



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE BACTERIAS CON RESISTENCIA A CARBAPENEMS
DE LA FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE* Y BACTERIAS NO
FERMENTADORAS (*PSEUDOMONAS SPP.* Y *ACINETOBACTER
SPP.*)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GERARDO MENDOZA REYES



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: RUTH EDITH MARTIN FUENTES**

VOCAL: **Profesor: LUCIANO HERNÁNDEZ GOMEZ**

SECRETARIO: **Profesor: RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO**

1er. SUPLENTE: **Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN**

2º SUPLENTE: **Profesor: JAVIER FERNÁNDEZ TORRES**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA DE AGENTES PATÓGENOS DEL HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ, SECRETARIA DE SALUD, EN COLABORACIÓN CON EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

ASESOR DEL TEMA:

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

SUSTENTANTE:

GERARDO MENDOZA REYES

ÍNDICE	PÁGINA
I. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, ESQUEMAS Y GRÁFICOS.....	1
II. ABREVIATURAS	3
1. RESUMEN.....	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Betalactámicos	7
2.2. Mecanismo de acción de betalactámicos	8
2.3. Carbapenémicos.....	13
2.4. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos.....	16
2.5. Técnicas de estudio de carbapenemasas	22
2.6. Panorama actual de las carbapenemasas	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. OBJETIVOS.....	32
5. HIPÓTESIS.....	33
6. MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1. Diseño experimental	33
6.2. Selección de muestras.....	34
6.3. Realización de Carba NP Test	35
6.4. Confirmación por medio de CHROMagar™KPC	35
6.5. Extracción de ADN	36
6.6. Reacción de PCR	36
6.7. Electroforesis en gel de agarosa	38
7. RESULTADOS	39
7.1. Carba NP Test.....	39
7.2. Crecimiento en medio CHROMagar KPC.....	42

7.3. Detección de los genes KPC, IMP, VIM y NDM por medio de PCR.....	45
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIONES.....	58
10. PERSPECTIVAS.....	59
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

I. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, ESQUEMAS Y GRÁFICOS

	Figuras	PÁGINA
Figura 1	Clasificación de los antibióticos betalactámicos.....	8
Figura 2	Transpeptidación.....	9
Figura 3	Etapas de formación de la pared celular.....	10
Figura 4	Comparación de estructuras.....	11
Figura 5	Mecanismo de acción de los betalactámicos.....	12
Figura 6	Estructura química de los carbapenémicos disponibles.....	14
Figura 7	Aspecto típico de las colonias en medio CHROMagar KPC.....	24
Figura 8	Mecanismo de detección de β -glucoronidasa.....	25
Figura 9	Mecanismo de detección de β -glucosidasa.....	26
Figura 10	Fundamento del Carba NP Test.....	27
Figura 11	Distribución geográfica de casos reportados de carbapenemasas en México.....	31
Figura 12	Criterios de identificación para colonias con crecimiento en CHROMagar KPC.....	36
Figura 13	Carba NP Test.....	39
Figura 14	Crecimiento bacteriano en CHROMagar KPC.....	42
Figura 15	Producto de amplificación KPC (638pb).....	45
Figura 16	Producto de amplificación NDM (621pb).....	46
Figura 17	Producto de amplificación IMP (232pb).....	46
Figura 18	Producto de amplificación VIM (390pb).....	47

Tablas

Tabla 1	Primers empleados para la reacción, secuencias y productos de amplificación.....	37
Tabla 2	Programas ejecutados para las reacciones de PCR.....	37
Tabla 3	Características de las muestras que resultaron positivas a la prueba.....	41
Tabla 4	Características coloniales de las muestras de trabajo y controles positivos usados durante el ensayo del CHROMagar KPC.....	44
Tabla 5	Género y especie bacteriana asociada al gen de resistencia a carbapenems.....	47
Tabla 6	Resumen de los resultados obtenidos durante el proyecto experimental.....	48

Esquemas

Esquema 1	Clasificación de carbapenemasas basada en la propuesta de Ambler.....	21
Esquema 2	Esquema para la detección de carbapenemasas.....	23

Gráficos

Gráfico 1	Sitios de aislamiento de muestras de trabajo.....	34
-----------	---	----

II. ABREVIATURAS

AmpC	Ampicilinasas
BGNF	Bacterias Gram negativas no fermentadoras
D-glu	D-Ácido glutámico
DAP	Ácido diaminopimélico
DHP-1	Dehidropeptidasa-1
EMEA	Agencia Europea de Medicamentos
GES	Siglas procedentes de “Guiana Extended Spectrum”, por su origen.
GIM	Siglas de “German IMipenemase”, por el lugar de origen.
IMI	Siglas de “IMIpenem hydrolysing-lactamases”
IMP	Siglas de “Imipenemase”
KPC	Siglas de “ <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase”
L-ala	L-alanina
L-lys	L-lisina
LA-EQAS	Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los antimicrobianos
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MBL	Metalo- β -lactamasa
MIC	Concentración mínima inhibitoria
NAG	Ácido N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilmurámico
NDM	Siglas de “New Delhi metallo- β -lactamase”
NMC A	Siglas de “Not Metalloenzyme carbapenemase”
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud
OXA	Siglas de “OXAcellin-hydrolysing”
PBP	Siglas de “Penicillin binding protein”
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ReLAVRA	Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos

SME	Siglas de “ <i>Serratia marcescens</i> enzyme”
SPM	Sigla de “Sao Paulo Metallo- β -lactamase”
UDP	Uridín difosfato
VIM	Siglas de “Verona Integron-encoded metallo- β -lactamase”

1. RESUMEN

Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos de mayor actividad que evaden la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana y que, generalmente, se reservan para el tratamiento de infecciones graves o para aquellas causadas por organismos resistentes a otros antibióticos. El sitio blanco de acción son las proteínas de unión a penicilina (PBP), implicadas en el último paso de la formación de la pared bacteriana.

La resistencia a los carbapenémicos es producto de la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único. El principal mecanismo de resistencia hacia estos betalactámicos es la modificación y desactivación del antibiótico mediada por enzimas, lo último llevado a cabo por carbapenemasas: enzimas que presentan acción hidrolítica frente a carbapenémicos, y que en los últimos años, se ha reportado con mayor frecuencia, afectando diferentes géneros y especies bacterianas.

Según la clasificación propuesta por Ambler, las carbapenemasas se dividen en dos tipos: las de tipo serina, llamados así, debido a que poseen un residuo de serina en el sitio activo, estas a su vez pueden ser de clase A (como las tipo KPC, GES, etc.), de clase C (como las AmpC) o las de clase D (como las OXA); el segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente el zinc, como cofactor para su actividad enzimática denominadas metalo- β -lactamasas y son de clase B (como las de tipo IMP, VIM, NDM, etc.). Todas estas pueden estar codificadas en cromosomas, o bien, en elementos genéticos móviles. La identificación del tipo de mecanismo presente en cepas reportadas como resistentes, permite a los sistemas de salud actuar con mayor eficiencia y control cuando se presente algún brote.

En base a estos antecedentes, se analizaron 182 muestras provenientes de diversos servicios del Hospital General Manuel Gea González comprendidos del periodo de julio de 2009 a diciembre de 2013, con el objetivo de detectar e identificar la presencia de enzimas responsables de causar resistencia a carbapenémicos, previamente reportada por el sistema automatizado MicroScan.

El estudio se llevó a cabo empleando técnicas de detección fenotípica y molecular, demostrando que son herramientas útiles para el diagnóstico de microorganismos multirresistentes. Los resultados indicaron la presencia de carbapenemasas de diversos tipos, como KPC, VIM, NDM e IMP en el 11% del total de muestras, demostrando así, la rápida diseminación que han tenido las enzimas en el ambiente hospitalario.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos naturales o semisintéticos que constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos usados en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y un amplio margen terapéutico. El espectro de los betalactámicos incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas, sin embargo, no son activos sobre las micoplasmas debido a que estas carecen de pared celular, tampoco son activas sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia* (1).

La presencia de una estructura constituida por 4 átomos de carbono, denominada anillo betalactámico, define químicamente a esta familia de antibióticos. Dicho anillo, es responsable del mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa, pues actúa sobre la pared celular bacteriana que no está presente en la célula eucariota animal y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) (2). Los betalactámicos son clasificados de acuerdo a su estructura química en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de betalactamasas (Figura 1). Para que el antibiótico sea efectivo, es necesario que se encuentre unido a otros radicales, generalmente otros anillos y cadenas lineales. Pequeñas diferencias entre cada grupo de antibióticos son capaces de modificar sus características, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas.

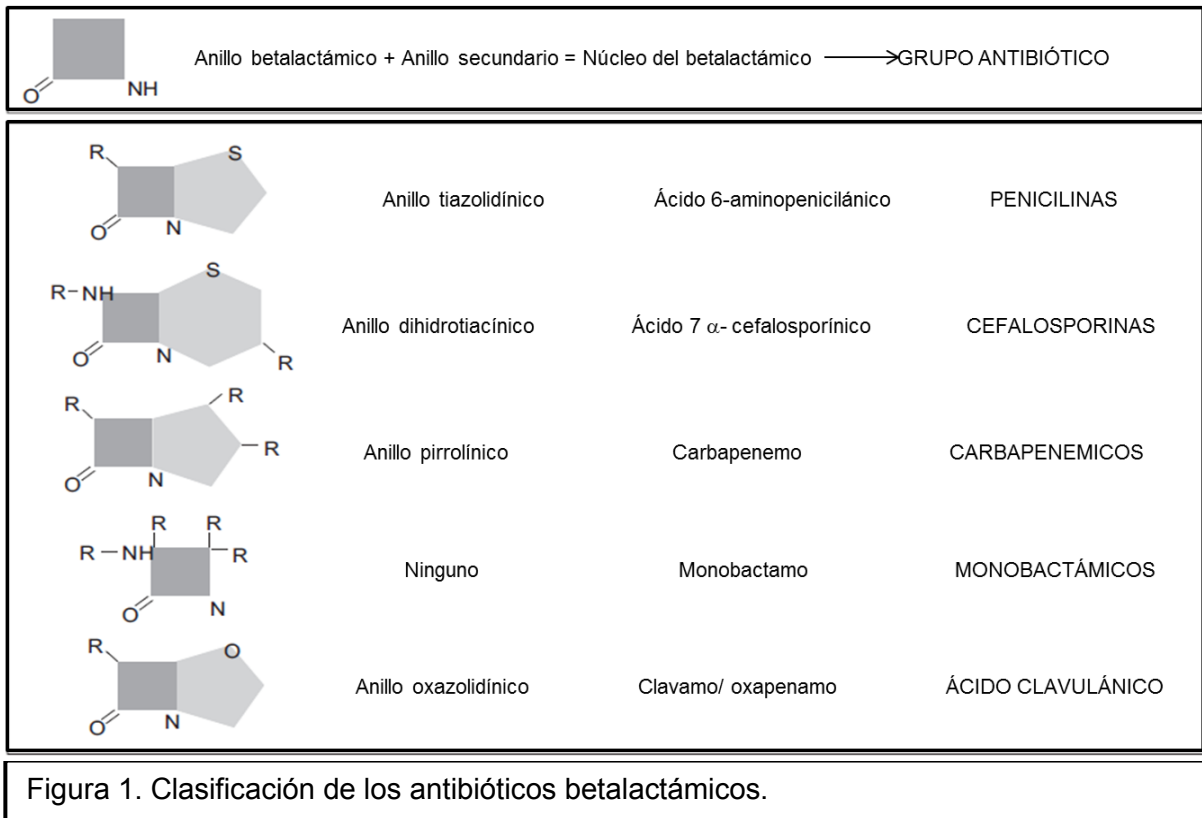


Figura 1. Clasificación de los antibióticos betalactámicos.

2.2. Mecanismo de acción de betalactámicos

Los betalactámicos producen su efecto mediante dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de autólisis bacteriana. La pared bacteriana es una estructura que envuelve a las bacterias de todos los géneros (excepto al género *Mycoplasma*), se sitúa fuera de la membrana citoplasmática y se compone principalmente de peptidoglucano.

El esqueleto del peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG), a su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla. Los diferentes componentes del peptidoglucano (NAM y NAG) se activan al unirse a uridín difosfato (UDP), de modo que se sintetiza UDP-NAG y UDP-NAM en citoplasma. Para el caso de UDP-NAM, se produce una adición secuencial y ordenada de distintos aminoácidos (actividad que requiere de energía y iones Mn^{2+}): primero se adiciona L-ala (L-alanina), después D-glu (D-Ácido glutámico), posteriormente m-DAP (ácido diaminopimélico, puede ser otro aminoácido, como L-Lys en *P. aeruginosa*) y por último la unión del dipéptido D-ala-D-ala. El paso siguiente es la

transferencia a un lípido isoprenoide C₅₅ (bactoprenol) presente en la membrana citoplasmática y que actúa como transportador. De esta manera, se añade NAG, completándose la subunidad monomérica del peptidoglucano. Unida al lípido de cadena larga, la subunidad puede atravesar la membrana hasta llegar a la cara externa, en donde es polimerizada mediante enlaces glicosídicos β (1-4) entre NAM y NAG (3). Finalmente, si la nueva unidad monomérica ha de estar implicada en un enlace transversal entre cadenas peptídicas, una enzima de la porción externa de la membrana cataliza una reacción de transpeptidación rompiendo el enlace peptídico entre los dos restos subterminales de D-alanina, a la vez que forma un enlace peptídico entre el resto subterminal de D-alanina y el grupo amínico libre del ácido diaminopimérico de una cadena peptídica adyacente, si el péptido no está implicado en un enlace transversal, la misma enzima elimina el grupo terminal de D-alanina sin formar un nuevo enlace peptídico, formando de esta manera un tetrapéptido a partir del pentapéptido mencionado (Figura 2).

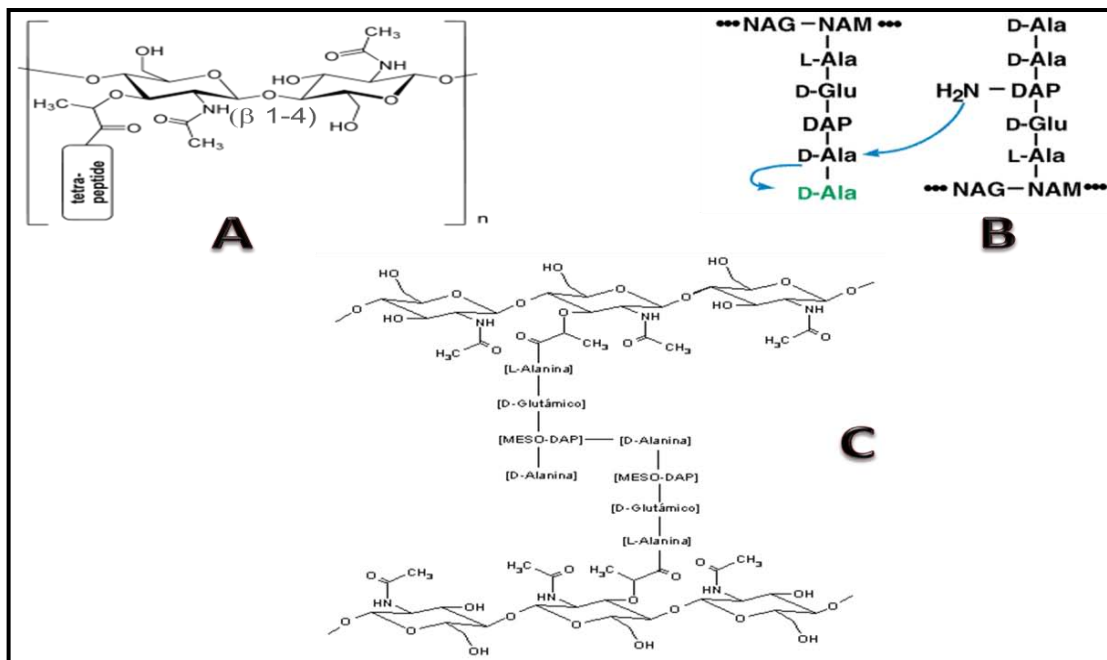


Figura 2. Transpeptidación. En la imagen A se muestra el enlace β1-4 formado entre NAM y NAG. La imagen B muestra una reacción de transpeptidación que da como resultado la ruptura de un enlace de D-alanina y la unión de dos cadenas adyacentes que constituyen el disacárido que formará al peptidoglucano (imagen C).

Estas estructuras disacarídicas que constituyen el esqueleto del peptidoglucano, se van acumulando hasta formar la malla que da origen a la formación de la pared celular (Figura 3).

