

Infecciones por *Klebsiella*: un desafío en hospitales cubanos. Contribución del LNRM-IPK en su prevención y control.

Autoría principal

Dianelys Quiñones Pérez¹.

Otros autores

Glenda Díaz¹, Yenisel Carmona¹, Arnaldo Zayas², Miriam Abreu¹, Daniel Salazar¹, Sandra García³, Yesleisys Santiesteban¹, Tania N. Jiménez¹, Marcia Hart⁴.

Colaboradores

Lic. Lilian Díaz, Lic. Ana Maria Cordero, Lic. Antonio Valdez, Dr. Roberto Álvarez, Dr. Andrés Zambrano, Dra. Rosa del Campo, Lic. Arancha Valverde, Dr. Nobumichi Kobayashi.

Entidad ejecutora principal

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Entidades participantes

²Hospital Juan Bruno Zayas, Santiago de Cuba.

³Pediátrico de Holguín.

⁴ Hospital Hermanos Ameijeiras, La Habana.

Autor para correspondencia

Dra. Dianelys Quiñones Pérez

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Departamento de Bacteriología-Micología.

Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, Lisa, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: diany.quinones@infomed.sld.cu; dia@ipk.sld.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ Dra. **Dianelys Quiñones Pérez** (28%): Trabaja en el Departamento de Bacteriología-Micología. Diseñó todas las investigaciones, ejecutó el trabajo experimental, procesó los datos experimentales, participó activamente en el análisis de los resultados y escribió los manuscritos publicados.
- ✓ Lic. **Glenda Díaz** (15%): Participó en la realización del trabajo experimental y análisis de los resultados en el último período de estudio % de participación: 15%.
- ✓ Dra. **Yenisel Carmona** (5%): contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.
- ✓ Lic. **Arnaldo Zayas** (15%): Participó en algunas tareas de la fase experimental del trabajo.
- ✓ Tec. **Miriam Abreu** (5%): Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.
- ✓ Lic. **Daniel Salazar** (5%): Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.
- ✓ Lic. **Sandra García** (7%): Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.
- ✓ Lic. **Yesleisys Santiesteban** (5%): Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.

- ✓ Dra. **Tania N. Jiménez** (5%): Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.
- ✓ Dra. **Marcia Hart** (10%): Participó en una de las tareas de la fase experimental del trabajo, redacción de publicación.

Resumen

Klebsiella spp constituye uno de los principales patógenos nosocomiales a nivel mundial con extrema resistencia a la mayoría de los antimicrobianos incluso a los carbapenémicos. La emergencia en Latinoamérica de esta resistencia ha conllevado a tres alertas epidemiológicas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) quien insta a los países a fortalecer la vigilancia de este patógeno. En Cuba, no existía una vigilancia nacional para *Klebsiella* spp por lo que se hizo necesario iniciar la misma en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del IPK (LNRM/IPK) con la introducción de metodologías para la caracterización convencional y molecular de este patógeno monitoreando la susceptibilidad antimicrobiana, especies circulantes, las bases genéticas de la resistencia a betalactámicos y determinar la relación genética entre aislados cubanos y su impacto en la evolución de la resistencia antibiotica valorando sus implicaciones clínico-epidemiológicas.

Se estudiaron 696 aislamientos procedentes de 14 provincias del país y el municipio especial Isla de la Juventud recibidas durante el período Enero/2010-Agosto/2014 en el LNRM/IPK. Se realizó la identificación de especies por métodos convencionales y automatizados. Se determinó la concentración inhibitoria mínima a 20 antimicrobianos según las normas CLSI, 2012 con la detección fenotípica de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *AmpC* plasmídica y carbapenemasa KPC. Se investigaron diferentes genes *bla* por PCR y posteriormente por secuenciación de ADN se determinaron los subtipos de CTX-M y TEM. Mediante estas dos técnicas moleculares, también se caracterizaron las cepas presuntivas de KPC para conocer variantes genéticas de esta. Se evaluó la relación clonal entre las cepas BLEE y las KPC positivas mediante la Electroforesis en Campos Pulsados y RAPD (Random amplified polymorphic DNA analysis), respectivamente.

