



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN MUESTRAS DE
PACIENTES PERTENECIENTES AL INSTITUTO NACIONAL
DE CANCEROLOGÍA**

T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL:
GRADO DE ESPECIALISTA**

**EN:
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PRESENTA:
ANA LAURA CASTELLANOS MEJÍA**

**TUTORA:
M. EN F. MARÍA DEL CONSUELO VELÁZQUEZ ACOSTA**

CIUDAD DE MÉXICO, 2023





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: Dra. Marta Menjívar Iraheta

Vocal: M en C Luis Manuel Perea Mejía

Secretario: Dra. Barbara Itzel Peña Espinoza

1er. Suplente: Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez

2do. Suplente: Dra. Verónica Viñuela Berni

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Microbiología.

Asesor del tema: _____

M. en F. María del Consuelo Velázquez Acosta

Sustentante: _____

Lic. Ana Laura Castellanos Mejía

Índice de abreviaturas

Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Método modificado de inhibición de carbapenémicos (mMIC)

Concentración mínima inhibitoria (MIC)

Proteínas fijadoras de penicilina (PFP)

Organización Panamericana de la Salud (OPS)

Multidrogo resistencia (MDR)

Resistencia extendida (XDR)

Panresistencia (PDR)

Prueba de Hodge modificada (MHT)

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Ácido ribonucleico (ARN)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Tetrazolio nitroazul y 5-bromo-4 -cloro-3-indolfosfato (NBT-BCIP)

Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)

Infecciones del tracto urinario (ITU)

Resumen

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial. La OMS estima que para el año 2050 los antibióticos no surtirán efecto dados los mecanismos de resistencia que habrán desarrollado las bacterias. Los carbapenémicos son un grupo de antibióticos de amplio espectro y de última generación, su prescripción estaba reservada a pacientes que presentaban infecciones por patógenos productores de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), sin embargo, su uso indiscriminado dio origen al desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia a estos antibióticos, por ejemplo; la producción de enzimas hidrolíticas conocidas como carbapenemasas.

La detección oportuna de organismos resistentes permite al personal médico cambiar esquemas de antibioterapia, así como ejecutar los protocolos para evitar la propagación de la cepa. Por estas razones y tomando en cuenta las metodologías disponibles en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), en el presente trabajo se realizó la identificación de organismos productores de carbapenemasas mediante la prueba Carba NP, el método modificado de Inactivación del Carbapenémico y PCR-Hibridación, de tal forma que se correlacionaron los resultados obtenidos y se describieron las frecuencias encontradas.

Fueron analizadas 58 cepas aisladas en muestras de pacientes, *E. coli* fue el patógeno con mayor número de aislamientos reportados, el tipo de carbapenemasa NDM fue el que prevaleció en las cepas. A su vez fueron detectadas dos clonas con la combinación de 2 carbapenemasas; una tipo NDM y otra tipo OXA 48.

La correlación entre las metodologías Carba NP y PCR-Hibridación fue de 98%, a su vez el método de inactivación mostró un 100% de concordancia con el de PCR-Hibridación.

Índice

Índice de abreviaturas

Resumen

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Justificación.....	3
1.3 Hipótesis	3
2. Fundamento teórico.....	3
2.1 Antibióticos.....	3
2.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos	4
2.2 Resistencia a antibióticos.....	4
2.2.1 Mecanismos de resistencia.....	6
2.2.2 Betalactamasas	7
2.2.3 Carbapenemasas.....	8
2.4 Métodos de detección de carbapenemasas.....	11
2.4.1 Pruebas de resistencia ante antibiótico	11
2.4.2 Pruebas enzimáticas basadas en hidrólisis	11
2.4.3 Ensayos inmunocromatográficos.....	12
2.4.4 Pruebas moleculares	12
2.4.5 Hibridación.....	12
3. Objetivos	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
4. Diseño metodológico	14
4.1 Tipo de estudio.....	14
4.2 Área de estudio	14
4.3 Muestras	14
4.4 Aspectos éticos	14
4.5 Criterios de inclusión y exclusión	14
4.5.1 Criterios de inclusión.....	14
4.4.2 Criterios de exclusión.....	15

4.6 Proceso	15
4.7 Plan de tabulación y análisis	17
5. Resultados	18
6. Discusión.....	22
7. Conclusiones.....	24
8. Anexos	25
Anexo 1.- Flujo de trabajo para la identificación y caracterización de la resistencia microbiana.....	25
Anexo 2.- Técnica Kirby-Bauer o difusión en placa.....	26
Anexo 3.- Método modificado de inactivación a carbapenémicos.....	27
Anexo 4.- Prueba Carba NP.....	28
Anexo 5.- Prueba PCR-Hibridación.....	30
Bibliografía	33

1. Introducción

Los antibióticos son fármacos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas (Organización Mundial de la Salud, 2023). Existe una gran gama de antibióticos, desde los betalactámicos como la penicilina que fue el primer antibiótico descubierto hasta los antibióticos de amplio espectro como los carbapenémicos.

Una de las necesidades importantes por las cuales se siguen desarrollando antibióticos es la resistencia microbiana cuyo aumento representa un problema de salud público a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2022). Dicha resistencia representa un reto en el quehacer diario del personal de la salud, particularmente para los médicos y químicos de laboratorio clínico, los primeros en el manejo del paciente y los segundos en el apoyo para brindar herramientas que permitan una buena elección del tratamiento farmacológico que puede ser prescrito.

Dado el papel que desarrolla el laboratorio clínico, se vuelve de vital importancia contar con métodos que permitan llevar a cabo de manera rápida y eficiente la identificación de patógenos resistentes, por lo que en este trabajo se correlacionó el desempeño de tres métodos para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas; Carba NP, método modificado de inhibición de carbapenémicos (mMIC) y PCR múltiple e hibridación reversa. (Jiménez Pearson, y otros, 2019)

1.1 Antecedentes

Las infecciones por patógenos fármaco resistentes cobran la vida de aproximadamente 700 000 personas al año según un comunicado de 2019 de la OMS y proyecta que para el año 2050 podrían ser cerca de 10 millones de defunciones al año. El diagnóstico certero y rápido de bacterias fármaco-resistentes no sólo impacta en la pronta atención al paciente que cursa con la enfermedad, sino también representa disminución en gastos para la institución que le brinda atención, así como la oportunidad de ser aislado y prevenir la diseminación del microorganismo. (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2022)

La resistencia a antibióticos es la capacidad heredada de los microorganismos para crecer en altas concentraciones de antibiótico. Dicha resistencia se cuantifica midiendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un antibiótico en el que las bacterias resistentes pueden desarrollarse en concentraciones nocivas para otras cepas de la misma especie. La causa de la resistencia puede ser intrínseca debido a la ausencia o presencia de estructuras que provocan la ineficacia de los antibióticos, por otra parte, las bacterias pueden ser resistentes por mutaciones o a través de la transferencia de material genético. (Huemer, Mairpady Shambat S, Brugger, & Zinkerna, 2020)

Los carbapenémicos pertenecen al grupo de antibióticos denominado β -lactámicos, se les considera fármacos de última elección para el tratamiento de patógenos multi resistentes. Existen diferentes mecanismos de resistencia para los carbapenémicos, uno de ellos es la producción de enzimas carbapenemasas, que hidrolizan el antibiótico y por ende se inactiva. (Yu Lin, Hsien Meng, Ing Moi , & Po Ren, 2022)

Las técnicas para el diagnóstico por parte del laboratorio de microbiología han ido evolucionando rápidamente y aunque la identificación más exacta de microorganismos productores de carbapenemasas se basa en métodos moleculares hay que destacar que no todos los laboratorios cuentan con los recursos necesarios para poder llevarla a cabo, es por ello que se vuelve necesario contar con otros métodos que no

representen un gasto tan elevado y que permitan obtener resultados confiables. Ejemplo de ello es el método modificado de inactivación del carbapenem y los ensayos enzimáticos como la prueba Carba NP.

1.2 Justificación

Ante el creciente número de aislamientos de microorganismos productores de carbapenemasas el laboratorio de microbiología del INCAN con la finalidad de emitir resultados rápidos y confiables lleva a cabo diferentes metodologías para la identificación de estas cepas, por lo cual se tiene la necesidad de correlacionar los resultados de estas pruebas.

1.3 Hipótesis

Al analizar el mismo grupo de cepas productoras de carbapenemasas mediante la prueba Carba NP, método modificado de inactivación de carbapenem y PCR hibridación se encontrará una alta correlación en los resultados para la detección de estas enzimas.

2. Fundamento teórico

2.1 Antibióticos

Los antibióticos están definidos por la OMS como medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2022). Existen diferentes tipos de antibióticos y son clasificados por familias de acuerdo al mecanismo de acción contra las bacterias.

2.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos

Tabla 1.- Antibióticos y su mecanismo de acción.

