

Frecuencia del gen *qacEΔ1* y resistencia a biocidas en aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido

Josefina Pastrana-Carrasco,* Jesús Ulises Garza-Ramos,* Humberto Barrios,* Rayo Morfin-Otero,[†] Eduardo Rodríguez-Noriega,[†] Juan Manuel Barajas,[‡] Sandra Suárez,[‡] Rita Díaz,[§] Guadalupe Miranda,[§] Fortino Solórzano,[§] Jesús Contreras,^{||} Jesús Silva-Sánchez*

*Departamento de Diagnóstico Epidemiológico, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.

[†] Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde, Instituto de Patología.

[‡] Hospital Infantil de Morelia, Eva Sámano de López Mateos.

[§] Hospital de Pediatría Siglo XXI, IMSS. ^{||} Hospital del Niño del Estado de Sonora.

***qacEΔ1* gene frequency and biocide resistance in extended-spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae clinical isolates.**

ABSTRACT

Objective. To determine the frequency of the gene *qacEΔ1* and characterize the resistance to biocides of extended-spectrum β-lactamases producing enterobacteriaceae (ESBL-PE) obtained from clinical isolates causing nosocomial infections. **Material and methods.** In total 59 ESBL-PE causing nosocomial infections were included: *Klebsiella pneumoniae* (35) and *Enterobacter cloacae* (24). Minimal inhibitory concentration (MIC) was tested for chlorhexidine (CHX) and benzalkonium chloride (CLBZ) by agar dilution technique. Amplification of the SHV, TLA-1 and *qacEΔ1* genes were performed by PCR using specific primers and plasmid identification was done by alkaline lysis method. Matting experiments were obtained on solid agar method. **Results.** Chlorhexidine-resistance was found in 100% of the ESBL-PE and benzalkonium chloride-resistance in 80%. In 68% of the biocides-resistant strains the *qacEΔ1* gene was present. The 66% of resulting transconjugants were resistant to CHX and the gene *qacEΔ1* was detected in 55%. **Conclusions.** The *qacEΔ1* gene of antiseptic resistance is widespread in the EP-ESBL and can be transferred horizontally. Thus it is advisable to use combinations of antiseptics, as recommended in the literature, to avoid

RESUMEN

Objetivo. Determinar la frecuencia del gen *qacEΔ1* y caracterizar la resistencia a biocidas en aislamientos clínicos de enterobacterias productores de β-lactamasas de espectro extendido (EP-BLEE) causantes de infecciones nosocomiales. **Material y métodos.** Se incluyó un total de 59 EP-BLEE correspondiendo a *Klebsiella pneumoniae* (35) y *Enterobacter cloacae* (24). Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para clorhexidina (CHX) y cloruro de benzalconio (CLBZ). Se detectaron los genes tipo-SHV, TLA-1 y *qacEΔ1* por PCR y secuenciación nucleotídica, se identificó el patrón plasmídico y se realizó la conjugación bacteriana. **Resultados.** Todos los aislamientos de EP-BLEE fueron resistentes a CHX y 80% para CLBZ. El 68% de los aislamientos resistentes a biocidas presentaron el gen *qacEΔ1*, los cuales se sometieron a conjugación. De las transconjugantes resultantes 66% fueron resistentes a CHX y se detectó en ellas el gen *qacEΔ1* en 55%. **Conclusiones.** El gen *qacEΔ1* de resistencia a antisépticos está ampliamente diseminado en las EP-BLEE y puede ser transferido de manera horizontal. Por esa razón es altamente recomendable utilizar combinaciones de antisépticos, como se describe en la literatura, que permita en cierta medida contrarrestar la selección de bacterias multirresistentes en los hospitales y al mismo tiempo disminuir los índices de infecciones nosocomiales.

Key words. ESBL. Enterobacteriaceae. Biocide-resistance. Chlorhexidine. Benzalkonium chloride. Plasmids. *qacEΔ1*.

Palabras clave. BLEE. Enterobacterias. Resistencia a biocidas. Clorhexidina. Cloruro de benzalconio. Plásmidos. *qacEΔ1*.