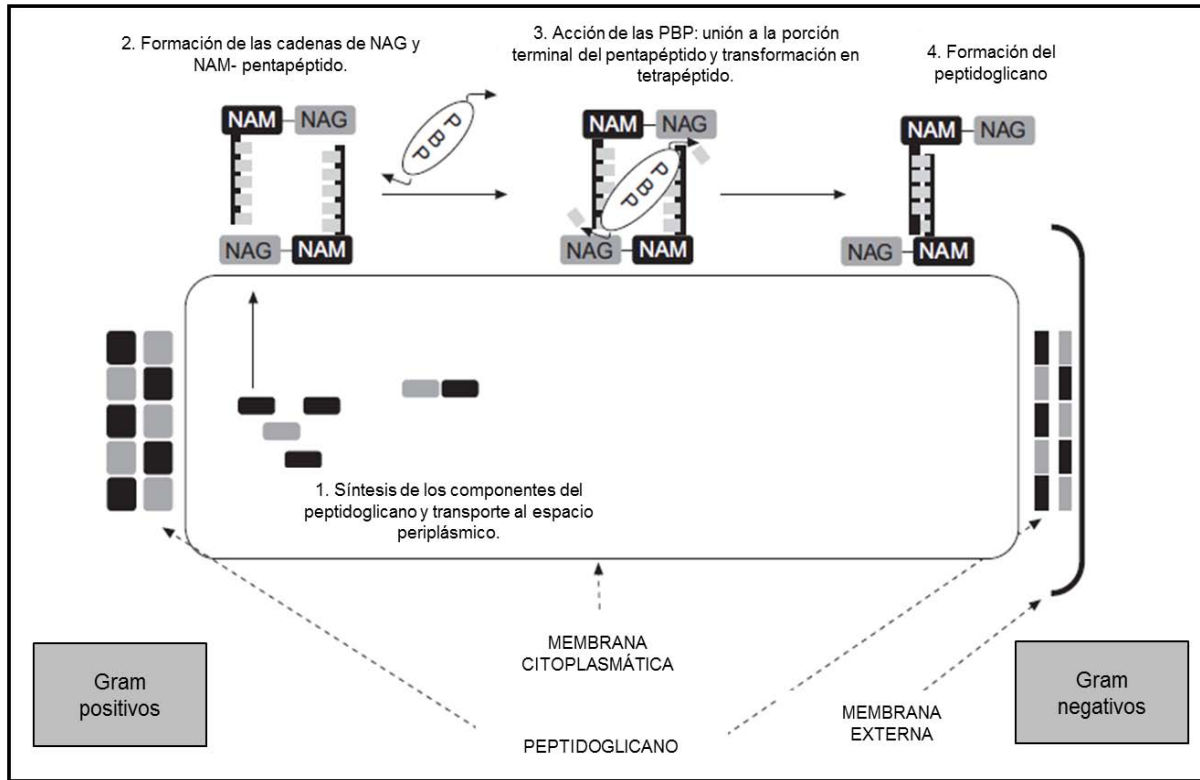
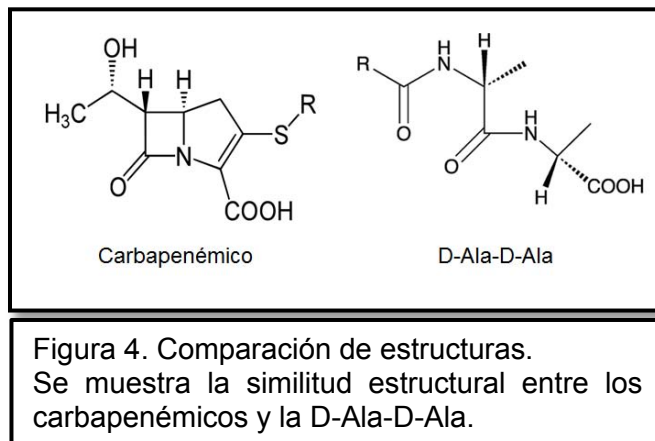


Figura 3. Etapas de formación de la pared celular.
NAM Ácido N-acetilmurámico; **NAG** Ácido N-acetilglucosamina; **PBP** Penicilin Binding Protein.

En el proceso de síntesis del peptidoglucano, están implicadas diversas enzimas situadas en la superficie, las cuales son conocidas con el nombre de proteínas fijadoras de penicilina (PBP, por sus siglas en inglés), éstas presentan actividad transpeptidasa, transglucosidasa y carboxipeptidasa y son enumeradas en orden decreciente de peso molecular. Por esta razón, las consecuencias de su bloqueo también son distintas. Las PBP-1a y PBP-1b actúan como transpeptidasas causantes de la elongación, y su bloqueo provoca la formación de esferoplastos que rápidamente se lisan. La PBP-2 determina la forma bacteriana, y su inhibición da lugar a formas ovoideas que se lisan fácilmente. La PBP-3 interviene en la división bacteriana, y su bloqueo provoca la aparición de formas filamentosas sin septos. Las PBP-4, PBP-5 y PBP-6 tienen actividad carboxipeptidasa, e

intervienen en la liberación del quinto aminoácido del pentapéptido, necesaria para la polimerización del peptidoglucano (4). La actividad de los betalactámicos (como los carbapenémicos) se debe a que existe un gran parecido estructural entre el grupo D-ala-D-ala y el anillo β -lactámico (Figura 4), el cual se une mediante un enlace covalente estable a la PBP, con la que quedan inactivadas tanto la enzima como el β -lactámico, impidiendo así, la formación de la pared celular.



Sin la pared celular, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión oncótica. Por tanto, para que actúen los betalactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular. Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano (Figura 5) (2).

Este último proceso (activación de autolisina endógena), se lleva a cabo debido a que al inhibir determinados pasos del ciclo de síntesis y ensamblaje del peptidoglucano, provocan la acumulación de sus precursores, lo que a su vez, desencadena la activación de las autolisinas de la bacteria, por la pérdida de un inhibidor de esta enzima, las cuales se encargan de la digestión de las subunidades viejas de peptidoglucano, debido a los procesos de síntesis y degradación constantes, que degradan el peptidoglucano y que finalmente provoca la lisis celular en medios hipotónicos, por entrada masiva de agua a la célula.

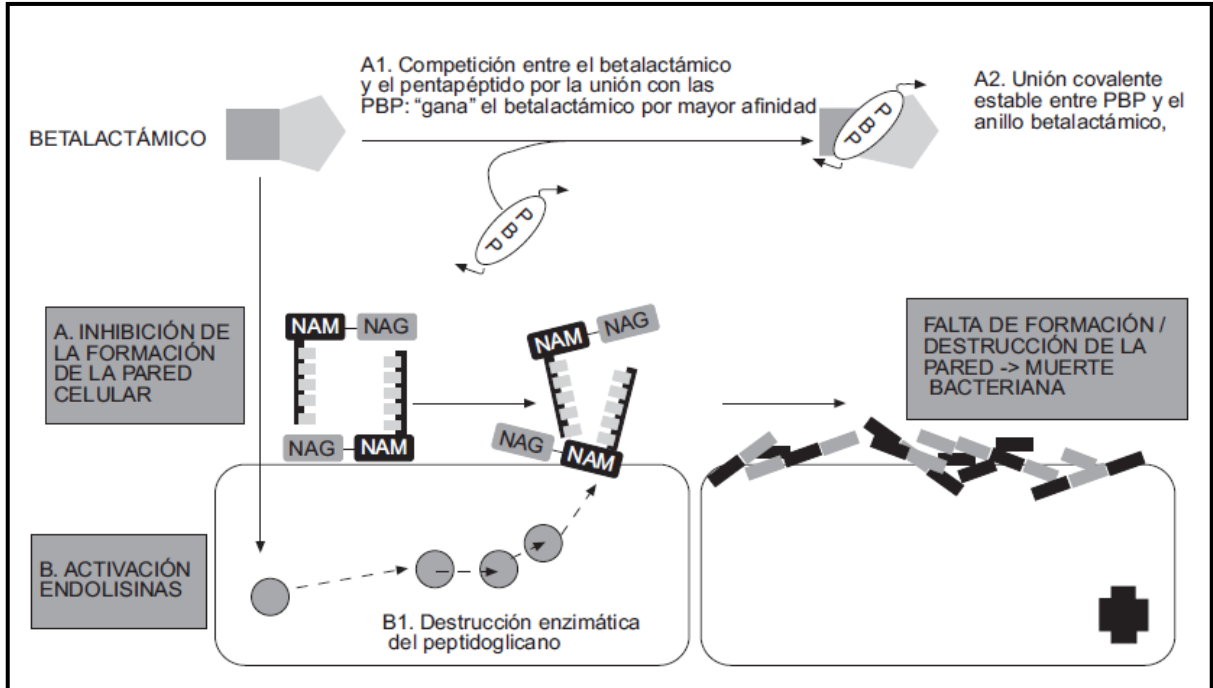


Figura 5. Mecanismo de acción de los betalactámicos

NAM Ácido N-acetilmurámico; **NAG** Ácido N-acetilglucosamina; **PBP** Penicilin Binding Protein

2.3. Carbapenémicos

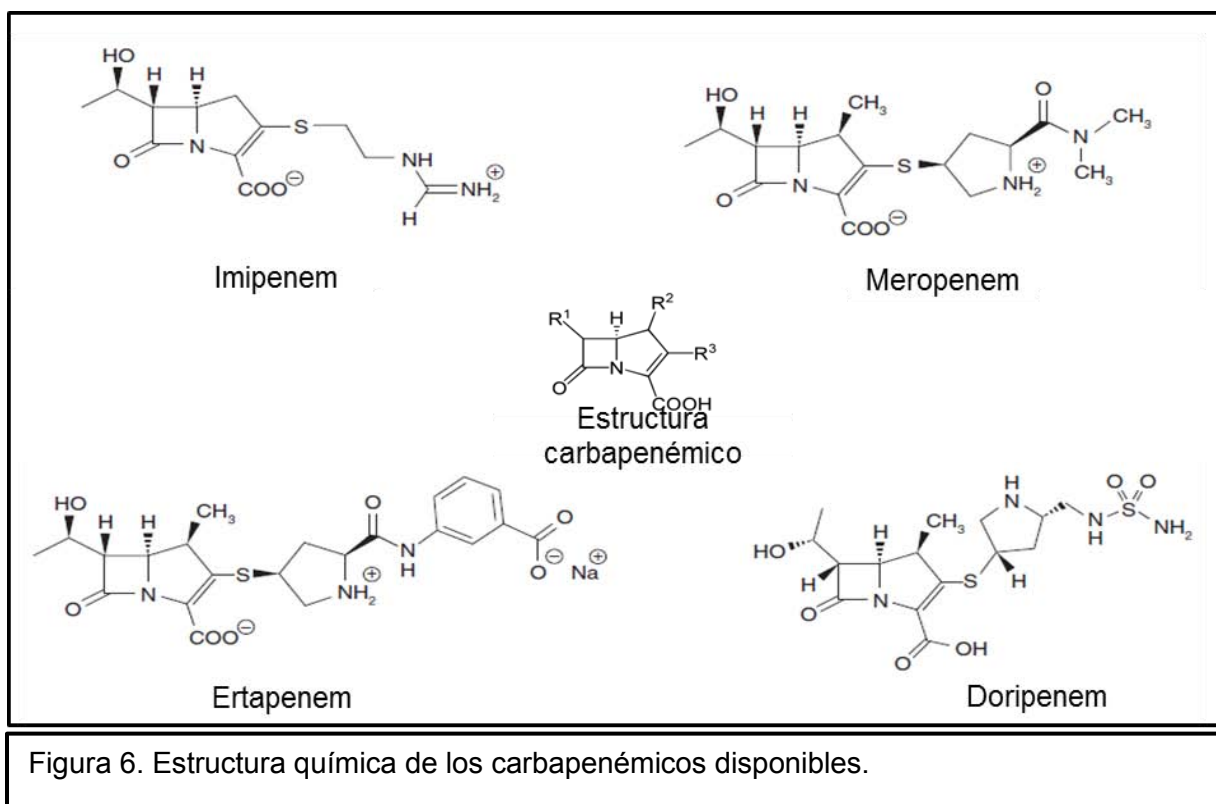
Todos los carbapenémicos disponibles son similares en cuanto a su amplio espectro, el cual está determinado por la capacidad de penetrar a través de la pared de las bacterias Gram negativas, la alta afinidad por las PBP esenciales de muchas especies y la elevada resistencia a muchas betalactamasas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, características que los hace imprescindibles en el tratamiento donde se sospecha de un patógeno multirresistente, en la monoterapia de numerosas infecciones nosocomiales graves y en la terapia dirigida contra las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o productoras de betalactamasas de amplio espectro y espectro extendido. Se ha propuesto una clasificación en 3 grupos, basada en su actividad antimicrobiana: el primero incluye a ertapenem, sin actividad frente a bacterias Gram negativas no fermentadoras (BGNNF), el segundo a imipenem, meropenem y doripenem, con actividad frente a éstos, y el tercero a los carbapenémicos aún no comercializados, con actividad frente a *Staphylococcus* resistentes a meticilina (5).

Para ejercer su acción, la molécula debe atravesar la pared celular bacteriana, de esta manera accede a las PBP, lo que es fácil en microorganismos Gram positivos, pero es más complicado en Gram negativos. Sus características estructurales les permiten acceder a las PBP de las bacterias Gram negativas a través de las porinas de la membrana externa (6), en *Pseudomonas aeruginosa*, por ejemplo, imipenem emplea exclusivamente la vía OprD (5), dicha proteína transmembranal tiene por objetivo permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa, se sabe, además, que es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros β -lactámicos (7). En *Acinetobacter baumannii* se han localizado tres porinas implicadas en el paso de estos antibióticos: CarO, Omp 33-36 y un homólogo de la OprD (8), los cuales permiten a la bacteria en cuestión, presentar resistencia a carbapenémicos cuando su expresión es reducida. Con respecto a la familia *Enterobacteriaceae*, alteraciones en la familia de las porinas OmpC y OmpF de *Enterobacter* spp, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*, así como de OmpK35 y Ompk36 en

Klebsiella pneumoniae se han asociado a resistencia bacteriana, debido a que todas estas proteínas de membrana externa están implicadas en el paso de los antibióticos a la bacteria (9).

La mayor afinidad por las PBP-1a y 1b de *E. coli* y *P. aeruginosa*, en comparación con otros β -lactámicos, determina un mayor y más rápido efecto bactericida. En general, el espectro de afinidad por las PBP es similar aunque la preferencia por algunas de ellas (especialmente las PBP-2 y 3) determina los diferentes matices de actividad intrínseca y potencia antimicrobiana de cada carbapenem. La inhibición de las PBP-2 y 3 es responsable de la aparición de cambios morfológicos que conducen a la formación de células esféricas (PBP-2) o de formas filamentosas (PBP-3). Todos muestran al contrario que ceftazidima y aztreonam, una elevada afinidad por las PBP-4 y una afinidad preferente sobre la PBP-2 de *E.coli* y *P. aeruginosa* (6).

Estructuralmente, los carbapenémicos se componen de un azobiciclo formado por la condensación de un anillo betalactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Los distintos carbapenems son fruto de sustituciones en las posiciones 2 y 3 (Figura 6).



La presencia de diversos grupos en estas posiciones le confiere a la molécula diferencias significativas: en la actividad antimicrobiana, grado de lipofilia e hidrofilia, así como daño potencial que pueden ocasionar en el humano.

El desarrollo de los carbapenémicos inició en 1976 cuando Alberts-Shonberg y colaboradores descubren la estructura de la tienamicina, producto del metabolismo de *Streptomyces catleya*, este carbapenémico con grandes características antimicrobianas, presentaba el inconveniente de ser inestable en soluciones acuosas, ser sensible a hidrólisis en medios de pH superiores a 8 y ser altamente reactivo a sustancias nucleofílicas tales como la hidroxilamina y la cisteína, entre otras (6). Estas circunstancias impulsaron el desarrollo de un derivado con propiedades más estables denominado: N-formimidoil tienamicina o imipenem. El compuesto tenía la desventaja de ser susceptible a la actividad hidrolítica de la enzima renal dehidropeptidasa 1 (DHP-1), por lo que se desarrolló una combinación con la cilastatina, cuya función, además de inhibir a DHP-1, es actuar como un agente protector del riñón contra posibles efectos tóxicos ejercidos por dosis altas del betalactámico. Actualmente, y con el apoyo de diversas investigaciones clínicas, el imipenem se ha convertido en el antibiótico de elección en diversas indicaciones, tales como la neumonía nosocomial, infección intra-abdominal, sepsis y neutropenia febril, debido a su probada eficacia y seguridad (10). Al igual que los demás carbapenémicos, sus características estructurales le permiten acceder a las PBP de las bacterias Gram negativas a través de las porinas de la membrana externa, presentando gran afinidad por las PBP 1a, 1b, 2, 4, 5 y 6 de *E. coli* y 1a, 1b, 2, 4 y 5 de *P. aeruginosa* (11).