Antibiótico	Mecanismo de acción
Aminoglucósidos	Se unen a la subunidad 30 de los ribosomas.
Anfenícolos	Se unen a la fracción 50S de los ribosomas bacterianos interfiriendo la síntesis proteica.
Betalactámicos	Se unen covalentemente a las proteínas fijadoras de penicilina (PFP) de la membrana citoplasmática bacteriana, que son enzimas que fabrican peptidoglicano.
Glicopéptidos	Interfieren en la síntesis de peptidoglicano.
Lincosamidas	Se unen a la fracción 50S de los ribosomas bacterianos interfiriendo la síntesis proteica.
Macrólidos	Se unen a la fracción 50S de los ribosomas bacterianos interfiriendo la síntesis proteica.
Nitroimidazoles	Entran por difusión pasiva al citoplasma bacteriano, donde generan un producto intermedio reducido que induce daño oxidativo en las cadenas de ADN.
Oxazolidinona	Se unen a la fracción 50S de los ribosomas bacterianos interfiriendo la síntesis proteica.
Quinolonas	Inhibe selectivamente la ADN-girasa.
Rifamicinas	Unión a la subunidad β de la ARN-polimerasa.
Sulfonamidas	Inhiben síntesis de ácido fólico.
Tetraciclinas	Se unen a la subunidad 30S del ribosoma.

2.2 Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos o RAM es un proceso de adaptación que se desarrolla a lo largo del tiempo como respuesta biológica por parte de los microorganismos (bacterias, hongos, parásitos) lo que produce menor respuesta a los medicamentos y se dificulta el tratamiento de las infecciones.

En el caso particular de las bacterias la Organización Panamericana de la Salud (OPS) hasta el año 2021 había establecido géneros que representaban un mayor riesgo para la salud de acuerdo con los siguientes criterios:

- Grado de letalidad de las infecciones que provocan.
- Necesidad y tiempo de hospitalización requerida para proporcionar el tratamiento necesario.

- Frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes.
- Facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas.
- Si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y vacunación)
- Opciones terapéuticas aún utilizables para tratar la infección y si se encuentra en desarrollo algún nuevo antibiótico contra el microorganismo.

Con base en los criterios descritos se originaron tres grupos con diferentes niveles de prioridad con base en el tipo de paciente que es afectado y el lugar en donde se adquiere la infección (OPS, Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Tabla 2.- Microorganismos de prioridad en el diagnóstico y control según la OPS.

Prioridad 1: Crítica	
Microorganismo	Resistencia
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
Enterobacterales	Carbapenémicos
Prioridad 2: Elevada	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter spp</i>	Fluoroquinolonas
<i>Salmonella spp</i>	Fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas y fluoroquinolonas
Prioridad 3: Media	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolonas

La resistencia puede presentarse a uno o varios antibióticos, de tal manera se tienen tres diferentes conceptos para definir la resistencia:

- Multidrogo resistencia (MDR, del inglés multidrug-resistance): el aislamiento bacteriano es resistente a por lo menos tres antibióticos.
- Resistencia extendida (XDR, del inglés extensively drug-resistance): el aislamiento bacteriano es resistente a todos los grupos de antibióticos excepto a uno o dos de ellos; es decir, se mantiene sensible o indeterminado solo a uno o dos grupos de antibióticos.
- Panresistencia (PDR, del inglés pandrug-resistance): el aislamiento bacteriano es resistente a todos los antibióticos. (Jiménez Pearson, y otros, 2019)

2.2.1 Mecanismos de resistencia

Se han identificado cuatro mecanismos mediante los cuales las bacterias presentan resistencia a los antibióticos:

- Alteración del sitio de acción: consiste en la modificación del sitio que es sensible al antibiótico, puede ser mediante metilación del sitio de acción, mutación en las proteínas blanco o genes que codifican para proteínas alternativas que son menos afines al antibiótico. (Ali Abushaheen, y otros, 2020)
- Bombas de eflujo: las bombas de eflujo o bombas de expulsión son sistemas dependientes de ATP que se encuentran en la membrana citoplasmática bacteriana y son utilizadas por la bacteria como medio de excreción de desechos de su metabolismo (Lirola Andreu, Ávila Jiménez, Fernández Mariscal, Reinoso Espín, & Martínez Martínez, 2022). El incremento de la presencia de bombas de eflujo, permite disminuir los niveles intracelulares del antibiótico (Ali Abushaheen, y otros, 2020).
- Reducción en la permeabilidad de la membrana: la membrana externa de las bacterias representa una de las primeras barreras de defensa contra los

antibióticos, en éstas se encuentran proteínas embebidas que forman canales que regulan el ingreso de elementos (como los antibióticos) a la célula, dichas proteínas son llamadas porinas (Tafur, Torres, & Villegas, 2008). La modificación o delección funcional de genes codificantes para porinas disminuye la entrada de antibiótico a la bacteria. (Ali Abushaheen, y otros, 2020)

- Producción de enzimas: las enzimas juegan un papel importante en la resistencia bacteriana, existen diferentes reacciones mediadas por enzimas como; hidrólisis (hidrolasas), transferencia de grupos funcionales (transferasas) y mecanismos Redox (Oxido-Reductasas). El grupo de transferasas es el más grande y diverso, cuya función de modificar covalentemente a los antibióticos no permite que se haga la unión de éste al sitio blanco. Las enzimas hidrolíticas son de gran importancia para el desarrollo de las bacterias, ejemplo de ello son las betalactamasas, enzimas que desdoblan el anillo lactámico, volviendo en compuestos biológicamente inactivos a antibióticos como penicilina, cefalosporina, monobactam y carbapenémicos (Mohanty, Pachpute, & Yadav, 2021).

2.2.2 Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas producidas por microorganismos Gram negativos como mecanismo de resistencia, estas enzimas escinden el enlace amida en el anillo beta-lactámico inactivando el antibiótico. (Rada, Hernández Gómez, Restrepo, & Villegas, 2018)

Existen dos clasificaciones para estas enzimas; la propuesta por Ambler las agrupa con base en la secuencia de aminoácidos en cuatro clases moleculares (A a D) (Rada, Hernández Gómez, Restrepo, & Villegas, 2018). Las clases A, C y D incluyen enzimas que hidrolizan sus sustratos mediante la formación de una enzima acilo a través de una serina en el sitio activo, mientras que las de clase B son metaloenzimas que

utilizan al menos un ion de zinc en el sitio activo para facilitar la hidrólisis de los betalactámicos. (Bush & Jacoby, 2010)

Por otro lado, la clasificación de Bush-Jacoby (2010) que es una modificación de la propuesta Bush (1995) tiene en cuenta los perfiles de sustrato e inhibidor en un intento de agrupar las enzimas de manera que puedan correlacionarse con su fenotipo en aislados clínicos. El sistema actualizado incluye cefalosporinasas del grupo 1 (clase C); grupo 2 (clases A y D) betalactamasas y serina carbapenemasas de amplio espectro, resistentes a los inhibidores y de espectro extendido; y metalo-betalactamasas del grupo 3 (Bush & Jacoby, 2010).

De entre todas las betalactamasas descritas hasta el momento (cerca de 1800) (Hussain, y otros, 2021), destacan por su interés e implicaciones clínicas las siguientes:

- 1) Betalactamasas de espectro extendido (enzimas tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA).
- 2) Betalactamasas resistentes a los inhibidores (enzimas tipo TEM y SHV).
- 3) Betalactamasas tipo AmpC (enzimas tipo LAT, MIR, CMY y FOX).
- 4) Carbapenemasas (enzimas tipo VIM IMP, IMI, KPC, NDM y OXA) (Calvo, Cantón, Fernández Cuenca , Mirelis, & Navarro, 2011)

2.2.3 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son un grupo específico de betalactamasas cuya acción hidrolítica es dirigida contra los carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem) (Werth, 2022) y en general contra los demás miembros de la familia de los betalactámicos. Este mecanismo fue descrito por primera vez en microorganismos Gram positivos como *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*, sin embargo, con el paso del tiempo se han ido describiendo microorganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia*

marcescens, y otros miembros de la familia de los *Enterobacteriales* en los que se identifica algún tipo de carbapenemasa (Hammoudi & Ayoub , 2020).

Para su clasificación se conservan los grupos propuestos por Ambler para las betalactamasas (Clase A, B, D), cabe destacar que hasta hace unos años ninguna enzima de la clase C había demostrado acción hidrolítica sobre carbapenémicos, recientemente algunos estudios han mostrado cierta afinidad por algunos miembros de la familia de los carbapenémicos como el imipenem (Hammoudi & Ayoub , 2020), sin embargo, no existe un consenso al respecto y únicamente se considera que su sobreproducción aunado a una menor permeabilidad de la membrana externa o sobreexpresión de la bomba de eflujo puede contribuir a la resistencia a estos antibióticos (Aurilio , y otros, 2022) , por lo que únicamente se considerarán las clases A, B y D.

- Clase A: las carbapenemasas de clase A pueden estar codificadas cromosómicamente como en el caso de la SME (*Serratia marcescens* enzyme) y NMC-A (no metalo-carbapenemasa tipo A), codificadas por plásmidos como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) o GES (betalactamasas de espectro extendido de Guyana) o ambas como la IMI (betalactamasa contra imipenem) (Aurilio , y otros, 2022).

Las carbapenemasas de clase A más importantes son las KPC y las GES codificadas por plásmidos. Las enzimas KPC se describieron inicialmente en *Klebsiella pneumoniae*, pero ahora se detectan en varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Los genes *bla_{KPC}* pueden transportarse en elementos genéticos móviles como los transposones y plásmidos (Moubareck & Halat, 2022)

- Clase B: el grupo está constituido por metalo beta lactamasas (MBL). Una de las más representativas es la codificada por el integrón de Verona (VIM), sin embargo, existen otras de igual relevancia en la clínica como la tipo *Pseudomonas* (IMP) y la MBL de Nueva Delhi (NDM). Estas enzimas se

expresan comúnmente a partir de elementos genéticos móviles, como integrones, plásmidos y transposones, razón por la cual se han propagado ampliamente entre las bacterias. (Hansen, 2021)

- Clase D: esta clase de carbapenemasas son denominadas OXA debido a su capacidad hidrolítica sobre la oxacilina, meticilina y cloxacilina. A pesar de que su actividad sobre los carbapenémicos es variable se le considera significativa dado que no son inhibidos por el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam (Moubareck & Halat, 2022). Las enzimas más representativas de este grupo son las pertenecientes a la clase tipo OXA-23, tipo OXA 24/40, tipo OXA-48, tipo OXA-58, tipo OXA-143 y tipo OXA-235 (Hammoudi & Ayoub , 2020).