INTRODUCCIÓN

Una forma de controlar y prevenir la diseminación de patógenos y las infecciones en los hospitales es usar biocidas como la clorhexidina (CHX) y el cloruro de benzalconio (CLBZ);¹ el uso de éstos se ha incrementado para diferentes propósitos industriales y para obtener una limpieza más eficiente en diferentes áreas hospitalarias. Se sugiere que el uso de biocidas puede ejercer una presión selectiva en microorganismos resistentes a las sales de amonio cuaternario (SAC) y a diversos antimicrobianos.²

El sitio blanco de los biocidas es la membrana de las bacterias y el daño producido en ésta es seguido por una coagulación intracelular.^{3,4} La sobreexpresión de genes como *qacE*, *qacEΔ1*, *emrE* y *cepA* codifican para proteínas que expulsan a los biocidas al exterior de la célula. Estas proteínas son mejor conocidas como “bombas de flujo” y son el principal mecanismo de resistencia a este tipo de compuestos. Por ende, este mecanismo de resistencia funciona para detoxificar y/o eliminar sustancias metabólicas que dañan a la célula, incluyendo a los biocidas.⁵ Estos genes se han identificado en bacterias Gram-negativas; *qacEΔ1* es uno de los más frecuentes en aislamientos clínicos.⁶⁻⁸ El gen *cepA* se ha descrito en plásmidos y/o en el cromosoma de *K. pneumoniae* y otras bacterias Gram-negativas.⁹

El uso de antibióticos ha dado por resultado la selección de bacterias multirresistentes. Un ejemplo son las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (EP-BLEE), causantes de infecciones nosocomiales. Estas enterobacterias no responden al efecto de las cefalosporinas de reciente formulación debido a la expresión de β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), favoreciendo un incremento en las tasas de morbilidad y prolongando el tiempo de estancia hospitalaria; esto conlleva un incremento de los costos de atención y afecta la calidad de vida del paciente durante su recuperación, por tanto es un problema de salud pública a nivel mundial.¹⁰

En México diversos estudios realizados en aislamientos clínicos de EP-BLEE indican la presencia de BLEE tipo SHV-5, SHV-2, CTX-M-15 y TLA-1 como

las principales β-lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas.^{11,12,18} Se ha descrito que el gen SHV-5 está localizado en un transposón,¹³ a diferencia del *qacEΔ1* que se describe como parte de un integrón, el cual generalmente contiene varios genes de resistencia a diversos grupos de antibióticos.⁶ Tanto los transposones e integrones tienen la capacidad de transferirse horizontalmente entre diferentes grupos bacterianos. El uso simultáneo de biocidas y antibióticos en los diferentes centros hospitalarios ha generado bacterias con resistencia a biocidas y a diversos antibióticos. En este trabajo se reporta la resistencia a clorhexidina y cloruro de benzalconio y la frecuencia del gen *qacEΔ1* en aislamientos clínicos de EP-BLEE, así como la capacidad de transferir por conjugación bacteriana la resistencia a otras especies bacterianas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Inicialmente en este estudio se incluyeron 240 aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (154) y *Enterobacter cloacae* (86) productores de BLEEs y causantes de infecciones nosocomiales. Estos aislamientos fueron colectados durante 1990 a 2001 y provinieron de cuatro hospitales de la República Mexicana: Hospital de Pediatría CMN SXXI, en el Distrito Federal; Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde, Jalisco; Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos, Michoacán y el Hospital Infantil del Estado de Sonora. Posteriormente, en este estudio fueron seleccionadas por conveniencia, y con base en el número de clones identificadas previamente en cada hospital, 59 aislamientos que correspondieron a 35 de *K. pneumoniae* y 24 de *E. cloacae*.¹⁴⁻¹⁶

Prueba confirmatoria para la producción de BLEEs

Se empleó el método de sinergismo de difusión de doble disco con cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg) en presencia y ausencia de ácido clavulánico (10 µg) siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).¹⁷ Las cepas

de *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 se incluyeron como controles en el ensayo.

Determinación de la susceptibilidad a biocidas

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los biocidas se ensayó por el método de dilución en placas de agar siguiendo las recomendaciones del CLSI.¹⁷ Los puntos de corte para CLBZ y CHX empleados en este estudio se basaron en los descritos por Fang, *et al.*⁹ Para CHX sensible a $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ y resistente a $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ y para CLBZ sensible a $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ y resistente a $\geq 64 \mu\text{g/mL}$, usando como cepas control *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *E. coli* ATCC 25922. Los biocidas clorhexidina y cloruro de benzalconio fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, Mo. USA).

