
Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas.

Silvio Barreto¹, María Zambrano² y María Araque¹.

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela y

²Grupo de Genética Molecular, Corporación CorpoGen, Bogotá, DC, Colombia.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial, susceptibilidad antimicrobiana, biopelícula.

Resumen. *Klebsiella pneumoniae* constituye uno de los principales patógenos oportunistas asociado con infecciones nosocomiales. La morbi-mortalidad producida por este microorganismo está relacionado en gran parte con la resistencia antimicrobiana y la capacidad de formar biopelículas. En este estudio se analizaron las variaciones fenotípicas de susceptibilidad de 50 cepas de *K. pneumoniae* (26, productoras de β LEE y 24, no productoras de β LEE) aisladas de pacientes pediátricos con septicemia nosocomial, recluidos en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela y su asociación con la formación de biopelículas. Las cepas fueron identificadas según los métodos microbiológicos estandarizados, los patrones de susceptibilidad se determinaron por concentración inhibitoria mínima, y la formación de biopelícula por técnicas espectrofotométricas. La mayoría de las cepas productoras de β LEE se asociaron con frecuencia a otros marcadores de resistencia, tales como: tobramicina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol (38%, cada uno), estreptomycin (36%), y netilmicina (34%). El fenotipo multirresistente predominante fue el constituido por β LEE⁺-AMG-TET-CLF (30%). El 18% de las cepas de *K. pneumoniae* fue sensible a los antibióticos probados. La formación de biopelículas se observó en el 77,8% de las cepas sensibles y en el 96,2% de las resistentes. No hubo relación estadística entre las variaciones fenotípicas de susceptibilidad y la formación de biopelículas ($p = >0,05$). Sin embargo, ambas características en *K. pneumoniae* deben ser consideradas en el momento de decidir una conducta terapéutica para el tratamiento de pacientes con infección nosocomial.

Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilms formation.

Invest Clin 2009; 50(2): 221 - 229

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial, antimicrobial susceptibility, biofilm.

Abstract. *Klebsiella pneumoniae* is the principal opportunist pathogen associated with nosocomial infections. The morbidity and mortality produced by this microorganism is related mostly to antimicrobial resistance and its capacity to form biofilms. In this study, the phenotypic variations of susceptibility in 50 *Klebsiella pneumoniae* strains (26 β LEE-producer and 24 no β LEE-producer) isolated from pediatric patients with nosocomial septicemia at the High-risk Neonatal Unit of the Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela and their associations with biofilm formation were analyzed. These strains were biochemically identified by standard microbiology methods. Antimicrobial susceptibility was determined by minimal inhibitory concentration and biofilm formation was detected by spectrophotometric techniques. Most of β LEE strains were frequently associated with resistance markers such as tobramycin, kanamycin, tetracycline, chloramphenicol (38% each), streptomycin (36%) and netilmicin (34%). The predominant multiresistant phenotype was composed of β LEE⁺-AMG-TET-CLF (30%). 18% of *K. pneumoniae* strains were sensible to the antibiotics tested. Formation of biofilm was observed in 77.8% and 96.2% of sensible and resistant strains, respectively. There was no statistic relation between phenotypic variations of susceptibility and biofilm formation ($p > 0.05$). However, both characteristics of *K. pneumoniae* should be evaluated to determine the therapeutic conduct to treat patients with nosocomial infection.

Recibido: 25-03-2008. Aceptado: 20-11-2008.

INTRODUCCIÓN

K. pneumoniae es uno de los principales patógenos nosocomiales que con frecuencia produce infecciones graves, especialmente en la población pediátrica recluida en las unidades de cuidado intensivo neonatal (1, 2). Varios brotes o epidemias nosocomiales han estado asociados con cepas de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, debido a la producción de β -lactamasas de espectro ex-

pandido (β LEE). Los genes TEM y SHV que codifican para las β LEE están mediados por plásmidos conjugativos que, a menudo, portan otros determinantes de resistencia, como el de la resistencia a los aminoglucósidos y quinolonas (3).

K. pneumoniae incrementa su virulencia no solo por presentar diversos marcadores de resistencia, sino por expresar en su superficie diversos factores de adherencia (fimbrias, pili, exopolisacáridos, entre otros) que le permiten además de colonizar los te-

jididos del hospedero, adherirse a superficies abióticas donde se organiza en comunidades bacterianas llamadas biopelículas (4, 5).