Tabla 3.- Clasificación de carbapenemasas.

Grupo Ambler	Grupo Bush-Jacoby	Familia de enzimas	Enzima representativa
Grupo A	2f	NMC-A	NMC-A
		IMI	IMI 1-12
		KPC	Kpc 2-24
		GES	GES 1-27
		SME	SME
Grupo B	3	NDM	NDM 1-16
		IMP	IMP 1-52
		VIM	VIM 1-46
		GIM	GIM-1
		SIM	SIM-1
Grupo D	2df	Tipo OXA	OXA-23 OXA-24 OXA-40 OXA-58

			OXA-143 OXA-235 OXA-48
--	--	--	------------------------------

(Lirola-Andreu, Ávila-Jiménez, Fernandez Mariscal, Reinoso Espin, & Martinez Martinez, 2022)

2.4 Métodos de detección de carbapenemasas

Existen diferentes metodologías utilizadas en el laboratorio clínico para la detección de carbapenemasas, varían en su especificidad y costo, por lo que la elección del mejor método se vuelve de carácter multifactorial. Los métodos se pueden dividir de acuerdo con la tecnología de detección, de modo que existen las pruebas de resistencia ante el antibiótico, las enzimáticas basadas en hidrólisis, los ensayos inmunocromatográficos y las pruebas moleculares.

2.4.1 Pruebas de resistencia ante antibiótico

Existen algunas variantes dentro de este grupo de pruebas, se puede realizar el mCIM, pruebas de sinergia basadas en inhibidores, prueba de Hodge modificada (MHT) y la prueba indirecta de carbapenemasas.

El mCIM es una metodología recomendada por CLSI para el estudio de la producción de carbapenemasas en organismos resistentes. La prueba se fundamenta en la hidrólisis del carbapenémico al estar en contacto con la cepa problema, la metodología se describe en el anexo 3.

2.4.2 Pruebas enzimáticas basadas en hidrólisis

Estas pruebas son colorimétricas, se fundamentan en la presencia de la enzima carbapenemasa que hidrolizará al carbapenemico presente en la prueba, reacción que

será evidenciada por el cambio de color en el medio de reacción. Existen pruebas comerciales como la β -Carba o Carba NP, la metodología es descrita en el anexo 4.

2.4.3 Ensayos inmunocromatográficos

Se han desarrollado metodologías basadas en la captura inmunológica de epítomos utilizando partículas de oro coloidal en placas de nitrocelulosa. Dicha metodología se ha desarrollado únicamente para las carbapenemasas más comunes (KCP, NDM y OXA-48), algunos kits disponibles son OXA-48 KSeT y Corisbio. (Wareham & Abdul Momin, 2017)

2.4.4 Pruebas moleculares

Las pruebas moleculares se basan en la detección de material genético, ya sea ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) además de ser el método de referencia para caracterizar los genotipos de resistencia y virulencia. A diferencia de las pruebas bioquímicas que detectan la actividad de estas enzimas, las pruebas moleculares detectan la presencia de un gen específico.

2.4.5 Hibridación

La hibridación es una técnica empleada en el laboratorio con la finalidad de identificar una secuencia de ADN o ARN en una muestra biológica. Es una metodología donde se utiliza una sonda, la cual suele estar hecha de ADN o ARN. Una molécula de cadena sencilla con una porción química o radiactiva puede ser detectada; la zona de cadena sencilla es entonces hibridada, y ahí es cuando comienza el proceso llamado hibridación. Esta sonda se mezcla con la muestra, buscando que la zona de cadena sencilla se una justamente con el ARN o con el ADN que se está intentando localizar. Después se lava la sonda no unida, y se observa dónde se expresa el gen o se encuentra ese fragmento de ADN en la célula (National Human Genome Research

Institute, 2022). Dicha unión se puede marcar, la señal se visualiza mediante una reacción inmunoenzimática colorimétrica, en el caso del kit utilizado en este proyecto la reacción se lleva a cabo con Estreptavidina-Fosfatasa y un cromógeno (tetrazolio nitroazul y 5-bromo-4 -cloro-3-indolfosfato (NBT-BCIP)) que genera precipitados insolubles en la membrana en aquellas posiciones en las que ha habido hibridación (Master Diagnostica, 2018) La metodología se ha incluido en el anexo 4.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Aislar cepas resistentes a carbapenémicos y detectar la presencia de enzimas tipo carbapenemasa mediante el método de Carba NP, método modificado de inactivación del carbapenémico y PCR múltiple e hibridación para correlacionar los resultados obtenidos de las tres metodologías.

3.2 Objetivos particulares

- Aislar organismos resistentes a carbapenémicos en muestras de pacientes del INCAN.
- Realizar la prueba de Carba NP para las muestras que presenten microorganismos resistentes a carbapenémicos.
- Realizar la prueba de inactivación para las muestras que presenten microorganismos resistentes a carbapenémicos.
- Realizar la prueba de PCR múltiple e hibridación para las muestras que presenten microorganismos resistentes a carbapenémicos.
- Correlacionar los resultados obtenidos por las tres diferentes metodologías utilizadas.

4. Diseño metodológico

4.1 Tipo de estudio

Estudio observacional retrospectivo transversal.

4.2 Área de estudio

El estudio se realizó en el INCAN, hospital de tercer nivel que brinda atención diaria a pacientes de todas las entidades de la República Mexicana. Se localiza en Ciudad de México, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan.

4.3 Muestras

58 cepas resistentes a carbapenémicos obtenidas a partir de muestras de diferente origen biológico de los pacientes de la consulta externa y hospitalizados, mismas que fueron procesadas en el laboratorio de microbiología del INCAN.

4.4 Aspectos éticos

El estudio realizado forma parte del trabajo rutinario del laboratorio de microbiología del INCA, por lo que no fue necesario solicitar la aprobación del comité de ética del instituto.

4.5 Criterios de inclusión y exclusión

4.5.1 Criterios de inclusión

- 1.-Muestras microbiológicas de pacientes de la consulta externa y hospitalizados.
- 2.- Muestras que cumplieron los criterios de aceptación pre-analítica estipulados por el laboratorio de microbiología.
- 3.-Microorganismos con resultados de resistencia a carbapenémicos en el antibiograma procesado de manera automática.

4.-Microorganismos que puedan ser recuperados del cepario y cumplan el criterio número 3.

4.4.2 Criterios de exclusión

- 1.- Muestras que no contengan microorganismos con resistencia a carbapenémicos.
- 2.- Microorganismos que no se encuentren en el cepario y de los que no se cuenten con los resultados de las pruebas Carba NP, método modificado de inactivación la carbapenémico o PCR.

4.6 Proceso

El análisis de las muestras consta de tres etapas; preanalítica, analítica y postanalítica. La primera etapa inicia con la toma de muestra y culmina con la llegada de esta al laboratorio de microbiología, esta es la etapa más crítica e involucra al personal médico, enfermería y personal de recepción del laboratorio clínico. La toma y transporte de las muestras de pacientes de hospitalización se encuentra a cargo del personal médico y de enfermería del INCAN, por otra parte, las muestras de la consulta externa se encuentran a cargo del personal de laboratorio, en ambos casos el procedimiento de encuentra estipulado en el manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología.

Una vez que la muestra llega al área de recepción del laboratorio y cumple lo estipulado en dicho manual, se lleva al área de microbiología. Es aquí donde inicia la fase analítica, las muestras son registradas en la bitácora correspondiente al tipo de muestra al que pertenezcan, se les asigna un número interno de identificación aunado al folio proporcionado en el área de recepción. La metodología subsecuente se ha esquematizado en el diagrama 1, el flujo de trabajo para la identificación y caracterización de la resistencia microbiana se explica en el Anexo 1.