En el meropenem, otro importante carbapenémico, su afinidad se ha demostrado hacia PBP 2, 3, 4 y 6 presentes en *E. coli* y *P. aeruginosa*; y PBP 1, 2 y 4 de *Staphylococcus aureus*, se caracteriza por presentar alta estabilidad ante la acción de la DHP-1 (12). Debido a su amplio espectro, al igual que el imipenem, es empleado en tratamientos de infecciones nosocomiales graves así como en pacientes que han recibido previamente antimicrobianos de amplio espectro o

bien, en el control de infecciones de etiología polimicrobiana o mixta (10). El doripenem representa el carbapenémico más reciente, de hecho, su uso se autorizó apenas en 2009. Fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas, infecciones complicadas del tracto urinario, pielonefritis y neumonías nosocomiales. Presenta afinidad por las PBP 2, 3 y 4 encontradas en *E. coli* y *P. aeruginosa* (13).

El ertapenem, a diferencia de los 3 carbapenémicos antes mencionados, muestra actividad escasa frente a patógenos nosocomiales relevantes como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*, y otros bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), lo que relega su uso al tratamiento de infecciones leves o moderadas adquiridas en la comunidad que precisan ingreso hospitalario. Esto ha orillado a considerar al ertapenem como un antibiótico de diagnóstico hospitalario y recomendado en el tratamiento de infecciones de pie diabético, infecciones ginecológicas agudas, entre otras (5). Su espectro se ha probado en bacterias Gram negativas productoras de betalactamasas de espectro extendido y de altos niveles de la enzima AmpC (6) sin embargo, es hidrolizado por metalo- β -lactamasas (14). En *E. coli*, se fija también a las PBP 3, 4 y 5. Además de la unión preferente a la PBP 2 (5).

2.4. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos

La resistencia a los carbapenémicos es poco frecuente, mucho menor que la reportada por otros betalactámicos, sin embargo en los últimos años se ha incrementado sustancialmente. En general, la resistencia suele presentarse de carácter local y en forma de brotes hospitalarios a pesar de que la incidencia es creciente y en algunos países (Japón, Grecia) y hospitales, puede considerarse endémica (5).

La resistencia por parte de las bacterias Gram negativas hacia los antibióticos, suele ser una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de ellos inherentes a la especie (resistencia intrínseca o natural) y otros adquiridos (por

medio de elementos móviles como transposones y plásmidos), que finalmente se manifiestan como resistencia a una amplia gama de antibióticos. En términos generales, los principales mecanismos de resistencia a antibióticos en Gram negativos son: 1) modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas; 2) disminución de la permeabilidad del 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, y 4) modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico (15).

Usualmente la resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram negativas ocurre por la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único, sin embargo, el mecanismo presentado en su mayoría es la desactivación mediada por enzimas, llamadas carbapenemasas, las cuales tienen la capacidad enzimática de romper el anillo β -lactámico e hidrolizarlo. Para ello, requiere la presencia de un nucleófilo (un grupo químico que puede donar electrones) en el sitio activo de la enzima. El mecanismo implicado consiste en que un hidroxilo libre, presente en la enzima, realiza un ataque nucleofílico sobre el carbonilo que se encuentra en el anillo, dando lugar a un intermediario acilado. Durante la formación de este intermediario, el nitrógeno de la estructura es protonado, provocando así la ruptura del enlace C-N. Posteriormente y utilizando estratégicamente una molécula de agua, el β -lactámico acilado se hidroliza dando lugar a un producto inactivado y la regeneración de la enzima (10).

La gran diversidad de enzimas que participan en la resistencia a los carbapenémicos ha obligado a la comunidad científica a clasificarlos en base a diversos criterios, lo que a su vez resulta una herramienta útil para realizar una correcta identificación. En 1980, R.P. Ambler propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato (Esquema 1) y la secuencia de aminoácidos de las betalactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas, designados como A, B, C y D (16). Según este sistema, las

betalactamasas A, C y D, tienen en su centro activo residuos de serina, mientras que las de clase B, son consideradas metaloenzimas.

Las enzimas de clase A se encuentran presentes tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, pueden ser de origen cromosómico o plasmídico y presentan un peso molecular cercano a 25,000 daltons. Asimismo, se han caracterizado por poseer una mayor capacidad hidrolítica contra imipenem que meropenem; confieren resistencia a aztreonam, pero no a las cefalosporinas de tercera generación y son inhibidas por el ácido clavulánico. Generalmente estas enzimas pueden encontrarse en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* codificadas en el cromosoma y en *Klebsiella pneumoniae* codificados en plásmidos (17). Tres son los tipos de enzimas que con mayor frecuencia son hallados en los aislamientos, entre ellos se encuentran las NMC/IMI, SME y la tipo KPC, para su mecanismo de hidrólisis requiere, como ya se mencionó, de una serina en su sitio activo (18).

La enzima SME-1 (*Serratia marcescens* enzyme), fue detectada por primera vez en Inglaterra a partir de dos aislamientos en *S. marcescens* que fueron colectados en 1982. La carbapenemasa SME-1 es casi idéntica a SME-2 y SME-3, y se ha encontrado esporádicamente a lo largo de Estados Unidos. Tanto IMI (Imipenem-hydrolysing β -lactamase) como NMC-A (not metalloenzyme carbapenemase), son enzimas cuya presencia es rara y ha sido detectada en aislamientos de *E. cloacae* en Estados Unidos, Francia y Argentina. Los genes para estas tres carbapenemasas se encuentran localizados en cromosomas.

En cambio las enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) se encuentran codificadas en plásmidos y su espectro de acción, también abarca a cefalosporinas, como la cefotaxima. Aunque las KPC se encuentran predominantemente en *K. pneumoniae*, se han reportado informes de estas enzimas en *Enterobacter* spp. y *Salmonella* spp. El primer miembro de la familia de las KPC (KPC-1) fue descubierto en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte en 1996, su actividad de carbapenemasa fue detectada con un bioensayo.

El descubrimiento de KPC-1 fue seguido rápidamente por informes de una variante denominada KPC-2 a lo largo de la costa este de los Estados Unidos y su caracterización se llevó a cabo en 2003, en Baltimore. Seguido de estos hallazgos, un brote en 2001 informó de una variante más: KPC-3, cuya presencia fue en *K. pneumoniae*, aunque también ha sido localizada en *Enterobacter* spp. Un análisis cinético de la enzima KPC-3, revela un perfil similar a los de KPC-1 y KPC-2 con un ligero aumento en la hidrólisis de la ceftazidima (18). La estructura de KPC-2 comparada con las de SME-1 y NMC-A, revela características conservadas entre las carbapenemasas. KPC-2 junto con otras carbapenemasas, tuvo una disminución en el tamaño del reservorio de agua (empleados para la reacción de hidrólisis) y una serina catalítica en una posición más superficial de la hendidura del sitio activo. La combinación de estos ajustes sutiles en el sitio activo de la carbapenemasa, permite a los carbapenémicos tener un mayor acceso al sitio catalítico, resultando en una especificidad alterada de estas enzimas. En general, la familia de las KPC, tienen un gran potencial de expansión debido a su ubicación en plásmidos así como su presencia mayoritariamente en *K. pneumoniae*, un organismo conocido por su capacidad para acumular y transferir determinantes de resistencia.

La carbapenemasa GES (Guiana extended spectrum) fue descrita por primera vez en el año 2000 en un aislamiento en *K. pneumoniae* en Guyana Francesa. Los genes que codifican para los genes GES, han sido localizados en integrones en plásmidos y debido a que estas enzimas tenían un amplio espectro de hidrólisis que incluía las penicilinas y cefalosporinas, fueron inicialmente clasificados como betalactamasas de espectro extendido. Al menos veinte variantes de GES se han descrito; GES-9 recientemente se ha identificado en un aislamiento de *P. aeruginosa* en Francia (18).

Las enzimas de clase B corresponden a carbapenemasas que presentan en su sitio activo el ion Zn^{2+} , el cual es empleado para unir el residuo de histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, razón por la cual son conocidos también como

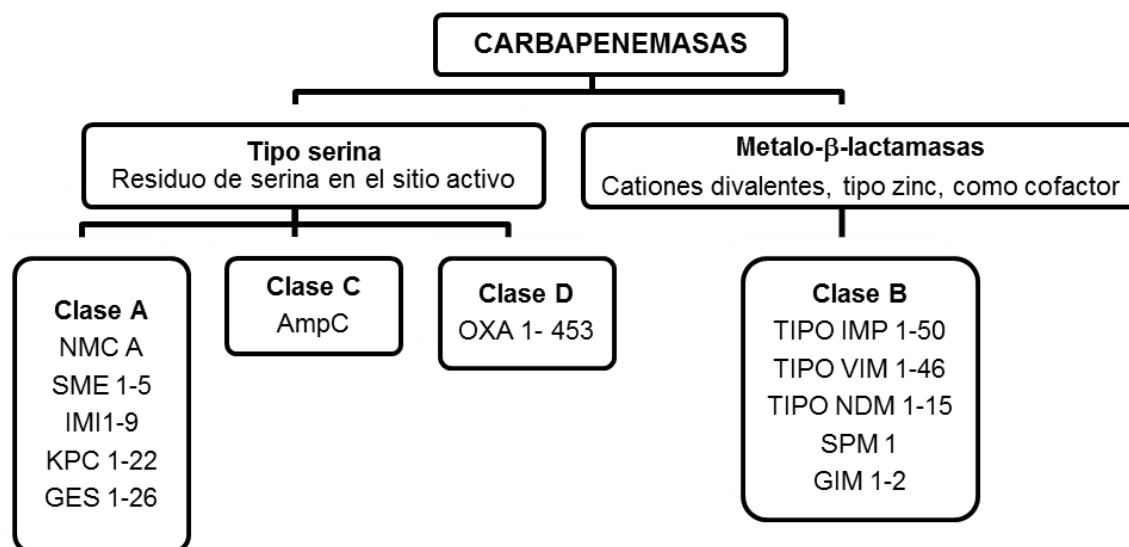
metalo- β -lactamasas. Los genes para estas enzimas están localizados en plásmidos e integrones. Esta clase de enzimas se caracteriza por la capacidad de hidrolizar carbapenémicos y por su resistencia a los inhibidores comerciales disponibles, sin embargo, son susceptibles a la inhibición por quelantes de iones metálicos, como el EDTA.

Entre las metalo- β -lactamasas más comunes se encuentra VIM (Verona integron-encoded metalo- β -lactamase), IMP (Imipenemase), GIM (German imipenemase), SPM (Sao Paulo metalo- β -lactamase) así como NDM (New Delhi metalo- β -lactamase), las cuales se encuentran codificadas en una variedad importante de integrones, los cuales al asociarse con plásmidos o transposones, se facilita la transferencia entre bacterias.

Siguiendo este modelo de clasificación, las enzimas del tipo AmpC son conocidas también como cefalosporinasas o enzimas de clase C, esto es debido a que median la resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Bacterias Gram negativas como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, han sido reportadas como portadoras del gen *ampC* en el cromosoma; mientras que otras bacterias como *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp., adquieren esta resistencia a través de elementos móviles como lo son plásmidos. Estas enzimas presentan baja afinidad hacia los carbapenémicos, sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplásmico permite que la enzima hidrolice al antibiótico generando de esta manera, resistencia a los carbapenems (20).

Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas) se han caracterizado principalmente en *A. baumannii*. El espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente a imipenem y meropenem, no hidrolizan ni cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam, a excepción de OXA-27, y todas son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina. Además, son inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de OXA-23 que es resistente. A pesar de que hasta la fecha las

oxacilinasas no han recibido tanta atención como las metalo- β -lactamasas, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, pues aunque su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes, como la presencia de bombas de eflujo o la disminución en la permeabilidad ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas (20).



Esquema 1. Clasificación de carbapenemasas basada en la propuesta de Ambler

NMC A No MetaloCarbapenemasa clase A; **SME** *Serratia marcescens* enzyme; **IMI** Imipenem hydrolysing-lactamases; **KPC** *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase; **GES** Guiana Extended Spectrum; **OXA** Oxacillin-hydrolysing; **IMP** Imipenemase; **VIM** Verona Integron-encoded metallo- β -lactamase; **NDM** New Delhi metallo- β -lactamase; **SPM** Sao Paulo metallo- β -lactamase; **GIM** German Imipenemase **MBL** Metallo- β -lactamasa (15).

2.5. Técnicas de estudio de carbapenemasas

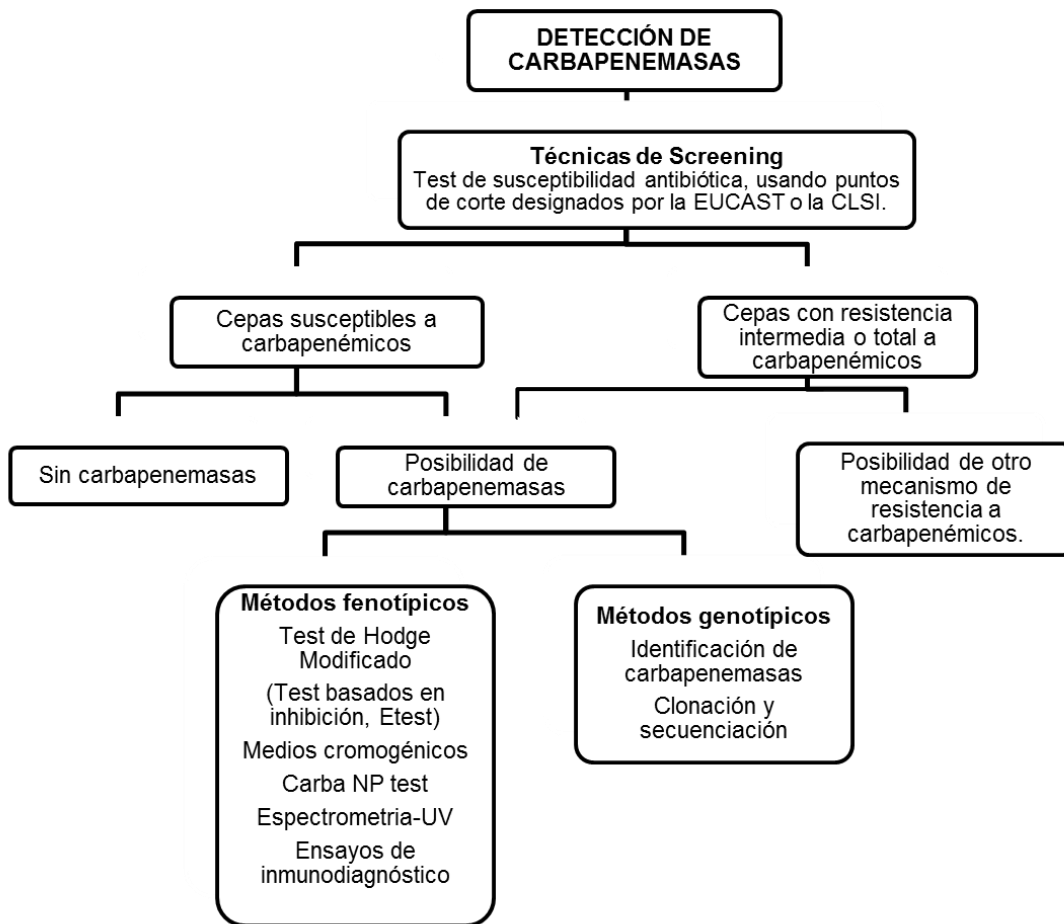
Debido a que las carbapenemasas representan una familia versátil de betalactamasas con una incidencia cada vez mayor, la optimización de las técnicas de detección es necesaria. La detección oportuna y efectiva de los microorganismos productores de carbapenemasas es una cuestión urgente, no sólo para la selección del régimen terapéutico apropiado, sino también para la aplicación de las medidas de control de infección (23).

Las técnicas empleadas han evolucionado progresivamente al paso de los años, de tal modo que ciertos factores como el tiempo de espera de resultados y precios, han sido reducidos de manera notable.

En general, una proyección preliminar de microorganismos productores de carbapenemasas se basa en el reconocimiento de la susceptibilidad disminuida a carbapenémicos en pruebas de susceptibilidad antibiótica, seguidas de otras pruebas fenotípicas, bioquímicas y de confirmación por métodos de detección moleculares (Esquema 2).

Las pruebas de susceptibilidad antibiótica basan sus criterios de aceptación en los puntos de corte propuestos por la EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) y por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), ya sea con respecto al incremento en la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) o disminución en el diámetro de la zona de inhibición. Dentro de las técnicas empleadas se cuenta con la microdilución en caldo, E-test y difusión en disco así como los sistemas automatizados Vitek, Phoenix y MicroScan.

Sin embargo, dada la variabilidad de resultados que pueden presentarse al emplear técnicas de susceptibilidad, la utilización de métodos fenotípicos resulta ser una herramienta alternativa que permite obtener resultados confiables cuando las pruebas genotípicas no se encuentran fácilmente disponibles. Dentro de este grupo se encuentra el Test de Hodge Modificado, llevado a cabo en medio Muller-Hinton y fundamentado en la inactivación de un carbapenémico por una cepa productora de carbapenemasa.