Detección de los genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TLA-1} y *qacEΔ1* por PCR e hibridación

Mediante la técnica de hibridación en colonia se confirmó la detección de los genes SHV y TLA-1, las sondas se generaron por PCR utilizando los oligonucleótidos SE5, SB3 y TLA-1-F y TLA-R, respectivamente.^{18,19} Las sondas fueron marcadas radioactivamente con P³² y posteriormente purificadas por medio de columnas (Roche-Diagnostics, USA). Las condiciones utilizadas para la hibridación fueron las reportadas por Maniatis.²⁰ Los filtros fueron revelados mediante placas de rayos X (Accesolab, USA). La identificación de las variantes del gen SHV se realizó con el análisis de los dobles picos presentes en los cromatogramas de las secuencias.²¹ La presencia del gen *qacEΔ1* se detectó en los 59 aislamientos clínicos y en sus respectivas transconjugantes por la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos reportados por Kazama.⁶ Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit High Pure™ PCR Purification Kit (Boheringer, USA) y secuenciados por el método de *dideoxy chain termination* descrito por Sanger, utilizando el secuenciador automático (ABI PRISM 377-18, kit EL:TaQ FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing).

Análisis de secuencias

La secuencia de aminoácidos se dedujo utilizando las herramientas bioinformáticas como el ExPASy Translate tool del sitio <http://web.expasy.org/translate/> y fueron comparadas con secuencias ya

publicadas para SHV-1 (No. de acceso a GenBank; HM751102) y TLA-1 (No. de acceso a GenBank; AF148067), en GenBank usando el programa Blastx.

Análisis de plásmidos

El patrón de plásmidos en los aislamientos clínicos y transconjugantes se determinó mediante la técnica descrita por Kieser.²² Los plásmidos R6K (40kpb), RP4 (54 kpb), R1 (94 kpb) y pUD21 (170 kpb) se incluyeron como marcadores de peso molecular.

Transferencia de la resistencia a biocidas y cefalosporinas

Las conjugaciones bacterianas se realizaron mediante el método descrito por Miller en fase sólida.²³ La cepa *E. coli* J53-2 (F⁺ *pro*⁻ *met*⁻ Rif^r) fue utilizada como receptora de los plásmidos que confieren resistencia. Las transconjugantes fueron seleccionadas en placas de agar Luria-Bertoni suplementado con rifampicina (100 $\mu\text{g/mL}$) en combinación con CLBZ (64 $\mu\text{g/mL}$), CHX (4 $\mu\text{g/mL}$) o cefotaxima (1 $\mu\text{g/mL}$).

RESULTADOS

Cepas bacterianas y detección de los genes que codifican para BLEEs

Los 59 aislamientos clínicos seleccionados de enterobacterias fueron productores de BLEEs. Mediante la hibridación tipo Southern, la amplificación y la secuenciación de los productos de PCR, se determinó que 100% (35/35) de los aislamientos de *K. pneumoniae* fueron positivos para la sonda del gene que codifica para las β -lactamasas tipo-SHV y correspondieron al alelo SHV-5. Sin embargo, el gen TLA-1 no fue identificado en esta especie bacteriana. En *E. cloacae* 87% (21/24) fue positivo para los genes que codifican para las β -lactamasas tipo-SHV que correspondieron al alelo SHV-5 y 12.5% (3/24) para la BLEE TLA-1.

Susceptibilidad a biocidas de los aislamientos clínicos productores de BLEE e identificación del gen *qacEΔ1*

Todos los aislamientos clínicos de EP-BLEE fueron resistentes a CHX y CLBZ, con excepción de 66% de los aislamientos de *K. pneumoniae* que fueron sólo resistentes a CLBZ. La distribución de los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a los dos biocidas ensayados se muestra en la figura 1.

