

Biomédica 2006;26:408-14

COMUNICACIÓN BREVE

Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano

José Ramón Mantilla¹, María Teresa Reguero¹, Elsa Beatriz González¹, Ibonne Ayde García¹, Aura Lucía Leal², Paula Andrea Espinal³, Celia Alpuche⁴, Ismael Alberto Valderrama⁵, Martha Isabel Garzón⁵, Narda María Olarte⁵

¹ Grupo de Epidemiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

² Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

³ Universidad del Sinú, Montería, Colombia.

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.

⁵ Empresa Social del Estado (ESE) Hospital El Tunal, Bogotá D.C., Colombia.

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Epidemiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.

Introducción. La caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* es una herramienta que contribuye a disminuir la diseminación de la resistencia y al control de las infecciones nosocomiales causadas por este patógeno.

Objetivo. Describir molecularmente un brote de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* en la Unidad de Cuidado Intensivo Neonatal de un hospital de tercer nivel de Bogotá.

Materiales y métodos. Se analizaron once aislamientos. Se verificó la producción de beta-lactamasas de espectro extendido mediante pruebas de difusión en agar. Se determinaron los puntos isoeléctricos de las betalactamasas mediante isoelectroenfoque. Se detectó el gen *bla*_{CTX-M-12} por PCR y se realizó genotipificación mediante BOX-PCR y electroforesis en gel con campos pulsados (PFGE).

Resultados. Los aislamientos fueron productores de beta-lactamasas de espectro extendido. La genotipificación por PFGE y por BOX-PCR, agrupó a dos aislamientos provenientes de objetos hospitalarios y a los ocho aislamientos causantes de infección en un grupo clonal epidémico. El aislamiento proveniente de un termómetro no fue agrupado en el grupo clonal epidémico y mostró un patrón de resistencia diferente. Se observó la producción simultánea de beta-lactamasas con diferentes puntos isoeléctricos. La PCR reveló el gen *bla*_{CTX-M-12} en los 11 aislamientos estudiados.

Conclusión: Este es el primer informe en Colombia de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12, caracterizado molecularmente. Este estudio da evidencia adicional de la diseminación global de BLEE de tipo CTX-M y alerta sobre la necesidad de actividades específicas de prevención para cortar la cadena de transmisión y del seguimiento de tipo epidemiológico en nuestros centros hospitalarios.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, beta-Lactamasas, infección hospitalaria, Resistencia a Antibióticos, Cefalosporinas, Tipificación Bacteriana.

Molecular characterization of an outbreak caused by CTX-M-12-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital's neonatal intensive care unit

Introduction. Molecular characterisation of *Klebsiella pneumoniae* strains is a tool that assists in the reduction of the dissemination of drug resistance and the control of nosocomial infections that are caused by this pathogen.

Objective. Molecular description of an outbreak of nosocomial infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in a tertiary level hospital in Bogotá.

Methods: Eleven *Klebsiella pneumoniae* isolates were analysed. Production of Extended Spectrum Beta-Lactamases was verified by agar diffusion tests. Isoelectric points of the enzymes were determined by isoelectric focusing. The *bla*_{CTX-M-12} gene was detected by PCR and pulsed field gel electrophoresis genotyping was done.

Results. All the isolates were Extended Spectrum Beta-Lactamase producers. Pulsed field gel electrophoresis and BOX-PCR genotyping grouped two isolates from hospital objects and eight infection-causing isolates into a single epidemic clone. The isolate from a thermometer was not grouped into the epidemic clone and showed a different resistance pattern. Isoelectric focusing revealed simultaneous beta-lactamase production having different isoelectric points. PCR amplification revealed the presence of the *bla*_{CTX-M-12} gene in the 11 isolates studied.

Conclusion. This is the first report of a molecularly characterised outbreak of CTX-M-12-producing *Klebsiella pneumoniae* from Colombia. The results of this study provide additional evidence of the global dissemination of CTX-M ESBL and the need for epidemiological follow-up in our hospitals.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, beta-Lactamases, Cross Infection, Drug Resistance, Cephalosporins, Bacterial Typing Techniques.