Se realizó un estudio de secuencias multilocus en 54 cepas productoras de BLEE de diferentes regiones del país y en las tres cepas productoras de carbapenemasas KPC para determinar su estructura poblacional y relación filogenética con aislamientos de otras regiones. Se realizó, además, un análisis particularizado de los aislamientos que causaron infecciones en niños. Se muestra la susceptibilidad de aislados de *Klebsiella* de diferentes áreas geográficas del país, revelando la circulación de *Klebsiella* resistente a carbapenémicos, colistina y dominante multidrogoresistencia. Esto, unido a la elevada prevalencia de BLEE con diferentes variantes genéticas, incluso en la comunidad, constituye una alarma de la resistencia de *Klebsiella* en el país. Se notifica la emergencia de *K. pneumoniae* productora de KPC en Cuba lo que permitió alertar a las autoridades de Salud Pública sobre la necesidad de implementar la vigilancia activa de carbapenemasas.

La policlonalidad observada entre las cepas BLEE positivas mostraron evidencia que la presión de selección ejercida por el amplio uso de cefalosporinas en los hospitales parece ser la causa de su emergencia en el país más que la diseminación de un clon específico. Se identificaron 27 secuencias tipos (STs) entre las cepas BLEE positivas con circulación en Cuba del complejo clonal 258. Se detectaron 10 nuevas secuencias tipo a nivel mundial y se evidenció una relación filogenética muy estrecha de las STs cubanas con líneas europeas y asiáticas. Se notifica una ST a nivel mundial portando el gen *blaKPC-2* lo que alerta sobre una propagación de este gen constituyendo una alerta internacional. Se notificó un 11% de resistencia a colistina y dominante multidrogorresistencia. El estudio en población pediátrica reveló una mayor afectación de los servicios de neonatología y UCI pediátricas con mayor ocurrencia de infección del torrente sanguíneo lo que alerta a reforzar las medidas de control de infección en estos pacientes muy susceptibles a las infecciones y con esquemas terapéuticos limitados.

Conclusiones: Se inicia una vigilancia nacional que aborda de manera integral la caracterización del género *Klebsiella* causantes de infecciones en Cuba con implementación de protocolos recomendados por OPS-OMS para la detección de fenotipos emergentes de resistencia lo que permitirá continuar con la vigilancia de este patógeno y alertar ante un nuevo evento epidemiológico. Se capacitó al personal técnico y profesional de la red nacional de Microbiología lo que permitió avances en el conocimiento de este patógeno aportando herramientas esenciales para un mejor diagnóstico y vigilancia de este microorganismo. Los estudios de la susceptibilidad antimicrobiana fueron imprescindibles para la elaboración del Consenso Nacional de Tratamiento de las Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria (IAAS) lo que constituyó un apoyo para el Programa de Prevención y Control de las IAAS y el PAMI.

Comunicación Corta

Klebsiella spp constituye uno de los principales patógenos nosocomiales a nivel mundial. Actualmente se considera una superbacteria por su extrema resistencia a la mayoría de los antimicrobianos y la emergencia de resistencia a carbapenémicos lo que representa un desafío para el control de la infección. El Centro para el Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, de sus siglas en inglés) declaró diferentes niveles de amenazas según el impacto de los patógenos para la salud pública ubicando en el nivel 1 los que requieren una acción urgente y agresiva para contenerlos (enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, principalmente *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas KPC y NDM-1); en el nivel 2 las que representan una amenaza seria que requieren de acciones rápidas y sostenidas para evitar su continua propagación (Entre las que se cita enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido como *Klebsiella pneumoniae*)¹. Esto evidencia el verdadero problema que representa este microorganismo en la actualidad. La producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) conlleva a la pérdida de la eficacia de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, principal familia de antibacterianos usados en las infecciones graves, y además, al comprometimiento de la eficacia clínica de los carbapenémicos al conllevar a un mayor uso de éstos como única opción terapéutica disponible.