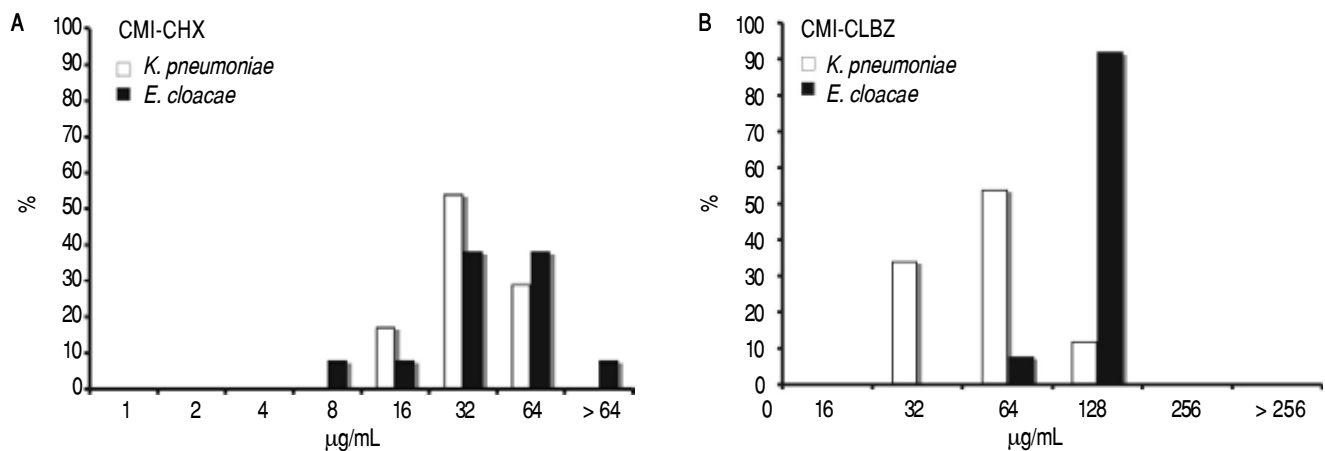


Figura 1. A. Distribución de la CMI para clorhexidina en los aislamientos clínicos de EP-BLEE. B. Distribución de la CMI para cloruro de benzalconio en los aislamientos clínicos de EP-BLEE. Punto de corte para clorhexidina: sensible 2 µg/mL, resistente ≥ 4 µg/mL. Punto de corte para cloruro de benzalconio; sensible 32 µg/mL, resistente ≥ 64 µg/mL.

Cuadro 1. Fenotipo de resistencia a los biocidas y presencia del gen *qacEΔ1* en aislamientos clínicos de EP-BLEE

Especies (n = 59)	Fenotipo ^r			
	CLBZ ^r		CHX ^r	
	(%)**	<i>qacEΔ1</i> (%)*	(%)**	<i>qacEΔ1</i> (%)*
<i>K. pneumoniae</i> (35)	23/35 (66)	13/23 (56)	35/35 (100)	21/35 (60)
<i>E. cloacae</i> (24)	24/24 (100)	19/24 (79)	24/24 (100)	19/24 (79)
Total (59)	47/59 (79)	32/47 (68)	59/59 (100)	40/59 (68)

* Porcentaje (%) de los aislamientos resistentes a un biocida y que presenta el gen *qacEΔ1*. ** Porcentaje (%) de los aislamientos resistentes.

En general, el gene *qacEΔ1* se identificó en 68% (32/47) de las EP-BLEE con resistencia a CLBZ y en 68% (40/59) resistentes a CHX (Cuadro 1). En el grupo de *E. cloacae* se observó que la resistencia a CHX y CLBZ fue de 100% (24/24) y la presencia del gen *qacEΔ1* fue de 79% (19/24). En el grupo de *K. pneumoniae* 100% (35/35) presentó resistencia a CHX y se identificó la presencia del gen *qacEΔ1* en 60% (21/35). Por otro lado 66% (23/35) presentó una resistencia a CLBZ con la presencia del gen *qacEΔ1* en 56% (13/23).

Presencia del gen *qacEΔ1* en transconjugantes y su susceptibilidad a biocidas

Los aislamientos presentaron de 1-3 plásmidos con un rango de talla de 40 a 210 kb. Por conveniencia se escogieron 32 aislamientos clínicos donde se identificó positivamente el gen *qacEΔ1* y que fueran resistentes a CHX y CLBZ (12 de *K. pneumoniae* y 20 de *E. cloacae*). Éstos fueron sometidos a

conjugación bacteriana, con una selección en CHX, CLBZ y cefotaxima. La obtención de transconjugantes en los dos primeros medios selectivos no fueron estables, mientras que las seleccionadas en cefotaxima sí lo fueron. En estos ensayos se obtuvo 84.3% (27/32) de transconjugantes, de las cuales ninguna mostró resistencia a CLBZ y sólo 66.6% (18/27) fueron resistentes a CHX, aumentando los valores de CMI dos veces con respecto a la cepa receptora de *E. coli* J53-2 (1 µg/mL para CHX). El gen *qacEΔ1* fue identificado en 55.5% (15/27) de las transconjugantes obtenidas.