Algunos de los resultados del presente artículo fueron presentados en la modalidad de póster en el *FIS 2005 Annual Meeting* (Federation of Infection Societies – Cardiff 7 – 9 de noviembre de 2005)

Los avances tecnológicos que han permitido la atención de recién nacidos de peso y edad gestacional cada vez menores han traído consigo un aumento en el riesgo de infecciones nosocomiales. Entre los agentes causales de este tipo de patologías se encuentra *Klebsiella pneumoniae*, patógeno que se asocia con altas tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos (1). Esta bacteria produce con frecuencia betalactamasas del tipo TEM o SHV (2,3); sin embargo, en los últimos años se ha informado la producción por *K. pneumoniae* de cefotaximasas (CTX-M). Las enzimas CTX-M son una nueva familia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que muestran mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y aztreonam que frente a ceftazidima (4).

Este artículo describe un brote de infección nosocomial causado por *K. pneumoniae* con fenotipo de cefotaximasas en una unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital de tercer nivel

de Bogotá. Con el fin de generar información útil en la formulación de estrategias de prevención y control de infecciones intrahospitalarias se caracterizaron molecularmente los aislamientos de *K. pneumoniae* asociados al brote.

Materiales y métodos

Descripción del brote

En una unidad de cuidado intensivo neonatal (UCIN) dotada con 24 camas en un hospital de tercer nivel de complejidad se presentó una sospecha de brote de sepsis de origen nosocomial entre la última semana de enero y la primera semana de marzo de 2001. Se identificaron 11 pacientes con deterioro clínico y paraclínico de tipo infeccioso con distermia, leucocitosis y trombocitopenia. Sus edades oscilaban entre uno y 25 días de nacido. La edad gestacional al nacimiento varió entre 29 y 40 semanas; el 50% de los pacientes tenía menos de 35 semanas y peso inferior a 1.600 g. En ocho de ellos se aisló en hemocultivo *K. pneumoniae* con potencial productor de BLEE. Ante esta situación, el comité de vigilancia epidemiológica del hospital tomó medidas inmediatas con el fin de cortar la cadena de transmisión del agente causal, modificar los factores de riesgo y aplicar la intervención terapéutica adecuada. La estrategia se basó en el reforzamiento del lavado de manos y la adopción de precauciones de aislamiento; se restringió el uso de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y se realizó educación intensificada global y por competencias en el área.

Correspondencia:

José Ramón Mantilla Anaya, Instituto de Biotecnología, Edificio Manuel Ancizar, Universidad Nacional de Colombia, avenida 30 No. 45 – 03, Bogotá, D. C.
Teléfono: 3165000 ext 16965, fax: 3165415
jrmantillaa@unal.edu.co

Recibido: 13/12/05; aceptado: 13/06/06

Además, se tomaron muestras de elementos (termómetro, careta y pesa bebés) potencialmente involucrados en la transmisión del patógeno identificado (cuadro 1).

Aislamientos bacterianos

Se estudiaron 11 aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de ocho pacientes diferentes y de tres fuentes inanimadas (cuadro 1), los cuales fueron identificados en el laboratorio del hospital por el sistema automatizado MicroScan y confirmados con el sistema comercial API 20E (BioMérieux).

Pruebas de susceptibilidad

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por la técnica de difusión en agar según las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute – antes NCCLS), con discos de amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, piperacilina/tazobactam, imipenem, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam (Oxoid). Para confirmar la producción de BLEE se utilizó la técnica de disco combinado (5) con discos de cefotaxima y ceftazidima solos y en combinación con ácido clavulánico (Oxoid). Se emplearon como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922 y como control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (productora de BLEE).

