

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

**PRESENCIA DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS
DE MUESTRAS RECOLECTADAS DE NUEVE HOSPITALES DE
LA CIUDAD DE QUITO, DE MAYO DEL 2009 A NOVIEMBRE
DEL 2010.**

Disertación previa a la obtención del título de Médico Cirujano

ANA MARÍA GÓMEZ JARAMILLO

Quito, 2011

A mi Madre, fuerza, valor y ejemplo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por proveerme la fuerza necesaria para desarrollar mis capacidades y por darme la motivación suficiente para culminar este trabajo.

A mi madre, eje de mi vida, quien con su amor y paciencia me ha apoyado en cada momento, sin ella no lo habría logrado.

A la Dra. Iliana Alcocer por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por sus enseñanzas y conocimientos impartidos que han forjado en mi disciplina y perseverancia.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Jeannete Zurita, por ser un ejemplo admirable para mí y todos los médicos ecuatorianos, por la guía que brindó a todo el equipo de trabajo involucrado en esta investigación.

No puedo dejar de mencionar a la prestigiosa Pontificia Universidad Católica del Ecuador en la cual viví los 6 años más maravillosos de mi vida y me permitió conocer grandes maestros que me dieron las herramientas necesarias para ejercer una profesión tan noble como esta, mi eterno agradecimiento.

A aquellas personas que con el tiempo se convirtieron en grandes amigos, a Fernanda por ser ejemplo de valentía y constancia, Gaby y Dianita por enseñarme a trabajar en equipo, Pedro, Sofy, Irina y David quienes con su tiempo y conocimientos hicieron realidad este sueño; a todos ellos muchas gracias.

A mis profesores, Dr. Francisco Pérez, quien con sus clases sembró en mi la curiosidad por los microorganismos y me hizo descubrir la complejidad de seres tan “simples”, y al Dr. Gonzalo Montero por el tiempo dedicado a este estudio.

Finalmente, a mis amigas y compañeras de toda la carrera: Pame y Patty por su eterna e incondicional amistad.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
REDNARBEC	Red Nacional de Resistencia Bacteriana
LPS	Lipopolisacárido
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetilmurámico
UDP	Uridin-trifosfato
PBP	Penicillin Binding Proteins
DHP-I	Dehidropeptidasa I
OprD	Porina D2
BLEES	β -lactamasas de espectro extendido
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
IMI	Imipenemasa
NMC-A	No metalo-carbapenemasa A
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa

Abreviatura	Significado
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
GES	Guyana extended spectrum
MBL's	Metallo β -lactamasas
EDTA	Ethilenodiamenetetra acético
IMP	Active on imipenem
VIM	Verona integron-encoded metallo β – lactamase
OXA	Oxacillin-hydrolyzing enzyme
TSI	Triple Sugar Iron Agar
CIT	Citrate Simmons Agar
MILI	Motility-Indol-Lysine Agar
O	Ornitina

Abreviatura	Significado
MR	Methyl Red
F	Fenilalanina
U	Urea
MHT	Modified Hodge Test
TSB	Tryptic Soy Broth
PCR	Polimerase Chain Reaction
<i>bla_{KPC}</i>	Gen KPC β -lactamasa
<i>bla_{GES}</i>	Gen GES β -lactamasa
<i>bla_{VIM}</i>	Gen VIM β -lactamasa
<i>bla_{IMP}</i>	Gen IMP β -lactamasa
Pb	Pares de bases
MILI	Motility-Indol-Lysine Agar
AMP	Ampicilina

Abreviatura	Significado
CAZ	Ceftazidima
CTX	Cefotaxima
IMP	Imipenem
MER	Meropenem
FOX	Cefoxitina
ERT	Ertapenem
HVZ	Hospital Vozandes
HBO	Hospital de Niños Baca Ortiz
HCAM	Hospital Carlos Andrade Marín
HG1	Hospital de las Fuerzas Armadas
HPN	Hospital de la Policía Nacional
MIA	Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora
SNQ	Hospital Solca de Quito
HPAS	Hospital Pablo Arturo Suárez
HEG	Hospital Enrique Garcés

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	40
1. Población de estudio	40
2. Tipo de Estudio	41
3. Procedimientos de Recolección de Información	41
3.1 Identificación Fenotípica de enterobacterias: Pruebas Bioquímicas	42
3.2 Suceptibilidad a Antimicrobianos	43
3.3 Detección Fenotípica de carbapenemasas: Test Modificado de Hodge, Test doble disco sinergia ácido borónico y EDTA	44
3.4 Detección genotípica de carbapenemasas: Extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección de genes de resistencia: <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{GES}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i>	48

CAPÍTULO IV. RESULTADOS	56
1. Análisis Univarial	56
1.1 Variables descriptoras de la población	56
1.2 Origen de la Muestra	57
1.3 Resistencia Bacteriana: Antibiograma Inicial	62
1.4 Cepas sospechosas de producir carbapenemasas	63
1.5 Antibiograma Confirmatorio: Utilizado para la comprobación fenotípica de la presencia de BLEE	64
1.6 Análisis Fenotípico y Genotípico	65
2. Análisis Estratificado	69
2.1 Sospecha de carbapenemasas por procedencia de la muestra	69
2.2 Análisis de Sensibilidad del Test de Hodge versus Genotipo	70
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	72

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	83
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	127

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Medida descriptiva de la edad de los pacientes de los cuales se tomó los aislados clínicos provenientes de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	56
Tabla 2.	Distribución según el tipo de muestras biológicas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.....	60
Tabla 3.	Identificación bacteriana realizada en la PUCE según género y especie en muestras tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 4.	Presencia de BLEES en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	64
Tabla 5.	Screening de la presencia de carbapenemasas mediante el Test Modificado de Hodge en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	65
Tabla 6.	Detección fenotípica de serin β -lactamasas mediante el Test ácido borónico - imipenem en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 7.	Detección fenotípica de metalo β -lactamasas mediante el Test de doble disco sinergia EDTA – imipenem en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	67
Tabla 8.	Descripción del Genotipo de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	68
Tabla 9.	Distribución por el origen de las muestras sospechosas de producir carbapenemasas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 10.	Descripción del perfil genotípico y su relación con el origen de las cepas sospechosas de producir carbapenemasas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	70
Tabla 11.	Sensibilidad y especificidad del Test Modificado de Hodge aplicado para el screening de la presencia de carbapenemasas en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución según sexo de los pacientes de los cuales se tomó los aislados clínicos provenientes de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	57
Figura 2.	Distribución según el servicio de salud de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	58
Figura 3.	Distribución del origen de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.** Descripción del perfil de resistencia y sensibilidad en el Antibiograma inicial en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010 **62**
- Figura 5.** Cepas sospechosas de producir carbapenemasas de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010 **63**
-

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Datos de origen de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas	128
Anexo 2.	Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (halos para imipenem igual o menor a 21 mm)	131
Anexo 3.	Descripción Fenotípica y Genotípica de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas	136

LISTA DE ANEXOS

Anexo 4.	Primers utilizados en el estudio para la identificación genotípica de genes responsables de la resistencia a carbapenemes	141
Anexo 5.	Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de enterobacterias	143
Anexo 6.	Apariencia de las colonias de enterobacterias en cultivo de EMB	144
Anexo 7.	Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas: Test Modificado de Hodge y Test de Doble Disco Sinergia	145

LISTA DE ANEXOS

Anexo 8.	Representación gráfica del gel de electroforesis de los genes <i>bla_{KPC}</i> encontrados en los aislados de enterobacterias resistentes a carbapenemes	151
-----------------	--	------------

RESUMEN

Las enterobacterias son los principales microorganismos causantes de enfermedades infecciosas en el ser humano; su perfil de resistencia natural las hace capaces de hidrolizar los antibióticos betalactámicos mediante la producción de β - lactamasas, y además su material genético es capaz de mutar y adquirir mecanismos de resistencia múltiples.

La resistencia de las enterobacterias a los carbapenemes es reconocida desde hace algunos años, inicialmente por la detección de carbapenemasas en casos aislados alrededor del mundo; sin embargo debido a que en su mayoría los genes responsables de la producción de estas enzimas tienen una ubicación plasmidial su diseminación ha sido rápida y existen verdaderos brotes de este tipo de cepas multiresistentes en Europa, Norte América y Sudamérica, convirtiendo a este fenómeno en un problema epidemiológico de gran magnitud y determinando un reto para la medicina actual en el manejo de estas infecciones que cursan con altas tasas de mortalidad.

El objetivo de este estudio fue identificar de manera fenotípica y genotípica a las enzimas responsables de esta resistencia, las carbapenemasas (metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas) en aislados bacterianos de origen hospitalario y comunitario.

Para el estudio fenotípico se utilizó el Test Modificado de Hodge como prueba de screening en cepas de enterobacterias posiblemente productoras de carbapenemasas; y las pruebas de doble disco sinergia con EDTA y ácido borónico que en sinergia con el imipenem se utilizan para la detección de metalo- β -lactamasas y serin- β -lactamasas respectivamente.

Para el análisis molecular se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando los genes mayormente diseminados entre las enterobacterias y que codifican metalo- β -lactamasas: *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y serin- β -lactamasas: *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*.

De los 2651 aislados el 65% corresponden a muestras comunitarias provenientes tanto de consulta externa y emergencia; del medio hospitalario, tanto clínico como quirúrgico, se obtuvo un 28% de las muestras; 3% corresponden a UCI y un 4% de cepas de las que no se pudo obtener información acerca del servicio de origen debido a inconsistencias en los registros hospitalarios.

El análisis fenotípico detectó un 2% de cepas (42 aislados) con un halo de sensibilidad igual o menor a 21mm para el imipenem las cuales fueron sometidas a la prueba de screening (Test Modificado de Hodge) resultando positivo en 7 de los mismos.

A estas 42 cepas, por otra parte, se las analizó mediante metodología molecular; y 6 demostraron poseer el gen *bla_{KPC}* responsable de la producción de serin- β -lactamasas del tipo KPC.

Para los genes *bla_{GES}*; *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* no se encontraron aislados productores de estas enzimas. Los aislados confirmados mediante PCR corresponden a los mismos aislados positivos en el Test Modificado de Hodge demostrando así que este último test tiene una alta Sensibilidad (100%) y Especificidad (93%) para la detección de cepas productoras de carbapenemasas.

Los Test de doble disco sinergia con imipenem para el caso del ácido borónico resultó positivo en las 6 cepas productoras del gen *bla_{KPC}* lo que lo hace útil para el screening de cepas productoras de serin β -lactamasas del tipo KPC. El uso de EDTA fue negativo en todas las cepas analizadas lo que concuerda con la ausencia de estos genes confirmado por PCR.

El conocimiento del perfil de resistencia de las enterobacterias a los carbapenem es de suma importancia para el control de la diseminación de estas cepas en nuestro medio ya que son capaces de producir infecciones con altas tasas de morbilidad y mortalidad con graves repercusiones económicas y humanas en el sistema de salud en el mundo entero.

Palabras clave: enterobacterias, carbapenemes, metalo- β -lactamasas, serin- β -lactamasas, Test Modificado de Hodge.

ABSTRACT

The enterobacteria are the main microorganisms that cause infectious diseases in humans. Their natural resistance profile makes them able to hydrolyze beta-lactamic antibiotics by producing β -lactamases and their genetic material is also able to mutate and get multiple resistance mechanisms.

The resistance of enterobacteriaceae to carbapenems has been recognized some years ago by the initial detection of carbapenemases in isolated cases around the world, but because most of the genes responsible of the production of these enzymes comes from plasmids, it's dissemination has been rapid and has been reported true outbreaks of multidrug-resistant strains in Europe, North and South America, making this phenomenon in a large-scale epidemiological problem and determine a challenge to modern medicine in the management of these kind of infections that lead to high rates of mortality.

The aim of this study was to identify by phenotypic and genotypic methods the enzymes responsible for this resistance, carbapenemases (metallo- β -lactamases and serine β -lactamases) isolated in hospital and community.

The Modified Hodge Test was used for the phenotypic study as an screening test in strains of enterobacteriaceae with presumable carbapenemases production, and the double disc synergy tests with EDTA and boronic acid were used for the detection of metallo- β -lactamases and serine β -lactamases, respectively. Polymerase chain reaction (PCR) was used for the molecular analysis amplifying the genes mostly scattered among the enterobacteriaceae and encoding metallo- β -lactamases: *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* and β -lactamase serine: *bla_{KPC}* and *bla_{GES}*.

Sixty five percent of the 2651 isolates were from the community samples of both outpatient and emergency environment; both clinical and surgical represented 28% of the samples, 3% were from ICU and of 4% of strains information about the service area was not available.

Phenotypic analysis detected 2% of strains (42 isolates) with an inhibition zone equal or lesser to 21mm for imipenem, those isolates underwent the screening test (Modified Hodge Test) and there was 7 positive cases. On the other hand they were analyzed by molecular methods, 6 of which proved to have the gene responsible for production *bla_{KPC}* of serine β -lactamases KPC type.

For genes *bla_{GES}*, *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* any isolate were found for the production of this enzymes. PCR-confirmed isolates correspond to the same positive isolates in the Modified Hodge Test demonstrating to have a high sensitivity (100%) and specificity (93%) for the detection of carbapenemase producing strains.

The Double Disc Synergy Test with imipenem in the case of boronic acid were positive in the 6 gene *bla_{KPC}* producing strains, so in fact it will be useful for the detection of serin – β -lactamases KPC type. The use of EDTA was negative in all strains tested and the protein chain reaction support this negative gene profile in all strains. Knowledge of the resistance profile of enterobacteriaceae to carbapenems is critical to controlling the spread of these kind of strains in our environment because it are able to cause infections with high morbidity and mortality rates, with serious economic and human impact in our system health.

Keywords: enterobacteria, carbapenems, metallo- β -lactamases, serine β -lactamases, Modified Hodge Test.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un problema de Salud Pública reconocido mundialmente y que causa gran mortalidad. En un inicio las β -lactamasas (aproximadamente 900 hasta el momento) eran uno de los mecanismos responsables de provocar estos perfiles de resistencia; y las carbapenemasas, enzimas también pertenecientes a este grupo, eran únicamente descritas en microorganismos como *Pseudomonas* y *Acinetobacter spp.*, considerados multiresistentes y causantes de infecciones nosocomiales de difícil control.

Sin embargo desde 1980 existen reportes de la presencia de carbapenemasas en el grupo de las enterobacterias y la vigilancia epidemiológica ha sido testigo de verdaderos brotes en varias regiones geográficas en los últimos años siendo su diseminación un hecho evidente. El análisis del programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY entre 2000 y 2004 demostró la presencia de estas enzimas en aislados de enterobacterias tanto en Norteamérica como en Europa y se comprobó además su expansión clonal.

Por otra parte en América Latina son más frecuentes los casos documentados de cepas resistentes a los carbapenem, perfil fenotípico mediado por la acción de estas enzimas; siendo Argentina y Brasil los países con mayor número de reportes.

Por los antecedentes expuestos se considera una emergencia epidemiológica el apareamiento de estas enzimas en el grupo de las enterobacterias tomando en cuenta que estas bacterias son las causantes de la mayoría de infecciones nosocomiales y comunitarias; esto determinaría una limitación a la hora de tomar decisiones terapéuticas. Es por esto que se necesita conocer la diseminación de las carbapenemasas, no solo en el Ecuador sino en América Latina y el resto del mundo.

El objetivo general en esta investigación fue determinar la presencia de carbapenemasas en enterobacterias aisladas de muestras clínicas tomadas de los hospitales pertenecientes a la REDNARBEC, mediante método fenotípico y molecular; y a su vez detectar los genes responsables de la resistencia según pertenezcan a la clasificación de las carbapenemasas (serin β -lactamasas y/o metalo β -lactamasas).

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La familia de las enterobacterias es el grupo más grande de bacilos gram negativos con importancia clínica; alrededor de 20 especies son las causantes de un 95% de patologías infecciosas en el ser humano. En general, estas bacterias se encuentran distribuidas de manera cosmopolita, presentes en el suelo, agua y vegetación; además de encontrarse en la flora intestinal de muchos animales y el hombre (1).

Las enfermedades producidas por estos microorganismos son muy variables, así se han descrito que un 30% de las septicemias son provocadas por estas bacterias, son agentes patógenos en el 90% de las infecciones de vías urinarias, siendo este último el foco primario más común para bacteriemia; y la gran mayoría de las infecciones intestinales son debidas a enteropatógenos (2,3).

Las enterobacterias más frecuentes y de mayor significación clínica están comprendidas entre las siguientes especies: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, etc, encontrándose en la mayoría de los aislados hospitalarios; sobre todo de las unidades de terapia intensiva, y en cepas de origen comunitario. (3,4)

Estas infecciones pueden derivarse de microorganismos normalmente comensales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, entre otros que también pueden comportarse como oportunistas; sin embargo otras bacterias siempre causan enfermedad como *Salmonella thyphi*, *Shigella spp.*, *Yersinia pestis*, etc. (1,5)

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gram negativos de aproximadamente 0,3 a 6 μm , pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos y no forman esporas, pueden crecer rápidamente de forma aerobia o anaerobia (anaerobios facultativos). Poseen requerimientos nutricionales relativamente sencillos, estos son los que determinan reacciones bioquímicas que sirven de base para su identificación; son capaces de fermentar la glucosa, reducen los nitratos, son catalasa positivos y oxidasa negativos (1).

En cuanto a su fisiología y estructura, las enterobacterias poseen un lipopolisacárido (LPS) termoestable, principal antígeno de la pared celular y formado por 3 componentes: el polisacárido somático O más externo, una región central polisacárida compartida por todas las enterobacterias (antígeno común enterobacteriano) y el lípido A. La clasificación serológica de las enterobacterias se basa en 3 grandes grupos de antígenos: los polisacáridos somáticos O, los antígenos capsulares K, y las proteínas flagelares H.

Las cepas móviles poseen flagelos peritricos, así mismo un gran número posee fimbrias o pilis los cuales son de 2 clases: fimbrias comunes codificadas por el cromosoma bacteriano y los pilis sexuales codificados por plásmidos conjugativos. Las fimbrias comunes confieren la capacidad para unirse a receptores específicos de la célula anfitriona y los pilis sexuales facilitan el proceso de transferencia genética entre bacterias. (6,7)

Las infecciones por enterobacterias se pueden originar desde un reservorio animal, de un portador humano o por la diseminación endógena de los microorganismos; y potencialmente cualquier sistema orgánico podría ser colonizado y por ende infectado. Los seres humanos son vulnerables a las infecciones por microorganismos entéricos sobre todo si existen condiciones predisponentes como enfermedades debilitantes de base, por ejemplo: patologías cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer, enfermedades autoinmunes, infección por VIH, pacientes transplantados, etc (8,9,10,11).

Por otra parte los pacientes hospitalizados poseen un riesgo mayor de ser colonizados por bacterias entéricas del ambiente nosocomial y por ende con una virulencia y un perfil de resistencia distinto al de un ambiente comunitario; es así como la instrumentación mediante catéteres, la intubación por ventilación mecánica, la colocación de vías centrales, la nutrición parenteral y otros dispositivos son la vía de entrada para las enterobacterias ya que poseen el acceso adecuado al torrente sanguíneo

o a sistemas vulnerables como lo son la vía respiratoria o urinaria donde el medio ambiente es propicio para la infección y la posterior diseminación. (12,13,14) Es así como las infecciones por bacterias gram negativas entéricas constituyen las patologías infecciosas de mayor incidencia y prevalencia tanto en el medio hospitalario como en el comunitario.

Tanto en las bacterias gram negativas como en las gram positivas, la pared microbiana es un elemento esencial para su crecimiento, proliferación y por ende su supervivencia; es así como el peptidoglucano componente principal de la pared bacteriana al ser polimérico le da estabilidad mecánica rígida a la misma gracias a su estructura de entramado por innumerables entrecruzamientos.

El peptidoglucano posee cadenas lineales de 2 aminoazúcares alternantes, la N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM), enlazadas por cadenas verticales de tetrapéptidos que le confieren rigidez. En las bacterias gram negativas la pared de peptidoglucano consiste en 50 a 100 moléculas de espesor y su síntesis incluye unas 30 enzimas y se la puede dividir en tres etapas.

En primer lugar se da la síntesis de un precursor en el citoplasma de uridin-trifosfato (UDP) acetilmuramil pentapéptido y UDP acetil-glucosamina, que posteriormente son transportados a través de la membrana citoplasmática por un transportador liposoluble y, por último, se unen al peptidoglucano en formación. En la segunda fase se unen los UDP acetilmurámico y acetilglucosamina formando un polímero largo. Finalmente en la tercera etapa se produce el entramado; que se logra con la reacción de transpeptidación por medio de transpeptidasas fuera de la membrana celular.

Las penicilinas actúan inhibiendo ciertas enzimas bacterianas, llamadas proteínas fijadoras de penicilinas por su siglas en inglés “Penicillin Binding Proteins” PBP, que son esenciales para la síntesis del peptidoglucano (carboxipeptidasas, transpeptidasas y endopeptidasas). Por lo tanto, las penicilinas actúan en la fase de crecimiento bacteriano y no en la fase de reposo. Las bacterias producen diferentes tipos de PBP que son semejantes desde el punto de vista estructural pero varían en el número y en las funciones fisiológicas que cumplen durante la síntesis de la pared celular. (15)

Los carbapenemes son los β -lactámicos de mayor amplio espectro, actividad y resistencia a las β -lactamasas. Estructuralmente, se caracterizan por derivar del anillo carbapenem. Si bien los primeros carbapenem fueron de origen natural, los que se han introducido para uso clínico son semisintéticos (meropenem) o sintéticos (imipenem).

A partir de diferentes especies del género *Streptomyces* se obtuvieron numerosos carbapenemes naturales. Inicialmente fueron consideradas como distintos grupos (tienamicinas, ácidos olivánicos, epitenamicinas, carpetimicinas, asprenomicinas, pluracidomicinas, etc.) pero al comprobar que tenían un núcleo común se incluyeron todos en una misma familia.

La obtención de tienamicina a partir de *Streptomyces cattleya* en 1976 es el momento clave en el desarrollo de los carbapenemes. Se buscó una forma estable químicamente del antibiótico, y se consiguió la N-form imidoil tienamicina o imipenem que, sin embargo, era inactivado por la dehidropeptidasa I renal (DHP-I). Este inconveniente fue resuelto mediante el desarrollo de cilastatina, un inhibidor de esta enzima, con una semivida de eliminación semejante a la del imipenem, y que, asociada a él en una proporción 1:1, bloquea su metabolismo renal.