Esquema 2. Esquema para la detección de carbapenemasas.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; **CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

Los test basados en inhibición, otro método de detección fenotípica, son aplicados a cada grupo de carbapenemasas y emplean un carbapenémico en combinación con un inhibidor. Así, se cuenta con inhibidores de carbapenemasas de clase A, que emplean componentes de ácido borónico para su realización; inhibidores de carbapenemasas clase B, que al requerir cationes divalentes para ejercer su acción, es usado el zinc como metal cofactor para la actividad enzimática; como inhibidores de carbapenemasas de clase C, son empleados el ácido borónico y la cloxacilina. Las carbapenemasas de clase D, son inhibidas por el ácido clavulánico, aunque se ha observado su inhibición al utilizar NaCl 100 mM (19).

Todas estas pruebas fenotípicas de detección requieren un mínimo de 48 horas desde que la muestra llega al laboratorio, por tal motivo, se ha optado por buscar nuevos métodos para acortar este tiempo, por lo que se han diseñado medios

cromogénicos para el aislamiento selectivo e identificación presuntiva de bacterias con resistencia a los betalactámicos. Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (BioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagar KPC. El fundamento de la reacción consiste en que el sistema enzimático es responsable de la escisión del sustrato en el interior del cromógeno presente en el medio. Con el fin de separar el sustrato, la unión entre las dos partes del cromógeno se rompe por la enzima, de este modo, los cromóforos son liberados y pueden ser detectados visualmente mediante la observación de un cambio de color en el medio (19).

El medio CHROMagar KPC, es un medio cromogénico empleado para la detección de bacterias Gram negativas con susceptibilidad reducida a la mayoría de los carbapenémicos. Contiene un suplemento que inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas sensibles a carbapenems, el cual se logra mediante la adición de imipenem. Las colonias bacterianas crecen de distintos colores de acuerdo con sus propiedades enzimáticas específicas (Figura 7).

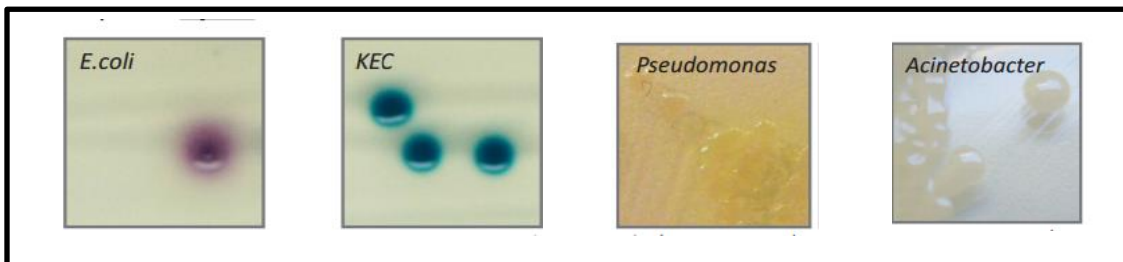


Figura 7. Aspecto típico de las colonias en medio CHROMagar KPC. Las cepas de *E. coli* muestran una coloración rosa oscuro a rojizo; las colonias del grupo KEC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) crecen mostrando una pigmentación azul metálico; las cepas de *Pseudomonas* muestra colonias translúcidas (+/- pigmentación natural de crema a verde) y las colonias de *Acinetobacter* suelen crecer de color crema. El crecimiento de las cepas sensibles a carbapenémicos se inhibe y las levaduras son inhibidas en su mayor parte.

El nombre CHROMagar KPC, se debe a que está diseñado para la detección principalmente del grupo KEC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), *Pseudomonas* y *E. coli*, aunque también permite la identificación de cepas de

Acinetobacter y *Stenotrophomonas*. Su fundamento, es el ya mencionado anteriormente: la capacidad enzimática de las bacterias. Para el caso de las cepas de *E. coli* resistentes a carbapenems, se realiza la detección de la enzima β -glucuronidasa, la cual se encuentra presente en este tipo de bacterias. En el medio se encuentra adicionado el sustrato cromogénico con el que se identifica a la enzima: el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucorónido, el cual al sufrir la ruptura de su estructura por el ataque de la enzima, se libera un cromóforo que da una coloración magenta/rosa oscuro a las cepas (Figura 8).

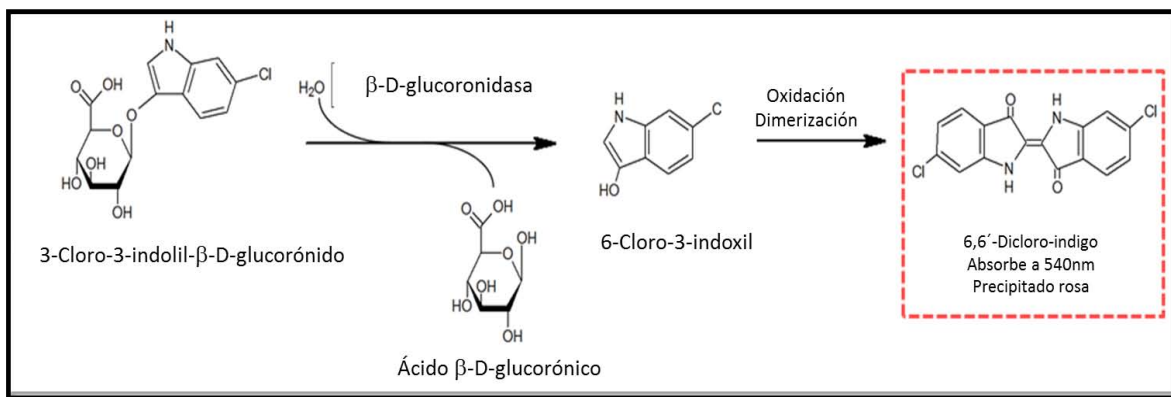


Figura 8. Mecanismo de detección de β -glucuronidasa por medio de un sustrato cromogénico en el medio CHROMagar.

Otras de las enzimas que se detectan por medio del CHROMagar es la β -glucosidasa. Su presencia se ha detectado en enterococos y en el grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*). El sustrato cromogénico que permite la identificación, es el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido, el cual al sufrir la ruptura de su estructura, libera un cromóforo que da una coloración azul intenso dando como resultado, colonias de este color (Figura 9).

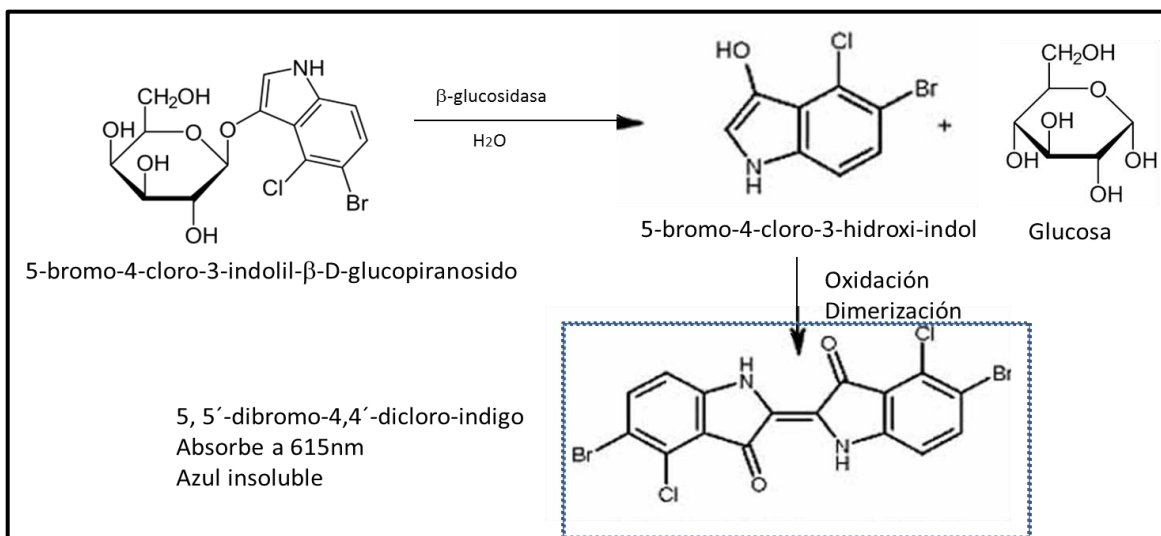


Figura 9. Mecanismo de detección de β -glucosidasa por medio de un sustrato cromogénico en el medio CHROMagar.

Las colonias de *P. aeruginosa* muestran una pigmentación natural de crema a verde, debido a que durante su metabolismo, libera un pigmento llamado piocianina, el cual es responsable de una coloración azul-verdosa que puede aparecer en las colonias. Este pigmento es característico de las colonias de *P. aeruginosa*.

Las colonias de *Acinetobacter*, por el contrario, no producen pigmentos, las colonias presentan las características que lo distingue en otros medios: colonias convexas, enteras con un tinte rosado pálido (crema).

Los métodos bioquímicos permiten hacer un reconocimiento más específico de las enzimas presentes en los productores de carbapenemasas. Algunas pruebas empleadas comúnmente en los laboratorios de referencia incluyen las basadas en el punto isoeléctrico de las proteínas; la espectrofotometría UV, las que se fundamentan en la medición de la hidrólisis llevada a cabo por las carbapenemasas y espectrometría de masas, en la que se realiza la detección de productos de degradación de carbapenémicos, sin embargo, no se encuentran fácilmente disponibles en los laboratorios de rutina debido a los gastos que estas implican.

Recientemente se incorporó al campo de la investigación un novedoso método que permite realizar la detección de carbapenemasas acortando considerablemente el tiempo de respuesta. Dicha técnica es conocida como Carba NP Test, y fue dada a conocer por los franceses Patrice Nordmann y Laurent Poirel en el año 2012. En esta técnica, al emplear un buffer de lisis, la carbapenemasa es liberada al medio provocando la hidrólisis del anillo betalactámico presente en el imipenem. La ruptura del anillo trae consigo cambios en el pH del medio, el cual es detectado por un indicador (el rojo de fenol), que vira de rojo a amarillo/naranja (Figura 10). La ventaja de este novedoso método es que los resultados pueden interpretarse, incluso, a los pocos minutos (21).

La técnica se ha reportado 100% sensible y específica para la familia *Enterobacteriaceae* y 100% específica y 94.4% sensible para *Pseudomonas* spp portadoras de carbapenemasas.

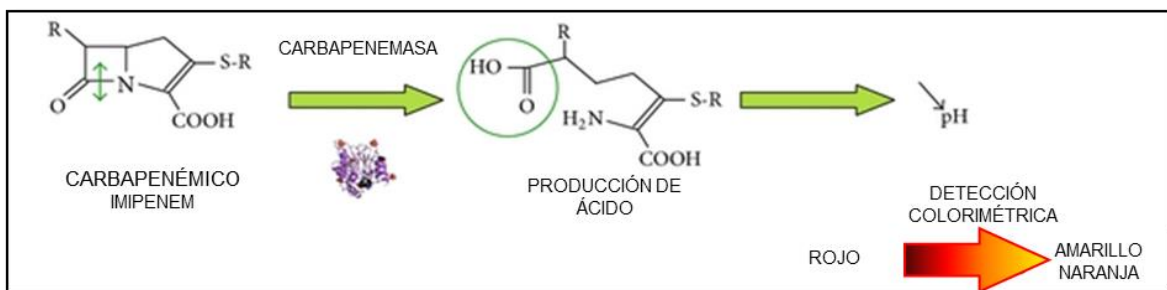


Figura 10. Fundamento del Carba NP Test.

Las técnicas de detección molecular en todo laboratorio continúan siendo el estándar de oro en la confirmación de detección enzimática. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite eludir las dificultades asociadas con la detección fenotípica y puede arrojar resultados dentro de periodos cortos de tiempo (4 a 6 horas) y en caso de ser necesaria la identificación precisa de la variante encontrada de carbapenemasa se recurre a la secuenciación o bien, a técnicas más sofisticadas como la clonación de los genes de resistencia.

2.6. Panorama actual de las carbapenemasas

En 1996, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) organizó la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) con el fin de obtener datos microbiológicos fidedignos, oportunos y reproducibles para mejorar la atención del paciente y de fortalecer la vigilancia mediante programas sostenibles de garantía su calidad. Desde entonces, han surgido otras organizaciones que tienen como fin monitorear la posible presencia de microorganismos con resistencia a antibióticos que representen un peligro para la población. En el año 2000, se inició el Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS), en el cual actualmente participan 17 laboratorios de 16 países de la Región, incluido México (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Distrito Federal) y es coordinado por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (ANLIS, Buenos Aires, Argentina). Siendo este último, el laboratorio de referencia en la región, para realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. El LA-EQAS se encarga del fortalecimiento de la detección, capacitación e información de los mecanismos de resistencia de mayor dificultad diagnóstica emergentes. Con la vigilancia de estas asociaciones, en 2011 se difundió una alerta en América Latina con el propósito de promover la búsqueda de carbapenemasas del tipo KPC y metalo- β -lactamasas (MBL) en la región, pues a nivel mundial, comenzaron a ser frecuentes los aislamientos de estas enzimas. A la par de esta alerta, fueron detectados en Argentina y Brasil los primeros aislamientos de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) (22).

Sin embargo, no sólo el LA-EQAS ha difundido estas alertas; en junio de 2010, la Organización Panamericana de Salud (OPS) en coordinación con la Organización Mundial de Salud (OMS) y el servicio de antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina) , difundieron una alerta sobre la presencia de carbapenemasas del tipo KPC. Posteriormente, se realizaron sesiones de capacitación y se estableció un protocolo regional de detección de carbapenemasas, en las cuales se incluía a la enzima NDM, ya que a pesar de no haberse presentado aún en América, en 2008 se realizó en Suecia

el primer aislamiento de la enzima NDM proveniente de un paciente que había viajado a la India, sin embargo, hasta esa fecha no se había reportado ningún caso en América. Fue hasta el 2010 que en E.U.A y Canadá cuando se detectó la presencia de la enzima en pacientes con antecedentes de haber viajado a la India.

El 22 de noviembre de 2011, la OPS/OMS emitieron una nueva alerta epidemiológica después de encontrar la presencia de carbapenemasas del tipo NDM en aislamientos de *K. pneumoniae* en Guatemala, esto ocurrió después que se informó sobre la emergencia de un mecanismo de resistencia en enterobacterias causante de brotes y relacionado a un aumento en la morbilidad y mortalidad intrahospitalaria en India, Pakistán e Inglaterra. Posteriormente, se notificaron casos en otros países europeos, Japón, Australia, Canadá y Estados Unidos de América. La presencia de NDM en Latinoamérica fue preocupante, pues anteriormente, sólo se habían reportado otras metalo- β -lactamasas en bacilos Gram negativos no fermentadores, como en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y en enterobacterias en menor proporción. La alerta volvió hacerse presente en diciembre de 2012, luego de que en agosto del mismo año, se reportó un brote de *K. pneumoniae* en seis pacientes hospitalizados en Bogotá, Colombia. Y En noviembre, Paraguay notificó el hallazgo de carbapenemasas del tipo NDM en aislamientos de *A. baumannii* en pacientes hospitalizados, estos últimos, sin registro de antecedentes de viajes recientes al exterior, pacientes infectados o familiares directos.

Recientemente, en marzo de 2014, se realizó la actualización de la alerta emitida en 2011 y 2012. En dicho comunicado se informó que la diseminación de carbapenemasas del tipo NDM había abarcado tantos países como especies bacterianas y se emitieron diversas recomendaciones y cuidados que se debían seguir en caso de encontrarse con estas bacterias. Según esta información, la carbapenemasa NDM se ha encontrado en *P. rettgeri* en Argentina, Brasil y México, en *A. baumannii* en Honduras, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, en *E. coli* y *E. cloacae* en Nicaragua y, recientemente, en *E. coli* en Costa Rica.

La situación en México no es conocida en su totalidad, pues son pocos los registros que se tienen acerca de la presencia de estas enzimas. Uno de los primeros hallazgos fue la descripción de una metalo- β -lactamasa del tipo VIM-2 localizada en un integrón en las enterobacterias *E. cloacae* y en *K. oxytoca*, y una VIM-23 en *E. cloacae* encontradas en Guadalajara (23). Recientemente se confirmaron dos hallazgos más: la detección en un brote hospitalario en un hospital de la Ciudad de México de la primera KPC-3 en *K. pneumoniae* y la primera NDM-1 aislada en *Providencia rettgeri* en Monterrey (23).

Referente a *P. aeruginosa*, sus mecanismos de resistencia se han descrito en casos clínicos desde 1986; en los cuales se reportó la resistencia en aislamientos provenientes de un hospital de Morelia, en donde se hallaron los genes IMP-15 y IMP-18, y de la producción simultánea de diferentes tipos de BLEE, incluida la GES-5 en asociación con VIM-2 y VIM-11; una publicación más, informa del hallazgo en aislamientos provenientes de la Ciudad de México de los genes IMP-15 y VIM-2 (24). Asimismo, en un paciente con fibrosis quística se encontró *P. aeruginosa* productora de betalactamasas OXA-141.