Análisis de betalactamasas por isoelectroenfoque

Los valores de los puntos isoeléctricos (pI) de las betalactamasas presentes en extractos obtenidos por sonicación se determinaron por isoelectroenfoque (IEF) en el Phast System (Pharmacia) sobre geles de poliacrilamida con rangos de pH entre 3,5 y 10 y se compararon con betalactamasas de pI conocidos (5,4 [TEM-1], 7,0 [SHV3], 7,6 [SHV-1], 7,8 [SHV-7], 8,2 [SHV-5] y 9,0 [TLA-1]), las cuales fueron amablemente suministradas por la doctora Celia Alpuche de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Detección por PCR de genes que codifican para cefotaximasas (CTX-M) y análisis de secuencia

Para la detección de genes *bla*_{CTX-M} se utilizaron condiciones e iniciadores de amplificación previamente descritos: CTX-MA y CTX-MB para genes de grupo CTX-M-1 (6); Toho-1A y Toho-1B para el grupo CTX-M-2 (7), y C1 y C2 para el grupo CTX-M-9 (8). La secuenciación directa de los productos de PCR se realizó en un secuenciador automático ABI Prism 3700 (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). Posteriormente se realizaron alineamientos comparativos con secuencias de cefotaximasas informadas en el GenBank con la ayuda del software Clustal W versión 1.81.

Cuadro 1. Información epidemiológica y bioquímica de los aislamientos de *K. pneumoniae*.

Aisl.	Sexo	Fecha de recolección	Servicio	Fuente	Dx	PI
1	M	25/01/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
2	F	25/01/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
3	M	26/01/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
4	F	30/01/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
5	F	13/02/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
6	M	18/02/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
7	M	20/02/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
8	M	4/03/02	UCIN	Hemocultivo	Sepsis	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
9	NA	4/02/02	UCIN	Termómetro	NA	5,4; 7,4; 8,2
10	NA	4/02/02	UCIN	Pesa	NA	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
11	NA	22/02/02	UCIN	Careta	NA	5,4; 7,4; 7,6 7,8; 8,2
12	F	29/07/01	Urgencias*	Hemocultivo	Sepsis	NA
13	M	24/06/01	Urgencias*	Hemocultivo	Sepsis	NA

Aisl: aislamiento; Dx: diagnóstico de la infección; PIs: puntos isoelectricos de betalactamasas; NA: no aplica; * Hospital Universitario Clínica San Rafael de Bogotá, Colombia.

Genotipificación

La tipificación mediante BOX-PCR se realizó con el iniciador BOXA1R 5'-TACGGCAAGGCGACG CTGACG en las condiciones de amplificación previamente descritas (9). Los productos amplificados se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con *buffer* TBE 0,5 X durante 3 horas a 4,6 V/cm. Con el fin de verificar los resultados de la tipificación con BOX-PCR se utilizó el procedimiento de PFGE siguiendo la metodología descrita por Miranda (10). Se digirió con la enzima *Xba*I (10 U/mcl) (Gibco BRL) durante 18 horas. Los fragmentos generados se separaron en gel de agarosa PFGE (Bio-Rad) al 1% y *buffer* TBE 1X en el equipo para campos pulsados CHEF-DR III (Bio-Rad) con pulsos de 5 a 60 segundos por 20 horas a 200 voltios.

Los patrones electroforéticos registrados en el Gel-Doc System de Bio-Rad se analizaron con el software NTSYSpc versión 2.0. Se generó una matriz de similitud basada en la presencia y ausencia de bandas y luego se creó un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). Los resultados se interpretaron de acuerdo con los criterios de Tenover y Malathum (11,12).

Resultados

Con base en los criterios de CLSI, todos los aislamientos fueron potenciales productores de betalactamasas con un perfil de resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, pero sensibilidad a ceftazidima. El aislamiento proveniente de un termómetro fue también resistente a este último antibiótico y a piperacilina/tazobactam, cefepima y amikacina. La presencia de betalactamasas de espectro extendido se confirmó en todos los casos. Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana revelaron que todos los aislamientos fueron sensibles a gentamicina, ciprofloxacina e imipenem, 10 de 11 a piperacilina/tazobactam y a cefepima, y 6 de 11 a amikacina.