En 1985 se introdujo en clínica la combinación imipenem/Cilastatina (MK-787, Merck & Co) y en 1994 el meropenem, estable ante la DHP-I por la introducción de un grupo metilo en posición 1b por lo que no requiere de un inhibidor de la DHP-I. El anillo es un azobicyclo, es decir, está formado por dos anillos condensados, uno β -lactámico y otro pirrolidínico, que comparten un nitrógeno. A diferencia del anillo tiazolidínico de las penicilinas, posee en posición 1 un átomo de carbono en lugar de uno de azufre y un enlace no saturado entre 2 y 3. Los distintos carbapenemes son fruto de sustituciones en las posiciones 1 y 2.

Son antimicrobianos de bajo peso molecular, hidrofílicos y de estructura compacta lo que permite una penetración rápida a través de las porinas de los gram negativos. Como otros β -lactámicos, inhiben la síntesis de la pared celular en su último paso, la transpeptidación. Para ello, se unen a enzimas (transpeptidasas PBP) situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática que realizan esta función. De esta forma, la pared celular se debilita y, como consecuencia, la bacteria se lisa (16,17).

Ésta es la razón por la que los carbapenémicos son habitualmente bactericidas y este poder es dosis dependiente. Por sus características, se han convertido en antimicrobianos muy útiles en el tratamiento de numerosas infecciones hospitalarias graves producidas por bacterias multiresistentes.

Los carbapenemes consiguen entrar fácil y rápidamente en las bacterias gram negativas gracias a que su estructura y su pequeño tamaño les permiten atravesar a través de las porinas de la membrana externa. El imipenem emplea exclusivamente la vía de la OprD (antes llamada porina D2) en *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que meropenem emplea ésta y otras porinas. La diana principal en los bacilos gram negativos tanto del imipenem como de meropenem, es la PBP-2, aunque también se unen a la PBP-1. En *Escherichia coli* meropenem se fija además a la PBP-3.

El espectro de actividad es muy amplio y determinado por su capacidad de penetrar a través de la pared de los gram negativos, su alta afinidad por las PBP esenciales de muchas especies y su alta resistencia a muchas β -lactamasas de gram positivos y gram negativos.

En general, el espectro de imipenem coincide con el de meropenem en la práctica clínica; *in vitro* son excelentes contra muy diversos microorganismos aerobios y anaerobios como por ejemplo: Estreptococos (incluyendo *S. pneumoniae* resistente a penicilina), Enterococos (excepto *E. faecium* y cepas resistentes a penicilina que producen carbapenemasas), *Staphylococcus aureus*, a pesar de que algunas cepas de estos cocos resistentes a meticilina son sensibles, muchas no lo son; y *Listeria spp.* son sensibles. (18)

La actividad contra el género *Enterobacteriaceae* es muy eficiente incluyendo a los organismos resistentes a cefalosporinas por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEES) sean cromosómicas o plasmídicas (19). Inhiben muchas cepas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter spp.*; sin embargo la resistencia frente a los carbapenemes se está haciendo presente desde hace algunos años por la aparición de nuevas enzimas con capacidad hidrolítica contra estos que constituyen el último recurso terapéutico en infecciones por enterobacterias multiresistentes

La resistencia bacteriana es considerada y declarada por la OMS como un problema de salud pública de grandes dimensiones ya que provoca alrededor del 60% de las infecciones nosocomiales multiresistentes en Estados Unidos y causan más del 85% de la mortalidad por infecciones en el mundo; y esta resistencia va desde 0% hasta un 100% para los fármacos de primera elección e implica también a las opciones antibióticas de primera y segunda línea dejando así al personal médico sin opciones terapéuticas (20, 21).

La capacidad de las bacterias de resistir la acción de los antibióticos se basa en características propias del microorganismo y aquellas adquiridas por transmisión genética, esto forma parte de la evolución para la adaptación al medio ambiente adverso.

La variabilidad genética determina estos cambios para la defensa de las bacterias en contra de los distintos antibióticos que actúan en diferentes sitios blanco con el objetivo de aniquilar al germen; es así como se reconocen algunos mecanismos:

1. Las mutaciones puntuales en el genoma bacteriano que compromete un par de bases de nucleótidos provocan un cambio en la síntesis de una enzima o en el sitio blanco que ataca un antibiótico (22).

2. Los reordenamientos de segmentos largos de ADN que implican inversiones, deleciones, duplicaciones, inserciones o transposiciones de estos segmentos desde un plásmido o un cromosoma hacia otro; estos arreglos son realizados por secuencias denominadas transposones, integrones o secuencias de inserción que tienen la capacidad de moverse de manera independiente entre la información genética (23).

3. Un tercer nivel responsable de los mecanismos de resistencia se debe a la adquisición de ADN acarreado mediante plásmidos, bacteriófagos, secuencias desnudas de ADN desde otra bacteria. Estos cambios confieren variabilidad genética a la bacteria (24,25).

Una vez instaurados estos reordenamientos genéticos que le brindan resistencia a la bacteria se pueden diseminar mediante transformación, transducción, conjugación o transposición bacteriana.

Así mediante estos procesos existen al menos ocho mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos:

- Alteración y producción enzimática.
- Disminución de la permeabilidad de la membrana.
- Bombas de flujo.
- Alteración del sitio blanco.
- Protección del sitio blanco.
- Sobreproducción de los sitios blanco.
- Bypass en una vía metabólica.
- Proteínas que ligan el antibiótico.

Los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos por parte de los bacilos entéricos son diversos; y la manera de transmisión de este perfil de resistencia comprende a los plásmidos y a las mutaciones puntuales (transmisión vertical y horizontal) (26).

Las enterobacterias además de presentar resistencia a antibióticos como los aminoglucósidos y las quinolonas (27), han ampliado su espectro de resistencia a los β -lactámicos de manera alarmante; es así como actualmente se describen más de 900 β -lactamasas (28), y según al grupo al que estas pertenezcan afectan a las penicilinas de amplio espectro y cefalosporinas (β -lactamasas de espectro extendido) e incluso a los carbapenemes (carbapenemasas).

En muchas ocasiones la resistencia a estos antibióticos esta mediada por una combinación de distintos mecanismos naturales o adquiridos, lo que hace que sea aún más difícil el manejo de las infecciones que estas bacterias provocan ya que se convierten en cepas multiresistentes (29).

Así, los mecanismos mayormente descritos en los bacilos gram negativos entéricos son (30):

- 1) Modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas.
- 2) Disminución de la permeabilidad al antibiótico a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de porinas.
- 3) Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de flujo.
- 4) Modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico.

La alteración enzimática es el mecanismo predominante para la resistencia a los β -lactámicos, las enzimas producidas con este fin, las β -lactamasas, son capaces de destruir el anillo β -lactámico al escindir el puente amida de estos compuestos; los genes codificantes de las mismas se encuentran tanto en el cromosoma bacteriano como en secuencias transferibles (plásmidos, transposones). Las β -lactamasas poseen un espectro de acción distinto según su secuencia aminoácida o el sustrato al que dirigen su acción; de esta manera existe una clasificación funcional y molecular en este sentido.

Propuesto inicialmente por Ambler, las β - lactamasas se clasifican según su estructura molecular en 4 clases principales que toman en cuenta la secuencia de aminoácidos que las componen (31,32).

Clase	Sitio Activo	Enzima	Substrato	Ejemplos
A	Serina	Penicilinasa	Penicilinas	
		Espectro amplio	Benzilpenicilina, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas	PC1 en <i>Staphylococcus aureus</i> TEM-1, SHV-1 en <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , y otras bacterias gram negativas
		Espectro extendido (BLEES)	Substratos de amplio espectro y oxiamino- β -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) y aztreonam	En <i>Enterobacteriaceae</i> : TEM, SHV, CTX-M; PER-1, VEB-1, VEB-2, GES-1, GES-2, IBC-2 en <i>Pseudomonas</i>
		Carbapenemasas	Substratos de espectro extendido, cefamicinas y carbapenem	KPC-1, KPC-2, KPC-3 en <i>K. pneumoniae</i> ; NMC/IMI, SME

Clase	Sitio Activo	Enzima	Substrato	Ejemplos
B	Metallo-β-lactamasas (Zn²⁺)	Carbapenemasas	Substratos de espectro extendido, cefamicinas y carbapenem	IMP, VIM, GIM, SPM, SIM en <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.
C	Serina	Cefalosporinasas	Substratos de espectro extendido, cephamycinas	AmpC en Enterobacteriaceae, <i>Acinetobacter baumannii</i>
D	Serina	Oxacilinasas		
		Amplio espectro	Aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cloxacilina, meticilina, oxacilina, y algunas cefalosporinas de amplio espectro	OXA in <i>P. aeruginosa</i>
		Espectro extendido	Substratos de amplio espectro y oxiamino- β -lactámicos y monobactam	OXA en <i>P. aeruginosa</i>
		Carbapenemasas	Substratos de espectro extendido, cephamicinas y carbapenemes	OXA en <i>Acinetobacter</i> spp.

Adaptado de Jacoby GA, Muñoz-Price LS. The new β -lactamasas. *N Engl J Med.* 2005;352:380-391.

Por otra parte la clasificación propuesta por Bush-Jacoby-Medeiros realiza una categorización funcional según el perfil de su sustrato y la sensibilidad a los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico.

Esta clasificación presenta 3 clases principales, cefalosporinasas que no son bien inhibidas por el ácido clavulánico; grupo 2 penicilinasas - cefalosporinasas, y β -lactamasas de espectro extendido que son generalmente inhibidas por los inhibidores de los β -lactámicos; y el grupo 3 metalo β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y e y que son pobremente inhibidos por casi todos los inhibidores (33,34).

Grupo	Enzima	Inhibición por Clavulanato	Clase Molecular	Ejemplos
1	Cefalosporinasa	No	C	<i>Enterobacter cloacae</i> P99 (C), MIR-1 (P)
2a	Penicilinas	Si	A	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (C,B)
2b	Amplio espectro	Si	A	SHV-1 (C,B), TEM-1 (P)
2be	Espectro extendido	Si	A	<i>Klebsiella oxytoca</i> K1 (C), TEM-3 (P), SHV-2 (P)
2br	Resistente a inhibidor	Disminuida	A	TEM-30 (IRT-2) (P)
2c	Carbencilinas	Si	A	AER-1 (C), PSE-1 (P), CARB-3 (P)
2d	Cloxacilinas	Si	D o A	<i>Streptomyces cacaoi</i> (C), OXA-1 (P)
2e	Cefalosporinasa	Si	A	<i>Proteus vulgaris</i> (C), FEC-1 (P)
2f	Carbapenemasa	No	A	IMI-1 (C), NMC-A (C), Sme-1 (C)
3	Carbapenemasa	No	B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1 (C), IMP-1 (P)
4	Penicilinas	No	A	<i>Burkholderia cepacia</i> (C), SAR-2 (P)

C, cromosómica; P, plasmidial.

Adaptado de Jacoby GA, Muñoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med.* 2005;352:380-391.

La presencia de estas β -lactamasas se reporta desde el inicio del uso de los antibióticos β -lactámicos en la década de 1940; su evolución ha hecho que su perfil de acción sea sumamente amplio llegando a cubrir hasta las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, siendo estas las β -lactamasas de espectro extendido (35,36).

Algunas de las β -lactamasas descritas hasta el momento poseen actividad hidrolítica frente a los carbapenemes, estas enzimas denominadas carbapenemasas poseen un perfil de acción frente a las penicilinas de amplio espectro, oxiamino-cefalosporinas y las cefamicinas; esta característica es un punto muy importante ya que se debe reconocer que su actividad no es limitada a los carbapenemes; de ahí que su presencia convierte a las bacterias en microorganismos multiresistentes (37).

Las carbapenemasas son descritas desde hace algunos años, los primeros reportes de este tipo de actividad enzimática en cepas de enterobacterias apareció en Estados Unidos en *Klebsiella pneumoniae* con brotes esporádicos en diferentes áreas de este país (38,39), en Sudamérica ya existen reportes de la presencia de estas enzimas (40,41,42) y su diseminación se hace eminente si no se toma las medidas epidemiológicas necesarias.

Según la clasificación de las β -lactamasas, las enzimas que hidrolizan a los carbapenemes se encuentran en las siguientes categorías moleculares y funcionales. Así tenemos:

En la clasificación funcional, las carbapenemasas se las encuentra ubicadas principalmente en los subgrupos 2f y el grupo 3.

Existen 4 clases mayores según la clasificación molecular, así las carbapenemasas se encuentran en la clase A con la característica fundamental de poseer un residuo serina en el sitio activo, la clase B metalo β -lactamasas que se caracterizan por poseer Zinc como elemento esencial para su acción hidrolítica, y la clase molecular D, OXA- β -lactamasas también serin carbapenemasas.

Las serin- carbapenemasas clase molecular A, son enzimas descritas desde hace 20 años atrás en brotes esporádicos de aislados de enterobacterias tales como *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella pneumoniae*, etc. En cuanto a sus propiedades bioquímicas poseen entre 265 a 269 residuos de aminoácidos que les otorgan una masa molecular ente 25 a 32 kDa. Su mecanismo de acción al igual que el de otras carbapenemasas envuelve un mecanismo de tres pasos vía acetilación y desacetilación (43).

Tienen como característica principal tener un residuo serina en la posición 170 con un alineamiento caracterizado por una secuencia de elementos altamente conservada, siendo el primer elemento y el más constante Ser70-X-X-Lys, donde X representan residuos variables. Adicionalmente se ha reconocido la presencia de un residuo Glu166 que tendría que ver con el proceso de acetilación (44,45).

Su perfil de acción abarca desde las bencilpenicilinas hasta las cefalosporinas y el aztreonam; sin embargo son capaces de hidrolizar al imipenem, por lo que las bacterias que poseen estas enzimas tienen una sensibilidad disminuida al mismo, mostrando así un perfil de mediana hasta una absoluta resistencia a este carbapenem, hidrolizando a estos últimos en un rango de hasta >200% que a la bencilpenicilina.

Por otra parte se ha demostrado su inhibición por medio del ácido clavulánico y el tazobactam lo que ubica a estas enzimas en el subgrupo funcional 2f según Bush y Jacoby (46). A esta clase de carbapenemasas pertenecen las siguientes familias de enzimas: SME, NMC e IMI codificadas en el cromosoma bacteriano, y las enzimas KPC y GES de origen plasmidial.

Los aislados bacterianos que poseen la carbapenemasa SME (“*Serratia marcescens* enzyme”) fueron descritos por primera vez en el año de 1982 en una cepa de *Serratia marcescens* en Londres (47); desde entonces la diseminación de esta enzima ha hecho que esté presente en brotes aislados en distintas partes de Estados Unidos y del mundo (48,49). Se han descrito hasta el momento las siguientes variantes para SME: SME-1, SME-2, SME-3 (50,51,52) las cuales tienen un perfil de acción que abarca tanto a las cefaloporinas de amplio espectro como a los carbapenemes; y difieren entre ellas apenas en 1 a 2 aminoácidos (53) teniendo en común reguladores de su expresión al gen del tipo Lys type (54).

Las enzimas IMI/NMC-A (imipenemase/no-metallo carbapenemase-A) forman 2 subgrupos, IMI y NMC-A respectivamente (55). La carbapenemasa NMC-A se diferencia de IMI en 8 substituciones de aminoácidos; de esta última existen dos variantes que difieren en 2 aminoácidos solamente. En general las dos enzimas poseen un 97% de similitud y comparten un 70% de semejanza con la estructura de SME.

Los genes de estas carbapenemasas se encuentran únicamente en el cromosoma bacteriano, razón por la cual se los ha encontrado de manera esporádica ya que no se asocian a elementos transportables o móviles. Han sido halladas en aislados en Estados Unidos, Francia y Argentina (56,57,58) y más recientemente en cepas de *Enterobacter cloacae* en China (59). Su espectro de acción hace que sean capaces de hidrolizar a las penicilinas, cefalosporinas al imipenem y al aztreonam.

La enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) tiene un origen plasmidial y posee un espectro de acción diferente a las otras serin-carbapenemasas, teniendo afinidad por cefalosporinas tipo aminothiazoleoximas como la cefotaxima; además a pesar de haber sido descubierta inicialmente en aislados de *Klebsiella pneumoniae* (60), se la ha encontrado en otras clases de enterobacterias como *Serratia spp.* y *Escherichia coli* (61,62).

La variante KPC-1 difiere de la KPC-2 por una mutación en un solo aminoácido; conforme fueron apareciendo brotes de estas enzimas en Estados Unidos (63,64) se determinó una alarma epidemiológica ya que las cepas de *Klebsiella pneumoniae* que producían la mayoría de las infecciones multiresistentes (65) eran portadoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEES), teniendo como única opción terapéutica a los carbapenemes.

Estas nuevas enzimas mostraban concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) menores que las establecidas por el CLSI (66). Por lo tanto la relevancia clínica de este comportamiento fenotípico hace que la presencia de estas enzimas sea subestimada ya que se muestran con una susceptibilidad menor a los carbapenemes y no una clara resistencia; o pueden comportarse como BLEES (67).

Por otra parte la estructura de KPC-3 posee similitud con las dos primeras enzimas descritas y posee una hidrólisis mayor para la ceftazidima (68). La expansión de KPC ha sido rápida por todo el mundo y existen reportes en distintos países como Francia, Italia, Brasil y Colombia (69,70,71). Hasta el momento se han descrito 11 variantes de KPC, en general todas conservan la secuencia S-XX-K, S-D-N, y K-T-G de la clase A y poseen un 45% de similitud con la estructura de SME; lo que demuestra que las carbapenemasas conservan ciertas características que les confieren su perfil de hidrólisis (72).

El espectro de acción de estas enzimas abarca a todas las clases de β -lactámicos y con mayor eficiencia para cefalotina, cefaloridina, bencilpenicilina, ampicilina y piperacilina, en comparación con la susceptibilidad hacia imipenem y meropenem a los cuales los hidrolizan 10 veces menos eficientemente que a las penicilinas y las cefalosporinas de las primeras generaciones (73).

Debido a su ubicación plasmidial y su asociación a elementos móviles, las enzimas KPC pueden ser transferidas y de ahí la facilidad para su disseminación (74,75). Las enzimas GES-1 (de “Guyana extended spectrum”) fueron descritas inicialmente en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en Guyana (76). Poseen en su estructura residuos de cisteína en las posiciones 69 y 238 según la clasificación de Ambler; además tienen similitud con otras β -lactamasas de clase A de hasta un 36% con KPC-2, 35% con SME-1 y un 50% con BEL-1.

Su espectro de acción abarca a las penicilinas y cefalosporinas de todas las generaciones con un alta capacidad de hidrólisis por lo que fueron clasificadas inicialmente como BLEES (77); sin embargo para el imipenem las primeras GES descritas mostraban una baja capacidad de acción en variantes como GES-2 (78), estudios posteriores demuestran mayor eficiencia en la hidrólisis para imipenem en las clases GES-4 que posee tres sustituciones de aminoácidos uno de las cuales es una serina en la posición 170 en comparación con GES-2 (79).

Así para estas enzimas según Lahey Clinic (80) hasta el momento se ha identificado 16 variantes de GES, las cuales difieren entre ellas con 1 a 4 sustituciones de aminoácidos (serina o aspargina en la posición 170) que las asocia a hidrólisis para imipenem.

Los genes codificantes de estas enzimas se encuentran ubicados en el plásmido bacteriano que en algunas cepas actúa como plásmidos transferibles y estos genes pertenecen a cassetes de integrones en este segmento de ADN (81).

Se han reportado brotes ocasionales de cepas que expresan GES en grupos pequeños de pacientes (82) en distintos países alrededor del mundo, tanto en Europa como en América y los demás continentes, los mismos que describen la presencia de estas enzimas en enterobacterias (83,84,85).

Las metalo β -lactamasas (MBL's) son enzimas que se caracterizan por tener al catión Zn^{2+} para su acción hidrolítica contra el anillo β -lactámico. Se encuentran en la clase funcional B según Ambler y pertenecen al grupo 3 según Bush. Existe una subclasificación funcional dependiendo de su capacidad de hidrólisis contra los distintos β -lactámicos; así las enzimas que pertenecen al grupo 3a poseen un amplio espectro de actividad; las del grupo 3b tienen mayor afinidad para la hidrólisis por los carbapenemes y las del grupo 3c hidrolizan pobremente a los carbapenemes en comparación con otros sustratos β -lactámicos (86).

Al igual que las serin β -lactamasas, las MBL's median la resistencia a los β -lactámicos al escindir el puente amida del anillo antibiótico; sin embargo la manera en que estas dos clases de enzimas logran este proceso difiere en algunos aspectos (87).

El set de aminoácidos que se coordina con las moléculas de Zinc brinda la arquitectura necesaria para que estos sean capaces de unirse a 2 moléculas de agua para catalizar la hidrólisis; estas combinaciones son histidina-X- histidina-X- aspartato (HXHXD), que son comunes a la mayoría de MBL's, así como casi todas estas enzimas poseen dos iones de Zinc en su sitio activo. El mecanismo de hidrólisis sugiere que el sitio activo de estas enzimas orienta y polariza la unión con el anillo β -lactámico para facilitar el ataque nucleofílico por medio del Zinc como metal cofactor (88).

Su espectro de acción hidrolítica abarca a las penicilinas, cefalosporinas de tardías generaciones, carbapenemes y no son inhibidos por sulbactam, ácido clavulánico ni los monobactam; siendo susceptibles al ion quelante del ácido ethilenediaminetetra acético (EDTA).

Las metalo β -lactamasas fueron descritas inicialmente en cepas de *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp*, y *Stenotrophomonas maltophilia* (89,90) siendo codificadas por el cromosoma bacteriano; estas bacterias al ser oportunistas provocan infecciones esporádicas y no representan un problema clínico relevante; sin embargo en la última década se han descrito MBL's transferibles en microorganismos con gran importancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa* en un alto porcentaje de aislados hospitalarios (91).