En México, *A. baumannii* también ha sido descrita como productora de carbapenemasas. En una publicación del 2013, se describe la epidemiología de *A. baumannii* durante 13 años en un hospital universitario de tercer nivel de atención en Guadalajara. Se analizaron 3680 aislamientos y se encontró que la diseminación se inició en una unidad de cuidados intensivos de pacientes adultos. Se observó que la sensibilidad a meropenem disminuyó entre 1999 y 2012 (de 92 a 12%), y que diferentes clones de *A. baumannii* producían VIM-4, IMP-1 y OXA-24 (Figura 11); el microorganismo se aisló frecuentemente en secreciones y afectó a pacientes que por la gravedad de su cuadro clínico de ingreso (neurocirugía, medicina interna) fueron estabilizados primero en la unidad de cuidados intensivos para después ser trasladados a los diferentes servicios hospitalarios (25, 26).

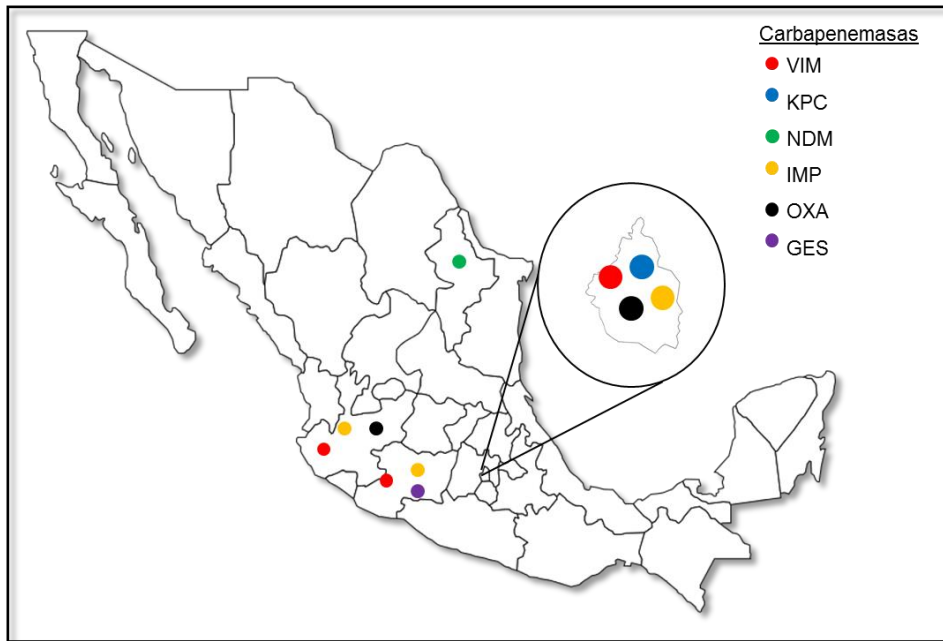


Figura 11. Distribución geográfica de casos reportados de carbapenemasas en México.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es un problema serio de salud, con fuertes repercusiones en la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados y en particular, en pacientes que adquieren infecciones intrahospitalarias. En los últimos años, se ha presentado un número importante de informes donde se reportan brotes de carbapenemasas: enzimas con acción hidrolítica frente a antibióticos de última generación (carbapenémicos), empleados en el tratamiento de infecciones nosocomiales. Las opciones disponibles después de haber fracasado con estos, son pocas y pueden traer consigo problemas nefrotóxicos y hepatotóxicos en el paciente. El principal problema con estas enzimas, es que se encuentran codificadas en plásmidos y en elementos móviles, lo que facilita su diseminación en diversos géneros y especies bacterianas. Realizar una detección oportuna e identificar la clase de enzimas presentes en bacterias resistentes que afectan a la población, permite a los sistemas de salud establecer medidas de control y vigilancia de tal modo, que se evite la propagación a niveles mayores.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar aislamientos de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* resistentes a carbapenems mediante técnicas como el Carba NP Test y PCR a partir de muestras provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales.

OBJETIVOS PARTICULARES

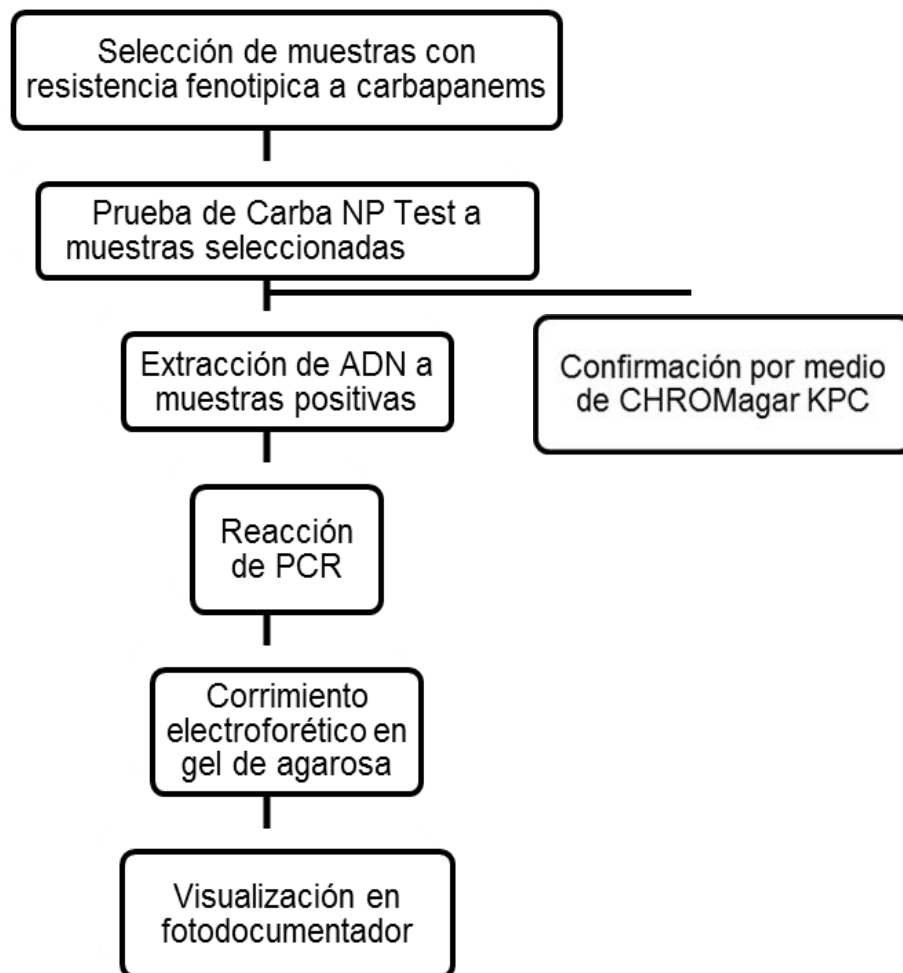
- Determinar la presencia de carbapenemasas mediante la técnica de Carba NP Test en cepas provenientes de infecciones nosocomiales.
- Identificar la presencia de genes asociados a resistencia a carbapenems (KPC, VIM, NDM e IMP) mediante de la visualización de los productos de amplificación obtenidos por PCR.

5. HIPÓTESIS

Si el principal mecanismo de resistencia hacia los carbapenémicos, son enzimas que inactivan la función del antibiótico, entonces las cepas de estudio reportadas como resistentes, analizadas mediante métodos de detección fenotípico y molecular, presentarán alguna de las enzimas que con mayor frecuencia se reportan a nivel mundial: KPC, NDM, VIM o IMP.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental



6.2. Selección de muestras

En base a las hojas del laboratorio clínico del área de microbiología de pacientes recibidos en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” durante el periodo de julio de 2009 a diciembre de 2013, se seleccionaron un total de 182 muestras previamente identificadas mediante el sistema automatizado MicroScan, las cuales mostraban resistencia a carbapenems (imipenem o meropenem). De estas muestras, 87 pertenecen a *A. baumannii* *haemolyticus*; 65 a *P. aeruginosa*, 1 corresponde a *P. putida*; 3 fueron identificadas como *E. coli*; 3 pertenecen a *E. aerogenes*; 1 como *E. cloacae*; 21 referidas a *K. pneumoniae* y 1 *K. oxytoca*, los sitios de aislamiento son mostrados en el gráfico 1. Las muestras almacenadas en ultracongelación (-70°C) en una suspensión de caldo BHI con glicerol 50%, fueron extraídas, atemperadas y re-sembradas en placas de agar MacConkey y Tripticasa Soya Agar (TSA) + Zn para su posterior análisis fenotípico.

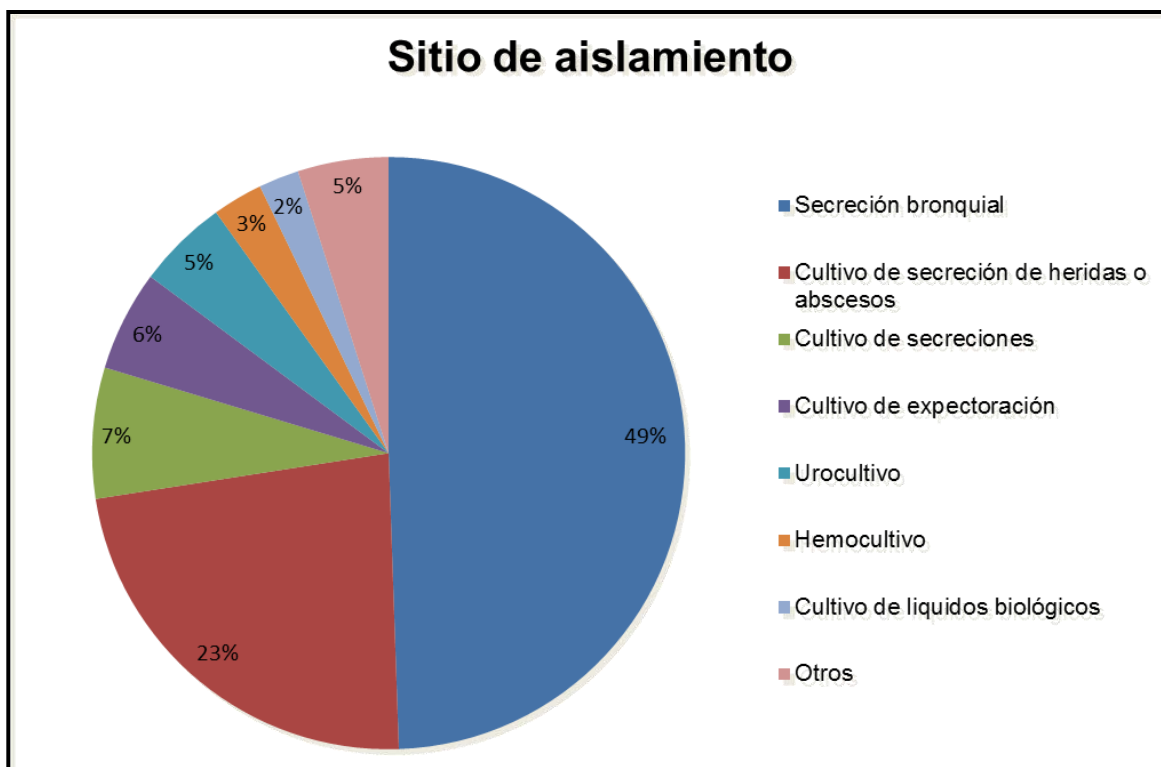


Gráfico 1. Sitio de aislamiento de muestras de trabajo. En “otros”, se encuentran representados sitios de aislamiento diversos, tales como: secreciones de gastrostomía, peri-gastrostomía y pancreática; cultivos de líquido-cefalorraquídeo, de líquido peritoneal, de exudado vaginal, y colección retroperitoneal, así como tejido pancreático y lesión ampular epidérmica.

6.3. Realización de Carba NP Test

Después de seleccionar las cepas y siguiendo el procedimiento descrito por Nordmann (27), se realizó la prueba de Carba NP Test al total de muestras. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se adicionaron 50 μ l de buffer de lisis Tris-HCl 20 mM (BPERII, Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) y proveniente de medio TSA suplementado con ZnSO₄ a 70 mg/ml, se resuspendieron de 4 a 5 colonias aisladas. Posteriormente se agregaron 100 μ L de solución A (Solución de rojo de fenol 0.5% w/v con ZnSO₄ 10mM) + imipenem 6 mg/ml. El tubo se sometió a agitación suave por medio de un agitador orbital (vórtex) y se incubó a 37°C, la lectura del test se llevó a cabo cada 10 min durante 2 h. Se consideraron positivas aquellas muestras que en el test viraron de color rojo a naranja/amarillo, o bien, mostraron alguna coloración diferente a la del control negativo.

	Sin antibiótico	Imipenem
Sin carbapenemasa	Rojo	Rojo
Productor de carbapenemasa	Rojo	Naranja/amarillo
Sin interpretación	Amarillo	Amarillo

6.4. Confirmación por medio de CHROMagar™ KPC

Como técnica de confirmación, las cepas fueron resembradas en placas de medio comercial conocido como CHROMagar™ KPC utilizando la técnica estriado en cuadrante. Todas las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis por 24 h y protegidas de la luz; para realizar esta última actividad se emplearon tiras de papel metálico que cubrían las cajas. El aspecto típico de las colonias se describe en la Figura 12.





Microorganismo	Aspecto de las colonias	
<i>Escherichia coli</i>	Rosa oscuro a rojizo	
<i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter sp</i>	Azul metálico	
<i>Pseudomonas</i>	Translúcidas (+/- pigmentación natural de crema a verde)	
<i>Acinetobacter</i>	Crema	

Figura 12. Criterios de identificación para colonias con crecimiento en CHROMagar KPC.

6.5. Extracción de ADN

Aquellas muestras que resultaron positivas al Carba NP Test y confirmadas por CHROMagar KPC, fueron sembradas una vez más en medio TSA con el objetivo de tener colonias frescas para la extracción del material genético. Esta última se llevó a cabo ejecutando una metodología tipo “Boiling” que consiste en tomar con asa bacteriológica estéril, de 4 a 5 colonias de la cepa seleccionada y colocarlas en 200 µl de agua estéril contenida en un tubo Eppendorf de 1.5 ml; se resuspendió homogéneamente y posteriormente, los tubos fueron sometidos a baño María por 15 min. Al término del baño, se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min. El ADN extraído corresponde al sobrenadante presente en el tubo. Este último, debidamente identificado, se guardó a 4°C hasta su uso.

6.6. Reacción de PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de las bandas de interés, fue realizada para los genes KPC, NDM, VIM e IMP empleando el TopTaq Master Mix Kit (250) No. de catálogo 200403. El procedimiento realizado consistió en colocar en un tubo Eppendorf 12.5 µl de TopTaq Master Mix, 5 µl de agua estéril, 5 µl de ADN extraído, 1 µl de primer forward y 1 µl de primer reverse, esto fue para la identificación de cada gen. Se utilizaron controles

positivos y negativos de cada gen (KPC, NDM, VIM e IMP). Los componentes de la reacción fueron mezclados con ayuda del vórtex antes de colocarlos en el termociclador.

Los primers empleados para la reacción, la secuencia, y los productos de amplificación son descritos en la tabla 1.

Primer	Secuencia 5´- 3´	Producto de amplificación
NDM_F	5-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3	621 pb
NDM_R	5-CGGAATGGCTCATCACGATC-3	
VIM_F	5-CGAATGCGCAGCACCAG-3	390 pb
VIM_R	5-GATGGTGTGGTTCGCATA-3	
IMP_F	5-GGAATAGAGTGGCTTAAYTC-3	232 pb
IMP_R	5-TCGGTTTAAAYAAAACAACCACC-3	
KPC_F	5-GTARCGCCGTCTSGTTCTGC-3	638 pb
KPC_R	5-GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC-3	

Tabla 1. Primers empleados para la reacción, secuencias y productos de amplificación
R: Reverse F: Forward

Asimismo, los programas empleados en el termociclador son descritos en la tabla 2.

Programa	Ciclos	Desnaturalización	Alineación	Extensión
NDM	25	94.0°C/30´	53.0°C/30´	72.0°C/50´
VIM	30	94.0°C/30´	52.0°C/40´	72.0°C/50´
IMP	30	94.0°C/30´	52.0°C/40´	72.0°C/50´
KPC	30	94.0°C/45´	58.0°C/30´	72.0°C/45´

Tabla 2. Programas ejecutados para las reacciones de PCR

Los primers empleados, así como los programas para la amplificación de genes, se diseñaron y adaptaron a partir de trabajos previamente realizados.

Para el caso de los primers de los genes VIM, NDM e IMP, el diseño partió de lo propuesto por Poirel et al. (28), mientras que para el gen KPC, se diseñó a partir del trabajo de Sang Sook et al. (29).