En 1996 se reporta el primer aislamiento de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos, constituyendo una alarma a nivel mundial. Esto propició el incremento del uso de las polimixinas y la tigeciclina, antimicrobianos más caros y para los que la resistencia ya emerge circulando cepas pandrogorresistentes de forma global². Este hecho se agrava aún más ante la amenaza inmediata de una reducción en el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos. El conocimiento de las bases genéticas de la resistencia a los antibióticos en un país, es de vital importancia para el control de la diseminación de dicha resistencia. Por otro lado, el conocimiento de la relación genética entre aislados que circulan en hospitales es imprescindible para detectar y prevenir la transmisión de cepas resistentes que pueden ser causa de brotes, además que contribuyen a esclarecer la dinámica de transmisión de la resistencia antimicrobiana.

Estudios puntuales desarrollados en algunos hospitales de Cuba, han evidenciado porcentajes elevados de resistencia a cefalosporinas en el género *Klebsiella*^{3, 4, 5}, incluso uno de ellos, demostró la presencia de BLEE tipo TEM en este patógeno³ lo que resalta aun más la necesidad de una vigilancia sostenida en el país.

Por la dispersión de las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y carbapenemasas (KPC y NDM) en servicios de salud de países de las Américas la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha emitido tres alertas epidemiológicas en los últimos 4 años⁶ y junto a la Organización Mundial de la Salud (OMS) solicitan incrementar los esfuerzos para intensificar la vigilancia e implementar protocolos para la detección oportuna de estos fenotipos emergentes de resistencia, así como intensificar medidas de prevención y control de infecciones.

Ante este llamado y la creciente multidrogorresistencia a nivel mundial de los patógenos causantes de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS), se da inicio en el 2010, en el Instituto "Pedro Kouri", IPK, a una vigilancia de laboratorio a escala nacional para el género *Klebsiella*. Se introducen metodologías y protocolos de trabajo para la caracterización convencional y molecular de este patógeno lo que ha permitido crear una colección de cultivo que durante el período Enero/2010-Agosto/2014 incluye 696 aislamientos procedente de 14 provincias del país y el municipio especial Isla de la Juventud, donde la caracterización de los mismos conforman este trabajo que incluye las siguientes investigaciones: 1- Identificación de especies de *Klebsiella* causantes de infecciones en Cuba. 2- Determinación de la susceptibilidad a 20 antimicrobianos según las normas del CLSI, 2012⁷ -Se implementaron y ejecutaron los protocolos para la detección fenotípica de la producción de Betalactamasas de espectro extendido, betalactamasa AmpC plasmídica y carbapenemasa KPC en aislamientos de *Klebsiella* resistentes a cefalosporinas y carbapenémicos, respectivamente. 4-Se estudiaron las bases genéticas que median la resistencia de esta bacteria a cefalosporinas (genes *bla*) y a carbapenémicos (genes *KPC*). Posteriormente por secuenciación de ADN se determinaron los subtipos de betalactamasas CTX-M y las variantes genéticas de KPC detectadas. Se desarrollaron los primeros estudios de epidemiología molecular en *Klebsiella* procedentes de

servicios hospitalarios cubanos de diferentes regiones del país aplicando la "Electroforesis en Campos Pulsados" (PFGE), Técnica de Referencia Internacional para los estudios a corto plazo y RAPD (Random amplified polymorphic DNA analysis), respectivamente. Se aplicó, además, el estudio de secuencias multilocus (MLST), Técnica de Referencia Internacional para los estudios a largo plazo o globales, en 54 cepas productoras de BLEE de diferentes regiones del país y en las tres cepas productoras de carbapenemasas KPC para determinar su estructura poblacional y relación filogenética con aislamientos de otras regiones del mundo.

Se suma Cuba, de esta forma, al esfuerzo internacional por un mejor control de la infección por *Klebsiella* y lucha contra su resistencia antimicrobiana dando cumplimiento a las medidas dictadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control de Enfermedades (CDC, siglas en Ingles) de Atlanta con vistas a contrarrestar el fenómeno de la resistencia antimicrobiana y la necesidad de prevenir infecciones como primera estrategia para la contención de este fenómeno.