La diseminación hacia las enterobacterias desde plásmidos de *Pseudomonas spp*. hace a las bacterias de mayor relevancia en las infecciones comunitarias y nosocomiales microorganismos multiresistentes de difícil control, siendo este suceso una verdadera emergencia epidemiológica ya que se han reportado epidemias en varias partes del mundo (92,93). Es fácil comprender que su diseminación se debe a la ubicación genética de las MBL's tanto en el cromosoma bacteriano como en los plásmidos, específicamente en sectores de integrones (94). Las familias más comunes de MBL's incluyen a VIM, IMP, GIM, y SIM las cuales están localizadas en distintas variedades de integrones que pueden estar asociados a plásmidos o transposones lo que facilita su diseminación.

Las MBL's transferibles como IMP (de "active on imipenem") están descritas inicialmente en Japón en aislados de *Serratia marcescens* (95), IMP-1 sería capaz de hidrolizar a las penicilinas, cefalosporinas pero no al aztreonam, posteriormente se encuentra la variante IMP-2, que esta vez localizado en un integron de clase 1; su propagación es descrita ya en Estados Unidos y Australia (96). Hasta el momento se han identificado cerca de 26 variantes para IMP alrededor del mundo.

Las enzimas VIM fueron descritas inicialmente en Verona Italia en 1997 de ahí su nomenclatura ("Verona integron-encoded metallo β -lactamase") (97). En un principio estas enzimas fueron halladas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, siendo la variante VIM-2 la mas descrita en el mundo (98,99); existen ya 26 variantes detalladas asociadas a integrones clase 1 en plásmidos; algunas de las cuales ya se han encontrado en América tanto en *Pseudomonas spp.* como en enterobacterias (100,101).

Los estudios que demuestran la presencia de estas enzimas en enterobacterias dan a conocer la magnitud de este fenómeno de transmisión de perfiles de resistencia ya que los microorganismos con estas enzimas dentro de su genotipo muestran un fenotipo multiresistente al estar asociado a BLEES concomitantemente (102,103,104).

Finalmente, las carbapenemasas clase molecular D, más conocidas como OXA – β -lactamasas (de “oxacillin-hydrolyzing”) se describen desde los años 1980 (105,106) y fueron halladas inicialmente en cepas de *Acinetobacter baumannii* y llamada en ese entonces ARI-1 (de “*Acinetobacter* resistant to imipenem”).

Inicialmente se las consideraba penicilinasas por hidrolizar a la Oxacilina y Cloxacilina, no se había identificado su acción en cefalosporinas de 3era generación; sin embargo estudios posteriores reportan la capacidad de hidrólisis de estas enzimas para ceftazidima y pobre inhibición por ácido clavulánico y EDTA (107); y se conoce que poseen un alta variabilidad en la secuencias de aminoácidos que componen sus diferentes variantes, lo que además les otorga distinto espectro de acción.

De las 193 variantes enzimáticas de las OXA – β -lactamasas descritas hasta el momento (80), se conoce que un número limitado de las mismas posee actividad hidrolítica sobre los carbapenemes. La primera OXA-carbapenemasa descrita OXA-23 posee una homología de hasta un 36% en la secuencia de aminoácidos con las variantes OXA-5 y 10 (108,109), exactamente existen 9 subgrupos de enzimas OXA-type con capacidad hidrolítica para imipenem (110).

Desde entonces existen reportes de brotes aislados de cepas productoras de estas carbapenemasas, sobre todo en cepas de bacterias oportunistas como *Acinetobacter spp*; en países como Corea, Japón, Estados Unidos, España, etc (111,112,113).

La presencia de estas enzimas en cepas de enterobacterias ya se reporta en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* las cuales poseen genes codificadores de estas enzimas sin embargo demuestran MICs dentro de parámetros de susceptibilidad a los carbapenemes; y no es detectado en los sistemas automatizados de Vitek y Phoenix (114,115) rutinariamente utilizados.

Los estudios sugieren que esta resistencia en el género *Enterobacteriaceae* mediada por enzimas OXA-type de origen plasmidial se sumaría a una resistencia previa en estas bacterias mediada por otros mecanismos como bombas de flujo, disminución de la permeabilidad y otras carbapenemasas adicionales (116).

La detección de la actividad de carbapenemasas en aislados clínicos ha sido desde siempre un verdadero reto para los laboratorios de Microbiología; y es de suma importancia el screening de estas cepas para evitar la diseminación de bacterias productoras de carbapenemasas y así determinar a tiempo fallas en el tratamiento de pacientes que padecen patologías infecciosas causadas por estos microorganismos.

Los principales obstáculos para la detección eficiente de este tipo de enzimas radica en que en la mayoría de pruebas habituales las cepas del genero *Enterobacteriaceae* cursan con aparente sensibilidad a los carbapenemes según los puntos de corte del CLSI, y pueden existir otros mecanismos de resistencia combinados (alteración de porinas, enzimas del tipo AmpC y/o CTX-M) que dan perfiles de resistencia a los carbapenemes. Por otra parte algunos estudios reportan cepas aparentemente sensibles al imipenem y que sin embargo por medios moleculares se ha determinado la presencia de genes responsables de codificar a distintas carbapenemasas (117).

Tomando en cuenta los parámetros internacionales del CLSI, la sospecha de la producción de carbapenemasas en enterobacterias se establece frente a una cepa que muestre una resistencia completa o intermedia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y/o una resistencia intermedia o completa a los distintos carbapenemes.

Según Pasterán (118) una zona de inhibición del halo menor o igual a 21mm o valores de MIC entre 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$ para el imipenem serían los parámetros a tomar en cuenta para instaurar pruebas fenotípicas de screening como el Test Modificado de Hodge y otras pruebas que usan al ácido borónico como inhibidor de carbapenemasas.

El Test Modificado de Hodge (MHT por sus siglas en inglés Modified Hodge Test) es una prueba de screening altamente sensible y específica para el grupo de las enterobacterias; sin embargo la utilización de este test en distintos estudios revela su utilidad únicamente para el screening de serin β -lactamasas y no para las metalo β -lactamasas que requieren un inhibidor del Zinc como el EDTA.

Por otra parte en cepas de *Providencia spp*, *Morganella spp*, y *Proteus spp*. su utilidad se ve limitada debido a que estas especies poseen MIC elevadas por mecanismos distintos a las carbapenemasas que afectarían los resultados de este screening (66). El MHT por otra parte puede presentar resultados falsos positivos en cepas que acarrean enzimas del tipo AmpC y/o CTX-M o una mutación en las porinas.

Otros estudios señalan la eficiencia de la utilización de inhibidores como el ácido borónico para detectar a enzimas de la familia de las serin β -lactamasas como KPC de una manera más específica; sobre todo en casos en los que existe MICs dentro de parámetros de sensibilidad (118,119,120); este inhibidor sintético serviría para el control de falsos positivos obtenidos con el MHT (117) ya que tiene la capacidad de inhibir la actividad de las enzimas del tipo AmpC en cepas hiperproductoras de la misma.

Por lo anteriormente expuesto existen limitaciones en las técnicas fenotípicas para la detección de microorganismos sospechosos de producir carbapenemasas; sin embargo las pruebas de screening descritas anteriormente muestran una alta sensibilidad y especificidad según el tipo de enzima a detectarse (118); por lo tanto los métodos moleculares son el gold standard para la detección de los genes involucrados de manera ineludible en la práctica microbiológica (122).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y METODOS

1. Población de Estudio.-

Se analizó una muestra de 2651 aislados clínicos obtenidos de distintos hospitales de Quito pertenecientes a la Red Nacional de Resistencia Bacteriana (REDNARBEC) en el periodo de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010. Los hospitales incluidos fueron: Hospital Carlos Andrade Marín, Hospital de las Fuerzas Armadas, Hospital Vozandes de Quito, Hospital Solca, Hospital Gineco - Obstétrico Isidro Ayora, Hospital Pablo Arturo Suárez, Hospital Enrique Garcés, Hospital de La Policía Nacional y el Hospital de niños Baca Ortiz. Se tomaron en cuenta datos de relevancia clínica como son la edad y sexo del paciente, así como el origen de la muestra y el servicio hospitalario que la proporciona; además se recolectó información acerca de la identificación bacteriana y la fecha de la obtención de la cepa (Anexo 1).

Cada uno de los aislados recibidos fue sometido a reaislamiento en medio de cultivo Agar EMB (eosina azul de metileno) y a identificación bioquímica para comprobar el género y especie (Anexo 6); posteriormente se realizó una bacterioteca conservando cada aislado en un tubo de Agar Nutriente y dos copias en tubos Eppendorf bajo congelación a -20° centígrados conservados en glicerol.

A cada enterobacteria identificada se le realizó un antibiograma inicial en donde se determinó la resistencia a los carbapenemes. Aquellas que mostraron un halo de sensibilidad menor o igual a 21 mm para el imipenem se consideraron cepas sospechosas de producir carbapenemasas y pasaron a confirmación fenotípica y genotípica mediante el Test Modificado de Hodge, Test de doble disco EDTA-imipenem, Test doble disco ácido borónico - imipenem y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) respectivamente.

2. Tipo de estudio:

Se realizó un estudio descriptivo transversal.

3. Procedimientos de recolección de información.-

3.1 Identificación fenotípica de enterobacterias.-

Pruebas Bioquímicas.-

El panel bioquímico permite establecer el arsenal enzimático que caracteriza a cada enterobacteria; es así como al entender el metabolismo de una cepa se puede identificar claramente el género y especie de la bacteria analizada según su comportamiento en distintos medios de cultivo especiales (123,124) (Anexo 5).

En general estos medios contienen:

- **Sustrato:** sobre el que actúa el material enzimático
- **Indicador:** que detecta la disminución del sustrato por su metabolismo enzimático o la aparición de un producto metabólico.

El panel bioquímico incluyó las siguientes pruebas.-

- Prueba TSI.- Triple Sugar Iron Agar o Triple Azúcar Hierro (Difco™)
- Citrato.- Citrate Simmons Agar (Difco™)
- MILI (Motility-Indol-Lysine Agar) y MIO (Motility-Indol- Ornitine Agar) (Difco™)
- Rojo de Metilo (Methyl Red. Difco™)
- Agar Fenilalanina (Difco™)
- Urea (Difco™)

3.2 Susceptibilidad a Antimicrobianos.-

Se utilizó el método de difusión de disco en agar Müller-Hinton (Difco) siguiendo las recomendaciones propuestas por el Clinical and Laboratory Standard Institute CLSI (125,126).

La prueba de sensibilidad o resistencia a antimicrobianos fue realizada transfiriendo de tres a cinco colonias aisladas en agar nutriente hacia caldo Müller-Hinton (Difco™), hasta obtener una turbidez de 0,5 de la escala de McFarland, verificada a través de un turbidímetro (Vitex) para obtener un inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

La suspensión fue sembrada en la superficie del agar Müller-Hinton (Difco™) con un hisopo estéril, mediante estría continua en 4 sentidos. Los discos de antibiótico fueron colocados con ayuda de una pinza estéril. Las placas se las incubó a 37°C por 24 horas.

Se midió los diámetros de los halos de inhibición (mm) con una regla y comparados con la tabla del CLSI. Aquellos que mostraron un halo de inhibición menor a 21 mm para el imipenem pasaron a ser analizados con la prueba confirmatoria de Hodge modificada y los Test de doble disco Sinergia descritos a continuación.

3.3 Detección fenotípica de carbapenemasas.-

Test Modificado de Hodge (Modified Hodge Test MHT).-

El test modificado de Hodge detecta la producción de carbapenemasas en aislados de enterobacterias. Este fenotipo de resistencia es detectado cuando la cepa sospechosa produce estas enzimas que permiten el crecimiento de una cepa sensible al carbapenem (*Escherichia coli* ATCC 25922) hacia el disco del antibiótico. El resultado es una indentación a manera de “hoja de trébol” (66) (Anexo 7).

Se preparó una dilución a 0.5 en la escala de Mc Farland de una cepa de *E.coli* ATCC 25922 en 5 ml de Muller Hinton Broth (Difco TM) a la cual se añadió 0.5 ml de la solución anterior a un tubo que contenga 4,5 ml de Muller Hinton Broth (Difco TM), logrando una dilución de 1:10.

Posteriormente se sembró la dilución de 1:10 de *E.coli* ATCC 25922 en una placa de Mueller Hinton Agar (Difco TM) y se secó por 3 a 5 minutos. Se colocó un disco de 10 µg de meropenem o ertapenem (BD BBL TM Sensi – Disc TM) en el centro del área a testarse. En una línea recta se inoculó el microorganismo sospechoso desde el borde del

disco al borde de la placa; el mismo procedimiento se realiza con un control positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705) y un control negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706). Se incubó por 16 a 24 horas a una temperatura de 35°C.

- **MHT positivo.-** si existe un indentación tipo “hoja de trébol” de la *E.coli* 25922 en la intersección con el microorganismo sospechoso.
- **MHT negativo.-** no existe crecimiento del *E.coli* 25922 a los costados del microorganismo sospechoso.

Limitaciones de la técnica.-

La clase de carbapenemasa no puede ser determinada por el Test modificado de Hodge; por otra parte algunos aislados pueden mostrar una pequeña indentación sin embargo no son productores de carbapenemasas (falsos positivos) debido a multiples factores como los son la producción de β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M o AmpC y/o otros mecanismos de resistencias hacia los carbapenemes como la mutación de porinas de membrana.

Test de Doble Disco – sinergia.-

Ácido borónico - imipenem.-

Existen estudios que proponen la utilización de pruebas confirmatorias mediante la técnica de la difusión de doble disco añadiendo inhibidores selectivos. Recientemente se ha encontrado la capacidad del ácido borónico de inhibir de manera reversible tanto a las enzimas de Clase C como a las serin-carbapenemasas del tipo KPC, GES, NMC-IMI (120,127) (Anexo 7). Por esta razón se considera al test con ácido 3-aminofenil borónico un screening para la detección de carbapenemasas; siendo útil para el control de falsos positivos que pueden aparecer con el Test de Hodge (123,128).

Se colocó un disco de imipenem de 10 µg a una distancia de 9 a 11 mm de centro a centro de un disco de ácido borónico de 300 µg en una placa de Müller Hinton Agar (Difco™) inoculada con una dilución de la cepa a estudiarse ajustada a una turbidez de 0.5 Mc Farland.

- **Test positivo:** un aumento en el área de inhibición entre el imipenem y el ácido borónico que demuestra sinergismo se considera un resultado positivo.
- **Test negativo:** no existe aumento en el área de inhibición del carbapenem.

Test EDTA – imipenem.-

Las metalo β -lactamasas poseen al Zinc como elemento esencial para su acción enzimática, agentes quelantes como el EDTA actúan inhibiendo a este cofactor por lo que se considera un inhibidor selectivos de estas enzimas y son la base para los test de doble disco para determinar sinergismo (Anexo 8). Al igual que para las otras técnicas se utilizó una placa de Müller Hinton Agar (Difco) en la que se sembró en 4 sentidos la cepa a analizarse y se colocó un disco de imipenem de 10 μg a una distancia de 9 a 11 mm de centro a centro de un disco de filtro en el que se colocó 10 μl de la solución de EDTA preparada previamente (113,114).

- **Test positivo:** un aumento en el área de inhibición entre el imipenem y el EDTA que demuestra sinergismo se considera un resultado positivo.
- **Test negativo:** no existe aumento en el área de inhibición del carbapenem con respecto al EDTA.

3.4 Detección genotípica de carbapenemasas.-

Extracción de ADN.-

Se realizó la extracción de ADN total y plasmidial mediante el siguiente protocolo (129):

Cada aislado fue inoculado en 5 ml de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco™) por 24 horas a 37°C. Se transfirió 1,5 ml a microtubos estériles, se centrifugó por un minuto a máxima velocidad (14 000 rpm). Una vez desechado el sobrenadante se lavó una vez con 1 ml de Tris – EDTA (Tris 50mM + EDTA 20mM, pH8), se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad (14 000 rpm).

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 400 ul de Tris – EDTA (Tris 50mM + EDTA 20mM, pH8); se añadió: 50 ul de SDS (al 10%), 10 ul de Liozina (a 5 mg/ml) y 5 ul de Proterinasa K (a 20 mg/ml), y se dejó incubar a 37 °C por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad (14 000 rpm). Se recolectó el sobrenadante en nuevos microtubos estériles y se mezcló con la pipeta P1000 5-10 veces para quebrar proteínas. A esto se adicionó: 23,25 ul de cloruro de sodio 5 M y 46,5 ul de solución de acetato de sodio 3 M y se dejó incubar por 1 hora a 4°C.

Posteriormente se centrifugaron 15 minutos a máxima velocidad (14 000 rpm), a esto se agregó 660 ul (2 volúmenes) de etanol al 100% helado y se dejó reposar de 10-15 minutos. Los tubos con la solución se centrifugaron por 15 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante fue descartado.

Se los dejó secar en la cabina de flujo laminar y se resuspendió el ADN con 200 ul de buffer Tris-EDTA (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5). El ADN se lo almacenó a – 20°C durante 24 horas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).-

Fundamento de la técnica:

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (130,131). Consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas.

La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje.

- **Inicialización**

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de $94\text{-}96\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ó $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos.

- **Desnaturalización**

Se desnaturaliza el ADN mediante calentamiento ($94\text{-}95\text{ }^{\circ}\text{C}$) de la muestra a una temperatura que depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también del largo de la misma.

- **Alineamiento/Unión del cebador**

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos, permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN.

- **Extensión/Elongación de la cadena**

Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente.

- **Elongación Final**

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

- **Conservación**

Este paso se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

Detección de genes de resistencia: *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*-

Cuatro genes de resistencia a carbapenemes y codificantes de serin β -lactamasas y metalo β -lactamasas: *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, respectivamente fueron analizados mediante la técnica de PCR.

Los iniciadores para la amplificación de los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* fueron diseñados y testados por Pitout et. al (2005); para los genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* se diseñaron los primers tomando en cuenta todas las variables alélicas para cada gen descritas hasta el momento (Anexo 4).

Para la reacción en cadena de la polimerasa fueron preparadas soluciones de 25 ul conteniendo:

Reacción para KPC y GES.-

Se realizaron la PCR con una reacción con 12,5 ul de Master Mix (Promega), 0,5 ul mM de cada iniciador (Invitrogen), 1 ul de ADN.

Reacción para VIM e IMP.-

La reacción calculada contenía 5 ul de Buffer, 11,88 ul de Agua para PCR, 2,5 ul de MgCl₂, 0,5 ul de dNtp's, 1 ul de cada iniciador (Invitrogen) y 3 ul de ADN.

Amplificación.-

El programa de amplificación del DNA fue realizado en el termociclador LabNet modelo MULTIGENE con los siguientes ciclos según el gen:

***bla_{KPC}* y *bla_{GES}* :**

El programa consistió en una denaturación inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 25 ciclos, los cuales consistieron en un paso de denaturación a 95°C por 1 minuto, seguido de un paso de hibridación a 55.6 °C por 1 minuto y un último paso de extensión a 72 °C por 1 minuto; finalmente, una extensión a 72 °C por 10 minutos

***bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* :**

En este caso se aplicó un programa con una denaturación inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 38 ciclos, los cuales consistieron en un paso de denaturación a 95°C por 1 minuto, seguido de un paso de hibridación a 52 °C por 1 minuto y un último paso de extensión a 72 °C por 1 minuto; finalmente, una extensión a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis electroforético.

Visualización de los productos de PCR.-

Los productos resultantes de la PCR fueron separados a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa ultra pura 1,0% (Invitrogen) disuelta en 45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico y 1,25 mM de EDTA (TBE 0,5X) a 125 Voltios por 45 minutos en tampón de de 89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico y 2,5 mM de EDTA (TBE 1,0X)

Para determinar los pesos moleculares las muestras fueron comparadas con un marcador de peso molecular trackit 100pb ladder (Invitrogen). La tinción del gel se realizó con SYBER Gold 10.000X concentrada en DMSO (PROMEGA).

Los productos del PCR fueron examinados por examen visual considerando como muestra positiva la presencia de una banda visible independientemente de su intensidad y cuyo tamaño de amplicon sea de 738 pb para el gen *bla_{KPC}*, de 864 pb para el gen *bla_{GES}*, de 600 pb para el gen *bla_{IMP}*, 500 pb para el gen *bla_{VIM}*; como control negativo fue empleado agua molecular con ausencia total de bandas, lo que no produjo ningún amplicon (Anexo 9).

CAPITULO IV. RESULTADOS

1. Análisis Univariar.-

1.1 Variables descriptoras de la población.-

La población de la que se obtuvo las muestras fue diversa con un promedio de edad de 43 años (± 26 ; 0-107); en su mayoría fueron mujeres.

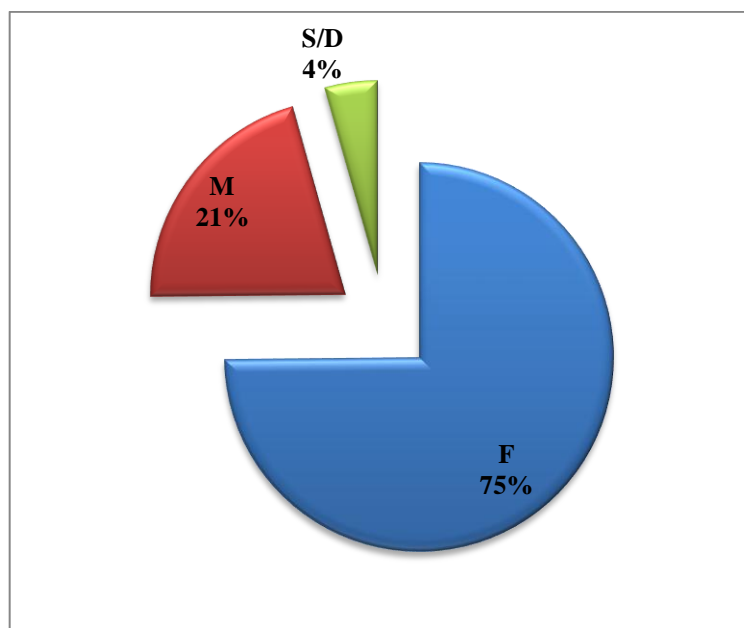
Tabla 1: Medida descriptiva de la edad de los pacientes de los cuales se tomó los aislados clínicos provenientes los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

N	Valido	2651
	Pérdidas	441
Promedio		43
Mediana		45.3
Moda		1
Desviación std.		26
Mínimo		0
Máximo		107
Percentiles	25	16,00
	50	46,00
	75	66,00

Fuente: Registros Hospitalarios.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Figura 1: Distribución según sexo de los pacientes de los cuales se tomó los aislados clínicos provenientes de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.