Las cepas utilizadas como controles positivos, fueron proporcionadas por el Dr. Jesús Silva Sánchez, perteneciente al Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública y corresponden a:

Muestra NDM-1: *Providencia rettgeri*

Muestra KPC-2: *Klebsiella pneumoniae*

Muestra IMP-1: *Pseudomonas aeruginosa*

Muestra VIM-1: *Pseudomonas aeruginosa*

6.7. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1.5 %. Estos se mezclaron con buffer de corrida CoralLoad Concentrate. Se emplearon controles positivos y negativos en cada corrida y marcador de peso molecular de 100 pb. El corrimiento electroforético se programó a 90V por 40 min.

Las imágenes se digitalizaron en el fotodocumentador GelLogic, en el programa Carestream MI SE (Molecular Imaging Software, standar edition) V.5.07.22.

7. RESULTADOS

7.1. Carba NP Test

Las 182 muestras seleccionadas con resistencia hacia algún carbapenémico (imipenem o meropenem), corresponden a diversos géneros y especies bacterianas, como ya se indicó anteriormente.

Para la prueba, las lecturas se efectuaron cada 10 min durante 2 h, realizando siempre comparación directa con los controles positivos (empleando las cepas que contenían VIM, NDM, IMP y KPC) y un control negativo. Al final de la prueba, 20 muestras resultaron positivas al Carba NP Test, las cuales presentaron una coloración amarilla/ naranja que difería de la coloración roja del control negativo (Figura 13).

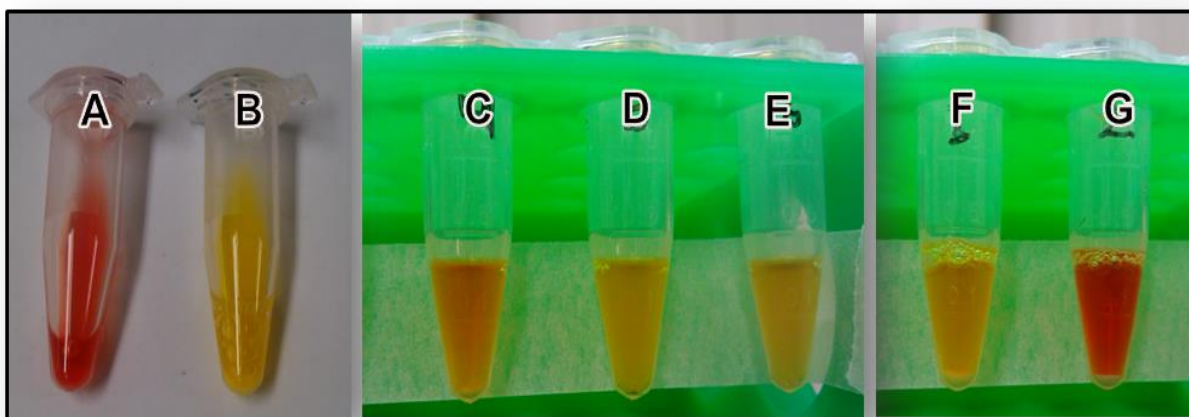


Figura 13. Carba NP Test. A: Control negativo y B: Control positivo empleados durante la prueba. Tubos C, D, E y F, muestras positivas al test. Tubo G, muestra negativa al test.

Tomando como referencia las hojas de microbiología, se detectó que 19 de las muestras positivas provenían de pacientes hospitalizados en la unidad de terapia intensiva y adquirieron una infección de origen nosocomial; del total de muestras positivas al Carba Test, 45% fueron aisladas a partir de secreciones bronquiales, 20% de secreción de heridas o abscesos, 10% de cultivo de secreciones, 5% de cultivo de expectoración, 5% de líquido peritoneal, 5% de hemocultivo y 5% líquido cefalorraquídeo. La muestra restante, proviene de una infección adquirida en la comunidad, esta fue extraída de secreción de herida y corresponde al 5% del total de muestras positivas al test.

Asimismo, estas cepas positivas mostraron resistencia hacia diversos antibióticos; después de analizar los puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria se observó que en el caso de los betalactámicos, las muestras de trabajo mostraron una resistencia del 100% a penicilinas (tomando como criterio la resistencia hacia al menos un penicilínico como ampicilina, piperacilina o ticarcilina), 100% resistentes a cefalosporinas (ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefepima, entre otros), 70% resistentes a monobactámicos (aztreonam) y 100% con resistencia a carbapenémicos (imipenem o carbapenem). La resistencia a los aminoglucósidos (amicacina, gentamicina o tobramicina) y a quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina) fue del 100% mientras que la resistencia mostrada hacia sulfonamidas (sulfametoxazol) fue del 65% (Tabla 3).

Muestra	Microorganismo	Sitio de aislamiento	PENICILINAS					CEFALOSPORINAS					MB	CB	AMINOGLUCÓSIDOS			QUINOLONAS			SN		
			Amp/Sulbactam	Ampicilina	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticlar/ A clav	Ceftiaxona	Ceftazidima	Cefotaxima	Cefazolina	Cefepima			Cefuroxima	Cefotetan	Aztreonam	Imipenem	Meropenem	Amicacina		Gentamicina	Tobramicina
246	<i>K. pneumoniae</i>	Cultivo de expectoración			R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	I	N/R	
257	<i>E. coli</i>	Secreción de heridas	R	R	R	R	S	ESBL	R	ESBL	R	R	R	S	ESBL	I	S	S	R	R	R	R	R
339	<i>A. baumannii</i>	Cultivo de secreciones	I	R	S	S	I		S	S	R	S	I	S	I	I	R	S	S	S	S	S	S
369	<i>K. pneumoniae</i>	Cultivo de secreciones			R	R	R		R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R		
412	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción de heridas o abscesos			R	R	R		R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R		
442	<i>Escherichia coli</i>	Cultivo de líquido peritoneal	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
488	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción de heridas o abscesos	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
511	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	S				R		R	R	R		R		N/R	R	R	R	R	R	R		R
532	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción bronquial				R	R		R	R	R		I		R	R	R	S	S	S	R	R	N/R
537	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	R	R					R	R	R	R			R	R	R	R			R		
538	<i>A. baumannii</i>	Secreción bronquial	S		N/R		R		R	R	R		R		N/R	R	R	S	R	R	R		R
551	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	S				R		R	R	R		R		N/R	R	R	I	R	R	R		R
555	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
559	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
679	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	I	R	R	R	R
827	<i>A. haemolyticus</i>	Hemocultivo	R		N/R		S		R	R	R		R		N/R	R	I	S	I	R	S		S
838	<i>A. baumannii</i>	Secreción de heridas o abscesos	S				R		R	R	R		R		N/R	R	R	I	R	R	R		R
890	<i>P. aeruginosa</i>	Cultivo de LCR			R		R		R	R	R		R		I	R	R	R	R	R	R	R	N/R
947	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción bronquial			R		R		R	R	R		R		S	R	R	R	R	R	R	R	N/R
21029	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción de heridas o abscesos		R	R				R	R		R	R			R	R	R	R		R		R

Tabla 3. Características de las muestras que resultaron positivas a la prueba. Se describe el sitio de aislamiento así como el microorganismo identificado y la resistencia hacia diverso tipo de antibióticos.

MB Monobactámicos; **CB** Carbapenémicos; **SN** Sulfonamidas; **R** Resistente; **I** Intermedio; **S** Sensible; **N/R** No informado
Los espacios en blanco corresponden a datos no disponibles, no apropiados o no aprobados.

7.2. Crecimiento en medio CHROMagar KPC

Las cepas fueron incubadas por 24 h a 37°C en condiciones de aerobiosis en placas de medio CHROMagar KPC, después de la incubación se observó que todas las placas mostraron crecimiento bacteriano (Figura 14). Las colonias mostraron una coloración característica en función del microorganismo presente (Tabla 4). Se utilizaron controles positivos resistentes a carbapenems de diferente género bacteriano: *P. rettgeri* (cepa con presencia de NDM-1), *K. pneumoniae* (cepa con presencia de KPC-2) y dos cepas de *P. aeruginosa* con presencia de VIM e IMP respectivamente.

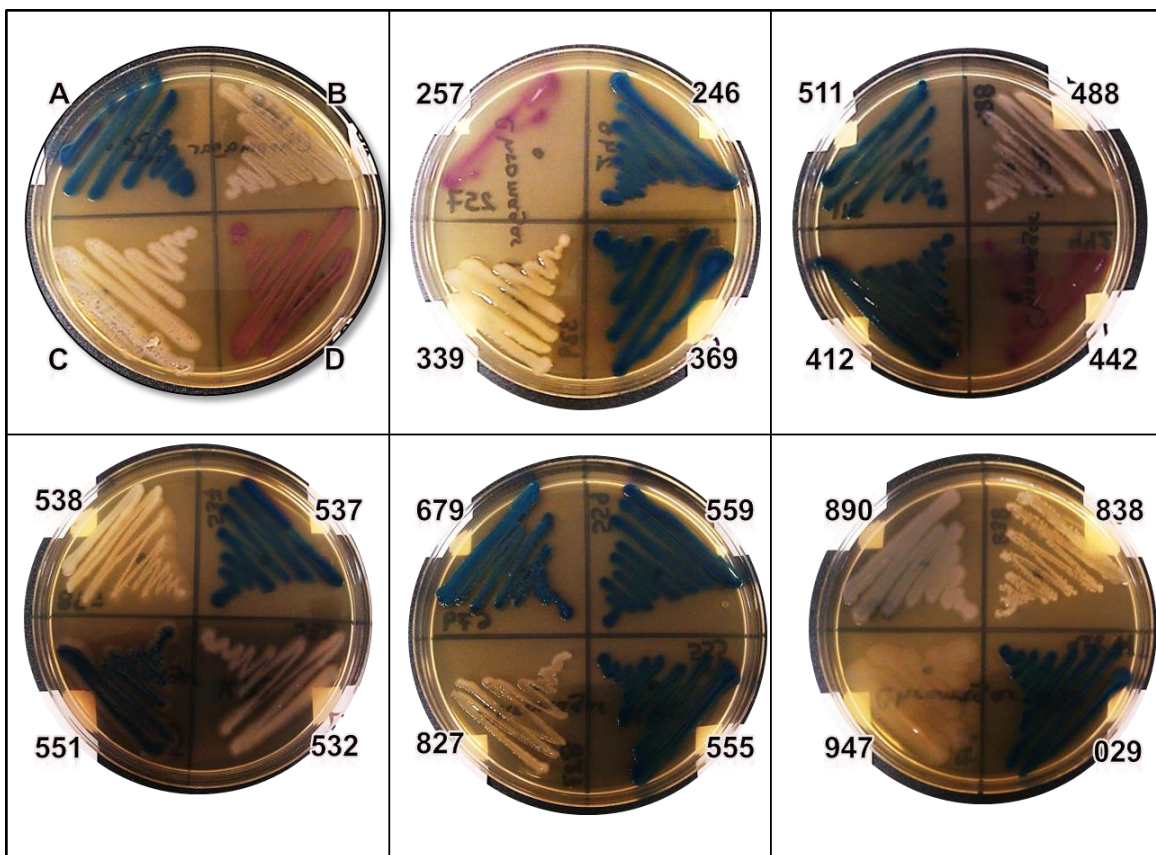


Figura 14. Crecimiento bacteriano en CHROMagar KPC. Imagen superior izquierda: se muestra el crecimiento de las cepas control A = KPC, B=IMP, C=VIM y D=NDM. Imágenes superiores derecha e inferiores, crecimiento de las cepas de trabajo en el medio cromogénico.

No. muestra	Características de las colonias	Microorganismo identificado por MicroScan	Tipo de crecimiento en CHROMagar KPC.
246	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
257	Colonias medianas, circulares, convexas, bordes redondeados. De color rosado.	<i>Escherichia coli</i>	Característico de <i>Escherichia coli</i>
339	Colonias medianas, convexas y bordes redondeadas. Color crema.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Característico de <i>Acinetobacter</i>
369	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
412	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
442	Colonias medianas, circulares, convexas, bordes redondeados. De color rosado.	<i>Escherichia coli</i>	Característico de <i>Escherichia coli</i>
488	Colonias pequeñas, circulares y bordes redondeados. De color crema transparentes.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Característico de <i>Pseudomonas</i>
511	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
532	Colonias pequeñas, circulares y bordes redondeados. De color crema transparentes.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Característico de <i>Pseudomonas</i>
537	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
538	Colonias medianas, convexas y bordes redondeadas. Color crema.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Característico de <i>Acinetobacter</i>
551	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC

555	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
559	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
679	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
827	Colonias medianas, convexas y bordes redondeadas. Color crema.	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Característico de <i>Acinetobacter</i>
838	Colonias medianas, convexas y bordes redondeadas. Color crema.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Característico de <i>Acinetobacter</i>
890	Colonias pequeñas, circulares y bordes redondeados. De color crema transparentes.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Característico de <i>Pseudomonas</i>
947	Colonias pequeñas, circulares y bordes redondeados. De color crema transparentes.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Característico de <i>Pseudomonas</i>
029	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
Control NDM	Colonias medianas, circulares, convexas, bordes redondeados. De color rosado.	<i>Providencia rettgeri</i>	Característico de <i>Escherichia coli</i>
Control VIM	Colonias pequeñas, circulares y bordes redondeados. De color crema transparentes.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Característico de <i>Pseudomonas</i>
Control KPC	Colonias grandes, convexas, mucoides y brillantes. De color azul metálico.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Característico del grupo KEC
Control IMP	Colonias pequeñas, circulares y bordes redondeados. De color crema transparentes.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Característico de <i>Pseudomonas</i>

Tabla 4. Características coloniales de las muestras de trabajo y controles positivos usados durante el ensayo del CHROMagar KPC.

7.3. Detección de los genes KPC, IMP, VIM y NDM por medio de PCR

Se realizó la detección de los genes asociados a la resistencia de carbapenémicos (carbapenemasas) en las 20 cepas seleccionadas mediante el Carba NP Test. Los genes del tipo KPC, VIM, NDM e IMP fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El gen KPC, que amplifica un producto de 638 pb, fue detectado en 11 cepas: 9 pertenecientes a *K. pneumoniae*, 1 cepa a *E. coli* y 1 cepa a *P. aeruginosa* (Figura 15 y Tabla 5).

El gen NDM, amplifica un producto de 621 pb, fue detectado en 2 cepas: 1 perteneciente a *A. haemolyticus* y 1 perteneciente a *K. pneumoniae* (Figura 16 y Tabla 5).

El gen IMP, que amplifica un producto de 232 pb, fue detectado en 4 cepas; 3 pertenecientes a *A. baumannii* y 1 a *P. aeruginosa* (Figura 17 y Tabla 5).

Por ultimo, el gen VIM que amplifica un producto de 390 pb, fue detectado en 3 cepas, 2 pertenecientes a *P. aeruginosa* y 1 a *E. coli* (Figura 18 y Tabla 5).

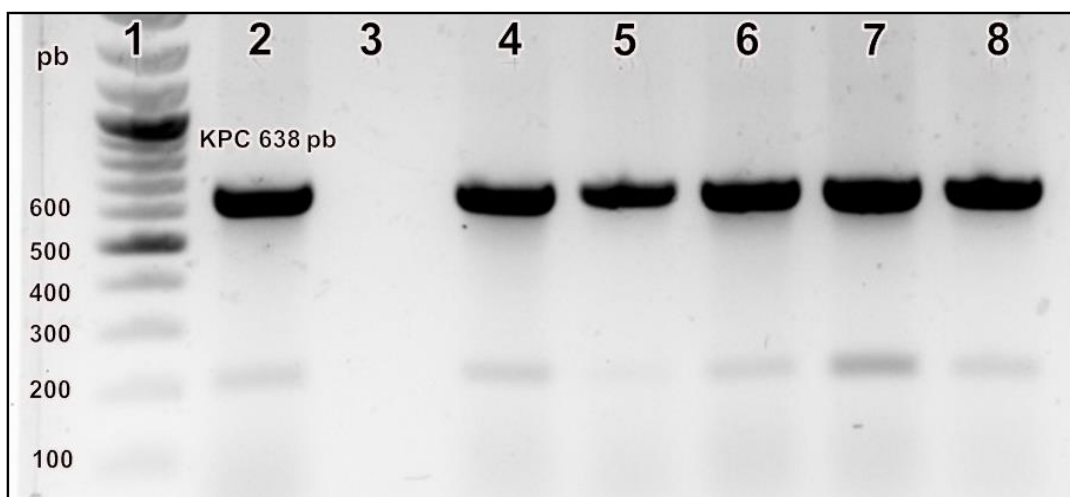


Figura 15. Producto de amplificación KPC (638 pb) en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para KPC, carril 3; control negativo. Carriles 4, 5, 6, 7 y 8; muestras de trabajo.