La biopelícula es un depósito no estructurado de células y de glucocáliz acumulado, compuesto por exopolisacáridos y una compleja comunidad de bacterias, donde se observa un ensamblado de microorganismos dentro de una matriz con la capacidad de adherirse a biomateriales o tejidos dañados del hospedero (6).

La cronicidad o persistencia de algunos procesos infecciosos causados por *K. pneumoniae* están asociados a la formación de biopelículas en dispositivos o implantes médicos (sondas, catéteres, prótesis, etc.) (4). Las infecciones donde las biopelículas están involucradas son difíciles de tratar con antibióticos, debido a que estos no logran penetrar en su estructura (7). La naturaleza aniónica del exopolisacárido retarda la difusión de los antibióticos catiónicos como los aminoglucósidos. Este fenómeno químico retarda la muerte celular al conferirle mayor tiempo a la bacteria para que implemente una respuesta adaptativa. En el caso, de microorganismos productores de β -lactamasas como *K. pneumoniae*, aumentan la producción enzimática en respuesta a la exposición del antibiótico β -lactámico; las β -lactamasas se acumulan en el exopolisacárido como resultado de su secreción o por lisis celular, produciendo de esta manera la inactivación del β -lactámico en las capas superficiales de la biopelícula y evitando que el antibiótico se difunda hacia el interior de la misma (6, 8, 9).

Por otra parte, en la biopelícula las bacterias cohabitan en microcolonias, que favorecen la transferencia de plásmidos por conjugación y promueven de esta manera la acumulación de determinantes de resistencia (7).

El objetivo de este estudio fue determinar las variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *K. pneumoniae* de ori-

gen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas en placas de policloruro de vinilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aisló un total de 50 cepas de *K. pneumoniae* en hemocultivos de pacientes pediátricos con septicemia nosocomial recluidos en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, Venezuela, durante el período comprendido desde el año 1997 hasta el 2004. En un estudio previo (3), a 26 de estas cepas se les había detectado por métodos moleculares, la producción de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE) tipo SHV-5.

El aislamiento y la identificación bioquímica de *K. pneumoniae* se realizó de acuerdo a la metodología clásica descrita por Koneman y col. (10).

Los fenotipos de susceptibilidad fueron determinados por concentración inhibitoria mínima (CIM) siguiendo el método de dilución en agar de acuerdo a la técnica estandarizada por Woods y Washington (11). Los resultados de la CIM fueron interpretados de acuerdo a lo descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (12). Los antimicrobianos utilizados en estos ensayos fueron: piperacilina-tazobactam (Wyeth-Lederle), meropenem (AstraZeneca), tobramicina (Valmoreca), netilmicina (Schering-Plough), kanamicina (Bristol-Myers), estreptomycin (Sigma), gentamicina (Farmachem), amikacina (Renochem-AG), tetraciclina (Sigma), cloranfenicol (Sigma) y ciprofloxacina (Proula). Se consideró como fenotipo multirresistente toda cepa con producción de β LEE asociada a otros marcadores de resistencia. Se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 como cepa control de estos ensayos.

Para la determinación de la formación de biopelículas en las cepas de *K. pneumo-*

niae, fue necesario establecer previamente el tiempo de ocurrencia de la fase estacionaria del crecimiento en dos cepas del grupo de estudio seleccionadas al azar y las cepas control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* MZ2098 y *K. pneumoniae* ATCC 23357. Se realizó una curva de crecimiento mediante el cultivo de las cepas en caldo Luria Bertani (LB) en aerobiosis a 37 °C, y se verificó cada hora la concentración de células por densidad óptica (DO). Los resultados determinaron que la fase estacionaria ocurrió durante el lapso de 10 a 18 horas. Teniendo en cuenta este resultado y lo reportado en la literatura (13, 14), se establecieron 18 horas de incubación como el tiempo suficiente para que las cepas bacterianas en fase estacionaria formaran biopelículas. Posteriormente, se estandarizó el inóculo bacteriano para los ensayos de determinación de la biopelícula, a partir de cultivos frescos de 18 horas en caldo BHI suplementado con MOPS 2 mM (3-[N-morfolino] ácido propanosulfónico (Sigma), se tomaron 100 μ L de cultivo de cada cepa y se colocaron en los pozos de una placa de policloruro de vinilo (PVC) (BD, Falcon), se leyó en un espectrofotómetro (Genios Tecan) a una longitud de onda de 595 nm. Las densidades ópticas alcanzadas en las 50 cepas de *K. pneumoniae* oscilaron entre 0,19 y 0,52. Con base en estos resultados, todas las cepas fueron ajustadas a un inóculo correspondiente a una DO de 0,19 en caldo BHI-MOPS.