M, masculino; F, femenino; S/D, no se obtuvo datos.

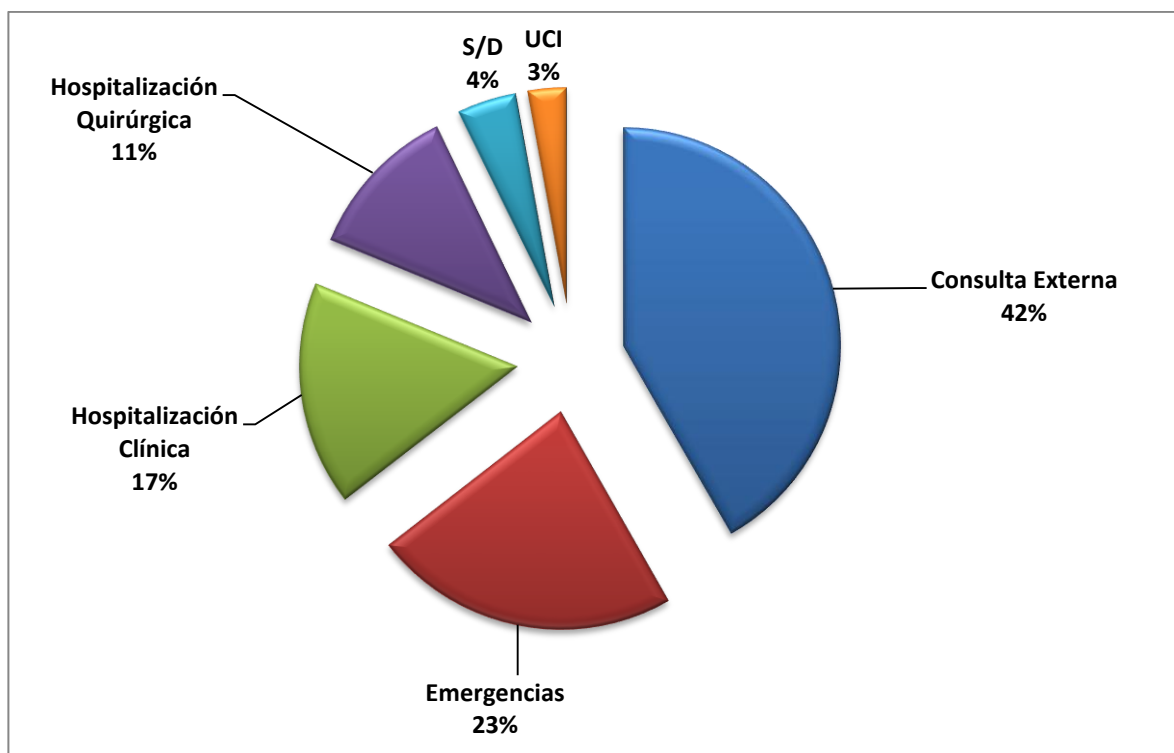
Fuente: Registros Hospitalarios.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

1.2 Origen de la muestra.-

Existió un claro predominio de muestras provenientes de la consulta externa y emergencia con un 65%, esto se explica debido a que los problemas de salud inician a este nivel; del medio hospitalario se obtuvo un 28% de las muestras, 3% corresponden a UCI y existió un 4% de cepas de las que no se pudo obtener información acerca del servicio de origen debido a inconsistencia en los registros hospitalarios tomados como referencia.

Figura 2: Distribución según el servicio de salud de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

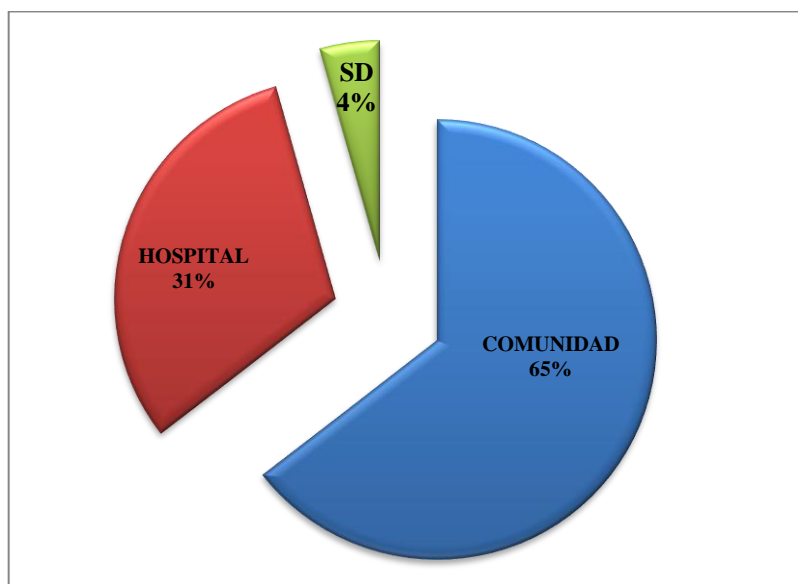


UCI, Unidad de Cuidados Intensivos; S/D, sin datos de origen.

Fuente: Registros Hospitalarios.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Figura 3: Distribución del origen de los aislados clínicos tomados de los colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.



S/D; sin datos de origen.

Fuente: Registros hospitalarios de los aislados clínicos.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Otro dato importante, es que el principal origen de las muestras fue comunitario (65%), pero que además, las muestras sin identificación de origen llegaron a un 4%.

Los aislados se obtuvieron de distintos tipos de muestras biológicas; a continuación una descripción porcentual:

Tabla 2: Distribución según el tipo de muestras biológicas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

Tipo de muestra	Frecuencia	Porcentaje
Absceso	27	1,02
Dispositivo invasivo	18	0,68
Heces	3	0,11
Hemocultivo	61	2,30
Herida	58	2,19
Herida quirúrgica	65	2,45
Hisopado de cavidad	48	1,81
Hueso	12	0,45
Líquido intrabdominal	49	1,85
Muestra del SNC	2	0,08
Orina	2080	78,46
Secreción de vía respiratoria	145	5,47
Úlcera	22	0,83
S/N	61	2,30
Total	2651	100

S/N, no determinado.

Fuente: Registros Hospitalarios.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Se confirmó la identificación bacteriana en los 2651 aislados mediante metodología bioquímica; se reconfirmó mediante el sistema Vitek en los Laboratorios Zurita y Zurita en los casos que fueron necesarios.

Tabla 3: Identificación bacteriana realizada en la PUCE según género y especie en muestras tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

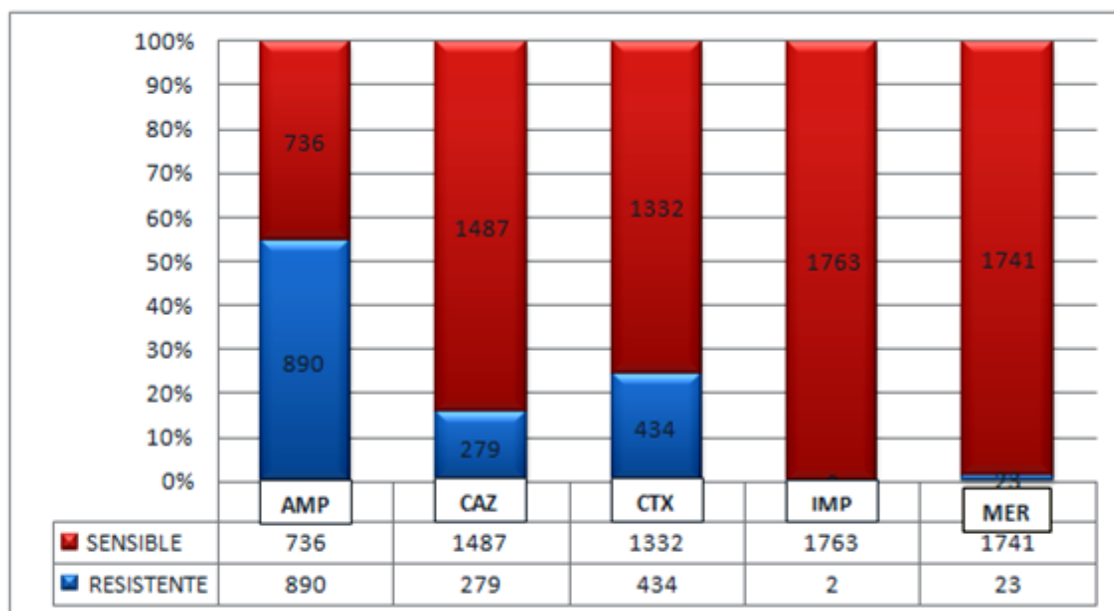
Microorganismo	Frecuencia	Porcentaje
<i>Citrobacter diversus</i>	4	0,2
<i>Citrobacter freundii</i>	19	0,7
<i>Citrobacter koseri</i>	2	0,1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	40	1,5
<i>Escherichia coli</i>	2174	82,0
<i>Hafnia alvei</i>	2	0,1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	63	2,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	236	8,9
<i>Morganella morganii</i>	9	0,3
<i>Proteus mirabilis</i>	66	2,5
<i>Proteus vulgaris</i>	13	0,5
<i>Serratia marcescens</i>	8	0,3
Total	2651	100,0

Fuente: Datos obtenidos de la elaboración de pruebas bioquímicas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE. **Elaboración:** Ana María Gómez Jaramillo.

1.3 Resistencia bacteriana: Antibiograma inicial.-

En el siguiente gráfico, podemos observar los resultados del primer antibiograma, en el cual se encontraron resistencias importantes en los fármacos utilizados (Anexo 2).

Figura 4: Descripción del perfil de resistencia y sensibilidad en el Antibiograma Inicial en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.



AMP, ampicilina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; IMP, imipenem; MER, meropenem.

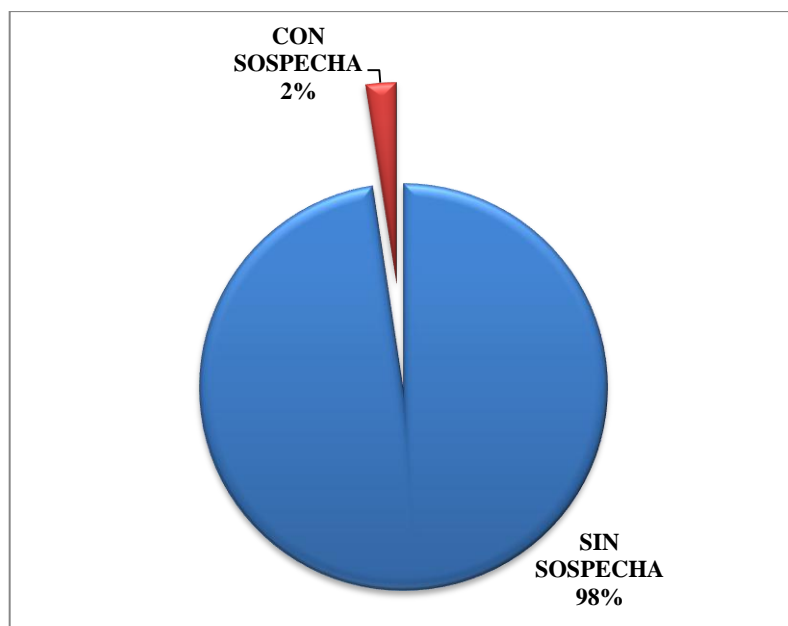
Fuente: Datos obtenidos de los antibiogramas realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

1.4 Cepas sospechosas de producir carbapenemasas.-

De todas las bacterias analizadas, se observó un 2% de las cepas como sospechosas de la presencia de carbapenemasas, al poseer un halo igual o menor a 21mm para el imipenem, lo cual fue verificado por fenotipo y genotipo posteriormente.

Figura 5: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.



Fuente: Datos obtenidos de los antibiogramas realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

1.5 Análisis del Antibiograma confirmatorio: Utilizado para la comprobación fenotípica de la presencia de BLEES.-

De las cepas analizadas se obtuvieron 434 aislados resistentes a los antibióticos ceftazidima y cefotaxima, perfil fenotípico para la producción de BLEES, el cual se confirmó al añadir ácido clavulánico a los antibióticos descritos encontrándose un aumento de 5 mm en el halo de inhibición.

Tabla 4: Presencia de BLEES en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

	Frecuencia	Porcentaje
NEGATIVO	78	18,73
POSITIVO (aumento del halo de inhibición en 5 mm)	356	81,27
Total	434	100,00

Fuente: Datos obtenidos de los antibiogramas realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

1.6 Análisis fenotípico y genotípico.-

El análisis fenotípico y genotípico con la utilización del Test Modificado de Hodge, las Pruebas de doble disco sinergia (EDTA - imipenem y ácido borínico – imipenem) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se lo realizó en las cepas que resultaron ser sospechosas en la producción de carbapenemasas; es decir, en los 42 aislados que presentaron un halo igual o menor a 21mm para el imipenem. Así obtuvimos:

Tabla 5: Screening de la presencia de carbapenemasas mediante el Test Modificado de Hodge en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

	Frecuencia	Porcentaje
NEGATIVO	35	84,33
POSITIVO	7	16,67
Total	42	100,0

Fuente: Datos obtenidos de la realización del Test Modificado de Hodge en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Tabla 6: Detección fenotípica de serin β -lactamasas mediante el Test ácido borónico - imipenem en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

	Frecuencia	Porcentaje
POSITIVO	6	14,29
NEGATIVO	36	85,71
Total	42	100,00

Fuente: Datos obtenidos de la realización del Test ácido borónico – imipenem en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Tabla 7: Detección fenotípica de metalo β -lactamasas mediante el Test de doble disco sinergia EDTA – imipenem en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

	Frecuencia	Porcentaje
POSITIVO	1	2,38
NEGATIVO	41	98,62
Total	42	100,00

Fuente: Datos obtenidos de la realización del Test EDTA – IMP en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Tabla 8: Descripción del Genotipo de los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

	Frecuencia	Porcentaje
<i>bla_{KPC}</i>	6	14,29
<i>bla_{GES}</i>	0	0,00
<i>bla_{IMP}</i>	0	0,00
<i>bla_{VIM}</i>	0	0,00
NINGUNO	36	85,71
Total	42	100,0

Fuente: Datos obtenidos de la realización de PCR en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

2. Análisis Estratificado.-

2.1 Sospecha de carbapenemasas por procedencia de la muestra.-

La distribución de las 42 cepas sospechosas de producir carbapenemasas tuvo predominancia en el origen comunitario al encontrarse 24 aislados entre consulta externa y emergencias, y 18 cepas provenientes de distintos servicios hospitalarios. El análisis molecular demostró 6 aislados genótipicamente positivos para el gen *bla_{KPC}*, siendo todos estos de origen hospitalario.

Tabla 9: Distribución por el origen de las muestras sospechosas de producir carbapenemasas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

CEPAS SOSPECHOSAS DE PRODUCIR CARBAPENEMASAS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
HOSPITALARIA	18	42,85
COMUNITARIA	24	57,15
TOTAL	42	100,00

Fuente: Registros Hospitalarios de los aislados clínicos.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Tabla 10: Descripción del perfil genotípico y su relación con el origen de las cepas sospechosas de producir carbapenemasas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

CEPAS SOSPECHOSAS DE PRODUCIR CARBAPENEMASAS	FRECUENCIA	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{IMP}</i>
HOSPITALARIA	18	6	0	0	0
COMUNITARIA	24	0	0	0	0
TOTAL	42	6	0	0	0

Fuente: Registros Hospitalarios de los aislados clínicos y datos obtenidos mediante la realización de PCR en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

2.2 Análisis de sensibilidad del Test Modificado de Hodge versus el genotipo.-

Encontramos que el Test Modificado de Hodge presentó una alta sensibilidad y especificidad, aunque fueron pocos casos, la coincidencia fue alta con 7 tests positivos de los cuales 6 presentaron el gen *bla_{KPC}*. Solo existió un caso falso positivo.

Tabla 11: Sensibilidad y especificidad del Test Modificado de Hodge aplicado para el screening de la presencia de carbapenemasas en los aislados clínicos tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010.

		GENOTIPO		
		Positivo	Negativo	
TEST DE HODGE	Positivo	6	1	7
	Negativo	0	14	14
		6	15	21
				IC 95%
SENSIBILIDAD		100%	100%	100%
ESPECIFICIDAD		93%	90%	97%
VPP		86%	80%	91%
VPN		100%	100%	100%

VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

Fuente: Datos obtenidos de la realización del Test de Hodge en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la PUCE.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

CAPITULO V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró un 2% de aislados sospechosos de producir carbapenemasas (42 aislados) (Anexo 3). Los reportes en varios países alrededor del mundo demuestran similares tasas de resistencia a estos antibióticos; sin embargo la vigilancia epidemiológica ya evidencia un aumento significativo en la resistencia mediada por carbapenemasas. (133, 135).

A pesar de ser un porcentaje bajo, es de suma importancia el hallazgo de estos aislados ya que confirma la presencia de estas enzimas en el Ecuador y además se une a la alerta epidemiológica ya existente en otros países de Sudamérica como Argentina (136).

Conociendo su mayor prevalencia en microorganismos nosocomiales multiresistentes como *Pseudomonas spp.* estas enzimas debido a su ubicación plasmidial tienen la facilidad de ser transmitidas hacia otras especies como las enterobacterias (137); lo que podría explicar la existencia de cepas de gram negativos entéricos con perfiles de resistencia a varios antibióticos incluyendo las cefalosporinas de amplio espectro.

La resistencia encontrada a las cefalosporinas de últimas generaciones por análisis fenotípico demostró la presencia de 434 cepas probablemente productoras de BLEES de las cuales 356 resultaron positivas en el antibiograma confirmatorio para la producción de estas enzimas; esto junto al hallazgo de cepas sospechosas de producir carbapenemasas demuestra que las enterobacterias circulantes en los hospitales estudiados son microorganismos multiresistentes.

El Test Modificado de Hodge mostró una sensibilidad del 100% y un especificidad del 93% para la detección de carbapenemasas (Anexo 7). Estos hallazgos coinciden con los estudios que reportan hasta un 93% de sensibilidad del MHT para el screening de estas enzimas, sin embargo el MHT no permite diferenciar el tipo de carbapenemasa existente. Los falsos positivos en MHT están dados por distintos factores, entre los que se encuentran la sobreproducción de enzimas como CTX-M (BLEES) y/o la presencia de otros tipos de β -lactamasas como AmpC más la alteración de las porinas de membrana; parámetros no confirmados en este estudio (118,138).

El uso de las pruebas de doble disco con inhibidores específicos EDTA o ácido borónico (AB) permiten diferenciar el tipo de carbapenemasa existente según sea metalo β -lactamasa o serin β -lactamasa, respectivamente (Anexo 7).

En este estudio las 6 cepas productoras de KPC confirmadas genóticamente mostraron perfiles fenotípicos positivos con ácido borónico, lo que sustenta los datos de una aceptable sensibilidad de este test para la detección de las enzimas tipo serin y además se confirma la capacidad inhibitoria de este compuesto sobre las enzimas de clase A, especialmente del tipo KPC (118,127).

La detección precisa de cepas productoras de KPC se ve muy limitada por varias circunstancias concernientes tanto a la metodología automatizada o manual, como a la cepa en sí. Es así como estudios realizados en Estados Unidos donde han existido brotes esporádicos de cepas productoras de esta enzima, han demostrado que un inóculo menor a lo recomendado coincide con datos de aparente susceptibilidad a los carbapenemes (67).

Por otra parte se ha encontrado que muchas cepas que poseen distintos tipos de carbapenemasas muestran diferentes perfiles de resistencia, es decir que las concentraciones mínimas inhibitorias fluctúan entre los rangos de MIC de 2 a 4 ug/ml, sin existir un parámetro constante (139, 140).

El hallazgo más común es la presencia del gen *bla_{KPC}* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, siendo estas las causantes de pequeños brotes en distintas partes del mundo (63,141,142). Los resultados del estudio determinaron la presencia de KPC en aislados de *K. pneumoniae* únicamente, sin embargo la evidencia científica ha demostrado la presencia de variantes de esta enzima en otros microorganismos como *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* (62,69,143).

La ubicación del gen *bla_{KPC}* en un transposon relacionado con secuencias en plásmidos conjugativos hace que su potencial de diseminación sea realmente alto; y por lo tanto el riesgo de que la resistencia se transfiera a otros representantes de las enterobacterias comúnmente asociados a infecciones tanto comunitarias como nosocomiales es inminente.

Por otra parte se ha visto frecuentemente que las cepas poseedoras de KPC acarrean conjuntamente genes productores de BLEES (144), además de que están asociados a determinantes plasmidiales de la resistencia hacia quinolonas y aminoglucósidos lo que contribuye a la transmisión de múltiples mecanismos de resistencia a la vez (145,146). Esto tiene un alto interés epidemiológico para entender su diseminación y conocer el perfil de multiresistencia de estos agentes microbiológicos.

Es importante recalcar que la resistencia a los carbapenemes en microorganismos entéricos no solamente está mediada por enzimas capaces de hidrolizarlos; ya que el perfil de multiresistencia se da por varias razones (140).

Se ha encontrado distintos mecanismos de resistencia asociados, como lo son la combinación de enzimas AmpC y la disminución en la permeabilidad de la membrana por la ausencia o alteración de porinas, la alteración de la afinidad de las enzimas blanco (proteínas ligadoras de penicilinas), y junto a estos las enzimas capaces de hidrolizar a los carbapenemes denominadas carbapenemasas (147,148,149).

Los resultados arrojados en este trabajo determinaron a la carbapenemasa del tipo KPC como responsable de la resistencia a los carbapenemes en 6 aislados; en las cepas restantes en las que no se halló los genes investigados la resistencia estaría mediada por uno o varios de los mecanismos descritos anteriormente.

En el presente estudio se encontró 42 aislados sospechosos de producir carbapenemasas, de los cuales 24 provenían de la comunidad y 18 aislados correspondían a los servicios de hospitalización; tomando en cuenta que el mayor porcentaje de la muestra total (65%) fueron cepas provenientes de consulta externa y emergencia.