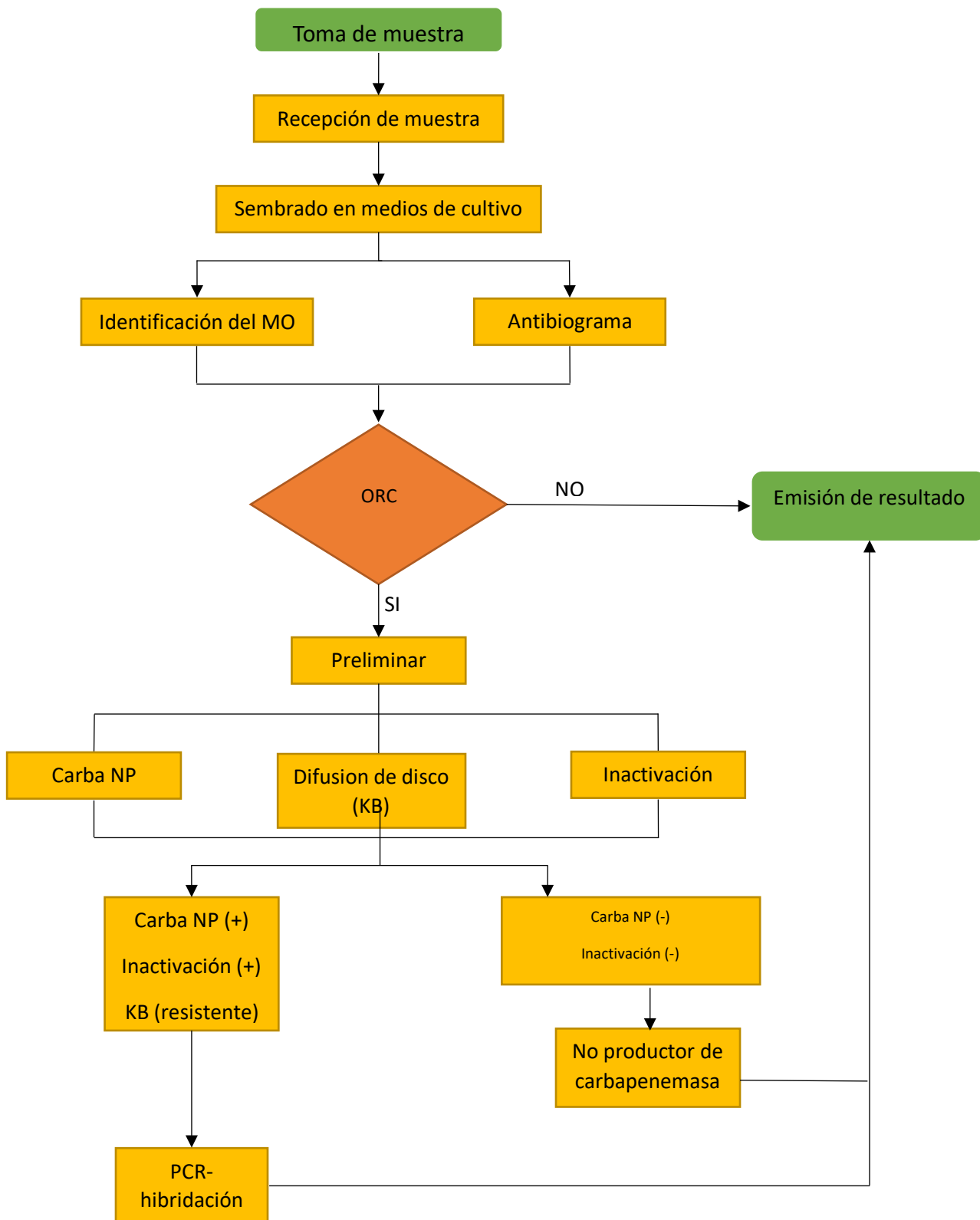


Diagrama 1.- Flujo de trabajo para la detección de organismos productores de carbapenemasa.

Las muestras son procesadas en el equipo automatizado Vitek, mismo que tiene puntos de corte establecidos con base en las guías del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), que se muestran en el Anexo 2, para definir la resistencia de un microorganismo a diferentes antibióticos, en el caso particular de este trabajo a los carbapenémicos.

Una vez que se ha realizado la identificación del microorganismo en alguna muestra y que éste ha mostrado ser resistente a los carbapenémicos se procede a realizar el montaje de tres pruebas: Kirby-Bauer, método modificado de Inactivación a Carbapenémicos (mCIM) y Carba NP. La primera se utiliza como método confirmatorio para la resistencia a carbapenémicos y no como método de detección de carbapenemasas, el procedimiento se detalla en el Anexo 2.

El método modificado de Inactivación a Carbapenémicos (mCIM) está aprobado por el CLSI para la identificación de cepas productoras de carbapenemasas. La metodología utilizada en este estudio fue tomada del manual interno de procedimientos del laboratorio de Microbiología, mismo que se basa en la guía del año 2020 emitida por el CLSI. Dicha metodología se desarrolla en el Anexo 3.

De igual manera el uso de la prueba Carba NP está aprobado por el CLSI, el procesamiento de las muestras se llevó a cabo con las indicaciones proporcionadas en el inserto del kit (Anexo 4) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor,

Una vez que se han obtenido datos positivos en una o ambas pruebas (mCIM y Carba NP) se realiza la identificación del tipo de carbapenemasa mediante PCR e hibridación con el kit AMR Direct Flow Chip y siguiendo la metodología desarrollada por el fabricante (Anexo 5).

4.7 Plan de tabulación y análisis

Se graficaron y tabularon los resultados con el programa Excel.

5. Resultados

En el gráfico 1 se encuentra representada la distribución de las muestras con respecto al sitio anatómico del cual fueron tomadas. Como se puede observar, el urocultivo (23) fue el tipo de muestra con el que más especímenes se contó, seguido de hemocultivos (19), así como menor cantidad expectoración, entrada de catéter, tejido y liquido de ascitis con sólo una muestra.

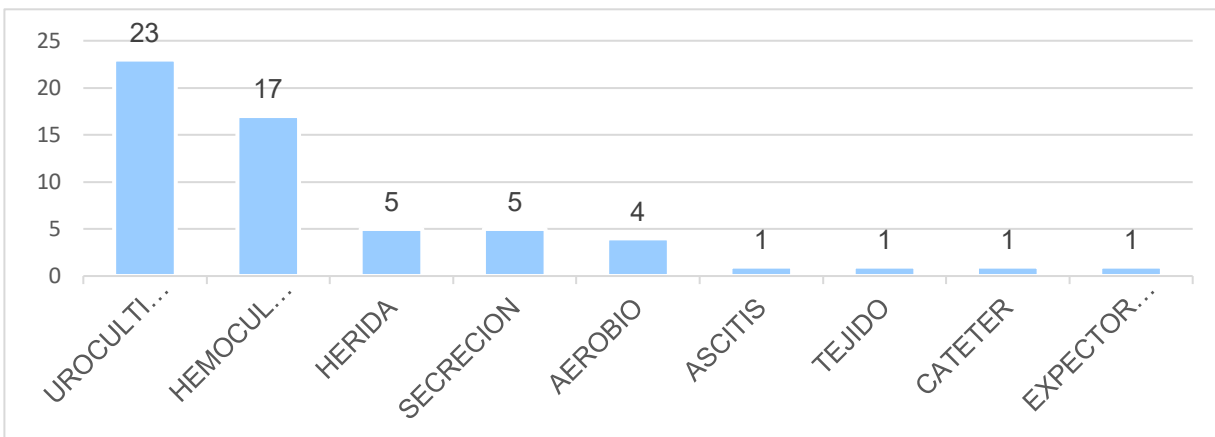


Gráfico 1.- Origen de las muestras procesadas.

Se representó en el gráfico 2 la agrupación por género y especie de los microorganismos aislados en las muestras trabajadas. La mayor prevalencia fue de *E. coli* con 42 aislamientos, por el contrario, sólo se obtuvo un aislado de *P. putida*.

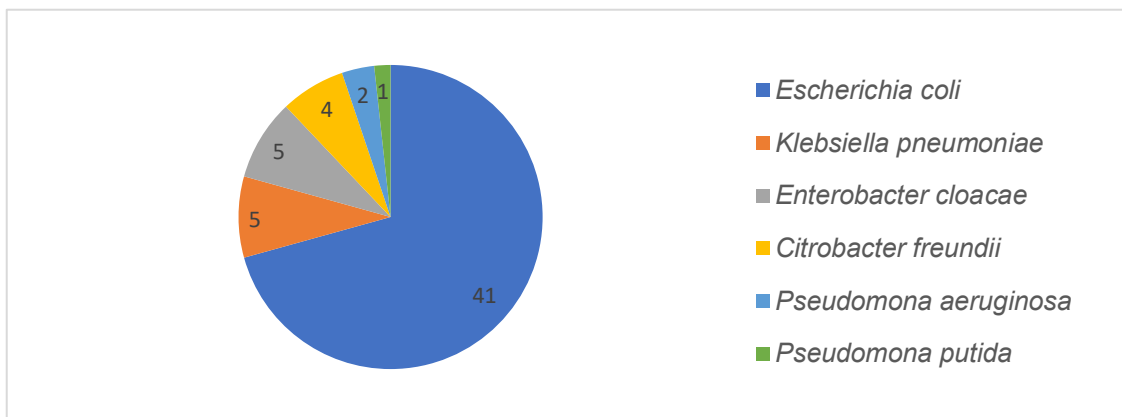


Gráfico 2.- Distribución de los organismos aislados con resistencia a carbapenémicos.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de Carba NP se muestran en el gráfico 3. Las muestras positivas correspondieron al 98% y un 2% a las muestras indeterminadas, es decir, que la metodología no permitió determinar si el microorganismo era o no productor de carbapenemasas.

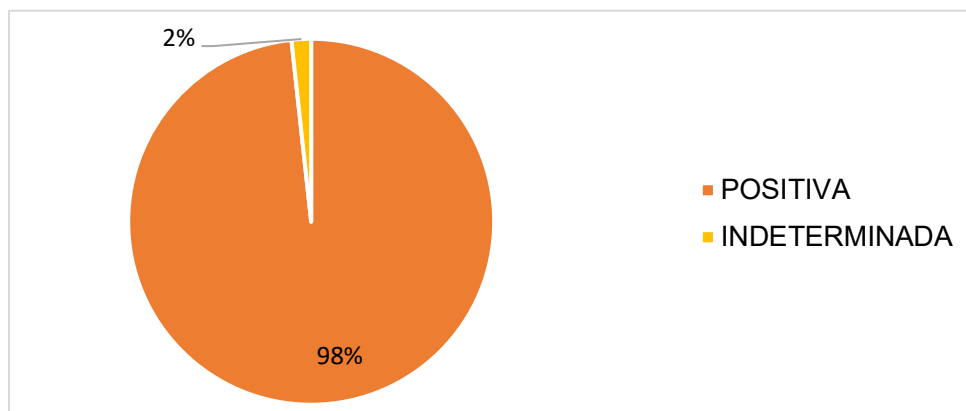


Gráfico 3.- Resultados obtenidos mediante la prueba Carba NP.