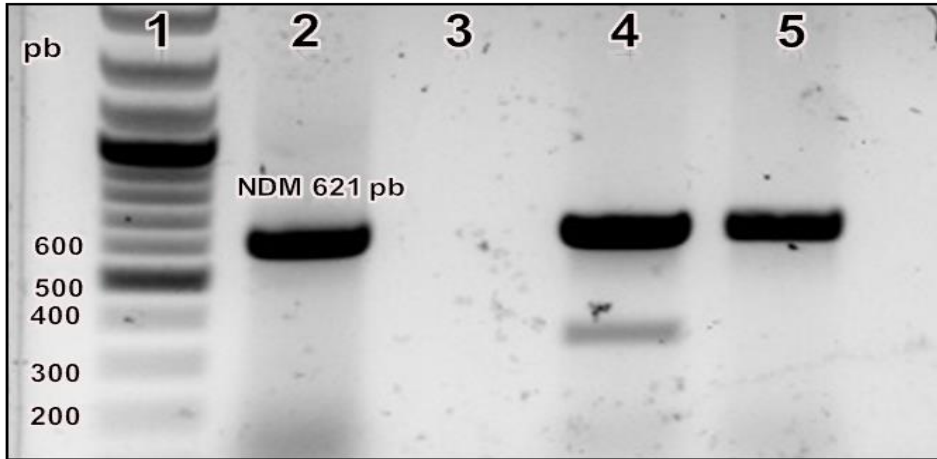


Figura 16. Producto de amplificación NDM (621 pb) en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para NDM, carril 3; control negativo. Carriles 4 y 5; muestras de trabajo.

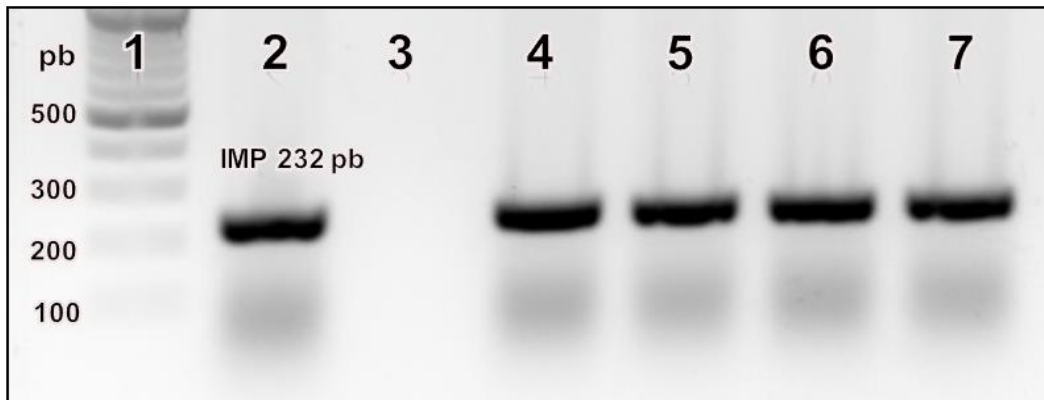


Figura 17. Producto de amplificación IMP (232 pb) en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para IMP, carril 3; control negativo. Carriles 4, 5, 6 y 7; muestras de trabajo.

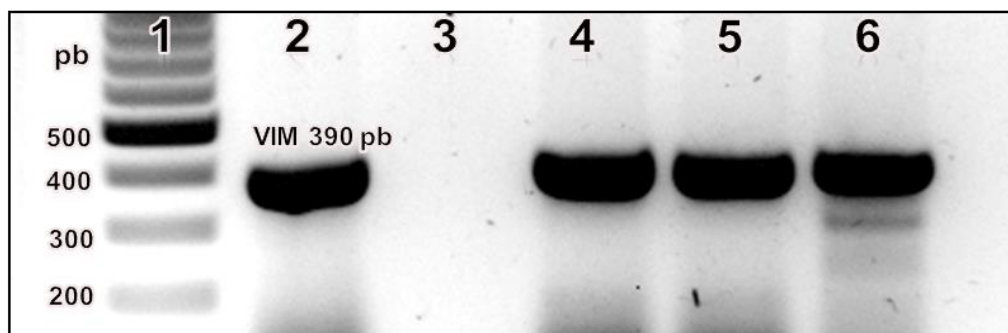


Figura 18. Producto de amplificación VIM (390 pb) en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo para VIM, carril 3; control negativo. Carriles 4, 5 y 6; muestras de trabajo.

GEN	MICROORGANISMOS	CANTIDAD
IMP	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
KPC	<i>Escherichia coli</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
NDM	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
VIM	<i>Escherichia coli</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2

Tabla 5. Género y especie bacteriana asociada al gen de resistencia a carbapenems.

El gen identificado en mayor número de cepas fue KPC con 11 aislamientos, 9 pertenecieron a *K. pneumoniae*, 1 a *E. coli* y 1 a *P. aeruginosa*. El gen IMP fue detectado en 4 aislamientos, 3 en *A. baumannii* y 1 en *P. aeruginosa*, el gen VIM en tres aislamientos, 2 en *P. aeruginosa* y 1 en *E. coli*, por último el gen menos detectado fue NDM, en dos aislamientos, 1 en *K. pneumoniae* y 1 en *A. haemolyticus* (Tabla 5).

El resumen de los resultados obtenidos al realizar el Carba NP Test, la confirmación por medio del CHROMagar KPC, así como la carbapenemasa detectada por medio de PCR, se describen en la tabla 6.

Muestra	Microorganismo	Sitio de aislamiento	Carba NP Test	CHROMagar	CARBAPENEMASA DETECTADA			
					KPC	VIM	NDM	IMP
246	<i>K. pneumoniae</i>	Cultivo de expectoración	+	KEC				
257	<i>E. coli</i>	Secreción de heridas	+	<i>E. coli</i>				
339	<i>A. baumannii</i>	Cultivo de secreciones	+	<i>Acinetobacter</i>				
369	<i>K. pneumoniae</i>	Cultivo de secreciones	+	KEC				
412	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción de heridas o absesos	+	KEC				
442	<i>E. coli</i>	Cultivo de líquido peritoneal	+	<i>E. coli</i>				
488	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción de heridas o absesos	+	<i>P. aeruginosa</i>				
511	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	+	KEC				
532	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción bronquial	+	<i>P. aeruginosa</i>				
537	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	+	KEC				
538	<i>A. baumannii</i>	Secreción bronquial	+	<i>Acinetobacter</i>				
551	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	+	KEC				
555	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	+	KEC				
559	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	+	KEC				
679	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción bronquial	+	KEC				
827	<i>A. haemolyticus</i>	Hemocultivo	+	<i>Acinetobacter</i>				
838	<i>A. baumannii</i>	Secreción de heridas o absesos	+	<i>Acinetobacter</i>				
890	<i>P. aeruginosa</i>	Cultivo de LCR	+	<i>P. aeruginosa</i>				
947	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción bronquial	+	<i>P. aeruginosa</i>				
21029	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción de heridas o absesos	+	KEC				

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos durante el proyecto experimental.

KEC *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*

Con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de carbapenemasas en las muestras que resultaron negativas a la prueba del Carba NP Test, se seleccionaron 10 muestras al azar, y se realizó una PCR para la detección de los genes que codifican para KPC, VIM, NDM e IMP en cada una de las muestras.

Los pasos que se siguieron para la ejecución de PCR, fueron los mismos que en las demás muestras. Al finalizar las corridas, los geles fueron observados en fotodocumentador GelLogic, en el programa Carestream MI SE (Molecular Imaging Software, standar edition) V.5.07.22. Los resultados indicaron la ausencia de genes que codifican para las carbapenemasas en estudio (KPC, VIM, NDM e IMP).

8. DISCUSIÓN

En términos generales, una proyección preliminar de productores de carbapenemasas se basa en el reconocimiento de susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, logrado por medio de la utilización de los resultados emitidos por sistema MicroScan, seguido de pruebas fenotípicas (empleo del medio CHROMagar KPC), ensayos bioquímicos (como el Carba NP Test) y confirmación por medio de una prueba de detección molecular (como la PCR) (19). En conjunto, dichas pruebas permitieron la identificación de cepas bacterianas que presentan resistencia a carbapenémicos por medio de la producción de carbapenemasas.

Los resultados emitidos por el sistema automatizado (MicroScan) permitieron identificar aquellas muestras nosocomiales con resistencia no solo hacia carbapenémicos, también hacia otros betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos) y otras familias de antibióticos como los aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas, incluidos en el panel de identificación. Es interesante notar que prácticamente todas estas bacterias productoras de carbapenemasas, presentan resistencia hacia al menos un miembro de los antibióticos mencionados.

Lo anterior se debe a que las carbapenemasas de clase A (como KPC) y de clase B (como VIM, NDM e IMP), alteran el mecanismo de acción de una cantidad importante de antibióticos. Las de clase A, además de hidrolizar carbapenémicos, también ejercen acción frente a otros betalactámicos, como las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos (6), también existen estudios que demuestran que cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas (principalmente KPC), se caracterizan por ser resistentes a aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas (30), todo esto mediante mecanismos que difieren a la producción de carbapenemasas. Por ejemplo, en bacterias la familia *Enterobacteriaceae*, la resistencia a quinolonas generalmente es mediada por mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa y la topoisomerasa IV, y en *E. coli*, la transferencia de un plásmido le permite la producción de bombas de eflujo que expulsan a estos antibióticos (31). En *P. aeruginosa*, la baja permeabilidad de su membrana externa

se asocia como el elemento clave para explicar la resistencia intrínseca hacia una diversidad importante de antibióticos. La permeabilidad para compuestos hidrofílicos es tan solo del 1-8% en comparación con la observada con *E. coli*. Asimismo, en los últimos años se ha demostrado que la capacidad de *P. aeruginosa* para eliminar antibióticos que penetran en la misma, empleando para ello sistemas activos de expulsión, incluso es más importante que la baja permeabilidad de su membrana externa. En la gran mayoría de los casos, la resistencia a carbapenémicos en este patógeno se debe a la combinación de la producción de AmpC y de la pérdida de la porina OprD (32).

También, las metalo- β -lactamasas (VIM, NDM, IMP), se caracterizan por generar resistencia a otros betalactámicos, como las cefalosporinas así como a aminoglucósidos y quinolonas, y presentan sensibilidad variable a aztreonam (15). La selección de muestras con resistencia a carbapenémicos (imipenem o meropenem) a partir de los resultados emitidos por el MicroScan, representó el primer criterio de selección de cepas bacterianas con posible presencia de carbapenemasas, esto último, de máxima importancia, debido a que la prueba fenotípica a la que someteríamos las muestras (Carba NP Test) tiene como fundamento la hidrólisis *in vitro* de un carbapenémico mediado por la acción de estas enzimas.

El Carba NP Test resultó ser una herramienta eficiente para la detección de cepas con presencia de genes asociados a la resistencia de carbapenémicos. Diversos estudios, como el publicado por Tijet et al. (33), así como el descrito por Nordmann et al. (34), demuestran la especificidad y sensibilidad que posee la técnica frente a la detección de cepas productoras de carbapenemasas. En su estudio, Tijet emplea un panel de aislamientos de diversas bacterias (de la familia *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*) con presencia de carbapenemasas como KPC, VIM, NDM, OXA-48, entre otros. Como resultado final, la autora reporta al test 100% sensible y específica para aislamientos de la familia *Enterobacteriaceae* y 100% específica y 94.4% sensible para aislamientos de *P. aeruginosa*. Por otro lado, Nordmann emplea para su estudio un panel de productores de

carbapenemasas compuesto por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *C. freundii*, concluyendo al final de su análisis, que la técnica muestra una excelente sensibilidad y especificidad en la detección de la presencia de estas enzimas (100% en ambos casos). Los resultados obtenidos en nuestra investigación, confirman lo publicado al encontrar en todas las muestras con resultado positivo al test, la presencia de un gen asociado a resistencia, teniendo entonces, una técnica 100% sensible y específica. Lo anterior sugiere la utilización de esta técnica en la detección rápida de microorganismos con resistencia a carbapenémicos, siempre y cuando se apoye en otras técnicas fenotípicas y moleculares. El Carba NP Test combina excelente sensibilidad, especificidad, bajo costo y tiempos de respuesta rápidos, sus desventajas son que a través de esta técnica, no pueden ser identificadas las carbapenemasas cuando dos o más tipos son producidos en la misma cepa, además no es posible detectar cepas cuya resistencia está asociada a mecanismos diferentes.

A pesar de haber empleado una técnica con una sensibilidad y especificidad alta, todas aquellas muestras con resultado positivo al Carba NP Test fueron sembradas en el medio cromogénico CHROMagar KPC, el cual fue empleado como prueba confirmatoria. Su fundamento, como ya se mencionó anteriormente, es la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de los microorganismos mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Los resultados, fueron los esperados, debido a que ninguna de las muestras fue inhibida por el carbapenémico adicionado al medio (imipenem) y además, las características fenotípicas de las colonias corresponden al microorganismo previamente identificado por el MicroScan, lo que sugiere su utilización en la detección rutinaria de bacterias con resistencia a carbapenémicos, pues entre las ventajas que presenta, se encuentran la fácil identificación por las tonalidades que toman las colonias bacterianas, los tiempos de obtención de resultados, así como el empleo directo de muestras procesadas de heces, orina, hisopos, etc., directamente en las placas del medio. Sin embargo, también presentan desventajas; algunas colonias con baja resistencia a carbapenémicos pueden tener dificultad para crecer y la

identificación definitiva requiere de pruebas adicionales como pruebas bioquímicas, inmunológicas o de detección molecular.

La realización de PCR resultó ser la prueba de identificación definitiva que nos permitió establecer qué tipo de carbapenemasa se encontraba presente en las cepas de estudio, pues a pesar de haber obtenido resultados positivos en el Carba NP Test y en el CHROMagar, estos últimos no indican el tipo de enzima que provoca la resistencia bacteriana. Al realizar PCR a las 20 muestras, se determinó la presencia de cuatro enzimas: KPC, VIM, NDM e IMP, obteniendo al final del análisis, la detección de tan solo una enzima por cada cepa estudiada.

El análisis molecular de las cepas de estudio, mostró la presencia de genes asociados a resistencia de 4 tipos: KPC (9 presentes en *K. pneumoniae*, 1 en *P. aeruginosa* y 1 en *E. coli*); NDM (presente en 1 cepa de *A. haemolyticus* y 1 de *K. pneumoniae*); VIM (presente en 2 cepas de *P. aeruginosa* y 1 en *E. coli*) e IMP (presente en 3 cepas de *A. baumannii* y 1 de *P. aeruginosa*). Los resultados indican una clara diseminación de estas enzimas en diversos géneros y especies bacterianas en un periodo corto de tiempo. Recientemente en 2013, una publicación de Rodríguez-Zulueta et. al (35) reportó el primer brote de *K. pneumoniae* productora de KPC en el hospital donde se realizó este trabajo, la detección se llevó a cabo en muestras provenientes de diversas fuentes, por ejemplo, tracto respiratorio, fluidos biológicos, sangre, heridas quirúrgicas, entre otras. En dicho estudio, el gen fue localizado sólo en una especie bacteriana, caso contrario a lo que sucedió en esta investigación, pues no solo fue encontrada en cepas de *K. pneumoniae*, sino también en cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*. Esta situación se ha presentado en otros países del continente Americano; por ejemplo, en Brasil, hasta la fecha han sido localizadas cepas de *K. pneumoniae* (la gran mayoría encontrada en esta especie bacteriana), *E. cloacae*, *S. marcescens*, *E. coli* y *C. freundii* productoras de KPC-2, todas estas, a partir de muestras de diversos hospitales del país (36); Argentina es otro país en donde los reportes se han hecho presentes, hasta el momento, se ha detectado la presencia de KPC-2 en enterobacterias en al menos 24 centros hospitalarios, de los cuales, en 86% de

los casos, se presenta *K. pneumoniae* como el principal microorganismo aislado seguido de *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens* y *E. cloacae* (37). En 2006, Colombia presentó un reporte en donde detalla el hallazgo de dos cepas con presencia de carbapenemasas del tipo KPC-2, éstas aisladas de pacientes y lugares geográficos distintos, pero ambas en el mismo patógeno: *K. pneumoniae* (38). Sin embargo, no fue el único reporte de KPC en este país: en 2008 la alerta se volvió hacer presente, cuando, tras una operación de una persona de origen israelí, la variante KPC-3 fue hallada en *K. pneumoniae* obtenida de diversos pacientes (39). En 2014, se emitió otro reporte, en donde se realiza un estudio de 3 años (de 2008 a 2011), concluyendo que la variante KPC-3 resultó ser el mecanismo de resistencia a carbapenémicos más frecuente entre los aislamientos estudiados, situación que no es usual en países de América, pero sí en Europa y Asia, donde se ha asociado principalmente con pacientes que viajaron a zonas endémicas (40). En 2014, Uruguay informó los primeros hallazgos de KPC-2 presentes en *K. pneumoniae*, situación que orilló a las autoridades sanitarias a reforzar las medidas de control e higiene para evitar la propagación a niveles mayores (41), asimismo, Paraguay ha dado a conocer los resultados de un estudio realizado en diversos hospitales de la región, estos indican la diseminación de esta enzima en bacterias como *E. cloacae*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* (42). Canadá también ha reportado la presencia de enzimas KPC en diversas especies bacterianas: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *R. ornithinolytica* y *C. freundii*, en el periodo de 2008 a 2011(43). Estados Unidos no es la excepción de casos reportados de esta enzima. A raíz del primer hallazgo de *K. pneumoniae* productora de KPC en 1996 (Carolina del Norte) y el brote de KPC en Nueva York (2002), se ha diseminado esta enzima (en sus variantes KPC-2 y KPC-3) en 37 estados, apareciendo en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, entre otros (44).