El análisis molecular halló entre las cepas sospechosas 6 *K. pneumoniae* con el gen *bla_{KPC}*, siendo todas estas de origen hospitalario (Anexo 3), este perfil fenotípico de resistencia a antibióticos de amplio espectro como lo son los carbapenemes se desarrollaría en bacterias causantes de infecciones nosocomiales debido al uso restrictivo a nivel hospitalario de estos antibióticos; sobre todo en servicios como las Unidades de Cuidados Intensivos (150,151).

Por lo anteriormente expuesto, las cepas comunitarias que mostraron en el análisis fenotípico halos menores o iguales a 21mm podrían deber su resistencia a mecanismos distintos a carbapenemasas (porinas y permeabilidad) como se lo analizó anteriormente (152).

Los resultados moleculares de este proyecto son congruentes con la epidemiología mundial; sin embargo el origen de las carbapenemasas tiene dos direcciones: el ambiente sanitario por transmisión plasmidial entre agentes nosocomiales y, por otra parte, el material genético proveniente del medio ambiente desde microorganismos que poseen dentro de sus cromosomas elementos móviles (integrones, transposones, etc) que llevan genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar a los carbapenemes (153).

Esta última aseveración tiene su fundamento al reconocer que los carbapenemes son sintetizados a partir de un organismo proveniente del suelo, el *Streptomyces catleya*, y estas enzimas son sintetizadas en bacterias del suelo como *Bacillus cereus*, *Shewanella spp.* lo que les garantiza su supervivencia en este ambiente (154,155,156).

Como parte de la evolución y como mecanismos de defensa frente al ambiente los microorganismos de la comunidad desarrollaron este tipo de enzimas, que además actuarían para regular el metabolismo, por ejemplo, en la renovación y síntesis de la pared bacteriana (157), por otra parte el estudio molecular ancestral de las carbapenemasas demuestra que todas tienen un origen común.

Los resultados obtenidos luego del análisis mediante el Test del doble disco para la detección de enzimas VIM e IMP arrojaron resultados negativos, es decir que no existió sinergismo entre EDTA – imipenem en 41 de las 42 cepas sospechosas de este estudio. Esto fue corroborado por la técnica de PCR que no demostró la presencia de los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* en ningún aislado.

La detección de las metalo β -lactamasas tiene grandes limitaciones, similar a lo que ocurre con las BLEES; los tests microbiológicos que se utilizan regularmente para la detección de estas enzimas pueden presentar resultados erróneos debido a que muchas cepas que poseen MBL's cursan con sensibilidad fenotípica al imipenem (MIC entre 1 a 2 μ g/ml) (158) a pesar de acarrear el gen, además de que la sensibilidad y especificidad de estas pruebas depende mucho del género bacteriano a estudiarse, ya sea *Pseudomonas spp.* o *Enterobacteriaceae*.

Por otra parte se ha comprobado la capacidad del EDTA de permeabilizar la membrana bacteriana en los gram negativos lo que daría como resultado tests positivos sin que sea mediado por metalo β -lactamasas (159) aportando resultados falsos positivos. Estudios adicionales han reportado falsos positivos si las cepas producen BLEES, especialmente de la familia OXA (160). Otros mecanismos que interfieren en la detección de MBL's tienen que ver con la capacidad que tiene el Zinc para modificar las porinas de membrana OprD y el sistema CzxR-CzcS (Cobre) (161, 162).

Por esta razón los test microbiológicos que utilizan EDTA deben ser continuamente evaluados en su especificidad y sensibilidad, particularmente cuando se utilicen en enterobacterias, las recomendaciones internacionales proponen la presencia de una MIC > a 2 μ g/ml como un parámetro sospechoso de producir MBL's en organismos entéricos (163).

Los aislados sospechosos de producir carbapenemasas de este estudio al ser analizados mediante método molecular no demostraron la presencia del gen *bla_{GES}* para la producción de la enzima GES. Esta enzima ha estado relacionada con brotes pequeños en países como Guyana y Grecia donde el uso de los carbapenemes es muy común debido a la alta incidencia de enterobacterias productoras de BLEES.

La hidrólisis de los carbapenemes secundaria a la producción de enzimas GES muestra perfiles fenotípicos con concentraciones mínimas inhibitorias levemente elevadas para el imipenem, además de ser característica la eficiente hidrólisis frente a ceftazidima. Por otra parte la sensibilidad disminuida al imipenem en cepas portadoras de esta enzima también se ha visto asociada a la combinación de otros mecanismos de resistencia como la disminución de la permeabilidad (85).

El estudio presentado demuestra el perfil de resistencia frente a los carbapenemes de las enterobacterias circulantes en los medios hospitalarios analizados y los reconoce como microorganismos multiresistentes, además evidencia que ya existe una circulación de estas cepas lo que explica las fallas terapéuticas con estos antibióticos (164).

Los factores que favorecen la aparición de microorganismos multiresistentes, sobretodo cepas que acarreen los genes responsables de la producción de enzimas del tipo BLEES y KPC están asociados al uso irracional de los antibióticos, esto es un factor determinante debido a que antibióticos como las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de amplio espectro ejercen una presión genética selectiva para el desarrollo de carbapenemasas.

A lo anterior se suman los factores relacionados al paciente como lo son la estancia hospitalaria prolongada, la severidad de la infección, el uso previo de varios antibióticos, haber sido manipulado con dispositivos invasivos y la asociación de comorbilidades que en conjunto contribuyen al desarrollo y adquisición de mecanismos de resistencia múltiples, datos no analizados en este estudio.

Por lo tanto el reconocimiento oportuno de enterobacterias capaces de hidrolizar a los carbapenemes es prioritario ya que un error en su detección conlleva a fallas terapéuticas que sumadas al factor tiempo aumentan la morbilidad y mortalidad. Varios estudios han comprobado la asociación entre la infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC y altas tasas de mortalidad que llegan hasta un 47% (64). Además un re tratamiento de estas infecciones conlleva a una enorme selección de estas cepas y la inducción al desarrollo de otras resistencias.

Es así como la decisión empírica inicial para el tratamiento de determinada infección debería ser basada en un conocimiento claro de la epidemiología sectorial y la clínica de la enfermedad infecciosa para orientar adecuadamente el escogimiento de un antibiótico con un espectro específicamente dirigido al microorganismo más responsable y así evitar el desarrollo y diseminación de resistencias combinadas.

Por otra parte la terapéutica óptima frente a infecciones por microorganismos multiresistentes es un verdadero reto, aún no se establece la mejor conducta a seguir; sin embargo opciones como las polimixinas, tigeciclina, colistina y sus asociaciones con antibióticos con diferentes mecanismos de acción como la rifampicina y/o azitromicina/fosfomicina y sulbactam han demostrado efectiva actividad in vitro (165,166,167).

La investigación y el entendimiento claro de la resistencia y sus mecanismos genéticos permitirá desarrollar medidas y conductas coherentes que reduzcan la diseminación de estas cepas tanto al nivel hospitalario y comunitario; ya que los carbapenemes son los antibióticos de mayor espectro dentro del arsenal terapéutico con los que la medicina actual cuenta para combatir infecciones severas y difíciles de tratar y que aun tomará tiempo para que se desarrollen moléculas antimicrobianas capaces de superar su espectro de acción.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- De los 2651 aislados se encontró 42 cepas (2% de los aislados) sospechosas de producir carbapenemasas, siendo esto un indicio de la resistencia a los carbapenemes en nuestro medio.
- Los métodos fenotípicos utilizados en los laboratorios de Microbiología son apropiados para la identificación de la resistencia a los carbapenemes mediada por carbapenemasas.
- Por su parte el Test Modificado de Hodge mostró una alta sensibilidad y especificidad; por lo tanto es la técnica de screening más adecuada para la detección de este tipo de resistencia; sin embargo no determina el tipo de carbapenemasa.
- El hallazgo de un test de doble disco sinergia de ácido borónico – imipenem positivo en las cepas portadoras del gen *bla_{KPC}* lo confirma como la prueba fenotípica de screening más adecuada para la detección de serin β -lactamasas del tipo KPC.

- El test de doble disco sinergia con EDTA – imipenem resultó negativo en 41 cepas testadas; en el análisis genotípico no se encontraron genes para metalo β -lactamasas (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*) lo que coincide con el análisis fenotípico.
- En relación a los métodos genotípicos, la PCR es la técnica más recomendada para la detección del gen *bla_{KPC}* ya que confirmó la presencia del mismo en 6 de las 42 cepas sospechosas, siendo todas estas *Klebsiella pneumoniae*.
- El gen *bla_{KPC}* encontrado en las 6 cepas descritas al ser parte de plásmidos transmisibles fue detectado mediante el análisis de ADN plasmidial y total extraído. Este gen posee un alto potencial de diseminación entre las enterobacterias circulantes en los medios hospitalarios estudiados debido a su ubicación en estos elementos móviles.
- La resistencia mediada por la carbapenemasa del tipo KPC en los aislados analizados está relacionada con perfiles de multiresistencia ya que al mismo tiempo presentaron el perfil fenotípico para β -lactamasas de espectro extendido.
- Los genes detectados corresponden a la clase serin β -lactamasas, específicamente de la familia KPC, no se encontraron enzimas del tipo GES a pesar de estar comúnmente asociados a perfiles de multiresistencia en cepas productoras de BLEES.

- Los microorganismos aislados que presentaron un perfil fenotípico de resistencia a los carbapenemes y que no poseen los genes relacionados con la producción de las carbapenemasas analizadas podrían deber su resistencia a otros mecanismos asociados como lo son las enzimas del tipo AmpC, CTX-M y/o alteración de porinas de sus membranas, mecanismos no estudiados en la presente investigación.
- El perfil genotípico correspondiente a la producción de carbapenemasas fue encontrado en cepas provenientes de los servicios intrahospitalarios lo que concuerda con el uso exclusivo de los carbapenemes en este medio y por lo tanto el desarrollo de esta resistencia.
- La adquisición del gen *bla_{KPC}* en aislados de enterobacterias nosocomiales está dada por la transmisión de plásmidos entre bacterias, muy probablemente desde géneros como *Pseudomonas spp.*, en las cuales es conocida la resistencia a los carbapenemes por varios mecanismos que incluyen las β -lactamasas del tipo serin, metalo β -lactamasas y alteración de porinas.
- Por otra parte, la exposición de las enterobacterias a los antibióticos Carbapenémicos haría que se expresen los genes que confieren resistencia hacia los mismos si se toma en cuenta la posibilidad de que las bacterias posean estos genes de manera ancestral.

- Las cepas analizadas al poseer genes productores de carbapenemasas (*bla_{KPC}*) y perfiles fenotípicos correspondientes a la producción de BLEES son microorganismos multiresistentes y por tanto pueden estar fuertemente asociados a otros tipos de resistencias como por ejemplo hacia las fluoroquinolonas, aminoglucósidos, etc.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Las infecciones con enterobacterias resistentes a los carbapenemes son una verdadera emergencia y un reto para las unidades de salud si no se toman las medidas necesarias. Las normas internacionales dictadas por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines) recalcan la importancia de la oportuna detección y confirmación de estos microorganismos cuando existen enterobacterias con halos de inhibición o MICs dentro del rango sospechoso ($< 21\text{mm}$ para el imipenem) utilizando el Test Modificado de Hodge.

El beneficio económico de utilizar las técnicas fenotípicas (Test Modificado de Hodge y el test de doble disco sinergia ácido borónico – imipenem) frente al costo de la técnica molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa es significativamente grande, por lo que la hace una práctica útil en todos los sentidos y aplicable a nuestra realidad, tomando en cuenta además su alta sensibilidad y especificidad.

A pesar de que la PCR es una técnica que requiere una alta inversión económica y humana para ser utilizada de manera rutinaria en los medios hospitalarios; el resultado académico e investigativo obtenido es trascendental para establecer futuros proyectos en el ámbito molecular microbiológico de nuestro país.

Por otra parte la detección temprana de pacientes infectados o colonizados por estos microorganismos multiresistentes es clave para iniciar una terapéutica oportuna y permite tomar las medidas necesarias para evitar su diseminación. Las normas internacionales de bioseguridad estrictamente utilizadas para el contacto con estos pacientes minimizan este riesgo; por lo que se deben implementar a manera de protocolos de seguimiento.

Las infecciones dadas por enterobacterias resistentes a los carbapenemes provocan altas tasas de mortalidad (por ejemplo: *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC) y por lo tanto su diseminación debe ser controlada y detectada oportunamente debido al riesgo inminente de brotes epidémicos y por ende con graves consecuencias económicas y sociales.

Es por esto que organismos internacionales como el CDC (Centers of Disease Control and Prevention) y el Comité HIPAC (por sus siglas en inglés Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee Management of Multidrug-resistant organisms in healthcare settings) han propuesto estrategias estrictas ante la presencia de enterobacterias resistentes a los carbapenemes, y específicamente ante la presencia de infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC por su fácil diseminación.

Dentro de las recomendaciones se establece que en lugares donde este perfil de multiresistencia es un problema endémico, el screening debe ser rutinario en los pacientes hospitalizados para detectar a los posibles portadores y contactos. Los casos aislados en la muestra analizada en la presente investigación hacen que esta medida aún no sea necesaria por no ser una verdadera endemia. No obstante la vigilancia continua se hace mandatoria al existir una alerta epidemiológica y por ende un problema de salud pública.

La vigilancia microbiológica en los servicios de salud debe estar encaminada a detectar la presencia de enterobacterias nosocomiales multiresistentes en los servicios hospitalarios de mayor riesgo donde los pacientes, debido a sus patologías de base, están expuestos a antimicrobianos de amplio espectro. De encontrarse estos patógenos se debe concientizar y replantear el uso racional de antibióticos en estas unidades.

Finalmente, las medidas de control y calidad en los laboratorios microbiológicos, las normas universales de bioseguridad, y la suspicacia en la detección de enterobacterias resistentes a los carbapenemes basándose en los parámetros establecidos para su identificación tomando en cuenta siempre que estos microorganismos pueden cursar como falsamente sensibles, son los pasos básicos para el control de estas cepas causantes de infecciones graves y mortales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Murray Patrick R., Rosenthal Ken S., Pfaller Michael A. Bacteriología. *Enterobacteriaceae*. In: Elsevier Inc. Microbiología Médica. 5ta. Edición. Madrid, España; 2006. p. 323-38.
- 2.- Jonas Marschall, Denis Agniel, Victoria J. Fraser, Joshua Doherty, David K. Warren. Gram-negative bacteremia in non-ICU patients: factors associated with inadequate antibiotic therapy and impact on outcomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 61, 1376–1383.
- 3.- Antonia Andreu, Juan Ignacio Alós, Miguel Gobernado, Francesc Marco, Manuel de la Rosa, José Antonio García Rodríguez, et al. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio Nacional multicéntrico. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 2005;23(1):4-9
- 4.- Jean Louis Vincent, MD, PhD; David J. Bihari, MB, FRCP; Peter M. Suter, MD; Hajo A. Bruining, MD, PhD; Jane White, MRCPsych; Marie-Helene Nicolas-Chanoin, MD, PhD; et al. The Prevalence of Nosocomial Infection in Intensive Care Units in Europe Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study *JAMA*. 1995;274(8):639-644.

- 5.- Richard L. Guerrant, Thomas Van Gilder, Ted S. Steiner, Nathan M. Thielman, Laurence Slutsker, Robert V. Tauxe, et al. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32:331–50.
- 6.- Miguel Blanco, Jorge Blanco, Jesús Eulogio Blanco, M. Pilar Alonso, Inmaculada Abalia, Elena Rodríguez, et al. Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 236-241.
- 7.- Rodríguez-Angeles G. Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. *Salud Publica Mex* 2002;44:464-475.
- 8.- Mario Tumbarello, Teresa Spanu, Maurizio Sanguinetti, Rita Citton, Eva Montuori, Fiammetta Leone, et al. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors, Molecular Antimicrobial agents and chemotherapy, Feb. 2006, p. 498–504 Vol. 50, No. 2.
- 9.- Ben Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clinical and Infectious Disease*. 2009; 49(5): 682-90.

- 10.- Smita Gupta, MD, Janak Koirala, MD, MPH, Romesh Khardori, MD, PhD, Nancy Khardori, MD, PhD. Infections in Diabetes Mellitus and Hyperglycemia. *Infectious Disease Clinics N Am* 21 (2007) 617–638.
- 11.- Bellier C, Risk factors for Enterobacteriaceae bacteremia after liver transplantation. *Transpl Int.* 2008; 21(8): 755-63.
- 12.- Benca J. Nosocomial meningitis caused by Enterobacteriaceae: risk factors and outcome in 18 cases in 1992-2007. *Neurology and Endocrinology Letters.* 2007; 28 Suppl 2: 27-9
- 13.- Friedmann R . Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. *Infection Control Hospital Epidemiology.*2009; 30(6): 534-42.
- 14.- Issam Raad, Hend Hanna, Dennis Maki. Intravascular catheter related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Infection The Lancet* Vol 7 October 2007.
- 15.- Hardman Joel G., Goodman Gilman Alfred MD., Ph.D., D.Sc., Antibiotics. Penicilins, Cefalosporins and other β -lactams. In: McGraw Hill Interamericana. Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. United States of America. 2001. p. 1207 – 1232.

- 16.- Walsh Christopher. Validated Targets and Major Antibiotic Classes. In: ASM Press. Antibiotics, actions, origins, resistance. Washington, D.C. United States of America. 2003. p. 23 – 45.
- 17.- Holly M. Mattoes, Joseph L. Kuti, George L. Drusano, David P. Nicolau. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: dosage strategies for meropenem. Science Direct. 2004. Volume 26, Issue 8, Pages 1187-1198.
- 18.- Paul R. Rhomberg, Ronald N. Jones. Antimicrobial spectrum of activity for meropenem and nine broad spectrum antimicrobials: report from the MYSTIC Program (2002) in North America. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003. Volume 47, Issue 1, Pages 365-372.
- 19.- Ronald N. Jones, Paul R. Rhomberg, David J. Varnama, Dilip Mathaib. A comparison of the antimicrobial activity of meropenem and selected broad-spectrum antimicrobials tested against multi-drug resistant Gram-negative bacilli including bacteraemic *Salmonella* spp. Initial studies for the MYSTIC programme in India. International Journal of Antimicrobial Agents. 2002. Volume 20, Issue 6, Pages 426-431.
- 20.- Programa de Enfermedades Transmisibles. División de Prevención y Control de Enfermedades Organización Panamericana de la Salud. Prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos en las Américas. Plan estratégico de vigilancia de la resistencia a los antibióticos. OPS/HCP/HCT/139/99.

- 21.- Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
- 22.- Juan Carlos Galán, María Rosario Baquero, María Isabel Morosini, Fernando Baquero. High mutation rate bacteria: Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada, Artículo de Revisión. *Infectio* 2006; 10(1): 22-29
- 23.- George L. Daikos, Chris Kosmidis, Panayotis T. Tassios, George Petrikos, Alexandra Vasilakopoulou, Mina Psychogiou, Ioanna Stefanou, et al. *Enterobacteriaceae* Bloodstream Infections: Presence of Integrons, Risk Factors, and Outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2007, p. 2366–2372
- 24.- Gerald L. Mandell, MD, John E. Bennett, MD, Raphael Dolin, MD. Principles of Anti-infective Therapy and Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. In: Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier. Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia, EE.UU. 2009. Vol.1, Section E, Chapter 18-19.
- 25.- PM Bennett. Review. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* (2008) 153, S347–S357.

- 26.- Alessandra Carattoli. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, June 2009, p. 2227–2238.
- 27.- John H. Tran, George A. Jacoby, and David C. Hooper. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan. 2005, p. 118–125.
- 28.- David L. Paterson, Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical microbiology reviews*, Oct. 2005, p. 657–686.
- 29.- Hiroshi Nikaido. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review Biochemistry*. 2009 ; 78: 119–146.
- 30.- Carlos José Suárez, Juan Nicolas Kattan, Ana María Gusmán, María Virginia Villegas. Mecanismos de resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infection Diseases* 2006; 10(2): 85-93.
- 31.- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine*. 2005 Jan 27;352(4):380-91.

- 32.- Barry G. Hall, Miriam Barlow. Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000;10(93):130.
- 33.- Karen Bush, George A. Jacoby, Antone A. Medeiros. Minireview: A Functional Classification Scheme for β -lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, June 1995, p. 1211–1233.
- 34.- George A. Jacoby. Minireview: β -lactamase Nomenclature. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Apr. 2006, p. 1123–1129.
- 35.- David L. Paterson, MD, PhD. Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine* (2006) Vol 119 (6A), S20–S28.
- 36.- David M. Livermore. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1995, p. 557–584
- 37.- MMWR (US). Guidance for Control of Infections With Carbapenem-Resistant or Carbapenemase- Producing *Enterobacteriaceae* in Acute Care Facilities. *JAMA*. 2009;301(19):1979-1982

- 38.-** Andrea Endimiani, Andrea M. Hujer, Federico Perez, Christopher R. Bethel, Kristine M. Hujer, Jennifer Kroeger, et al. Characterization of *bla*_{KPC}-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009) 63, 427–437.
- 39.-** Chiang T, Mariano N, Urban C et al. Identification of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring KPC enzymes in New Jersey. *Microbiology Drug Resistance* 2007; 13: 235–9.
- 40.-** Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curricular Opinion of Infectious Disease*. 2008;21: 367-371.
- 41.-** Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Disease*. 2009;9:228-236.
- 42.-** Maria Virginia Villegas, Karen Lolans, Adriana Correa, Carlos Jose Suarez, Jaime A. Lopez, Marta Vallejo, et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Aug. 2006, p. 2880–2882 Vol. 50, No. 8.

- 43.-** Alain Dubus, Jean Marc Wilkin, Xavier Raquet, Staffan Normark, Jean Marie Frere. Catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases: role of the conserved hydroxy group of the Lys-Thr(Ser)-Gly triad. *Biochemistry Journal* (1994) 301, 485-494.
- 44.-** Jan Walther-Rasmussen, Niels Hoiby. Class A carbapenemases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2007) 60, 470–482.
- 45.-** Medeiros, A. A., and R. S. Hare. β -lactamase-mediated resistance to penems and carbapenems amongst *Enterobacteriaceae*. American Society for Microbiology, 1986 abstr. 116. 26th
- 46.-** Karen Bush, George A. Jacoby. Updated Functional Classification of β -lactamases, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Mar. 2010, p. 969–976.
- 47.-** Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1990 May;34(5):755-8.