Mediante el método PCR-Hibridación se identificó el tipo de carbapenemasa que producía cada microorganismo analizado, las 58 muestras fueron positivas para genes de resistencia a antibióticos, en la gráfica 4 se representó la distribución del tipo de carbapenemasa con respecto al microorganismo del cual se aisló. En esta se puede observar que se obtuvo una mayor cantidad de carbapenemasas tipo NDM, seguido por el tipo OXA-48, además de dos organismos con una combinación de carbapenemasas NDM/OXA 48.

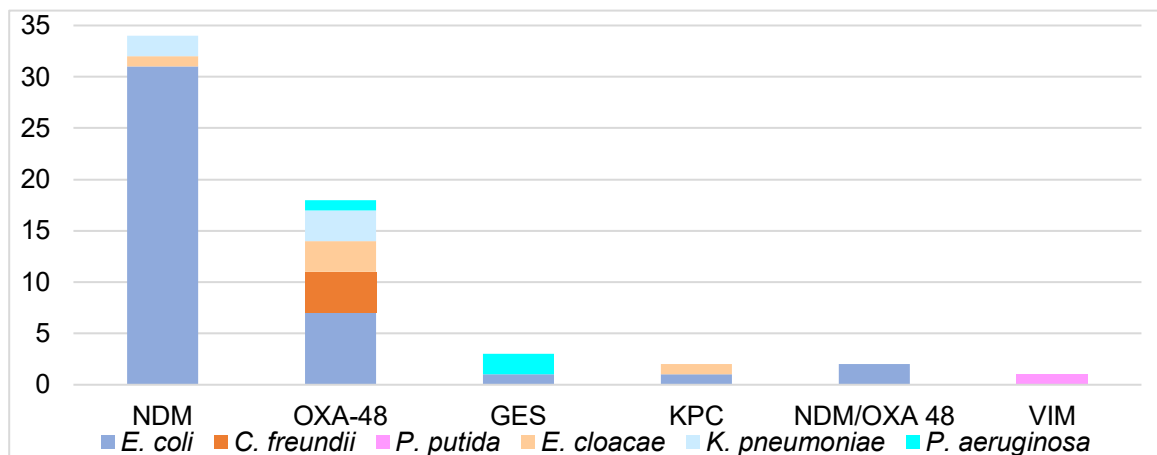


Gráfico 4.- Tipo de carbapenemasa de acuerdo con el tipo de microorganismo aislado.

Los resultados obtenidos con la prueba PCR-Hibridación se relacionaron al origen de la muestra en el gráfico 5. Los urocultivos fueron el tipo de muestra que más prevalencia tuvo y dentro de este grupo el tipo de carbapenemasa NDM fue el de mayor incidencia. Por otro lado, los organismos con coproducción de carbapenemasas se encontraron en una muestra de urocultivo y una de hemocultivo.

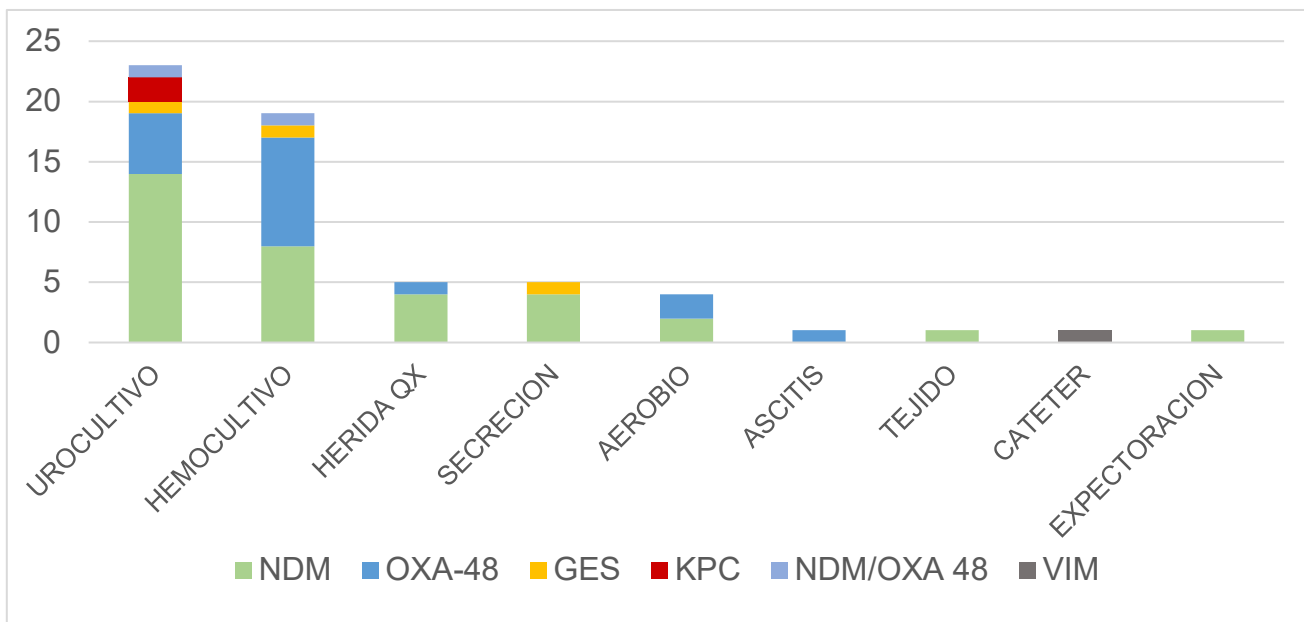


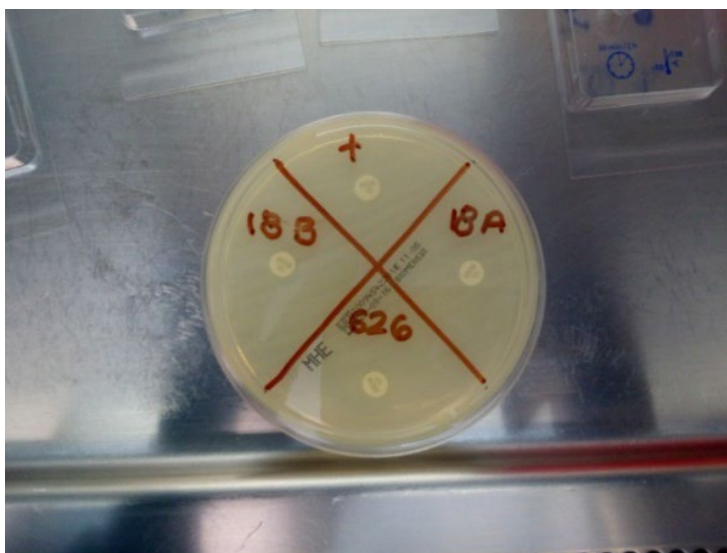
Gráfico 5.- Tipo de carbapenemasa con respecto al origen de las muestras.

Figura 3.- Prueba Carba NP.



Prueba Carba NP, se muestra el resultado de una prueba positiva (lado izquierdo) y una negativa (lado derecho).

Figura 4.- Método modificado de inactivación del carbapenémico.



Se observa un resultado positivo de la prueba.

Figura 5.- Prueba PC-Hibridación

Validado 25/09/2022 12:25:39 25/09/2022 13:42:19 AMR POSITIVO

Detalles del resultado:

AMR POSITIVO

Muestra positiva para:
Carbapenemasa VIM

Nota: Ausencia de control de ADN humano.
Ausencia de control exógeno.
Muestra negativa para el resto de genes de resistencia antibiótica incluidos en el test AMR direct flow chip.

LOTES => PCR: AMRP015L / Chips: AMRE10.2 / Reactivo: HS12HH094E

6. Discusión

En octubre de 2021 la OPS emitió una alerta a cerca de la situación pos pandemia de resistencia antimicrobiana en América Latina, se hacía mención de países como Colombia y Uruguay con datos al alza de aislamientos productores de carbapenemasas, sobre todo del tipo KPC y NDM. En el análisis realizado en muestras del INCAN hubo una notable prevalencia del tipo NDM con un 58% de las muestras analizadas (OPS, Organización Panamericana de la Salud, 2021).

La alerta emitida por la OPS en 2021 a cerca de los organismos prioritarios resistentes a carbapenémicos hace mención de *Enterobacterales* y *P. aeruginosa*, información reflejada en los resultados obtenidos al encontrar una prevalencia de *E. coli* en los aislamientos realizados, seguida de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, todos miembros de la familia de las Enterobacterias (OPS, Organización Panamericana de la Salud, 2021). Comparando con los reportes de prevalencia de este grupo de organismos en nuestro país, en un estudio realizado en el estado de Tamaulipas por Lara y colaboradores en 2018 se reportó la prevalencia de *E. coli* en muestras diversas y en 2017 en el estado de Nuevo León, Garza y colaboradores para muestras únicamente de urocultivo reportaron la misma prevalencia (Lara Medina, y otros, 2018) (Garza Montufar, Treviño Valdez, & De la Garza Salinas, 2017).