DISCUSIÓN

La CHX y el CLBZ son compuestos ampliamente utilizados en hospitales para la antisepsia y reducción de la diseminación de patógenos. Debido a su amplio uso se ejerce una presión selectiva sobre microorganismos resistentes a estos compuestos.^{24,25} En este trabajo se identifica la presencia del gen

qacEΔ1 en aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de BLEE y resistentes a CHX y CLBZ. Asimismo, se identificó la capacidad de *qacEΔ1* a transferirse en forma horizontal a una cepa de *E. coli* receptora de plásmidos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el porcentaje de resistencia a CHX en *K. pneumoniae* fue ligeramente mayor que el reportado por Fang en Taiwán (100% vs. 83%),⁹ con una resistencia para CLBZ de 66% (CMI de $\geq 64 \mu\text{g/mL}$); en contraste, los aislamientos de *E. cloacae* fueron resistentes a ambos biocidas. Por otro lado, en este trabajo se identificó que el gen *qacEΔ1*, que codifica para una bomba de eflujo, se encuentra tanto en los aislamientos clínicos como en la mitad de las transconjugantes obtenidas de las cruas realizadas. Esto sugiere la posible presencia de otros genes que participen en la resistencia a biocidas, como: *qacE*, *emrE* y *cepA*, y que se han descrito en bacterias Gram-negativas.^{7,9,26} Kazama, *et al.* reportaron resultados similares identificando que 65% de aislamientos clínicos contenían el gen *qacEΔ1*.²⁷ En otros géneros bacterianos, como *Pseudomonas aeruginosa*, la resistencia cruzada entre diferentes antibióticos y biocidas se ha reportado previamente;²⁸ esto sugiere que la resistencia a ambos compuestos sería seleccionada por un mecanismo común como cambios en la permeabilidad celular.²⁹ Asimismo, Russell propuso que la resistencia a biocidas contribuiría a la resistencia de antibióticos por mecanismos de co-resistencia o resistencia cruzada.²⁴

Respecto a los genes que codifican a las BLEE SHV-5 y TLA-1, se ha descrito que están localizados en transposones,^{13,30} mientras que el gen *qacEΔ1* forma parte de un integrón de clase 1.⁶ Otros mecanismos de resistencia a desinfectantes son las mutaciones espontáneas tipo MAR (*Multiply Antibiotic-Resistant mutants*) en el genoma que condiciona una disminución en la expresión de las porinas o activación de bombas de eflujo que confiera la resistencia a otros compuestos.³¹

Tanto antisépticos como antibióticos son requeridos en los hospitales para el control de las infecciones. En el caso de los antisépticos son empleados en los centros de atención médica para la prevención, en primera instancia, de infecciones postoperatorias y las asociadas con dispositivos usados de manera cotidiana para el cuidado de los pacientes. Los antisépticos incluidos en las soluciones empleadas para el lavado de manos son un elemento crucial para el combate de bacterias que colonizan la piel de las manos de los trabajadores de la salud.³²

El tipo de antisépticos utilizado en cada centro hospitalario tiene resultados variables.³³ Por ejemplo,

se ha reportado que la combinación de un antiséptico basado en alcohol conteniendo un solvente aprótico polar como el dimetil sulfoxido (DMSO) (70 de isopropanol más 4% de DMSO) fue eficiente para la asepsia en piel de las manos de los trabajadores de la salud,³⁴ con una desinfección más efectiva que repercutió favorablemente en la disminución de las tasas de infección de heridas, de infecciones de catéter, menor contaminación de cultivos de sangre y en general en las infecciones nosocomiales asociadas a la diseminación a través de las manos de los trabajadores de la salud.

Los resultados del presente trabajo muestran que en hospitales de diferentes regiones del país hay una co-selección de genes de resistencia a desinfectantes y antibióticos, derivados del amplio uso de ambos compuestos en los hospitales, y su diseminación se facilita al estar contenidos en plásmidos, como se observó en el fenotipo de las transconjugantes resultantes de este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Teresa Rojas por su apoyo técnico. J. Pastrana fue becaria del CONACyT. Investigación financiada por CONACyT proyecto "SALUD-2003-C01-009".