Breve descripción de los principales resultados alcanzados:

1-El Inicio de la vigilancia nacional del género *Klebsiella* en el LNRM/IPK con implementación de métodos fenotípicos y genotípicos recomendados por OPS-OMS para la caracterización de dicho patógeno, así como la capacitación del personal técnico y profesional de la red nacional de Microbiología permitió durante este el periodo de vigilancia avalar científicamente la problemática de *Klebsiella* causante de infecciones en diferentes regiones del país donde *K. pneumoniae* representó la especie más frecuente (93%), lo que la ratifica como la de mayor impacto clínico dentro del género. *K. oxytoca* ocupó el segundo lugar (5.74%). Otras especies de menor importancia clínica se identificaron como: *K. ornithinolytica* (0.71%); *K. terrigena*, (0.43%); *K. ozaenae* (0.28%) y *K. rhinoscleromatis* (0,14%). Sin embargo, algunas de estas especies fueron causa de infecciones invasivas. Estos hallazgos evidencian como las implicaciones clínicas de las especies minoritarias del género *Klebsiella* cobran cada día mayor interés observando posibles cambios evolutivos en su comportamiento clínico.

El monitoreo de la susceptibilidad antimicrobiana durante estos años suscita una gran preocupación ya que se obtuvieron porcentajes de resistencias elevados para la mayoría de los antimicrobianos evaluados, principalmente para los betalactámicos, con excepción de los carbapenémicos. Para las cefalosporinas, antibióticos de elección en las infecciones severas en este género se constató entre 50-54% de resistencia y para el monobactámico aztreonam 43%. Los carbapenémicos constituyen antibióticos de primera línea recomendados para infecciones graves causadas por enterobacterias multiresistentes productoras de BLEE o de β -lactamasa AmpC y con frecuencia son la única opción terapéutica disponible por lo que la detección de resistencia a estos es una alarma en la actualidad. La vigilancia implementada permitió detectar dicha emergencia en nuestro país y aunque el porcentaje de resistencia es bajo (2%) es considerado un hallazgo alarmante y constituye una alerta epidemiológica para todos los hospitales y refuerza, la necesidad de mantener una vigilancia continua de la

resistencia antimicrobiana incluso fortalecer la de otros bacilos Gram negativos por la fácil diseminación entre diferentes géneros bacterianos.

La resistencia para aminoglucósidos (17-41%), fluoroquinolonas (ácido nalidixico, 35%; ciprofloxacina, 24%; ofloxacina 21%), a tetraciclinas (31-36%), la nitrofurantoína (32%) y el trimetoprim-sulfametoxazol (51%), también fue elevada. Se constató un 11% de aislamientos de *Klebsiella* resistentes a la colistina. El 53.5 % de estas cepas procedieron de los servicios de neonatología y UCI y el 82% de ella estuvieron relacionadas con procesos invasivos. Merece la pena señalar que, esta droga junto a la tigeciclina constituyen las únicas armas terapéuticas en la actualidad para combatir las cepas de *Klebsiella* resistente a los carbapenémicos y el uso de este antibiótico, aunque sea racional, lleva al desarrollo de subpoblaciones resistentes (heterorresistencia) que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia posterior.

El 62.2% de estas cepas resistentes a colistina fueron productoras de BLEE invalidando el uso de las cefalosporinas frente a las mismas pero afortunadamente una sola cepa fue resistente a carbapenémicos, los únicos antibióticos junto a la colistina de mejor efectividad frente a bacilos Gram negativos en la actualidad ante la inexistencia de la tigeciclina en Cuba. Las cepas no mostraron resistencia a tigeciclina, aunque cuatro cepas mostraron sensibilidad intermedia con una CIM=4µg/mL, lo que, podría significar la posible adquisición de mecanismos de resistencia como las bombas de eflujo y mecanismo de protección ribosomal que inactivarían a este antimicrobiano.

Los resultados del presente trabajo ratifican el fenómeno de la multidrogorresistencia (MDR) en el género *Klebsiella*, donde se obtuvo un 39% de cepas MDR^{8,9,10}. Se llevó a cabo la detección fenotípica de mecanismos de resistencia (Betalactamasas de Espectro Extendido, *AmpC* plasmídica, carbapenemasas. Se evidenció que el 50.5% del total de aislamientos de *Klebsiella* coleccionados durante la vigilancia fueron productores de BLEE. Este hallazgo justifica los elevados niveles de resistencia para las cefalosporinas y el aztreonam. De ellos, el 89% procedía de muestras de pacientes ingresados y el 11% de la comunidad. Esta distribución confirmó la variabilidad epidemiológica de este fenotipo de resistencia y evidenció la necesidad de un monitoreo sistemático. Por otro lado, de las cepas resistentes a cefoxitina en dos de ellas se confirmó fenotípicamente la producción de *AmpC* constituyendo un hallazgo novedoso del presente trabajo ya que es el primer reporte de *Klebsiella* spp productora de esta enzima en Cuba.