La formación de biopelícula se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por O'Toole y col. (14) modificado por Suescún y col. (15). Se colocaron 150 μ L del inóculo estandarizado de cada cepa en un pozo de una placa de PVC, a 37°C por 18 horas. Se verificó el crecimiento bacteriano en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para visualizar la formación de la biopelícula se removieron las células planctó-

nicas (bacterias libres), y se descartó el medio de cultivo por inmersión de la placa de PVC en un bandeja con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, las células sésiles (adheridas a las paredes del pozo) fueron teñidas con 200 μ L del colorante cristal violeta al 1%, por 20 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante fue eliminado lavando los pozos 3 veces con agua destilada. La formación firme de un anillo violeta adherido a la superficie interna del pozo acompañada de una $DO > 0,23$ se consideró como una prueba positiva para la producción de biopelícula.

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizaron el Statistical Product and Service Solutions (SPSS) versión 11.0, el Statistical Analysis System (SAS) versión 8.02 y el Origin 5.0. Los resultados fueron analizados mediante la aplicación de la prueba Chi cuadrado y el test exacto de Fisher. Una $p < 0,05$ se consideró con significancia estadística.

RESULTADOS

En la Tabla I, se muestra que las cepas de *K. pneumoniae* β LEE+ se asociaron con mayor frecuencia a la presencia de otros marcadores de resistencia, con porcentajes superiores al 30% para la resistencia a tobramicina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin y netilmicina, 20% para gentamicina y 18% para piperacilina-tazobactam y amikacina. Aunque en el grupo de cepas β LEE- el porcentaje de resistencia a los antibióticos no superó el 22%, los marcadores de resistencia más frecuentes fueron: en primer lugar, estreptomycin (22%), seguida por tobramicina y netilmicina (14%, respectivamente). Todas las cepas fueron sensibles al meropenem y ciprofloxacina, independientemente de la producción o no de β LEE. De igual forma, se observó que el grupo de *K. pneumoniae*

TABLA I
 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) EN CEPAS
 DE *K. pneumoniae* CON O SIN PRODUCCIÓN DE β LEE, A PIPERACILINA-TAZOBACTAM,
 MEROPENEM, AMINOGLUCÓSIDOS, TETRACICLINA, CLORANFENICOL Y CIPROFLOXACINA

Antibiótico	Rango ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Nº cepas resistentes	% resistencia (N = 50)
Piperacilina-tazobactam			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	4-128	9	18
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	1-2	0	0
Meropenem			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,25-1	0	0
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,25	0	0
Tobramicina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,25-64	19	38
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,25-32	7	14
Kanamicina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	1- \geq 256	19	38
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	1-128	5	10
Netilmicina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,5-128	17	34
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,5-128	7	14
Estreptomina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,5- \geq 256	18	36
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,5-128	11	22
Gentamicina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,25- \geq 64	10	20
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,25- \geq 64	6	12
Amikacina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,5-256	9	18
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,5-64	1	2
Tetraciclina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	16-64	19	38
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	2-32	1	2
Cloranfenicol			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	32-128	19	38
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	4-32	1	2
Ciprofloxacina			
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁺	0,125-1	0	0
<i>K. pneumoniae</i> β LEE ⁻	0,125-0,5	0	0

β LEE⁺: cepa productora de β -lactamasa de espectro expandido. β LEE⁻: cepa no productora de β -lactamasa de espectro expandido.

β LEE+, mostró rangos inhibitorios para la mayoría de los antibióticos iguales o superiores a una dilución en comparación con los valores mostrados por las cepas β LEE-.