- 48.-** Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfaller MA, Jones RN. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme, *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001 Feb;39(2):125-7.
- 49.-** Anne Marie Queenan, Wenchi Shang, Paul Schreckenberger, Karen Lolans, Karen Bush, John Quinn. SME-3, a Novel Member of the *Serratia marcescens* SME Family of Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Oct. 2006, p. 3485–3487 Vol. 50, No. 10.
- 50.-** Thierry Naas, Laurence Vandael, Wladimir Sougakoff, David M., Livermore, Patrice Nordmann. Cloning and Sequence Analysis of the Gene for a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, SME-1, from *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38: 1262, 1994.
- 51.-** Anne Marie Queenan, Carlos Torres Viera, Howard S. Gold., Yehuda Carmeli, George M. Eliopoulos, Robert C. Moellering Jr. SME-Type Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamases from Geographically Diverse *Serratia marcescens* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov. 2000, p. 3035–3039.

- 52.-** Laurent Poiriel, Aline Wenger, Jacques Bille, Sandrine Bernabeu, Thierry Naas, Patrice Nordmann, et al. SME-2-Producing *Serratia marcescens* Isolate from Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, June 2007, p. 2282–2283.
- 53.-** Fahd K. Majiduddin, Timothy Palzkill. Amino Acid Sequence Requirements at Residues 69 and 238 for the SME-1 β -lactamase To Confer Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2003, p. 1062–1067.
- 54.-** Thierry Naas, David M. Livermore, Patrice Nordmann. Characterization of an LysR Family Protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, Its Effect on Expression of the Carbapenem- Hydrolyzing β -Lactamase Sme-1, and Comparison of This Regulator with Other β -Lactamase Regulators. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, March. 1995, p. 629–637.
- 55.-** Patrice Nordmann, Sophie Mariotte, Thierry Naas, Roger Labia, Marie Helene Nicolas. Biochemical Properties of a Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase from *Enterobacter cloacae* and Cloning of the Gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 1993, p. 939-946.

- 56.-** Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emergency in Infectious Disease*. 2003 Aug;9(8):999-1002.
- 57.-** Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, Ricover N, Ayala JA. First class a carbapenemase isolated from enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Mar;48(3):1068-9.
- 58.-** Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996 Sep;40(9):2080-6.
- 59.-** Yun-Song Yu, Xiao-Xing Du, Zhi-Hui Zhou, Ya-Gang Chen, Lan-Juan Li. First Isolation of *bla*IMI-2 in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate from China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr. 2006, p. 1610–1611.
- 60.-** Hesna Yigit, Anne Marie Queenan, J. Kamile Rasheed, James W. Biddle, Antonio Domenech-Sanchez, Sebastian Alberti, et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Dec. 2003, p. 3881–3889.

- 61.-** Jia Chang Cai, Hong Wei Zhou, Rong Zhang, and Gong-Xiang Chen. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates Possessing the Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in Intensive Care Units of a Chinese Hospital. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, June 2008, p. 2014–2018.
- 62.-** Ashfaque Hossain, M. J. Ferraro, R. M. Pino, R. B. Dew, E. S. Moland, T. J. Lockhart K. S. Thomson, et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an *Enterobacter spp.* *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Nov. 2004, p. 4438–4440.
- 63.-** Andrea Endimiani, Andrea M. Hujer, Federico Perez, Christopher R. Bethel, Kristine M. Hujer, Jennifer Kroeger, Margret Oethinger, et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009) 63, 427–437.
- 64.-** Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium, *Arch Intern Med.* 2005 Jun 27;165(12):1430-5.

- 65.-** Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella spp.* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Annals of Internal Medicine*. 1993 Sep 1;119(5):353-8.
- 66.-** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Clinical and Laboratory Standards Institute. Appendix G Screening Confirmatory Tests for Suspected Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*. CLSI Document M100-S19. Vol.29 No. 3. EEUU 2009.
- 67.-** Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 Jul;49(7):3018-20.
- 68.-** Neil Woodford, Philip M. Tierno, Jr., Katherine Young, Luke Tysall, Marie-France I. Palepou, Elaina Ward, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Dec. 2004, p. 4793–4799 Vol. 48, No. 12.
- 69.-** Stephanie Petrella, Nathalie Ziental-Gelus, Claudine Mayer, Murielle Renard, Vincent Jarlier, Wladimir Sougakoff. Genetic and Structural Insights into the Dissemination Potential of the Extremely Broad-Spectrum Class A β -Lactamase

KPC-2 Identified in an *Escherichia coli* Strain and an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from the Same Patient in France. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Oct. 2008, p. 3725–3736.

- 70.-** Carla Fontana, Marco Favaro, Loredana Sarmati, Silvia Natoli, Anna Altieri, Maria C Bossa, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC Research Notes* 2010, 3:40.
- 71.-** Maria Virginia Villegas, Karen Lolans, Adriana Correa, Juan Nicolas Kattan, Jaime A. Lopez, John P. Quinn. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Apr. 2007, p. 1553–1555.
- 72.-** Thierry Naas, Gaelle Cuzon, Maria-Virginia Villegas, Marie-Frederique Lartigue, John P. Quinn, Patrice Nordmann. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase *bla_{KPC}* gene. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Apr. 2008, p. 1257–1263.
- 73.-** Patrice Nordmann, Gaelle Cuzon, Thierry Naas. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228–36.

- 74.- David Goldfarb, Sarah-Beth Harvey, Kelsi Jessamine, Peter Jessamine, Baldwin Toye, Marc Desjardins. Detection of Plasmid-Mediated KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: Evidence of Intrahospital Transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2009, p. 1920–1922.
- 75.- Shiri Navon-Venezia, Azita Leavitt, Mitchell J. Schwaber, J. Kamile Rasheed, Arjun Srinivasan, Jean B. Patel, et al. First Report on a Hyperepidemic Clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel Genetically Related to a Strain Causing Outbreaks in the United States. *Antimicrobial agents and Chemoterapy*, Feb. 2009, p. 818–820.
- 76.- Laurent Poirel, Isabelle Thomas, Thierry Naas, Amal Karim, Patrice Nordmann. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum b-Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 0066-4804/00/04.0010.
- 77.- Jun-ichi Wachino, Yohei Doi, Kunikazu Yamane, Naohiro Shibata, Tetsuya Yagi, Takako Kubota, Hideo Ito, et al. Nosocomial Spread of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing a Novel Class A β -Lactamase, GES-3, in a Neonatal Intensive Care Unit in Japan. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, June 2004, p. 1960–1967.

- 78.-** Laurent Poirel, Gerhard F. Weldhagen, Thierry Naas, Christophe De Champs, Michael G. Dove, Patrice Nordmann. GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept. 2001, p. 2598–2603.
- 79.-** Jun-ichi Wachino, Yohei Doi, Kunikazu Yamane, Naohiro Shibata, Tetsuya Yagi, Takako Kubota, et al. Molecular Characterization of a Cephamycin-Hydrolyzing and Inhibitor-Resistant Class A β -Lactamase, GES-4, Possessing a Single G170S Substitution in the Ω -Loop. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Aug. 2004, p. 2905–2910.
- 80.-** β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences. Lahey Clinic. [Consultado: Noviembre 2010]. Disponible en: URL: <http://www.lahey.org/Studies>.
- 81.-** Laurent Poirel, Laura Brinas, Nicolas Fortineau, Patrice Nordmann. Integron-Encoded GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug. 2005, p. 3593–3597.

- 82.-** Seok Hoon Jeong, Il Kwon Bae, Doelman Kim, Seong Geun Hong, Jae Seok Song, Jung Hun Lee, Sang Hee Lee. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β -Lactamases in Korea. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Nov. 2005, p. 4809–4810.
- 83.-** A. Duarte, F. Boavida, F. Grosso, M. Correia, L. M. Lito, J. Melo Cristino, et al. Outbreak of GES-1 β -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Apr. 2003, p. 1481–1482.
- 84.-** Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, Song EH, Jeong SH. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2005 Oct;56(4):698-702. Epub 2005 Sep 2.
- 85.-** Sofia Vourli, Panagiota Giakkoupi, Vivi Miriagou, Eva Tzelepi, Alkiviadis C. Vatopoulos, Leonidas S. Tzouvelekis. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 234 (2004) 209–213.

- 86.-** Beth A. Rasmussen, Karen Bush. Minireview. Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb. 1997, p. 223–232.
- 87.-** Michael I. Page, Adriana Badarau. Review Article. The Mechanisms of Catalysis by Metallo β -Lactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications Volume 2008*, Article ID 576297.
- 88.-** Spencer J, Clarke AR, Walsh TR. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic beta-lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo-beta-lactamase. *Journal of Biology and Chemotherapy*. 2001 Sep 7;276(36):33638-44. Epub 2001 Jul 6.
- 89.-** S. Kuwabara, E.P. Abraham. *Biochem. Some Properties of Two Extracellular β -Lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. J. (1967) 103, 27 c.*
- 90.-** Yushi Saino, Fujio Kobayashi, Matusuhisa Inoue, Susumu Mitsuhashi. Purification and Properties of Inducible Penicillin β -Lactamase Isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Oct. 1982, p. 564-570.
- 91.-** Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. 2003 Oct;52(4):699-702. Epub 2003 Sep 1.

- 92.- Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of bla(VIM-1)-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene. *Diagnosis, Microbiology Infection Diseases*. 2004 Mar;48(3):167-72.
- 93.- Jing-Jou Yan, Wen-Chien Ko, Chin-Luan Chuang, Jiunn-Jong Wu. Metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2002) 50, 503–511.
- 94.- Hideo Ito, Yoshichika Arakawa, Shinji Ohsuka, Rochaporn Wacharotayankun, Nobuo Kato, Michio Ohta. Plasmid-Mediated Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene *bla_{IMP}* among Clinically Isolated Strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Apr. 1995, p. 824–829.
- 95.- Yoichi Hirakata, Koichi Izumikawa, Tochiyuki Yamaguchi, Hiromu Takemura, Hironori Tanaka, Ryoji Yoshida, et al. Rapid Detection and Evaluation of Clinical Characteristics of Emerging Multiple-Drug-Resistant Gram-Negative Rods Carrying the Metallo- β -Lactamase Gene *bla_{IMP}*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Aug. 1998, p. 2006.

- 96.-** Anton Y. Peleg, Clare Franklin, Luke J. Walters, Jan M. Bell, and Denis W. Spelman. OXA-58 and IMP-4 Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases in an *Acinetobacter junii* Blood Culture Isolate from Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006 January; 50(1): 399–400.
- 97.-** Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Jul;43(7):1584-90.
- 98.-** Ines Schneider, Emma Keuleyan, Rudolf Rasshofer, Rumyana Markovska, Anne Marie Queenan, Adolf Bauernfeind. VIM-15 and VIM-16, Two New VIM-2-Like Metallo- β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Aug. 2008, p. 2977–2979 .
- 99.-** Ørjan Samuelsen, Mariana Castanheira, Timothy R. Walsh, James Spencer. Notes. Kinetic Characterization of VIM-7, a Divergent Member of the VIM Metallo- β -Lactamase Family. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug. 2008, p. 2905–2908.

- 100.-** Maria Virginia Villegas, Karen Lolans, Maria del Rosario Olivera, Carlos José Suarez, Adriana Correa, Anne Marie Queenan, John P. Quinn. First Detection of Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan. 2006, p. 226–229.
- 101.-** Rodrigo E. Mendes, Mariana Castanheira, Patricia Garcia, Manuel Guzman, Mark A. Toleman, Timothy R. Walsh. Letters to the Editor. First Isolation of *bla*VIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr. 2004, p. 1433–1434.
- 102.-** George L. Daikos, Panayiotis Petrikkos, Mina Psychogiou, Chris Kosmidis, Evangelos Vryonis, Athanasios Skoutelis, et al. Prospective Observational Study of the Impact of VIM-1Metallo- β -Lactamase on the Outcome of Patients with *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, May 2009, p. 1868–1873.
- 103.-** José Manuel Rodriguez Martinez, Patrice Nordmann, Nicolas Fortineau, Laurent Poirel. VIM-19, a Metallo- β -Lactamase with Increased Carbapenemase Activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan. 2010, p. 471–476.

- 104.-** Frederic Robin, Nadjat Aggoune Khinache, Julien Delmas, Malek Naim, Richard Bonnet. Novel VIM Metallo- β -Lactamase Variant from Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan. 2010, p. 466–470.
- 105.-** Matthew, M. Plasmid mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *Journal of Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 5:349–358. 1979.
- 106.-** Simpson, I. N., P. B. Harper, and C. H. O’Callaghan. Principal β -lactamases responsible for resistance to β -lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 17:929–936. 1980.
- 107.-** Bush, K. 1988. Recent developments in β -lactamase research and their implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* 10:681–690; 739–743.
- 108.-** Paton, R., R. S. Miles, J. Hood, and S. G. B. Amyes. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2:81–87. 1993
- 109.-** Walther-Rasmussen, J., and N. Hoiby. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 57:373–383. 2006.

- 110.-** Poirel, L., C. Heritier, V. Toluen, and P. Nordmann. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:15–22.
- 111.-** Da Silva, G. J., S. Quinteira, E. Bertolo, J. C. Sousa, L. Gallego, A. Duarte, Et al. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase- producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 54:255–258. 2004.
- 112.-** Hujer, K. M., A. M. Hujer, E. A. Hulten, S. Bajaksouzian, J. M. Adams, C. J. Donskey, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter spp.* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50:4114–4123. . 2006.
- 113.-** Lopez-Otsoa, F., L. Gallego, K. J. Towner, L. Tysall, N. Woodford, D. M. Livermore. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40:4741–4743. 2002.

- 114.-** Aktaş, Z., C. B. Kayacan, I. Schneider, B. Can, K. Midilli, A. Bauernfeind. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 54:101–106. 2008.
- 115.-** Laurent Poirel, Claire Héritier, Venus Tolün, Patrice Nordmann .Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan. 2004, p. 15–22
- 116.-** Gülmez, D., N. Woodford, M. F. Palepou, S. Mushtaq, Y. Yakupogullari, D. M. Livermore. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31:523–526. 2008.
- 117.-** Fernando Pasteran, Tania Mendez, Melina Rapoport, Leonor Guerriero, Alejandra Corso. Controlling False-Positive Results Obtained with the Hodge and Masuda Assays for Detection of Class A Carbapenemase in Species of *Enterobacteriaceae* by Incorporating Boronic Acid. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2010, p. 1323–1332.

- 118.-** Fernando Pasteran, Tania Mendez, Leonor Guerriero, Melina Rapoport, Alejandra Corso. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2009, p. 1631–1639.
- 119.-** K. Lee, Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum, and Y. Chong. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 2003, p. 4623–4629.
- 120.-** Athanassios Tsakris, Aggeliki Poulou, Katerina Themeli-Digalaki, Evangelia Voulgari, Theodore Pittaras, Danai Sofianou, et al. Use of Boronic Acid Disk Tests To Detect Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of KPC Carbapenemase-Possessing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2009, p. 3420–3426.
- 121.-** Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”. Servicio de Antimicrobianos, Dpto. de Bacteriología, Fernando Pasterán. Alerta Epidemiológica: Diseminación de carbapenemasas. Octubre 2008.

- 122.-** Justin M. Cole, Audrey N. Schuetz, Charles E. Hill, Frederick S. Nolte. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 2009, p. 322–326.
- 123.-** Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker. *Biología de los Microorganismos*. 8va edición. Madrid, España. 1999.
- 124.-** Alcocer Iliana. *Manual, Laboratorio de Microbiología*. Quito, Ecuador. 2010.
- 125.-** Xuan Qin, Scott J Weissman, Mary Frances Chesnut, Bei Zhang, Lisong Shen. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2004, 3:13.
- 126.-** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Clinical and Laboratory Standards Institute. β -lactamase Tests. CLSI Document M02-A10, Vol.29 No. 1. EEUU 2009.
- 127.-** Doi, Y., B. A. Potoski, J. M. Adams-Haduch, H. E. Sidjabat, A. W. Pasculle,

and D. L. Paterson. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound. *Journal of Clinical Microbiology* 46:4083–4086.

- 128.-** Fernando Pasteran, Tania Mendez, Melina Rapoport, Leonor Guerriero, Alejandra Corso. Controlling False-Positive Results Obtained with the Hodge and Masuda Assays for Detection of Class A Carbapenemase in Species of *Enterobacteriaceae* by Incorporating Boronic Acid. *Journal of Clinical Microbiology*. Apr. 2010, p. 1323–1332 Vol. 48, No. 4.
- 129.-** Alcocer Negrete I. Universidad Estatal de Londrina, Centro de Ciencias Agrarias, Departamento de Tecnología de Alimentos y Medicamentos. Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos: *Salmonella spp.*: Patronización de Ensayo Inmunoenzimático para detección en Alimentos. Londrina-Paraná.; 1999.
- 130.-** Lewin Benjamin PhD. Genes IX. 9ed. Sudbury (USA): McGraw Hill; 2008.
- 131.-** Surzycki, S. Basic Techniques in Molecular Biology. Springer. New York, USA. 2000.
- 132.-** Liliana Jordá Vargas, Andrea Vila, Alejandra Lanza, Pablo Bonvehi, Javier Nazar, Analía Mikietuk, et. al. Utilidad del sistema *VITEK* en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínicos of Latinoamerica* 2005; 39 (1): 19-25

- 133.-** Castanheira M, Mendes RE, Woosley LN, Jones RN. Trends in carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Europe and the Americas: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2007-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jun;66(6):1409-11. Epub 2011 Mar 18.
- 134.-** Turner, P. J. 2004. Susceptibility of meropenem and comparators tested against 30,634 Enterobacteriaceae isolated in the MYSTIC Programme (1997–2003). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**:291–293.
- 135.-** Turner, P. J. 2005. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51:281–289.
- 136.-** Marcela Radice, Pablo Power, Gabriel Gutkind, Karina Fernández, Carlos Vay, et. al. First Class A Carbapenemase Isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2004, p. 1068–1069 Vol. 48, No. 3.

- 137.-** Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, J. N. Kattan, J. A. Lopez, J. P. Quinn, and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51:1553 – 1555.
- 138.-** Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann. Do CTX-M β - lactamases hydrolyse ertapenem? *J. Antimicrobial agents and Chemotherapy*. doi: 10.1093/JAC.
- 139.-** Bradford, P. A., S. Bratu, C. Urban, M. Visalli, N. Mariano, D. Landman, J. J. Rahal, S. Brooks, S. Cebular, and J. Quale. 2004. Emergence of Carbapenem resistant *Klebsiella spp.* possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clinical of Infectious Diseases* 39:55–60.
- 140.-** Yigit, H., A. M. Queenan, J. K. Rasheed, J. W. Biddle, A. Domenech-Sanchez, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2003. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:3881–3889.

- 141.-** Cuzon G, Naas T, Demachy MC et al. Plasmid-mediated Carbapenem hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52: 796–7.
- 142.-** Monteiro J, Henriques APC, Santos AF et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak: emergence of KPC-2-producing strains in Brazil. In: *Abstracts of the Forty-seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Chicago, IL, 2007. Abstract C2-1929, p. 141. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- 143.-** J. Kamile Rasheed, James W. Biddle, Karen F. Anderson, Laraine Washer, Carol Chenoweth, John Perrin, et. al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Type 2 Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme in Clinical Isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* Carrying a Common Plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2008, p. 2066–2069 Vol. 46, No. 6.
- 144.-** 1. Bradford, P. A., S. Bratu, C. Urban, M. Visalli, N. Mariano, D. Landman, J. J. Rahal, S. Brooks, S. Cebular, and J. Quale. 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenemhydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin. Infection Diseases*. 39:55–60.

- 145.-** Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9:228 – 236.
- 146.-** Poirel, L., C. Leviandier, and P. Nordmann. 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*
- 147.-** Stapleton, P. D., K. P. Shannon, and G. L. French. 1999. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 β -lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1206–1210.
- 148.-** Chow, J. W., and D. M. Shlaes. 1991. Imipenem resistance associated with the loss of a 40-kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:499–504.
- 149.-** Lee, E. H., M. H. Nicolas, M. D. Kitzis, G. Pialoux, E. Collatz, and L. Gutmann. 1991. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 35:1093–1098

- 150.-** Caterina Mammina, Daniela Maria Palma, Celestino Bonura, Maria Rosa Anna Plano, Rachele Monastero, Concetta Sodano. Outbreak of Infection with *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 3 in an Intensive Care Unit in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2010, p. 1506–1507.
- 151.-** Leanne B. Gasink, MD, MSCE, Paul H. Edelstein, MD, Ebbing Lautenbach, MD, MPH, MSCE, Marie Synnestvedt, PhD, and Neil O. Fishman, MD. Risk Factors and Clinical Impact of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *Infection Control Hospital Epidemiology*. 2009 December ; 30(12): 1180–1185.
- 152.-** Enrique Llobet, Catalina March, Paloma Gimenez, José A. Bengoechea *Klebsiella pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan. 2009, p. 298–302.
- 153.-** Bush, K. 1997. The evolution of β -lactamases, p. 152–166. *In* D. J. Chadwick and J. Goode (ed.), *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*, vol. 207. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.

- 154.-** Butterworth, D., M. Cole, G. Hanscomb, and G. N. Rolinson. 1979. Olivanic acids, a family of β -lactam antibiotics with β -lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species. I. Detection, properties and fermentation studies. *J. Antibiot.* 32:287–294.
- 155.-** Materon, I. C., A. M. Queenan, T. M. Koehler, K. Bush, and T. Palzkill. 2003. Biochemical characterization of β -lactamases Bla1 and Bla2 from *Bacillus anthracis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47:2040–2042.
- 156.-** Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt. 2006. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258:72–77.
- 157.-** Normark, S. 1995. β -Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb. Drug Resist. Mech. Epidemiol. Dis.* 1:111–114.
- 158.-** Scoulica, E. V., I. K. Neonakis, A. I. Gikas, and Y. J. Tselentis. 2004. Spread of blaVIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:167–172.