En el análisis por isoelectroenfoque, la muestra proveniente del termómetro produjo tres betalactamasas con puntos isoeléctricos 5,4, 7,4 y 8,2. Los demás aislamientos expresaron dos

betalactamasas adicionales con pI 7,6 y 8,9 y ausencia de la betalactamasa con pI 8,2 (cuadro 1).

La PCR con iniciadores para el grupo CTX-M 1 produjo un fragmento de 550 pb en todos los aislamientos. Con los otros iniciadores no se observaron productos de amplificación.

El alineamiento de las secuencias amplificadas de los 11 aislamientos de *K. pneumoniae* mostró 100% de similitud entre ellas y con la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 213 y 747 del gen *bla*_{CTX-M-12} (número de acceso en el Gen Bank AF305837) (13).

Diez de los once aislamientos estudiados conformaron un grupo estrechamente relacionado genéticamente (grupo clonal epidémico), como se observa en las figuras 1 y 2.

La agrupación resultante por BOX-PCR fue similar a la obtenida mediante PFGE.

Ninguno de los procedimientos de genotipificación estableció relación genética entre el aislamiento proveniente del termómetro y el grupo clonal epidémico (figuras 1 y 2).

Discusión

En las últimas dos décadas la emergencia y diseminación de *K. pneumoniae* productora de BLEE ha convertido a este patógeno en un reto tanto para el manejo de antimicrobianos como para la prevención y el control de las infecciones nosocomiales (1).

Dadas sus características inmunológicas, los neonatos son susceptibles a adquirir enfermedades infecciosas de origen intrahospitalario por patógenos como *K. pneumoniae*, el cual posee la capacidad de diseminarse rápidamente, causando brotes de infección nosocomial (1).

Mediante técnicas moleculares, este trabajo confirmó la presencia de un brote de infección nosocomial causado por un clon de *K. pneumoniae* productora de BLEE y el análisis microbiológico retrospectivo de los aislamientos puso en evidencia la posible presencia de cefotaximasas, enzimas que se han asociado con brotes epidémicos (13,14). El primer informe de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en Colombia se dio a conocer en el VI Congreso de Enfermedades