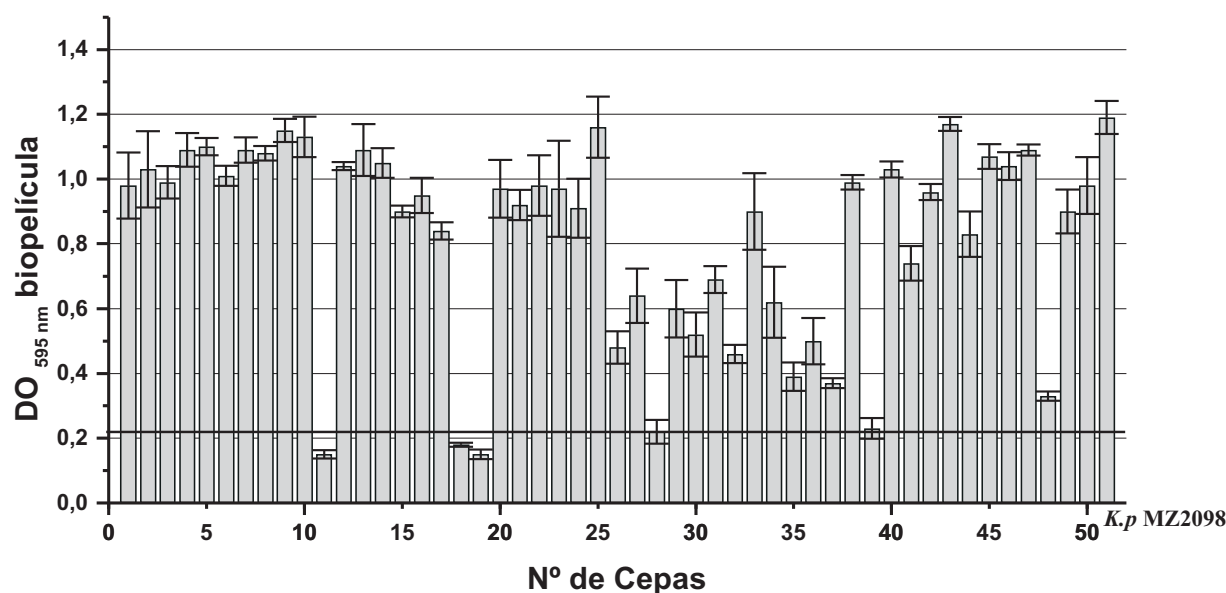
La formación de biopelícula se observó en la mayoría de las cepas estudiadas (45/50; 90%) a una $DO > 0,23$. De este grupo de cepas, el 75,6% (34/45) produjo biopelículas a una $DO > 0,8$. Sólo 5 cepas (0,1%) registraron $DO \leq 0,23$, lo cual se correspondió con la no formación de biopelícula (Fig. 1). Los resultados de la asociación de los patrones de susceptibilidad a los antibióticos con la formación de biopelículas se muestran en la Tabla II. El 18% de las cepas de *K. pneumoniae* no presentaron marcadores de resistencia. De este grupo, el 77,8% formó biopelícula, mientras que más del 90% de las cepas resistentes produjo biopelículas. El fenotipo multiresistente más frecuente (30%) fue el constituido por β LEE+-aminoglucósidos-tetraciclina-cloranfenicol (β LEE+-AMG-TET-CLF). Casi todas las cepas que conformaron este fenotipo formaron biopelículas (93,3%). No se obser-

vó significancia estadística entre los diferentes patrones de susceptibilidad y la producción de biopelícula ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

K. pneumoniae ha sido reconocida como una de las especies en las que se han detectado con mayor frecuencia diversos mecanismos de resistencia, especialmente la producción de β -lactamasas y de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (1-3).

En este estudio, se demostró que más del 30% de las cepas de *K. pneumoniae* β LEE+ se asoció con frecuencia a otros marcadores de resistencia tales como: tobramicina (38%), kanamicina (38%), tetraciclina (38%), cloranfenicol (38%), estreptomycin (36%), netilmicina (34%) y piperacilina-tazobactam (18%). Estos resultados avalan las afirmaciones de Kizirgil y col. (16), quienes sustentan que cepas de *K. pneumoniae* productoras de β LEE aisladas en Unidades de Cuidado Intensivo, son frecuentemente más resistentes a los amino-



DO: densidad óptica; nm: nanómetro; *K.p* MZ2098: cepa control *K. pneumoniae*. Los microorganismos con una $DO \leq 0,23$ (se indica con la línea) no formaron biopelículas. Las barras muestran el promedio \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos independientes para cada una de las cepas estudiadas.