La introducción del método fenotípico para la detección presuntiva de carbapenemasa KPC permitió detectar tres cepas productoras de este fenotipo emergente en el país. El estudio de las bases genéticas de la resistencia a Betalactámicos permitió conocer los tipos de BLEE producidos por *Klebsiella* spp procedentes de diferentes áreas geográficas del país detectando los tres tipos más frecuentes: gen *bla*CTX-M (76%), gen *bla*TEM (70%) y el gen *bla*SHV (30%). La caracterización molecular de 54 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* productoras de BLEE procedentes de diferentes provincias del país mostró que la mayoría de las cepas CTX-M se

correspondieron con el grupo 1: CTX-M-15 (43 aislamientos, 79.6%), CTX-M-32 (2 aislamientos, 3.7%), CTX-M-1 (1 aislamiento, 1.8%) y CTX-M-12 (1 aislamiento, 1.8%). El resto de los aislamientos correspondieron al grupo 2: CTX-M-2 (6 aislamientos, 11.1%) y grupo 9: CTX-M-9 (1 aislamiento, 1.8%) y el recientemente descrito CTX-M-124 (1 aislamiento, 1.8%). Merita la pena señalar la coexistencia de diferentes mecanismos en dos cepas: una de ellas con CTX-M-15 más CTXM-2 y la otra con CTX-M-15 más TEM-26 ¹¹. Los estudios de epidemiología molecular en estos aislamientos productores de BLEE demostraron una elevada diversidad genética. Esta policlonalidad observada demostró la ausencia de algún brote epidémico y al correlacionarla con los fenotipos de resistencia sugiere la aparición de cepas resistentes a las cefaloporias específicas de forma individual más que la circulación y transmisión de un aislado habitual entre pacientes, es decir que la presión de selección ejercida por el amplio uso de cefalosporinas en los hospitales puede ser la causa de la elevada prevalencia de BLEE más que la diseminación de un clon específico.

El análisis de secuencias multilocus corroboró la diversidad genética obtenida por PFGE al identificar 27 secuencias tipos (STs), diversidad que fue mayor entre las cepas aisladas en La Habana donde también se observa mayor circulación de diferentes grupos de betalactamasas tipo CTX-M. Se reveló una mayor similitud genética de los aislamientos cubanos con los de Asia y Europa. A pesar de la circulación internacional de clones de *K. pneumoniae* multidrogorresistente se reportaron 10 nuevas STs a nivel mundial en este trabajo (ST733-ST742) lo que constituyó un hallazgo novedoso de la presente investigación y resalta la importancia de los estudios de epidemiología local ¹¹.

Dándole cumplimiento a una de las medidas internacionales para el control de la diseminación de carbapenemasas, se estudiaron las bases moleculares de la resistencia a carbapenémicos en tres aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* causantes de infecciones severas presuntamente productoras de carbapenemasa KPC. Dicha vigilancia permitió detectar y confirmar por el método de referencia internacional (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR), la emergencia, por vez primera en Cuba de carbapenemasas tipo KPC lo que constituyó una alerta epidemiológica nacional en el país ^{12,13}.