- 159.-** Chu, Y. W., T. K. M. Cheung, J. Y. W. Ngan, and K. M. Kam. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and Imipenem-EDTA disk method. *Int. J. Antimicrobial Agents* 26:340-341, 2005.
- 160.-** Segal, H., and B. G. Elisha. 2005. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 56:598.
- 161.-** Conejo, M. C., I. Garcia, L. Martinez-Martinez, L. Picabea, and A. Pascual. 2003. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:2313–2315.
- 162.-** Perron, K., O. Caille, C. Rossier, C. van Delden, J. L. Dumas, and T. Kohler. 2004. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279:8761–8768.
- 163.-** Timothy R. Walsh, Mark A. Toleman, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2005, p. 306–325 Vol. 18, No. 2.

- 164.-** Scott A. Weisenberg, Daniel J. Morgan, Rosanny Espinal-Witter, and Davise H. Larone. Clinical outcomes of patients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following treatment with imipenem or Meropenem. Weill Medical College of Cornell University 2University of Maryland *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 June ; 64(2): 233–235.
- 165.-** Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:570–3.
- 166.-** Maria Souli, Panagiota Danai Rekatsina, Zoi Chryssouli, Irene Galani, Helen Giamarellou, Kyriaki Kanellakopoulou. Does the Activity of the Combination of Imipenem and Colistin In Vitro Exceed the Problem of Resistance in Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates? 4th Department of Internal Medicine, Athens University School of Medicine, University General Hospital Attikon, Chaidari, Greece. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, May 2009, p. 2133–2135 Vol. 53, No. 5.

- 167.-** María E. Pachón Ibáñez, Fernando Docobo Pérez, Rafael López-Rojas, Juan Domínguez Herrera, Manuel E. Jiménez Mejía, et al. Efficacy of Rifampicin and Its Combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in Experimental Models of Infection Caused by imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Service of Infectious Diseases, Spain. Antimicrobial agents and Chemotherapy, Mar. 2010, p. 1165–1172 Vol. 54, No. 3.

ANEXOS

Anexo 1.- Datos de origen de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	Código Hospital	Edad (Años)	Sexo	Servicio	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE
HCAM 084	995	40	M	Hospitalización Quirúrgica	Hisopado de herida de Pie	<i>Serratia marcescens</i>
HCAM 238	1292	71	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HCAM 335	430	49	M	Consulta Externa	Catéter central	<i>Enterobacter cloacae</i>
HCAM 371	1155	48	M	Emergencias	Orina	<i>Proteus mirabilis</i>
HG1 017	1016	1 a 3 m	F	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Enterobacter cloacae</i>
HG1 116	796	85	M	Hospitalización Quirúrgica	Herida de Escroto	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SNQ 035	S/N	7	M	Emergencias	Orina	<i>Morganella morganii</i>
SNQ 038	S/N	63	M	Emergencias	Espudo	<i>Proteus mirabilis</i>
SNQ 060	S/N	54	F	Consulta Externa	Secreción vaginal	<i>Proteus mirabilis</i>
SNQ 061	S/N	53	F	Hospitalización Clínica	Secreción de herida quirúrgica	<i>Proteus mirabilis</i>
HBO 030	O1067	3 a 7 m	M	Hospitalización Quirúrgica	Orina	<i>Morganella morganii</i>
HVZ 016	723	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HVZ 029	447	54	M	Consulta Externa	Espudo	<i>Enterobacter cloacae</i>
HVZ 032	702	70	F	Consulta Externa	Úlcera	<i>Proteus mirabilis</i>
HVZ 077	521L	86	F	Hospitalización Quirúrgica	Úlcera de talón	<i>Morganella morganii</i>

Anexo 1.- Datos de origen de los aislados tomados de los colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	Código Hospital	Edad (Años)	Sexo	Servicio	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE
HVZ 078	3435	24	M	Hospitalización Clínica	líquido subgaleal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HVZ 079	3436	ND	M	Hospitalización Clínica	Hemocultivo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HVZ 080	3437	ND	M	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HVZ 081	3438	29	M	Hospitalización Quirúrgica	Biopsia de tobillo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HVZ 082	3439	54	F	Hospitalización Clínica	Secreción traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HVZ 083	3440	46	M	Hospitalización Clínica	Secreción traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MIA 009	1839	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
MIA 020	1872	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
MIA 067	1997	ND	F	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Escherichia coli</i>
MIA 097	2083	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
MIA 098	2087	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
MIA 194	2402	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HPN 046	2241	76	M	Consulta Externa	Úlcera de pierna	<i>Proteus vulgaris</i>
HPN 049	2265	26	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HPN 050	2272	5	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>

Anexo 1.- Datos de origen de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	Código Hospital	Edad (Años)	Sexo	Servicio	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE
HPN 065	2321	70	M	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Proteus mirabilis</i>
HPN 071	2421	35	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HPN 103	2709	23	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HPN 104	2714	28	M	Consulta Externa	Orina	<i>Enterobacter aerogenes</i>
HPAS 019	77	69	F	Hospitalización Quirúrgica	Abceso de pie	<i>Citrobacter freundii</i>
HPAS 034	115	71	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HPAS 036	128	ND	F	Hospitalización Quirúrgica	Orina	<i>Proteus vulgaris</i>
HPAS 043	163	79	M	Emergencias	Espujo	<i>Escherichia coli</i>
HPAS 093	118	ND	F	Consulta Externa	Orina	<i>Klebsiella oxytoca</i>
HPAS 100	147	ND	F	UCI	Herida de cráneo	<i>Klebsiella oxytoca</i>
HPAS 128	16	ND	M	Emergencias	Orina	<i>Escherichia coli</i>
HEG 41	3216	28	M	Hospitalización Quirúrgica	Abceso	<i>Klebsiella oxytoca</i>

M, masculino; F, femenino; ND: No determinado; CE: Consulta Externa; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

Fuente: Registros Hospitalarios.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Anexo 2. Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (halos para Imipenem igual o menor a 21 mm)

Código PUCE	Código Hospital	Sexo	SERVICIO	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE	Ampicilina (AMP) <u>Mm</u>	Ceftazidima (CAZ) <u>mm</u>	Cefotaxima (CTX) <u>mm</u>	Imipenem (IMP) <u>mm</u>	Meropenem (MER) <u>mm</u>
HCAM 084	995	M	Hospitalización Quirúrgica	Hisopado de herida de Pie	<i>Serratia marcescens</i>	6	22	28	21	26
HCAM 238	1292	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	22	6	6	21	15
HCAM 335	430	M	Consulta Externa	Catéter central	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	15	6	21	26
HCAM 371	1155	M	Emergencias	Orina	<i>Proteus mirabilis</i>	20	29	33	21	29
HG1 017	1016	F	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	28	19	21	24
HG1 116	796	M	Hospitalización Quirúrgica	Herida de Escroto	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	26	31	20	28
SNQ 035	ND	M	Emergencias	Orina	<i>Morganella morganii</i>	6	27	23	19	27
SNQ 038	ND	M	Emergencias	Espuito	<i>Proteus mirabilis</i>	22	28	20	21	25
SNQ 060	ND	F	Consulta Externa	Secreción vaginal	<i>Proteus mirabilis</i>	17	6	6	19	16

Anexo 2. Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (halos para Imipenem igual o menor a 21 mm)

Código PUCE	Código Hospital	Sexo	SERVICIO	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE	Ampicilina (AMC) <u>Mm</u>	Ceftazidima (CAZ) <u>mm</u>	Cefotaxima (CTX) <u>mm</u>	Imipenem (IMP) <u>mm</u>	Meropenem (MER) <u>mm</u>
SNQ 061	ND	F	Hospitalización Clínica	Secreción de herida quirúrgica	<i>Proteus mirabilis</i>	6	22	24	17	28
HBO 030	O1067	M	Hospitalización Quirúrgica	Orina	<i>Morganella morganii</i>	6	17	28	20	26
HVZ 016	723	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	12	20	10	20	26
HVZ 029	447	M	Consulta Externa	Espuito	<i>Enterobacter cloacae</i>	18	19	20	21	20
HVZ 032	702	F	Consulta Externa	Úlcera	<i>Proteus mirabilis</i>	6	13	6	18	12
HVZ 077	521L	F	Hospitalización Quirúrgica	Úlcera de talón	<i>Morganella morganii</i>	6	13	11	21	21
HVZ 078	3435	M	Hospitalización Clínica	líquido subgaleal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	14	10	19	14
HVZ 079	3436	M	Hospitalización Clínica	Hemocultivo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	11	14	12
HVZ 080	3437	M	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	11	17	13

Anexo 2. Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (halos para Imipenem igual o menor a 21 mm)

Código PUCE	Código Hospital	Sexo	SERVICIO	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE	Ampicilina (AMC) <u>Mm</u>	Ceftazidima (CAZ) <u>mm</u>	Cefotaxima (CTX) <u>mm</u>	Imipenem (IMP) <u>mm</u>	Meropenem (MER) <u>mm</u>
HVZ 081	3438	M	Hospitalización Quirúrgica	Biopsia de tobillo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	14	10	17	14
HVZ 082	3439	F	Hospitalización Clínica	Secreción traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	13	10	18	14
HVZ 083	3440	M	Hospitalización Clínica	Secreción traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	15	13	18	16
MIA 009	1839	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	18	25	27	21	23
MIA 020	1872	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	13	23	26	21	24
MIA 067	1997	F	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Escherichia coli</i>	19	24	27	21	24
MIA 097	2083	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	18	25	27	21	23
MIA 098	2087	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	8	23	27	21	25
MIA 194	2402	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	15	17	21	21	22

Anexo 2. Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (halos para Imipenem igual o menor a 21 mm)

Código PUCE	Código Hospital	Sexo	SERVICIO	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE	Ampicilina (AMC) <u>Mm</u>	Ceftazidima (CAZ) <u>mm</u>	Cefotaxima (CTX) <u>mm</u>	Imipenem (IMP) <u>mm</u>	Meropenem (MER) <u>mm</u>
HPN 046	2241	M	Consulta Externa	Úlcera de pierna	<i>Proteus vulgaris</i>	19	27	17	18	21
HPN 049	2265	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	11	20	12	20	24
HPN 050	2272	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	10	26	15	17	20
HPN 065	2321	M	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Proteus mirabilis</i>	20	25	30	20	24
HPN 071	2421	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	14	20	23	21	23
HPN 103	2709	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	8	22	25	20	25
HPN 104	2714	M	Consulta Externa	Orina	<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	23	27	19	23
HPAS 019	77	F	Hospitalización Quirúrgica	Absceso de pie	<i>Citrobacter freundii</i>	6	22	26	21	27
HPAS 034	115	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	15	19	23	21	24

Anexo 2. Susceptibilidad a antimicrobianos en cepas tomadas de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasas (halos para Imipenem igual o menor a 21 mm)

Código PUCE	Código Hospital	Sexo	SERVICIO	Origen de la Muestra	Identificación bacteriana PUCE	Ampicilina (AMC) <u>Mm</u>	Ceftazidima (CAZ) <u>mm</u>	Cefotaxima (CTX) <u>mm</u>	Imipenem (IMP) <u>mm</u>	Meropenem (MER) <u>mm</u>
HPAS 036	128	F	Hospitalización Quirúrgica	Orina	<i>Proteus vulgaris</i>	21	26	28	21	24
HPAS 043	163	M	Emergencias	Espuito	<i>Escherichia coli</i>	11	15	6	15	26
HPAS 093	118	F	Consulta Externa	Orina	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	21	26	21	29
HPAS 100	147	F	UCI	Herida de cráneo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	23	23	21	27
HPAS 128	16	M	Emergencias	Orina	<i>Escherichia coli</i>	6	28	31	20	30
HEG 41	3216	M	Hospitalización Quirúrgica	Absceso	<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	27	30	20	21

ND, no determinado; M, masculino; F, femenino; CE, consulta externa; UCI, unidad de cuidados intensivos; AMP, ampicilina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; IMP, imipenem; MER, meropenem.

Fuente: Datos obtenidos de los Antibiogramas realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Católica.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Anexo 3.- Descripción Fenotípica y Genotípica de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	SERVICIO	ORIGEN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN PUCE	Halo Imipenem (IMP) mm	ANÁLISIS FENOTÍPICO			GENOTIPAJE			
							TEST EDTA - IMP:	TEST AB - IMP:	TEST HODGE	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> IMP
HCAM 084	995	M	Hospitalización Quirúrgica	Hisopado de herida de Pie	<i>Serratia marcescens</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HCAM 238	1292	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HCAM 335	430	M	Consulta Externa	Catéter central	<i>Enterobacter cloacae</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HCAM 371	1155	M	Emergencias	Orina	<i>Proteus mirabilis</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HG1 017	1016	F	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Enterobacter cloacae</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HG1 116	796	M	Hospitalización Quirúrgica	Herida de Escroto	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
SNQ 035	S/N	M	Emergencias	Orina	<i>Morganella morganii</i>	19	P	N	N	0	0	0	0
SNQ 038	S/N	M	Emergencias	Espuito	<i>Proteus mirabilis</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
SNQ 060	S/N	F	Consulta Externa	Secreción vaginal	<i>Proteus mirabilis</i>	19	P	N	N	0	0	0	0

Anexo 3.- Descripción Fenotípica y Genotípica de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	SERVICIO	ORIGEN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN PUCE	Halo Imipenem (IMP) mm	ANÁLISIS FENOTIPICO			GENOTIPAJE			
							TEST EDTA - IMP:	TEST AB - IMP:	TEST HODGE	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> IMP
SNQ 061	S/N	F	Hospitalización Clínica	Secreción de herida quirúrgica	<i>Proteus mirabilis</i>	17	P	N	N	0	0	0	0
HBO 030	O1067	M	Hospitalización Quirúrgica	Orina	<i>Morganella morganii</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
HVZ 016	723	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
HVZ 029	447	M	Consulta Externa	Espuito	<i>Enterobacter cloacae</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HVZ 032	702	F	Consulta Externa	Úlcera	<i>Proteus mirabilis</i>	18	P	N	N	0	0	0	0
HVZ 077	521L	F	Hospitalización Quirúrgica	Úlcera de talón	<i>Morganella morganii</i>	21	P	N	P	0	0	0	0
HVZ 078	3435	M	Hospitalización Clínica	Líquido subgaleal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	P	N	P	1	0	0	0
HVZ 079	3436	M	Hospitalización Clínica	Hemocultivo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	P	N	P	1	0	0	0
HVZ 080	3437	M	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	P	N	P	1	0	0	0

Anexo 3.- Descripción Fenotípica y Genotípica de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	SERVICIO	ORIGEN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN PUCE	Halo Imipenem (IMP) mm	ANÁLISIS FENOTÍPICO			GENOTIPAJE			
							TEST EDTA - IMP:	TEST AB - IMP:	TEST HODGE	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> IMP
HVZ 081	3438	M	Hospitalización Quirúrgica	Biopsia de tobillo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	P	N	P	1	0	0	0
HVZ 082	3439	F	Hospitalización Clínica	Secreción traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	P	N	P	1	0	0	0
HVZ 083	3440	M	Hospitalización Clínica	Secreción traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	P	N	P	1	0	0	0
MIA 009	1839	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
MIA 020	1872	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
MIA 067	1997	F	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
MIA 097	2083	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
MIA 098	2087	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
MIA 194	2402	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0

Anexo 3.- Descripción Fenotípica y Genotípica de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	SERVICIO	ORIGEN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN PUCE	Halo Imipenem (IMP) mm	ANÁLISIS FENOTÍPICO			GENOTIPAJE			
							TEST EDTA - IMP:	TEST AB - IMP:	TEST HODGE	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> IMP
HPN 046	2241	M	Consulta Externa	Úlcera de pierna	<i>Proteus vulgaris</i>	18	P	N	N	0	0	0	0
HPN 049	2265	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
HPN 050	2272	M	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	17	P	N	N	0	0	0	0
HPN 065	2321	M	Hospitalización Clínica	Orina	<i>Proteus mirabilis</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
HPN 071	2421	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HPN 103	2709	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
HPN 104	2714	M	Consulta Externa	Orina	<i>Enterobacter aerogenes</i>	19	P	N	N	0	0	0	0
HPAS 019	77	F	Hospitalización Quirúrgica	Abceso de pie	<i>Citrobacter freundii</i>	21	N	N	N	0	0	0	0
HPAS 034	115	F	Consulta Externa	Orina	<i>Escherichia coli</i>	21	P	N	N	0	0	0	0

Anexo 3.- Descripción Fenotípica y Genotípica de los aislados tomados de los hospitales colaboradores, de Mayo del 2009 a Noviembre del 2010: Cepas sospechosas de producir carbapenemasas.

Código PUCE	NÚMERO DEL CULTIVO	SEXO	SERVICIO	ORIGEN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN PUCE	Halo Imipenem (IMP) mm	ANÁLISIS FENOTÍPICO			GENOTIPAJE			
							TEST EDTA - IMP:	TEST AB - IMP:	TEST HODGE	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> IMP
HPAS 036	128	F	Hospitalización Quirúrgica	Orina	<i>Proteus vulgaris</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HPAS 043	163	M	Emergencias	Espuito	<i>Escherichia coli</i>	15	P	N	N	0	0	0	0
HPAS 093	118	F	Consulta Externa	Orina	<i>Klebsiella oxytoca</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HPAS 100	147	F	UCI	Herida de cráneo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	21	P	N	N	0	0	0	0
HPAS 128	16	M	Emergencias	Orina	<i>Escherichia coli</i>	20	P	N	N	0	0	0	0
HEG 41	3216	M	Hospitalización Quirúrgica	Abceso	<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	P	N	N	0	0	0	0

M, Masculino; F, Femenino; P, Test Positivo; N, Test Negativo; 0, Ausencia del gen; 1, Presencia del gen; *bla*, betalactamasa; IMP, imipenem; AB-IMP, ácido borónico – imipenem.

Fuente: Datos obtenidos del screening fenotípico y genotípico realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Católica.

Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Anexo 4. Primers utilizados en el estudio para la identificación genotípica de genes responsables de la resistencia a carbapenemes.

Genes	Primers	Amplicón	Referencia	Función
<i>bla</i> _{IMP} Forward	GAAGGYGTTTATGTTTCATAC	600 pb	Pitout <i>et al.</i> (2005)	Identificación de genes de resistencia
<i>bla</i> _{IMP} Reverse	GTA MGTTC AAGAGTGATGC			
<i>bla</i> _{VIM} Forward	GTT TGG TCGCATATCGCAAC	500 pb	Pitout <i>et al.</i> (2005)	Identificación de genes de resistencia
<i>bla</i> _{VIM} Reverse	AATGCGCAGCACCAGGATAG			
<i>bla</i> _{KPC} Forward	CGGAACCATTCGCTAAACTC	738 pb	Diseñado según las variables alélicas existentes hasta el momento	Identificación de genes de resistencia
<i>bla</i> _{KPC} Reverse	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT			

Anexo 4. Primers utilizados en este estudio para la identificación genotípica de genes responsables de la resistencia a carbapenemes.

Genes	Primers	Amplicón	Referencia	Función
<i>bla</i> _{GES} Forward	ATGCGCTTCATTCACGCAC	864 pb	Diseñado según las variables alélicas existentes hasta el momento	Identificación de genes de resistencia
<i>bla</i> _{GES} Reverse	CTATTTGTCCGTGCTCAGG			

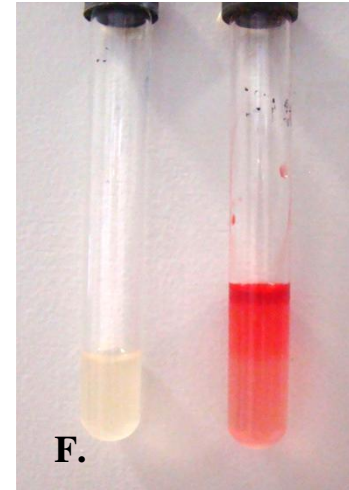
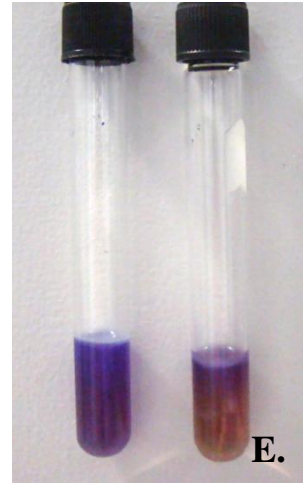
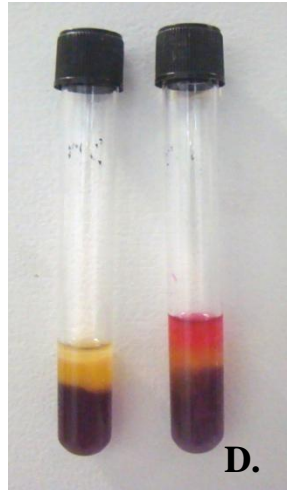
bla, betalactamasa; pb, pares de bases.

Fuente: Pitout *et al.* (2005); Primers diseñados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Católica.

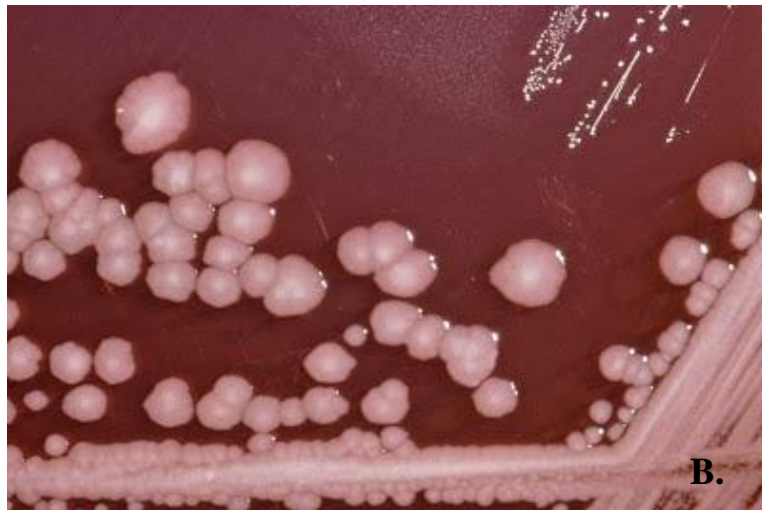
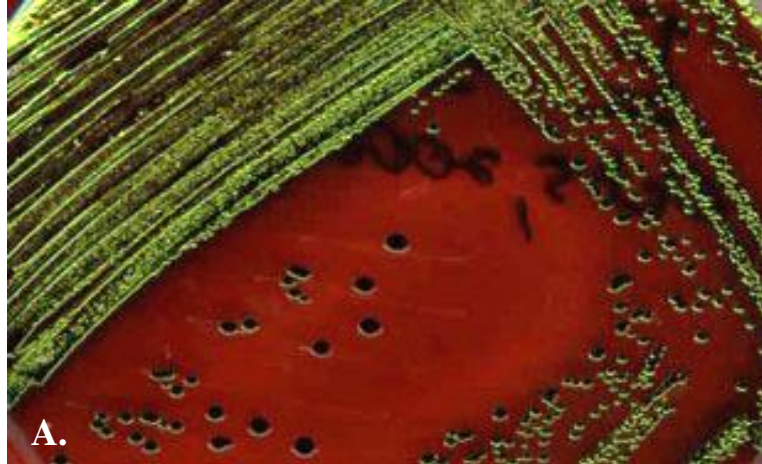
Elaboración: Ana María Gómez Jaramillo.