En cuanto al tipo de muestra del que se aislaron los microorganismos, el urocultivo (N=23) fue el espécimen prevalente, cabe destacar que en México las infecciones del tracto urinario (ITU) son la tercera causa de morbilidad en el país, por lo que se puede explicar la prevalencia observada en este estudio. (Cortéz Enríquez & Torres González, 2022)

Se realizaron tres metodologías para la detección de carbapenemasas. La prueba de Carba NP obtuvo una concordancia de 98% con respecto al método estándar (PCR-Hibridación) que fue utilizado. El 2% restante correspondió a una cepa de *P.*

aeruginosa que mediante PCR se identificó como productora de carbapenemasa tipo GES, la bibliografía indica que este tipo de enzimas tiene una capacidad hidrolítica lenta frente a imipenem, carbapenémico utilizado en este test, razón por la cual el resultado no fue concluyente (Sakurada, 2016).

El método modificado de inactivación a carbapenémicos tuvo una concordancia del 100% con el método de PCR- Hibridación. La metodología implementada en el Laboratorio de Microbiología permite identificar los organismos productores de carbapenemasas, implica un bajo costo tanto en insumos como en equipamiento para realizar la prueba si se compara con los necesarios para los métodos moleculares, sin embargo, permite identificar el tipo de enzima que es producida por los microorganismos. Por otro lado, los tiempos necesarios para efectuar la metodología son de 22-26 horas dependiendo del tiempo de incubación, lo que retrasa la emisión de un resultado que es vital para el escalamiento o des-escalamiento de la antibioterapia del paciente.

Por otro lado, se encontraron en dos clonas de diferente paciente y origen de muestra la combinación de 2 carbapenemasas; una tipo NDM y otra tipo OXA 48. El primer reporte de una coproducción de estas enzimas se dio en un aislado de *A. baumannii* por Karthikeyan en 2010 en la India y en 2014 Khajuria reporta varios aislados de *E. coli* aisladas en muestras de orina con coproducción de NDM Y OXA 48. (Karthikeyan, Thirunarayan, & Krishnan, 2010) (Khajuria, Praharaj , Kumar, & Grover , 2014)

7. Conclusiones

Se detectó la presencia de carbapenemasas producidas por patógenos en muestras de pacientes del INCAN mediante las metodologías Carba NP, método modificado de inactivación al carbapenémico y PCR-Hibridación.

El principal microorganismo aislado fue E. coli productora del tipo de carbapenemasa NDM.

El método modificado de inactivación del carbapenémico mostró un 100% de concordancia con el de PCR-Hibridación. Para un laboratorio cuyo presupuesto e infraestructura es limitado podrían adoptarse las metodologías del “Manual de Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes” como es la sinergia con Acido fenilborónico y EDTA, obteniendo datos que permiten conocer el fenotipo del organismo y sospechar el tipo de carbapenemasa producida, metodología recomendada por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

La prueba Carba NP tuvo correlación de 98% con la técnica de PCR-Hibridación, por lo cual representa una opción fácil y económica para el tamizaje de este tipo de muestras.

8. Anexos

Anexo 1.- Flujo de trabajo para la identificación y caracterización de la resistencia microbiana.

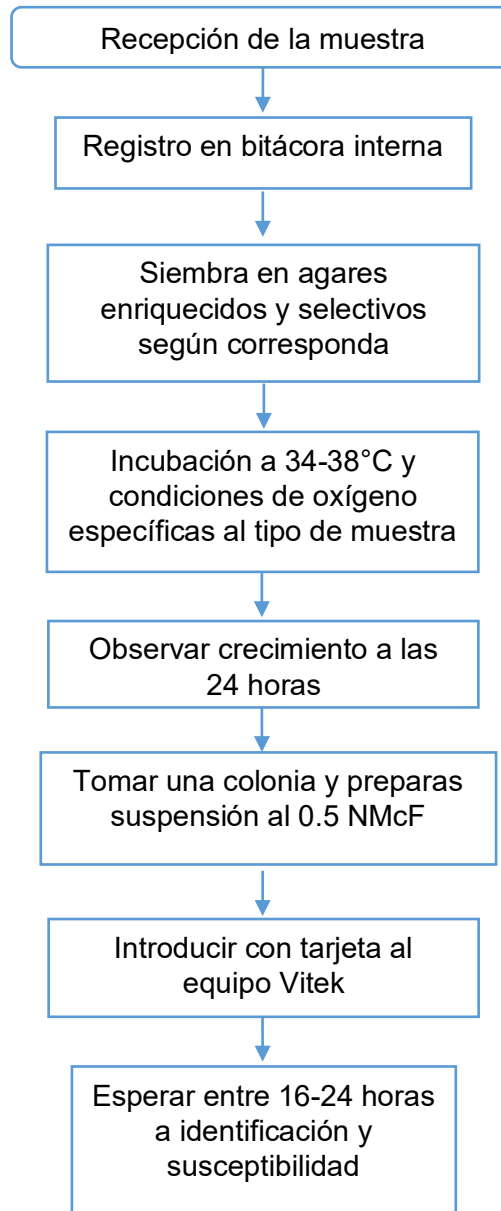
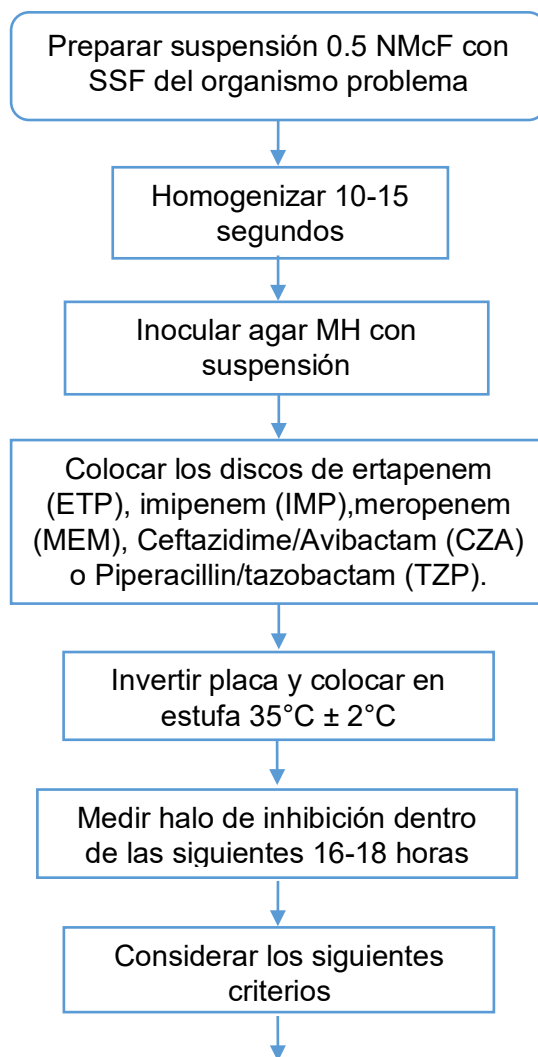


Diagrama 2.- Metodología primo aislamiento de las muestras.

Anexo 2.- Técnica Kirby-Bauer o difusión en placa.



ENTEROBACTERIAS				P. aeruginosa			
Antibiótico	Sensible (mm)	Indeterminado (mm)	Resistente (mm)	Antibiótico	Sensible (mm)	Indeterminado (mm)	Resistente (mm)
IMP	≥23	20-22	≤19	IMP	≥19	16-18	≤15
ETP	≥22	19-21	≤18	MEM	≥19	16-18	≤15
CZA	≥21	-	≤20	CZA	≥21	-	≤20
TZP	≥21	18-20	≤17	TZP	≥21	15-20	≤14

NMcF=Nefelómetro de MacFarland SSF=solución salina fisiológica

Diagrama 3.- Metodología para el método difusión en agar (Kirby-Bauer).

Anexo 3.- Método modificado de inactivación a carbapenémicos.

