquero F, et al. High Diversity of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases Among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 60(6): 1370-1374.
- Guzmán M, Alonso G. Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido ( $\beta$ LEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. *Invest Clin.* 2009; 50(4):419 - 431.
- Araque M, Rivera I. Simultaneous presence of blaTEM and blaSHV genes on a large conjugative plasmid carried by extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med Sci.* 2004; 327(3):118-22.
- González A, Gil F, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Suárez M, Nieves B. Brote por *Klebsiella pneumoniae* multiresistente y productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. *Rev Chil Infect.* 2011; 28 (1): 28-34.
- Tolmasky M, Bonomo R. Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM Press; Washington, DC: 2007.
- Navarro F, Calvo R, Canton R, Fernandez F, Mirellis B. Phenotypic detection of resistance mechanisms in microorganisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29 (7):524-534.
- Jacoby GA. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(2):120-126.
- Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Sciencet.* 2008; 321(5887):365-7.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-Mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(4):664-89.
- Giamarellou H. Aminoglycosides plus beta-lactams against gram-negative organisms. Evaluation of in vitro synergy and chemical interactions. *Am J Med.* 1986;80(6B): 126-137.
- Abreu S, Varela Y, Millán B, Araque M. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario. *Enf Inf Microbiol.* 2014;34(3):92-9.
- Espinal P, Mantilla J, Saavedra C, Leal A, Alpuche C, Valenzuela E. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido. *Biomédica.* 2004;24(3):252-61
- Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benítez M, Domínguez M, Pedroza R. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Health Centres of Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2006;26:80-8.
- González A, Nieves B, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Moreno M. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of two intensive care units. *Rev Chil Infect.* 2013;30(4):374-80.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21th informational supplement. Document M100-S23. 2013;31(1).
- Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, Duportail F, et al. Emergence and Spread of Three Clonally Related Virulent Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* with Variable Resistance to Aminoglycosides and Tetracycline in a French Geriatric Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3736-42.
- Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, et al. Plasmid mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(6):1007-12.
- Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, et al. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(1):133-6.
- Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelm I, Orden B, et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2359-66.
- Ángel-Díaz M, Ramón-Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (Proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(9):503-10.
- Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agent Chemother.* 2000;44(12):3249-56.
- Houghton JL, Green KD, Chen W, Carneau-Tsodikova S. The Future of Aminoglycosides: The End or Renaissance. *Chembiochem.* 2010;11(7):880-902.
- Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid Mediated 16S RNA Methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance aminoglycosides. *Antimicrob Agent Chemother.* 2004;48(2):491-6.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S RrRNA methylation. *Antimicrob Agent Chemother.* 2003;47(8):2565-71.
- Neonakis A, Scoulica E, Manios A, Georgiladakis A, Tselentis Y. Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(5):526-31.
- Briceno I, Suarez M. Resistencia bacteriana en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes. *MEDICRIT.* 2006;3:30-42.
- Salazar E, Nieves B, Guzmán M, Albarado L, Láreza I, González D. Determinación del gen que codifica la enzima APH-(3')-Via en aislamientos de *Acinetobacter* 13TU:RUH1139 de origen hospitalario. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2013;33:6-12.
- Isturiz R. Global resistance trends and the potential impact on empirical therapy. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(4):201-6.
- Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital.

- Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(4):1223-7.
32. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of Methyltransferases Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob. Agent Chemother.* 2008;52(5):1843-5.
  33. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1178-82.
  34. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(12):3992-7.
  35. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')Ib-cr in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1003-6.
  36. Cambau E, Lascols C, Sougakoff V, Bébéar C, Bonnet R, Cavallo JD, et al. Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(10):1013-20.
  37. Martínez-Martínez L, Cano M, Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(5):685-711.
  38. Castanheira M, Pereira A, Nicoletti A, Pignatari A, Barth A, Gales A. First report of plasmid-mediated qnrA1 in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1527-9.
  39. Rodríguez-Martínez J, Conejo M, Díaz de Albal P, López-Cerero L, Fernández Echaurib P, Pascuala A. Asociación en un mismo plásmido de blaVIM-1 y qnrS2 en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas en Sevilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(5):246-8.
  40. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy C, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):394-7.
  41. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001;7(2):337-41.
  42. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Sakae K. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):801-3.
  43. González F, Pallecchi L, Rossolini GM, Araque M. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrB19 in nontyphoidal *Salmonella* enteric strains isolated in Venezuela. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6(5):462-4.