Fig. 1. Evaluación de la formación de biopelículas en cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

TABLA II
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *K. pneumoniae*
Y LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

Patrones de susceptibilidad <i>K. pneumoniae</i>	% /Nº Cepas Total	Formación de biopelícula		
		Positivo % (n/total)	Negativo* % (n/total)	p
Cepas sensibles	18 (9/50)	77,8 (7/9)	22,2 (2/9)	0,65
Cepas resistentes	82 (41/50)	92,7 (38/41)	7,3 (3/41)	0,57
1 AMG	12 (6/50)	66,7 (4/6)	33,3 (2/6)	0,64
2 AMG	2 (1/50)	100 (1/1)	0 (0/1)	0,49
3 o más AMG	16 (8/50)	100 (8/8)	0 (0/8)	0,44
Cepas multirresistentes	52 (26/50)	96,2 (25/26)	3,8 (1/26)	0,54
β LEE ⁺ -TET-CLF	4 (2/50)	100 (2/2)	0 (0/2)	0,1
β LEE ⁺ -AMG -TET-CLF	30 (15/50)	93,3 (14/15)	6,7 (1/15)	0,54
β LEE ⁺ -AMG -TET-CLF-Pip/Taz	18 (9/50)	100 (9/9)	0 (0/9)	0,57

β LEE: β -lactamasa de espectro extendido. AMG: aminoglucósidos. TET: tetraciclina. CLF: cloranfenicol. Pip/Taz: piperacilina-tazobactam. * Corresponde a cepas con DO \leq 0,23 (ver Fig. 1).

glucósidos que aquellas que no producen esta enzima. De hecho, los patrones β LEE⁺-AMG-TET-CLF y β LEE⁺-AMG-TET-CLF- Pip/Taz fueron los fenotipos multirresistentes predominantes (30 y 18% respectivamente).

Las cepas analizadas en este estudio fueron aisladas de pacientes pediátricos con diagnóstico de septicemia nosocomial. Por su condición clínica grave, estos pacientes fueron sometidos a procedimientos invasivos que facilitaron muy probablemente la colonización de los mismos por *K. pneumoniae*. Numerosos estudios señalan que los dispositivos médicos invasivos (catéteres, sondas, prótesis, etc.), así como el tejido desvitalizado o lesionado por cirugías o traumatismos, pueden ser colonizados por *K. pneumoniae* (4, 5, 17, 18). Bajo estas circunstancias *K. pneumoniae* puede desarrollar la formación de biopelículas, que favorecen la instauración de procesos crónicos o persistentes refractarios a la terapia antimicrobiana (4, 7, 9). En este estudio, se demostró que el 90% de las cepas analizadas formó biopelículas; esta propiedad fue independiente de cualquiera de las variaciones

fenotípicas de susceptibilidad presentes en las cepas estudiadas. Es probable que la formación de biopelícula en *K. pneumoniae* sea una condición inherente del microorganismo y que la misma, esté regulada por factores propios del microambiente bacteriano (pH, temperatura, oxígeno, nutrientes, etc), así como por la secreción o estimulación de sustancias que promueven la comunicación bacteriana o la percepción de quórum (del inglés *quorum sensing*) para la expresión particular de esta característica fenotípica (19, 20). Los resultados de este estudio han puesto en evidencia que en la UARN del IAHULA reside una población bacteriana con adaptaciones importantes al ambiente y circunstancias donde convive. La resistencia a los agentes antimicrobianos y en especial la formación de biopelículas fueron características que le otorgaron a las cepas estudiadas de *K. pneumoniae*, ventajas para su persistencia y diseminación en el ambiente intrahospitalario.

Donlan y Costerton (6) señalaron que las bacterias que forman biopelículas disminuyen considerablemente su susceptibilidad

a los agentes antimicrobianos. Esto es debido, por una parte, a que el transporte o difusión de los antibióticos a través de la matriz de una biopelícula es lento o limitado y requiere concentraciones de antibióticos cien o mil veces más elevadas que las bacterias en fase planctónica (células libres) y, por la otra, la acción final de los antibióticos está impedida al encontrarse bacterias que en condición de biopelícula que reducen su tasa de crecimiento y disminuyen su actividad metabólica (22).