El análisis de la secuenciación nucleotídica del gen *blaKPC* reveló la variante genética tipo 2 evidenciando la circulación de la carbapenemasa KPC-2 en Cuba que es una de las de mayor diseminación mundial junto a la KPC-3. El estudio de epidemiología molecular para evaluar la relación genética entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC mediante RAPD demostró que son genéticamente idénticas y tienen un mismo origen. Dichas cepas derivaron de dos provincias distantes geográficamente Holguín (región oriental) y La Habana (región occidental). La correlación del genotipo con el perfil de resistencia antimicrobiana y datos epidemiológicos revelan una transmisión nosocomial de este genotipo en dos servicios de un mismo hospital lo que agrava la repercusión epidemiológica de este evento. El estudio de secuencia multilocus reveló que las tres cepas *blaKPC*-2-positivas se clasificaron como ST1271 (CC29), un single locus variant (SLV, siglas en inglés) de la ST29. La ST1271 se revela en este estudio como un nuevo clon que porta

el gen *blaKPC-2* a nivel mundial ya que la presencia de este gen no había sido reportado en esta ST, así como en el clon ST29. Los pacientes infectados con *K. pneumoniae* productora de KPC no documentaron antecedentes de viajes al extranjero, lo que sugiere la adquisición local y una diseminación silente del clon ST1271 portando este rasgo de resistencia emergente a nivel mundial.

Debido a que los viajes intercontinentales se han relacionado directamente con la propagación de los pacientes colonizados o infectados con *K. pneumoniae* productora de KPC, el turismo internacional y viajes al exterior pueden haber desempeñado un papel importante para su emergencia en Cuba. Un análisis particularizado en población pediátrica reveló una mayor afectación de los servicios de neonatología y UCI pediátricas con mayor ocurrencia de infección del torrente sanguíneo lo que alerta a reforzar las medidas de control de infección en estos pacientes muy susceptibles a las infecciones y con esquemas terapéuticos limitados ¹⁴.

Bibliografía

1. Frieden, T. Antibiotic resistance threats in the United States, CDC, 2013
2. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2009;9:271–4
3. González L, Ramos A, Nadal L, Morffi J, Hernández E, Álvarez, AB. Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos en hospitales. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59(1):52-4.
4. Suarez B. Detección de fenotipos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. [Tesis de Especialista de Primer Grado en Microbiología]. La Habana: IPK; 2011.
5. Ramos A., Hernandez W, Nodarse R, Padrón A, De Armas E, Rosario E. Detección precoz de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes graves. *Rev Cub Med Int Emerg* 2006;5(1):294-301
6. OPS/PAHO. Alerta epidemiológica: Diseminación de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* en Latinoamérica (2 de julio del 2010). Accesible en http://antimicrobianos.com.ar/categ_ory/alerta/ (12 December 2011, date last accessed).
7. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100-S20. Table 1 Enterobacteraceae M02-M07- Minimal Inhibitory Concentration: Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012
8. Quiñones D. National Surveillance Program of *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter* spp. in Cuba. *The APUA Newsletter* Vol. 30 (3): 7-10. (Boletín internacional) Diciembre, 2012
9. Arnaldo Zayas, Dianelys Quiñones, Daniel Salazar. Caracterización microbiológica de *Klebsiella* aisladas en hospitales cubanos. *Memorias Convención Internacional de Salud Pública*. Cuba Salud Diciembre 2012, ISBN 978-959-212-811-8. La Habana
10. Quiñones, Y Carmona, A. Zayas, M Abreu, D. Salazar, S. Garcia, D. Torres, N. Kobayashi, A. Valverde, R del Campo. Resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. y producción de B-lactamasas de espectro extendido en hospitales de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2014 Vol. 66 (3) (in press).

11. Quiñones D, Valverde A, Rodríguez M, Kobayashi N, Zayaz A, Abreu M, Canton R, Del Campo R. High Clonal Diversity of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolations in Cuba: First Report from the National Surveillance Program. *Microbial Drug Resistance*. May 2013. doi:10.1089/mdr.2013.0021.
12. Quiñones D. Alerta epidemiológica: emergencia de carbapenemasas tipo KPC y NDM-1 en Cuba. *BOLIPK*. Vol.24.Núm.09, Pág. 64 La Habana, Cuba Fecha: 01/03/14.
13. Quiñones D, Hart M, Espinosa F, García S, Carmona Y, Ghosh S, Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolations producing KPC-2 carbapenemase in Cuba. *New Microbes and New Infections*, 2014; 2(4): 123–126.
14. Santiesteban Y, Carmona Y, Pérez L, Díaz L, García S, Kobayashi N, Quiñones D. Resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. y producción de β-lactamasas de espectro extendido en hospitales de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2014 Vol. 66 (3) (in press).