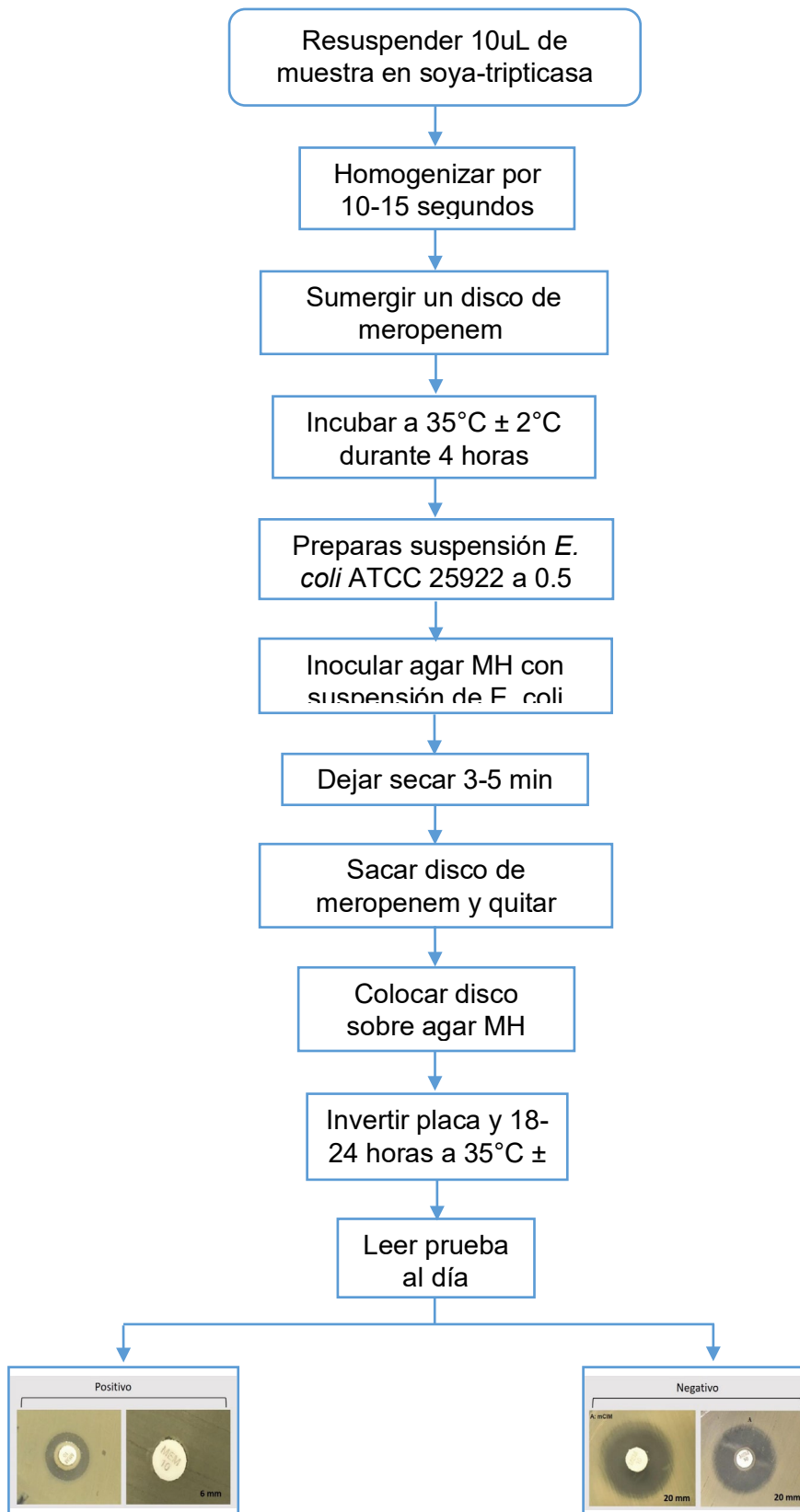


Diagrama 4.- Metodología para el método modificado de inactivación a carbapenémicos.

Anexo 4.- Prueba Carba NP

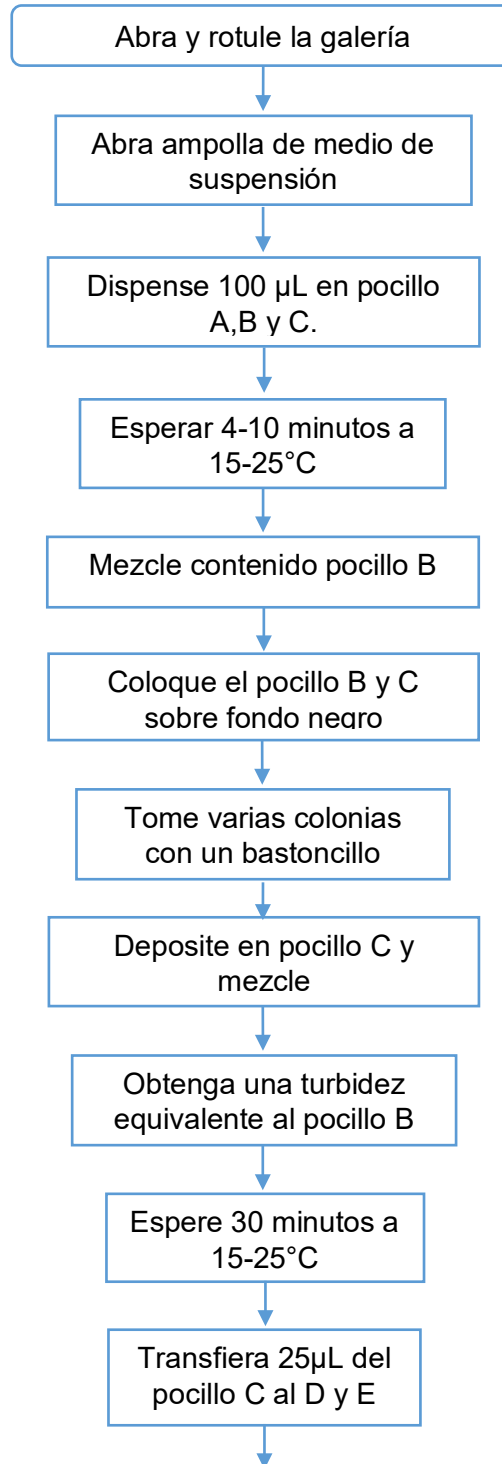


Diagrama 5.- Metodología para la prueba Carba NP (Parte A).

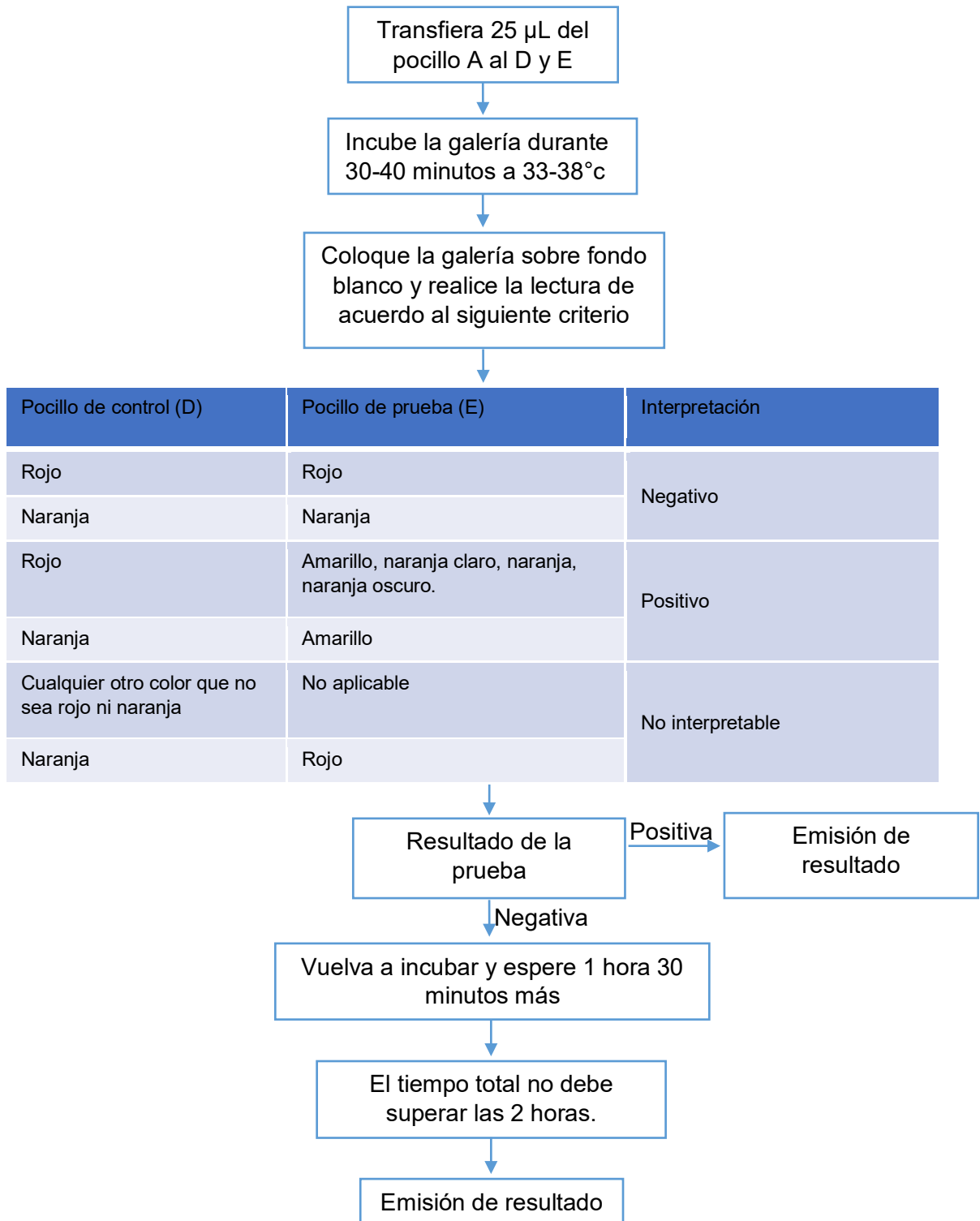


Diagrama 5.- Metodología para la prueba Carba NP (Parte B).