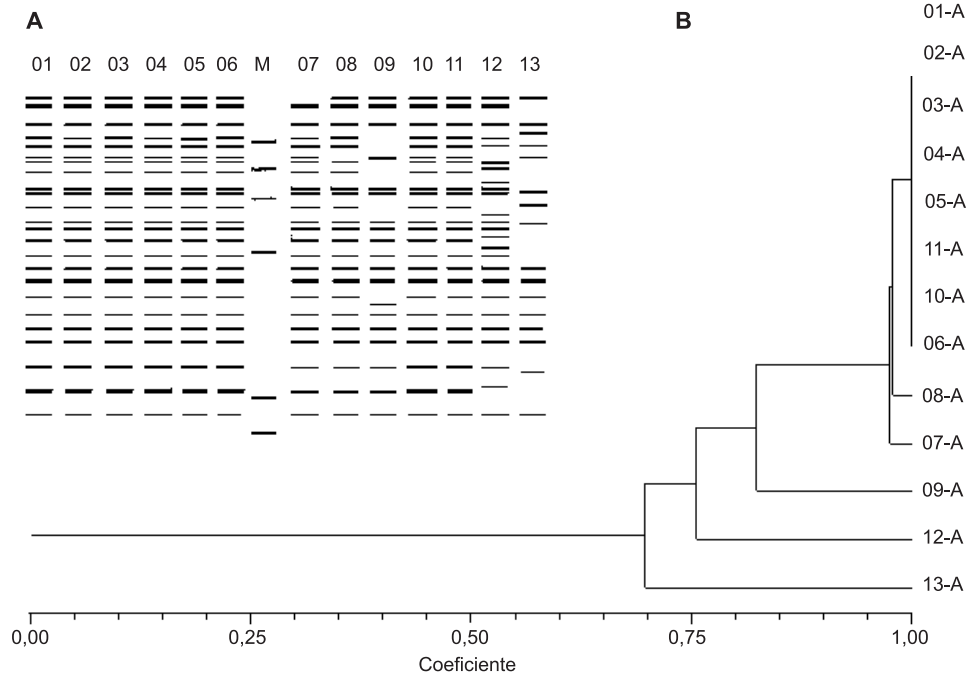


Figura 1. A: Patrones electroforéticos de tipificación por BOX-PCR de aislamientos de *K. pneumoniae*. Carriles 01 a 11: aislamientos del brote; carriles 12 y 13: cepas de *K. pneumoniae* utilizadas como controles del procedimiento; carril M: marcador de peso molecular, ØX174 RFDNA/*Hae*III (Invitrogen®). **B:** dendrograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA.

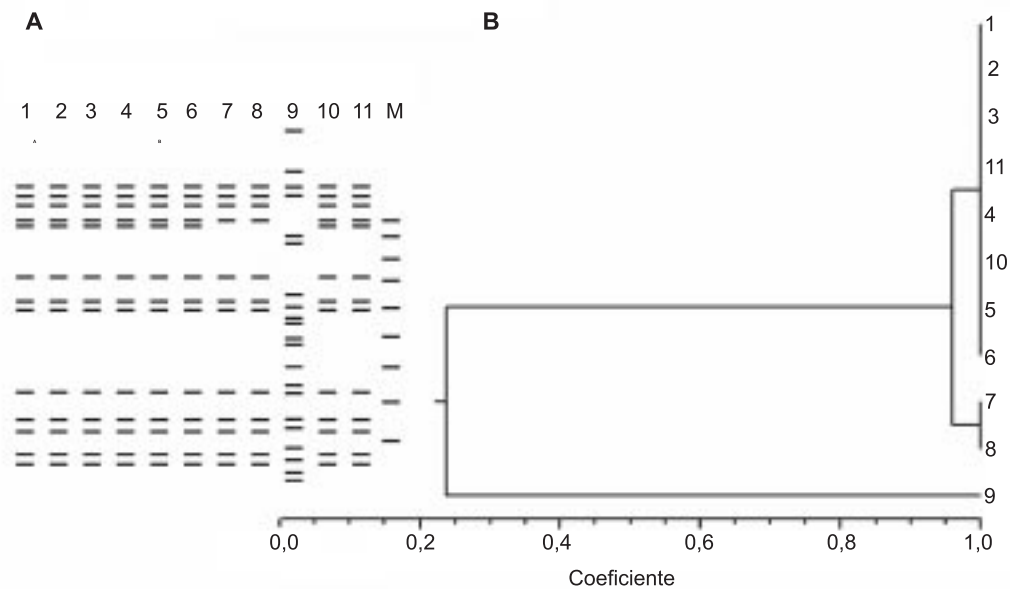


Figura 2. A: Patrones electroforéticos de tipificación por PFGE de aislamientos de *K. pneumoniae*. Carriles 1 a 11: aislamientos del brote; carril M: marcador de peso Lambda DNA ladder (Bio.Rad®). **B:** dendrograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA.

Infeciosas (Cartagena-2003). Posteriormente se informó sobre la detección del gen bla_{CTX-M} en uno de siete aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* productores de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 (15). En otro trabajo realizado por nuestro grupo se detectaron cefotaximasas del mismo tipo en aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos de pacientes con infección intrahospitalaria de cuatro centros hospitalarios de tercer nivel de Bogotá, resultado que sugiere una posible diseminación de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en nuestro medio (Mantilla JR, Valenzuela EM, González EB, Méndez AM, Leal AL, Sierra P, *et al.* Alta prevalencia de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en *Enterobacteriaceae* asociadas con infección intrahospitalaria en Bogotá. Resumen de trabajo presentado en el IV Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Infectio 2004; 8:143).