Al igual que en este trabajo de investigación, diversas publicaciones alrededor del mundo advierten la presencia de KPC en géneros y especies bacterianos distintos, esto es de esperarse cuando se sabe que dicha enzima a diferencia de otras del mismo tipo (NMC, IMI y SME), se encuentran codificadas en elementos móviles

como los plásmidos (45), característica que permite una rápida y eficiente diseminación entre especies bacterianas.

Para el caso de las metalo- β -lactamasas, el panorama luce similar, esta clase de enzimas se ha caracterizado por estar codificadas tanto en plásmidos e integrones así como en el cromosoma y su detección se ha realizado en múltiples microorganismos de géneros y especies diferentes alrededor del mundo. Esto puede explicar el hecho de haberlas localizado en una variedad importante de microorganismos: IMP en *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*; NDM en *A. haemolyticus* y *K. pneumoniae* y VIM en *E. coli* y *P. aeruginosa*. Los reportes en México son más conocidos; un hallazgo importante fue la descripción de una metalo- β -lactamasa de tipo VIM-2 localizada en un integrón en las enterobacterias *E. cloacae* y en *K. oxytoca*, y una VIM-23 en *E. cloacae* encontradas en Guadalajara, al occidente del país (23). Más recientemente hubo dos hallazgos importantes: la detección en un brote en un hospital de la Ciudad de México de la primera KPC-3 en *K. pneumoniae* y la primera NDM-1 aislada en *Providencia rettgeri* en Monterrey (23). En 2008, una publicación emitida por Garza-Ramos et. al (24), detalla el hallazgo de una carbapenemasa IMP de la variante IMP-15 en cepas de *P. aeruginosa*, a partir de especímenes recuperados de un hospital en Guadalajara. En ese mismo año, un reporte de Morfín-Otero et. al (26) señala la presencia de metalo- β -lactamasas VIM-2 e IMP-15 en cepas de *P. aeruginosa*, estas últimas, recolectadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). En esta misma especie bacteriana, se han detectado IMP-15 y IMP-18, y producción simultánea de diferentes tipos de BLEE, incluida la GES-5 en asociación con VIM-2 y VIM-11 en distintos casos reportados.

Pese a todos los resultados antes descritos, a nivel nacional no se había detectado la presencia de NDM en cepas de *K. pneumoniae* o en *A. haemolyticus*, por lo que los resultados mostrados en este trabajo, corresponden a los primeros de su tipo en el México.

A nivel continente, recientemente ha llamado la atención el surgimiento de carbapenemasas del tipo NDM y ante tal situación, desde 2011, la OMS/OPS ha

emitido alertas debido a la aparición de esta carbapenemasa en cepas de *K. pneumoniae* en Guatemala (46), los hallazgos continuaron, y en junio de 2012, Uruguay informó sobre tres pacientes hospitalizados por *P. rettgeri* portadora de NDM. En el mismo año, en Colombia se reportó un brote de *K. pneumoniae* con NDM y en Paraguay, se aisló a *A. baumannii* con esta enzima en pacientes hospitalizados en nosocomios de la región. Los últimos reportes que se tienen, son los que informan de la transmisión de *K. pneumoniae* con presencia de NDM en hospitales de Canadá (47), en Argentina se presenta en *P. rettgeri*, en Honduras en *A. baumannii*, en Nicaragua en *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae* y en Costa Rica en *E. coli* (48). Cabe mencionar que nuestro país, a través del Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos, en el cual participa el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, informa todos los hallazgos surgidos en materia de epidemiología con el objetivo de alertar y proveer de la información necesaria a otras naciones para prevenir y detectar la presencia de diversos tipos de carbapenemasas y así evitar su propagación a niveles mayores. Todo esto se realiza a través de boletines de alerta, diseño de métodos de diagnóstico, capacitación de profesionales y líneas de investigación enfocadas principalmente a la resistencia microbiana, los cuales son difundidos a los diferentes organismos del sector salud.

Tan solo 20 muestras, correspondientes al 11%, de un total de las 182 analizadas, fueron confirmadas con presencia de un gen asociado a resistencia. Lo que indica que las 162 muestras restantes, presentan un fenotipo de resistencia a carbapenémicos, diferente a la producción de carbapenemasas, el cuál es detectado por el sistema automatizado MicroScan. Los mecanismos implicados pueden ser diversos; desde activación de bombas de eflujo, aumento en la permeabilidad combinado con la presencia de una carbapenemasa de tipo AmpC, este fenómeno ocurre cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, por lo que la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplásmico permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se genere resistencia a los carbapenémicos, o la presencia de carbapenemasas para los cuales, el

Carba NP Test, no está diseñado. Sin embargo, para confirmar dichas hipótesis, deben generarse nuevos estudios ya que con la metodología empleada, no pueden ser detectados estos mecanismos. Asimismo, es necesario secuenciar los genes localizados para poder definir la variante y así ubicar el gen específico encontrado a nivel mundial. La realización de la PCR a una muestra significativa del total de cepas negativas al Carba NP Test (10 muestras), mostraron la ausencia de genes que codifican para las carbapenemasas en estudio (KPC, NDM, VIM e IMP), lo que nos confirma dos cosas, la primera es que la técnica ejecutada muestra especificidad y sensibilidad para la detección de estas enzimas, aunque un resultado confirmatorio se obtendría con el análisis del total de cepas (162 cepas) y la segunda es que la resistencia a carbapenémicos se encuentra asociada a otros mecanismos, como ya se había planteado anteriormente.

El inicio de tratamientos inadecuados, la falta de actualización de los mismos y un trato inapropiado de los pacientes por parte del personal médico, pueden considerarse factores predisponentes que originan la propagación de los microorganismos con estas enzimas en el ambiente hospitalario. Aunado a esto, la migración y el movimiento de personas alrededor del planeta, ocasiona que las bacterias portadoras de dichas enzimas, extiendan su dominio, llegando a una diversidad enorme de países y microorganismos. Es fundamental establecer políticas que permitan el desarrollo y fortalecimiento de programas de vigilancia asociados a la resistencia bacteriana en centros de atención pública (hospitales, centros de salud, etc.), que incluyan aspectos como la estandarización de técnicas para la detección y confirmación de cepas resistentes, así como la optimización de los procesos y flujos de información que deben seguir los laboratorios de referencia. También es necesario implementar estrategias en la población hospitalaria que sean efectivas y enfocadas en disminuir la incidencia de bacterias multirresistentes: higiene del personal médico, precauciones de aislamiento, desinfección de áreas, prescripción adecuada de antibióticos, entre otros temas.

9. CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de técnicas de detección fenotípica y biología molecular, se logró la identificación de bacterias con resistencia a carbapenémicos en muestras de origen nosocomial.

A través del sistema automatizado MicroScan, el 11% de las bacterias identificadas como resistentes a carbapenémicos, fueron asociadas con la presencia de carbapenemasas del tipo KPC, VIM, NDM e IMP, como responsables de ocasionar dicha resistencia.

El mecanismo de resistencia para el 89% de las cepas restantes, puede estar asociado con la presencia de otro tipo de carbapenemasas, no detectadas en este trabajo, o a la activación de un mecanismo que difiere a la producción de enzimas, como activación de bombas de eflujo o la deficiencia de porinas.

Se logró detectar la presencia de la metalo- β -lactamasa NDM en *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter haemolyticus*, que representan los primeros casos reportados a nivel nacional.

El Carba NP Test es una técnica sensible y específica, que al complementarla con otras pruebas como el CHROMagar KPC, representa una herramienta confiable para la detección rápida de bacterias con presencia de carbapenemasas.

Las carbapenemasas del tipo KPC, VIM, NDM e IMP son encontradas principalmente en plásmidos, lo cual facilita que su diseminación se lleve a cabo en diversos géneros y especies bacterianas

10. PERSPECTIVAS

Amplificar el gen completo de cada tipo de carbapenemasa y secuenciarlos para determinar la variante a la que pertenecen.

Determinar en qué tipo de plásmido se localizan los genes encontrados. En este sentido, se podrá identificar en qué tipo de elemento genético móvil se encuentran localizados las carbapenemasas KPC, VIM, NDM e IMP presentes en las cepas de trabajo.

Mediante la realización de otro tipo de estudios, determinar el mecanismo de resistencia asociado en las 162 muestras negativas al Carba NP Test, las cuales difieren de la producción de carbapenemasas KPC, VIM, NDM e IMP.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Seija V. y Vignoli R. 2006. Temas de bacteriología y virología médica. Oficina del libro FEFMUR. 2a edición: 649-662.
- 2.- Suarez C. y Gudiol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 27(2): 116-129.
- 3.- Stainer R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P. Microbiología. Segunda edición. Editorial Reverte. Barcelona, España. 1992: 150-153.
- 4.- Calvo J. y Martínez L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 27(1): 44-52.
- 5.- Fresnadillo M., García M., García E. y García J. 2010. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 28 (Supl. 2): 53-64.
- 6.- Moreno K. 2013. Carbapenémicos: Tipos y Mecanismos de Resistencia Bacterianos. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX (608): 599-605.
- 7.- Gómez C., Leal A., Pérez M. y Navarrete M. 2005. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia 53(1): 27-34
- 8.- Abbott I., Cerqueira G., Bhuiyan S. and Peleg A. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. 2013. Expert Reviews Anti-infective Therapy 11(4): 395-409.
- 9.- Wozniak A., Villagra N., Undabarrena A., Gallardo N., Keller N., Moraga M., Román J., Mora G. and Garcia P. 2012. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. Journal of Medical Microbiology 61: 1270-1279.
- 10.- Rodloff A., Goldstein E. and Torres A. 2006. Two decades of imipenem therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 58: 916-929.

- 11.- Food and Drug Administration. 2006. PRIMAXIN I.V. [Fecha de consulta: 16 de febrero de 2015]. Disponible desde Internet: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050587s065,050630s028lbl.pdf>.
- 12.- Food and Drug Administration. 2006. Merrem I.V. [Fecha de consulta: 16 de febrero de 2015]. Disponible desde Internet: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050706s022lbl.pdf>.
- 13.- Food and Drug Administration. 2007. Doribax. [Fecha de consulta: 16 de febrero de 2015]. Disponible desde Internet: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/022106s012lbl.pdf>.
- 14.- Food and Drug Administration. 2004. INVANZ (Ertapenem for injection). [Fecha de consulta: 16 de febrero de 2015]. Disponible desde Internet: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/021337s018lbl.pdf>.
- 15.- Suarez C., Kattán J., Guzmán A. y Villegas M. 2006. Artículo de Revisión: Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Infectio. Revista de la asociación colombiana de infectología 10 (2): 85-93.
- 16.- Rao S. 2012. Extended spectrum beta-lactamases. Department of Microbiology JJM Medical College. 34p.
- 17.- Calvo J., Cantón R., Fernández F., Mirelis B. y Navarro F. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica. 34p.
- 18.- Queenan A. and Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile b-Lactamases. Clinical Microbiology Reviews 20 (3): 440-458.
- 19.- Hammoudi D., Moubareck C. and Sarkis D. 2014. Review: How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. Journal of Microbiological Methods 107 (2014): 106-118.

- 20.- Datta S. and Wattal C. 2010. Carbapenemase producing Gram negative bacteria in tertiary health care setting: therapeutic challenges. *Journal International Medical Sciences Academy* 23(1): 17-20.
- 21.- Dortet L., Poirel L. and Nordmann P. 2012. Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. By Using a Biochemical Test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (12): 6437-6440.
- 22.- Casellas J. 2011. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública* 30 (6): 519- 528.
- 23.- Rodríguez E., León G., Petersen S., Pérez H., González E y Morfín R. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica* 2014; 34(Supl. 1): 181-190.
- 24.- Garza E., Martín J., Bosques F. and Gonzalez G. 2010. Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Mexico: Special Focus on *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Chemotherapy* 2010; 56: 275-279.
- 25.- Garza U., Morfin R., Sader H., Jones R., Hernández E., Rodríguez E., Sánchez A., Carrillo B., Esparza S. and Silva J. 2008. Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-15} in Class 1 Integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(8): 2493-2946.
- 26.- Morfín R., Alcántar M., Rocha M., Alpuche C., Santos J., Gayosso C., Araiza J., Flores M., Esparza S., González E., Pérez H. y Rodríguez E. 2013. *Acinetobacter baumannii* Infections in a Tertiary Care Hospital in Mexico over the Past 13 Years. *Journal of Chemotherapy* 59: 57-65.
- 27.- Nordmann P. and Poirel L. Protocole: Rapid detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: The Carba NP (Nordmann-Poirel) test using bacterial colonies.

- 28.- Poirel L., Walsh TR.,Cuvillier V., Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (1): 119-123.
- 29.- Sang S., Kyeongmi K., Ji Y.,Bochan J., Myung S. and Seong G. 2012. Multiplex PCR for Rapid Detection of Genes Encoding Class A Carbapenemases. *Annals of Laboratory Medicine* 32: 359-361.
- 30.- Bradford P., Bratu S., Urban C., Visalli M., Mariano N., Landman D., Rahal J., Brooks S., Cebular S. and Quale J. 2004. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases* 39: 55-60.
- 31.- Endimiani A., Carias L., Hujer A., Bethel C., Hujer K., Perez F., Hutton R., Fox W., Hall G., Jacobs M., Paterson D., Rice L., Jenkins S., Tenover F. and Bonomo R. 2008. Presence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Possesing bla_{KPC} in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(7): 2680-2682.
- 32.- Martínez L., Pascual A. Mecanismos de Resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Universitario Virgen Macarena. Universidad de Sevilla. Control de Calidad SEIMC. 9p.
- 33.- Tijet N., Boyd D., Patel S., Mulvey M. and Melano R. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 57(9): 4578-4580.
- 34.- Dortet L., Poirel L. and Nordmann P. 2012. Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. By Using a Biochemical Test. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 56(12): 6437-6440.

- 35.- Rodríguez P., Silva J., Barrio H., Reyes J., Vélez F., Arroyo S., Ochoa L., Delgado G., Morales M., Tamayo E., Hernández R. and Garza U. 2013. First Outbreak of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) Clinical Isolates in a Mexican Medical Center. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 57(8): 4086-4088.
- 36.- Neves L., Curiao T., Ferreira J., Mucedola J., Carneiro E., Martinez R., Bellissimo F., Basile A., Evaristo M., Del Peloso P., Bley V., Barth L., Paula M., Baquero F. and Cantón R. 2011. Dissemination of bla_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(7): 3579-3583.
- 37.- Pasteran F., Corso A. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. 2010. Alerta: Diseminación de KPC en Argentina. 4p.
- 38.- Villegas M., Lolans K., Correa A., Suarez C., López J., Vallejo M., Quinn J. and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2006. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2880-2882.
- 39.- López J., Correa A., Navon-Venezia S., Correa A.L., Torres J., Briceño D., Montealegre M., Quinn J., Carmeli Y. and Villegas M. 2011. Intercontinental spread from Israel to Colombia of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clinical Microbiology and Infection* 17 (1): 52-56.
- 40.- Rodríguez E., Saavedra S., Leal A., Álvarez C., Olarte N., Valderrama A., Cuervo S. y Escobar J. 2014. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica* 34(1): 224-231.

- 41.- Márquez C., Ingold A., Echeverría N., Acevedo A., Vignoli R., García-Fulgueiras V., Viroga J., González O., Odizzio V., Etulain K., Nuñez E., Albornoz H., Borthagaray and Galiana A. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. 2014. *News Microbes and News Infections*. 2: 58-63.
- 42.- Melgarejo N., Martínez M., Rossana F. y Falcón M. 2013. Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Revista Salud Pública Paraguay* 3(1): 30-35.
- 43.- Tijet N., Sheth P., Lastovetska O., Chung C., Patel and Melano R. 2014. Molecular Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada, 2008-2011.
- 44.- Lee G. 2012. Epidemiology and treatment of KPC.s... what's the news?. *Pharmacotherapy Rounds* 2012. 22p.
- 45.- Diene S. and Rolain J. 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*. 20: 831-838.
- 46.- Organización Panamericana de la Salud. 2011. Alerta epidemiológica: primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM) en Latinoamérica. 5p.
- 47.- Organización Panamericana de la Salud. 2012. Alerta epidemiológica: Transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. 3p.
- 48.- Organización Panamericana de la Salud. 2014. Alerta epidemiológica: Carbapenemasas tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM). 3p.