REFERENCIAS

1. Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infect Dis* 2003; 3: 794-803.
2. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist* 2010; 16(2): 91-104.
3. Ishikawa S, Matsumura Y, Yoshizako F, Tsuchido T. Characterization of a cationic surfactant-resistant mutant isolated spontaneously from *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 261-8.
4. Hugo WB. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA (eds.). Principle and practice of disinfection, preservation, and sterilization. Disinfectant mechanism. 2nd. Ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications; 1992, p. 187-210.
5. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-79.
6. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE delta 1* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 159: 173-78.
7. Wang C, Zhan Q, Mi Z, Huang Z, Chen G. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEDelta 1* in 283 clinical isolates of Gram-negative bacteria in China. *J Hosp Infect* 2008; 69(4): 394-6.
8. Paulsen IT, Littlejohn TG, Radström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics.

- tics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 761-8.
9. Fang CT, Chen HC, Chuang YP, Chang SC, Wang JT. Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2024-8.
 10. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.
 11. Alcantar-Curiel D, Tinoco JC, Gayosso C, Carlos A, Daza C, Perez-Prado MC, et al. Nosocomial Bacteremia and Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* with Plasmids Carrying Both SHV-5 and TLA-1 Genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1067-74.
 12. Miranda G, Castro N, Leños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 30-5.
 13. Preston KE, Venezia RA, Stellrecht KA. The SHV-5 extended-spectrum β -lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. *Plasmid* 2004; 51: 48-53.
 14. Silva J, Aguilar C, Becerra Z, López-Antunano F, García R. Extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. *Microb Drug Resist* 1999; 5(3): 189-93.
 15. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velázquez M, et al. Outbreak of infection with Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3193-6.
 16. Miranda G, Castro N, Leños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al. Clonal and Horizontal Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* Expressing SHV-5 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 30-5.
 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M2-A6. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2004.
 18. Jesús Silva-Sánchez, Jesús Ulises Garza-Ramos, Fernando Reyna-Flores, Alejandro Sánchez-Pérez, Teresa Rojas-Moreno, Verónica Andrade-Almaraz, et al. Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) producing Enterobacteriaceae causing nosocomial infections in Mexico, a retrospective and multicenter study. *Arc Med Res* 2011; 42(2): 156-62.
 19. Garza-Ramos U, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Sal Pub Mex* 2007; 49(6): 415-21.
 20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd. Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1989.
 21. Garza-Ramos U, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Sal Pub Mex* 2007; 49(6): 415-21.
 22. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; 12: 19-36.
 23. Miller J (ed.). Nueva York: Experiments in molecular genetics. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; 1992, p. 82-5.
 24. Russell AD. Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 227-33.
 25. Boyce JM. New insights into improving hand hygiene practices. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 187-8.
 26. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multi-drug efflux systems. *Microbiol Rev* 1996; 60: 575-608.
 27. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 2009; 16(8): 1028-46.
 28. Kazama H, Kizu K, Iwasaki M, Mamashima H, Sasatsu M, Arai T. Isolation and structure of a new integron that includes a streptomycin resistance gene from the R plasmid of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134: 137-41.
 29. Lambert RJ, Joynson J, Forbes B. The relationship and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 972-84.
 30. Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 1999; 42: 219-29.
 31. Berçot B, Poirel L, Silva-Sánchez J, Nordmann P. Association of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaTLA-1 with a novel ISCR element, ISCR20. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4026-8.
 32. Coldham NG, Webber M, Woodward MJ, Piddock LJ. A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(8): 1655-63.
 33. Boyce JM. Antiseptic technology: access, affordability, and acceptance. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 231-33.
 34. Tarrand JJ, LaSala PR, Han XY, Rolston KV, Kontoyiannis DP. Dimethyl sulfoxide enhances effectiveness of skin antiseptics and reduces contamination rates of blood cultures. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1552-7.

Reimpresos:

Jesús Silva-Sánchez

Instituto Nacional de Salud Pública
Av. Universidad, Núm. 655
Col. Santa María Ahuacatlán
62100, Cuernavaca, Mor.
Tel.: (52) 777 329-3021
Fax: (52) 777-101-2925
Correo electrónico: jsilva@insp.mx

Recibido el 27 de febrero 2012.

Aceptado el 12 de julio 2012.