Anexo 5. Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de enterobacterias. A. Triple Sugar Iron Agar.

B. Citrato. C. Urea. D. MILI. E. MIO. F. Rojo de Metilo. G. Fenilalanina.

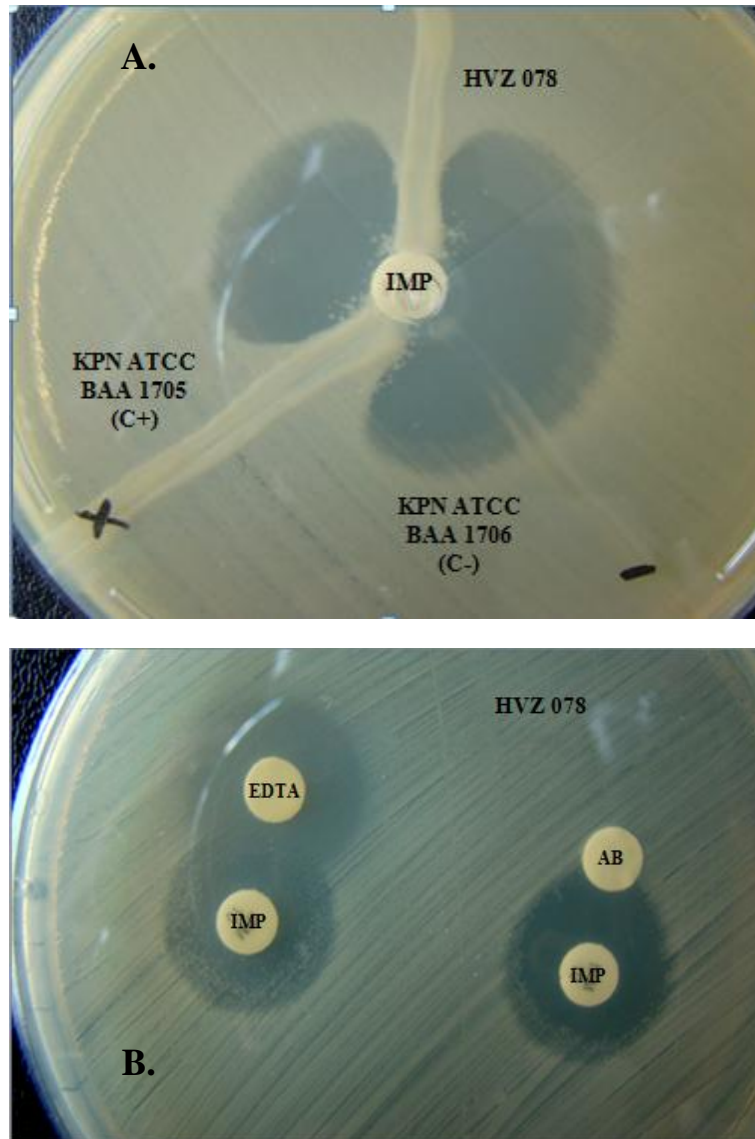


Anexo 6. Apariencia de las colonias de las enterobacterias en cultivo de EMB.

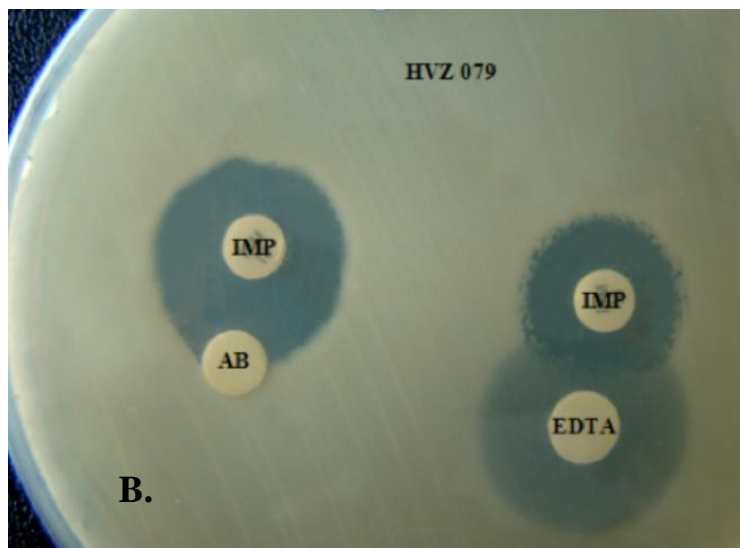
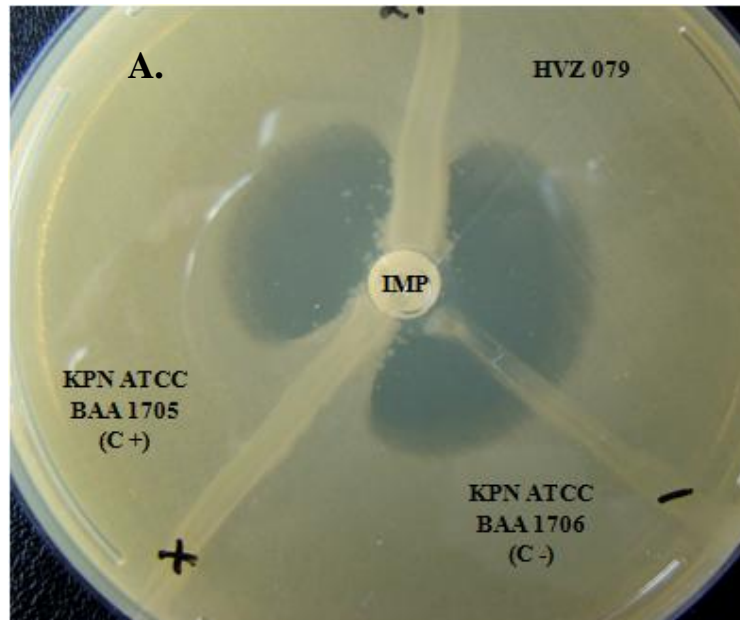


A. *Escherichia coli*. **B.** *Klebsiella pneumoniae*.

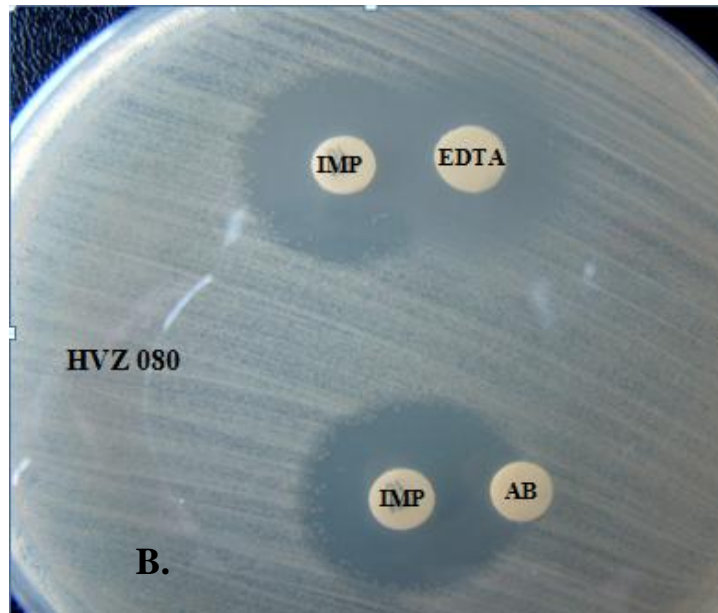
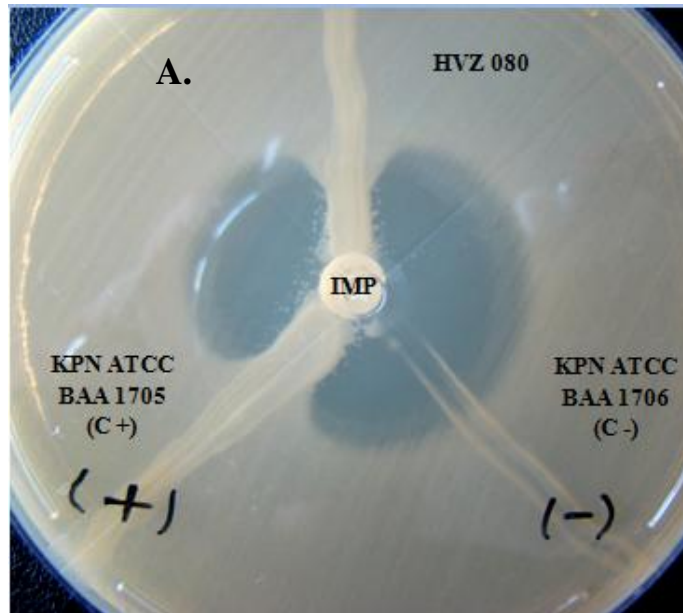
Anexo 7. Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas:



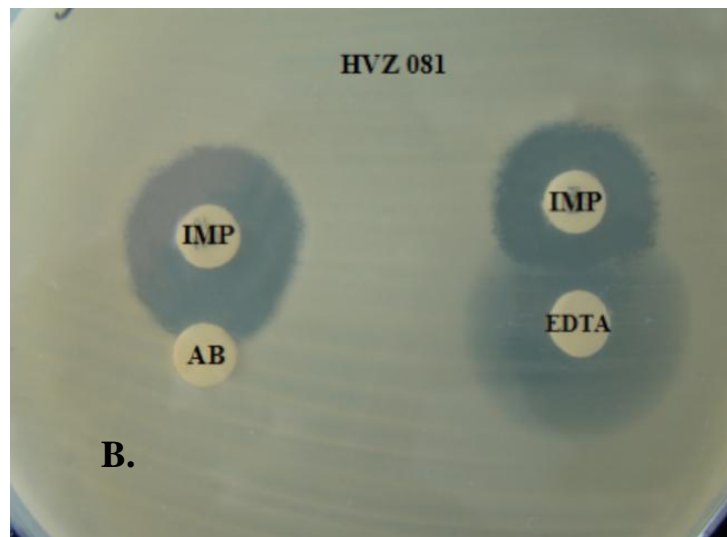
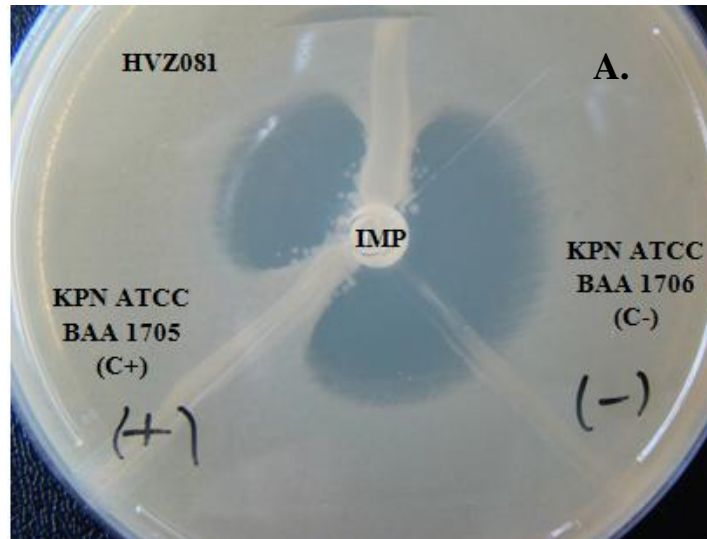
Aislado HVZ 078 A. Test Modificado de Hodge Positivo. Obsérvese la indentación en forma de hoja de trébol en la cepa positiva y en el control positivo. **B.** Test Doble Disco Sinergia EDTA – imipenem: NEGATIVO; Ácido Borónico – imipenem: POSITIVO. Obsérvese la sinergia entre los discos.



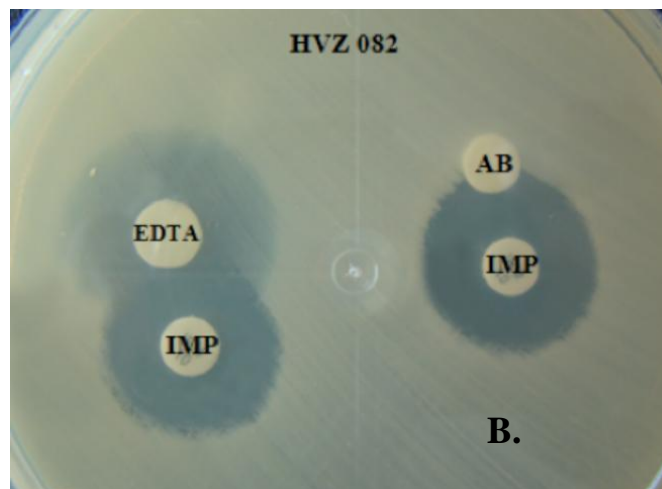
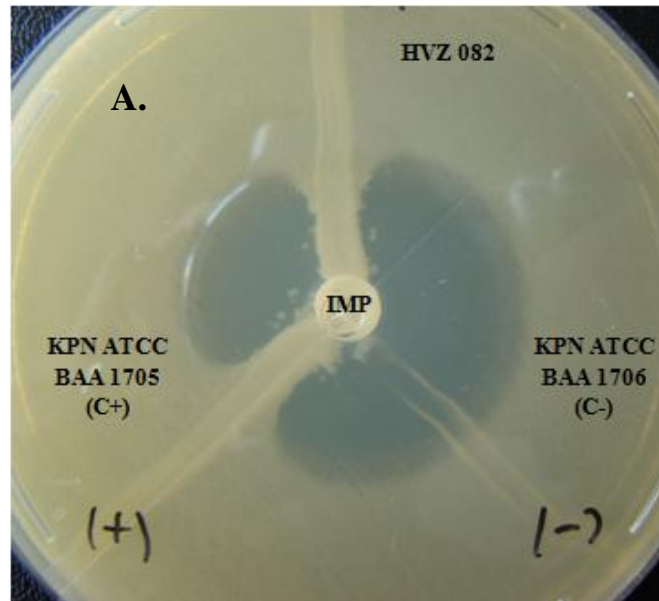
Aislado HVZ 079 A. Test Modificado de Hodge Positivo. Obsérvese la indentación en forma de hoja de trébol en la cepa positiva y en el control positivo. **B.** Test Doble Disco Sinergia EDTA – imipenem: NEGATIVO; Ácido Borónico – imipenem: POSITIVO. Obsérvese la sinergia entre los discos.



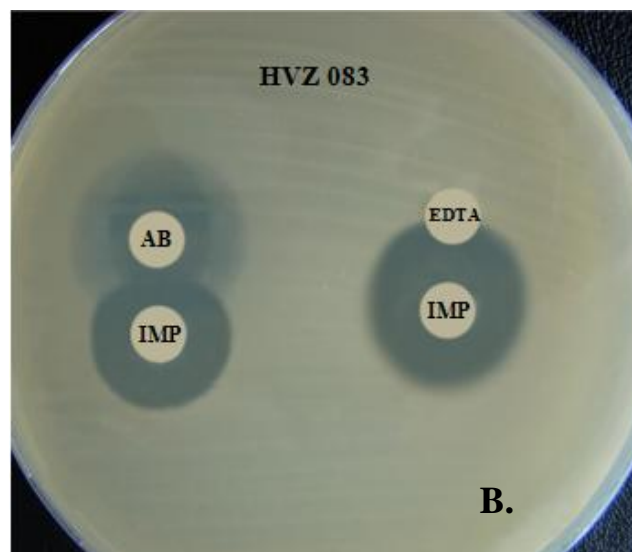
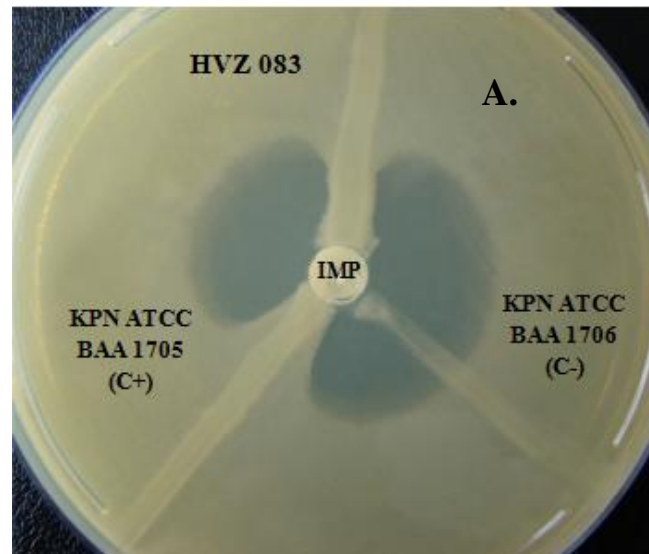
Aislado HVZ 080 A. Test Modificado de Hodge Positivo. Obsérvese la indentación en forma de hoja de trébol en la cepa positiva y en el control positivo. **B.** Test Doble Disco Sinergia EDTA – imipenem: NEGATIVO; Ácido Borónico – imipenem: POSITIVO. Obsérvese la sinergia entre los discos.



Aislado HVZ 081 A. Test Modificado de Hodge Positivo. Obsérvese la indentación en forma de hoja de trébol en la cepa positiva y en el control positivo. **B.** Test Doble Disco Sinergia EDTA – imipenem: NEGATIVO; Ácido Borónico – imipenem: POSITIVO. Obsérvese la sinergia entre los discos.

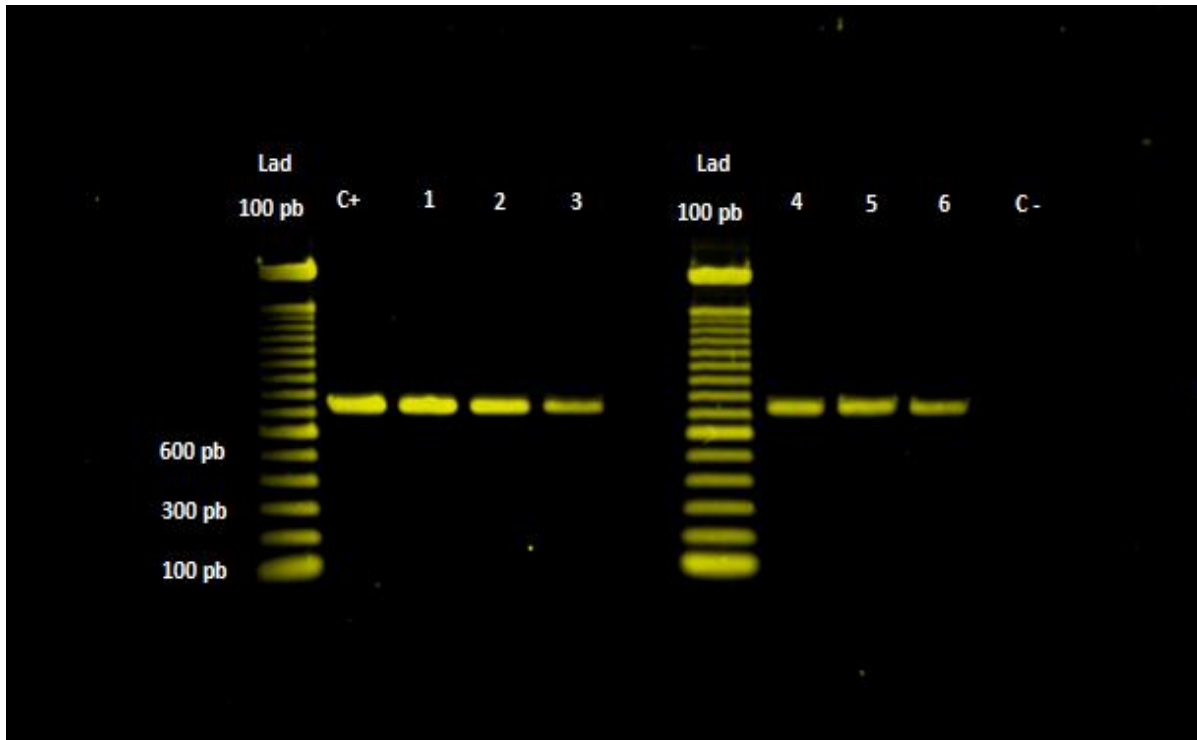


Aislado HVZ 082 A. Test Modificado de Hodge Positivo. Obsérvese la indentación en forma de hoja de trébol en la cepa positiva y en el control positivo. **B.** Test Doble Disco Sinergia EDTA – imipenem: NEGATIVO; Ácido Borónico – imipenem: POSITIVO. Obsérvese la sinergia entre los discos.



Aislado HVZ 083 A. Test Modificado de Hodge Positivo. Obsérvese la indentación en forma de hoja de trébol en la cepa positiva y en el control positivo. **B.** Test Doble Disco Sinergia EDTA – imipenem: NEGATIVO; Ácido Borónico – imipenem: POSITIVO. Obsérvese la sinergia entre los discos.

Anexo 8. Representación gráfica del gel de electroforesis de los genes *bla_{KPC}* encontrados en los aislados de enterobacterias resistentes a carbapenemes:



1. HVZ 78; **2.** HVZ 79; **3.** HVZ 80; **4.** HVZ 81; **5.** HVZ 82; **6.** HVZ 83; Observese la presencia de la banda correspondiente al gen *bla_{KPC}* (738pb). **C+** control positivo; **C-** control negativo; **lad** (ladder o marcador); **pb** (pares de bases).