Otro de los fenómenos que la formación de biopelículas favorece en la población bacteriana, es el del intercambio de información genética (4, 22). Ehlers y Bower (23), demostraron la transferencia conjugativa de un plásmido entre diferentes bacterias gramnegativas que formaban una biopelícula. La tasa de transferencia horizontal del plásmido fue superior en varios órdenes de magnitud en la biopelícula a la de los cultivos líquidos de estas mismas bacterias. En un estudio genético previo, a 26 de las cepas estudiadas en este trabajo se les detectó un plásmido de 87 kb que mediaba además, de la producción β LEE tipo SHV-5, otros determinantes de resistencia (3). Es posible que estas cepas bajo la condición de biopelícula *in vivo* hayan facilitado la transferencia de marcadores de resistencia entre ellas, permitiendo de esta manera demostrar la presencia de una gran variedad de patrones de susceptibilidad que se extendieron desde bacterias totalmente sensibles a cepas con fenotipos multirresistentes complejos.

Los resultados de este estudio permiten afirmar que la resistencia antimicrobiana y la capacidad para formar biopelículas, fueron características independientes en las cepas estudiadas, pero que constituyeron las bases para el establecimiento de *K. pneumoniae* como un patógeno nosocomial. Por lo tanto, estas dos condiciones en *K. pneumoniae* deben ser evaluadas en el mo-

mento de decidir una conducta terapéutica para el tratamiento de los pacientes con infección nosocomial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) código: ADG FA-02-97 de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

REFERENCIAS

1. Marra AR, Wey SB, Castelo A, Gales AC, Cal RGR, do Carmo Filho JR, Edmond MB, Pereira CAP. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis* 2006; 6:24.
2. Araque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini GM. Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15:37-42.
3. Araque M, Rivera I. Simultaneous presence of bla_{TEM} and bla_{SHV} genes on large conjugative plasmid carried by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med Sci* 2004; 327(3): 118-122.
4. Parsek M, Singh P. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:667-701.
5. Yu V, Hansen D, Chien W, Sagnimeni A, Klugman K, von Gottberg A. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(7):986-993.
6. Donlan R, Costerton W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 933-951.
7. Anderl J, Zahller J, Roe F, Stewart P. Role of nutrient limitation and stationary-

- phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(4):1251-1256.
8. **Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg E, Niels H.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(4):1175-1187.
 9. **Fux C, Costerton J, Stewart P, Stoodley P.** Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005; 13(1):34-40.
 10. **Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WN, Sommers H, Winn WC.** Diagnóstico Microbiológico. Texto atlas color. 3ª. Ed. México: Editorial Médica Panamericana; 1997.
 11. **Woods GL, Washington JA.** Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editores. Manual of Clinical Microbiology, 6º ed. Washington, DC. American Society for Microbiology 1995; 1327-1341.
 12. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Document M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically M7-A7. Vol. 27, N° 1, 17th informational supplement Wayne, PA: CLSI. 2007. p. 98-103.
 13. **O'Toole G, Kolter R.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 1998; 28(3):449-461.
 14. **O'Toole G, Pratt A, Watnick P, Newman D, Weaver V, Kolter R.** Genetic approaches to study of biofilms. Methods Enzymol 1999; 310:91-109.
 15. **Suescún A, Cubillos J, Zambrano M.** Genes involucrados en la biogénesis de fimbrias afectan la formación de biopelículas por parte de *Klebsiella pneumoniae*. Biomédica 2006; 26:528-537.
 16. **Kizirgil A, Demirdag K, Orden M, Bulut Y, Yakupoğullari Y, Toraman Z.** In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates. Microbiol Res 2005; 160:135-140.
 17. **Balestrino D, Haagensen J, Rich C, Foriester C.** Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. J Bacteriol 2005; 187(8):2870-2880.
 18. **Raffa R, Iannuzzo J, Levine D, Saied K, Schwartz R, Sucic N.** Bacterial communication "quorum sensing" via ligands and receptors: a novel pharmacologic for the design of antibiotic drugs. J Pharmacol Exp Therap 2005; 312(2):417-423.
 19. **Lasa I.** Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. Int Microbiol 2006; 9:21-28.
 20. **Rasmussen TB, Givskov M.** Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenesis drugs Int J Med Microbiol 2006; 296:149-161.
 21. **Mateo M, Maestre J.** Biofilm: modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioter 2004; 17(1):26-28.
 22. **Drenkard E, Ausubel FM.** *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 2002; 416:740-743.
 23. **Ehlers L, Bouwer E.** RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. Water Sci Technol 1999; 7:163-171.