La enzima CTX-M-12 descrita en el 2001 en Kenia fue aislada de una cepa de *K. pneumoniae* causante de brote infeccioso en UCIN (13). La presencia de esta cefotaximasa en nuestro medio puede ser producto de la diseminación global del mismo gen (3), o puede provenir de un gen ancestral diferente como se ha demostrado para otras enzimas del grupo CTX-M-1 (14). La proliferación de estas enzimas en *Enterobacteriaceae* puede tener importantes implicaciones para el diseño de esquemas de tratamiento eficaces, así como para los laboratorios de microbiología de los centros hospitalarios, ya que deben tener la capacidad de ofrecer resultados específicos con el fin de tomar medidas de control oportunas que eviten brotes epidémicos.

La detección por PCR de genes bla_{CTX} fue concordante con el fenotipo de cepas productoras de cefotaximasas. El aislamiento proveniente de un termómetro mostró un perfil de resistencia diferente al grupo clonal epidémico, y a pesar de que este termómetro fue utilizado en la UCIN, el aislamiento obtenido de este elemento no fue agrupado por los sistemas de tipificación en el grupo clonal epidémico; este resultado demuestra la importancia de utilizar la genotipificación para conocer específicamente las fuentes y factores de diseminación. El uso de PFGE permitió verificar el agrupamiento obtenido por BOX-PCR. Se podría

sugerir el uso de BOX-PCR para este fin, ya que esta técnica es de más fácil acceso para los laboratorios de los centros hospitalarios.

Los resultados de la tipificación permitieron confirmar la ceta y la pesa bebés como posibles fuentes de diseminación asociadas al brote. La recuperación de aislamientos a partir de este tipo de elementos en el estudio de brotes demuestra el papel que éstos juegan en la infección cruzada y, por tanto, permite orientar las medidas para la prevención y el control (16).

En conclusión, este es el primer informe en Colombia en el que se caracteriza molecularmente un brote de infección intrahospitalaria causado por *K. pneumoniae* productora de CTX-M-12. La importancia de este tipo de estudios radica en la generación de información útil para estudiar y confirmar la presencia de brotes; adicionalmente, aportan evidencia en apoyo del establecimiento y continuidad de las acciones de prevención orientadas a cortar la cadena de la transmisión y diseminación de microorganismos agresivos que aumentan la morbilidad y la mortalidad de los pacientes, principalmente de aquéllos más susceptibles como los neonatos.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias y al Hospital El Tunal ESE.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen relaciones económicas ni personales de ninguna índole que pudieran influenciar su juicio respecto a los resultados de la presente investigación. Todos los autores tuvieron acceso irrestricto a los datos y no existió participación de agentes externos en el diseño del estudio, ni en la recopilación, análisis e interpretación de la información.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia y por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias, código 1101-04-12675.

Referencias

1. **Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velazquez M, et al.** Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol* 2001;39:3193-6.
2. **Medeiros AA.** Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24(suppl.1):S19-45.
3. **Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3554-60.
4. **Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ.** CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:137-42.
5. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh Informational Supplement. NCCLS approved standard M100-S11. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
6. **Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, et al.** A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1936-42.
7. **Yagi T, Kurokawa H, Senda K, Ichiyama S, Ito H, Ohsuka S, et al.** Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1 like beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2606-11.
8. **Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM.** Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:630-7.
9. **Mantilla JR, García I, Espinal PA, Valenzuela EM.** Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 2004;33:48-58.
10. **Miranda G, Kelly C, Solórzano F, Leanos B, Coria R, Patterson JE.** Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1996;34:3138-41.
11. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
12. **Malathum K, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE.** Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J Clin Microbiol* 1998;36:211-5.
13. **Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA.** Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2141-3.
14. **Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M.** Two different extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. *J Clin Microbiol* 2002;40:1095-7.
15. **Villegas MV, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, et al.** CTX-M-12 beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:629-31.
16. **Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, et al.** Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:53-8.