Anexo 5.- Prueba PCR-Hibridación

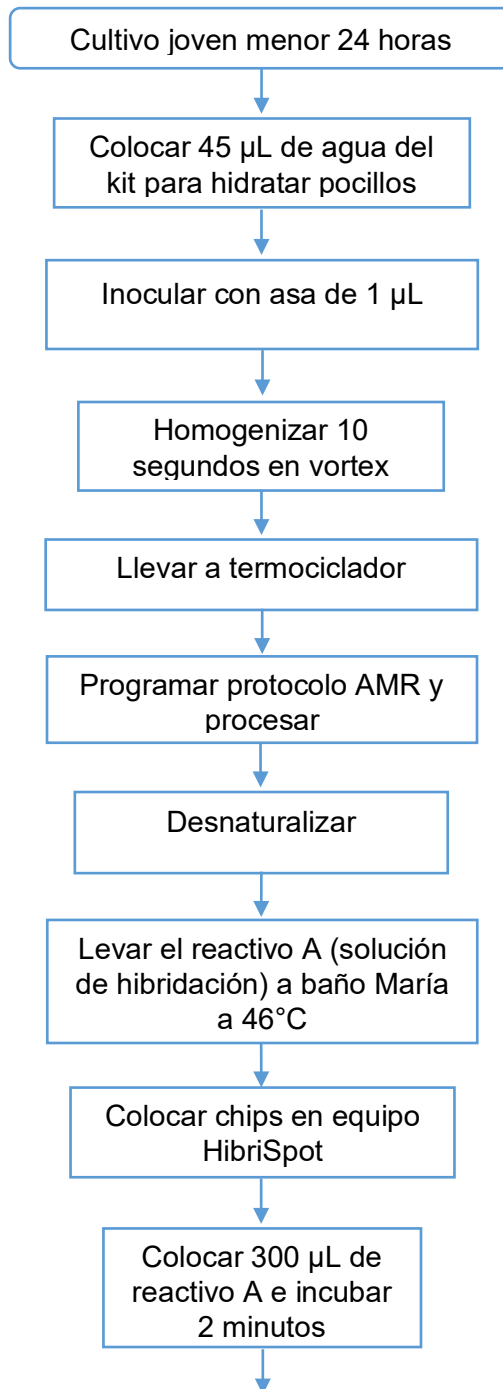


Diagrama 6.- Metodología para la prueba PCR-Hibridación (Parte A)

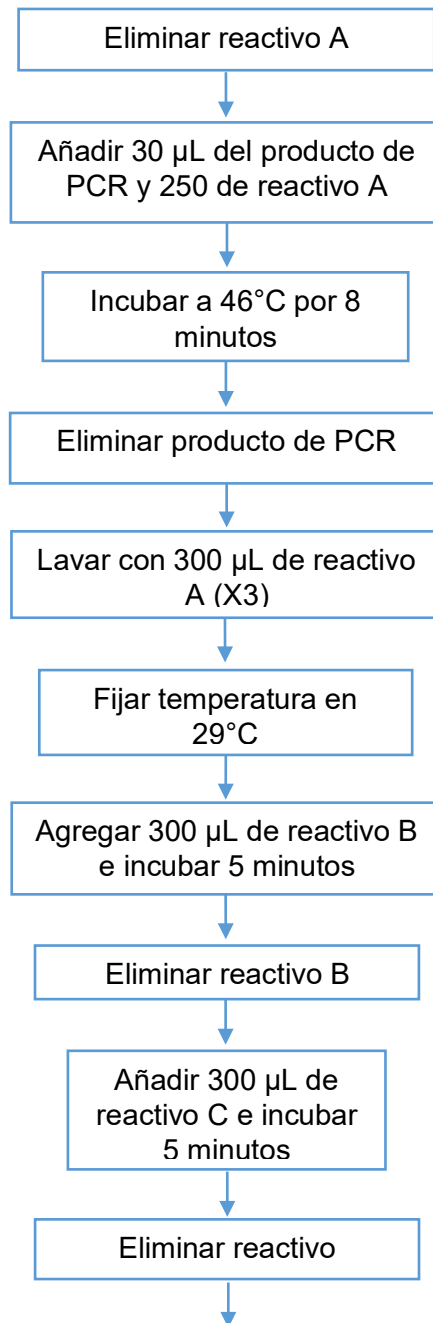


Diagrama 6.- Metodología para la prueba PCR-Hibridación (Parte B)

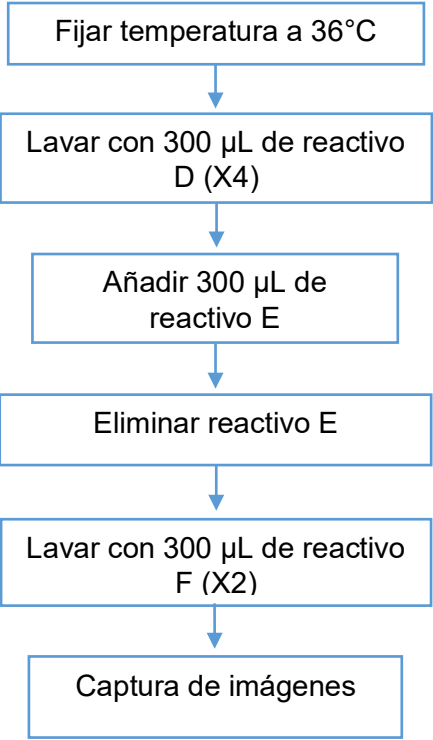


Diagrama 6.- Metodología para la prueba PCR-Hibridación (Parte C)

Bibliografía

- Ali Abushaheen, M., Muzaheed, Jamil Fatani, A., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., . . . Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *ELSEVIER*, 1-21.
- Aurilio , C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., . . . Pace, M. C. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*, 11, 421.
- Bonni, R. A., Jousset, A. B., Emeraud, C., Oueslati, S., Dortet, L., & Nass, T. (2021). Genetic Diversity, Biochemical Properties, and Detection Methods of Minor Carbapenemases in Enterobacterales. *Frontiers in Medicine*, 7:616490.
- Bush, K., & Jacoby, G. (2010). Updated Functional Classification of Beta-Lactamases. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 969–976.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández Cuenca , F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. Barcelona: SEIMC.
- Cortéz Enríquez, O., & Torres Gonzáles, J. H. (2022). PREVALENCIA, FACTORES DE RIESGO Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN MUJERESEMBARAZADAS. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 1-11.
- Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clinical Microbiology and Infection*, 831-838.
- Garza Montufar, M., Treviño Valdez, P., & De la Garza Salinas, L. (2017). Resistencia bacteriana y comorbilidades presentes en pacientes urológicos

ambulatorios con urocultivos positivos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 347-53.

Hammoudi , H. D., & Ayoub , M. C. (2020). The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, Apr 16;9(4):186.

Hansen, G. T. (2021). Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther*, 10:75–92.

Hopkins , K. L., Findlay, L., Meunier, D., Cumminis, M., Curtis, S., Kustos, I., . . . Woodfors, N. (2017). *Serratia marcescens* producing SME carbapenemases: an emerging resistance problem in the UK? *Journal Antimicrob Chemother*, 1535-1537.

Hopkins, K. L., Findlay, J., Doumith, M., Mather, D., Meunier, D., D'Arcy, S., . . . Woodford, N. (2017). IMI-2 carbapenemase in a clinical. *Journa Antimicrob Chemother*, 2129–2131.

Huemer, M., Mairpady Shambat S, S., Brugger, S., & Zinkerna, A. (2020). Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep*, Dec 3;21(12). Recuperado el 12 de Marzo de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7726816/>

Hussain, H. I., Aquib, A. I., Seleem, M. N., Shabbir, A. A., Hao, H., Iqbal, Z., . . . Li, K. (2021). Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 158:105040.

Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., . . . Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica*, 43-65.

- Karthikeyan, K., Thirunarayan, M. A., & Krishnan, P. (2010). Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2253-2270.
- Khajuria, A., Praharaj, A. K., Kumar, M., & Grover, N. (2014). Emergence of *Escherichia coli*, Co-Producing NDM-1 and OXA-48 Carbapenemases, in Urinary Isolates, at a Tertiary Care Centre at Central India. *J Clin Diagn Res*, (8)6.
- Lara Medina, R., Horta Rdriguez, C., Marcos Valdez, G., Ramirez Quintanilla, L., Acosta González, R., Martínez Montoya, H., & Hernández Jiménez, M. (2018). Prevalencia de carbapenemasas en aislamientos clínicos de Reynosa, Tamaulipas, México. *REVISTA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOMEDICINA*, 72.
- Lirola Andreu, L., Ávila Jiménez, Á., Fernández Mariscal, M., Reinoso Espín, Á., & Martínez Martínez, S. (2022). La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa. *Archivos de Medicina Universitaria*, 65-74.
- Lowe, C. F., Matic, N., Champagne, S., Romney, M. G., Leung, V., & Ritchie, G. (2020). The Brief Case: IMP, the Uncommonly Common Carbapenemase. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 4: Tema 4.
- Master Diagnostica. (2018). *AMR Direct Flow Chip Kit*. Granada: Master Diagnostica S.L.U.
- Mohanty, H., Pachpute, S., & Yadav, R. (2021). Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers. *Microbiologica*, 272-739.
- Moubareck, C. A., & Halat, H. D. (2022). The Collateral effects of Covid-19 Pandemic on the status of Carbapenemase-Producing Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infections Microbiology*, 12:823626.

- National Human Genome Research Institute. (23 de 11 de 2022). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-in-situ>
- OMS. (16 de Septiembre de 2022). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de WHO: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- OMS. (17 de 09 de 2022). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
- OPS. (22 de 10 de 2021). *Organización Panamericana de la Salud*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas>
- OPS. (08 de 10 de 2022). *Organizacion Panamericana de la Salud*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms#:~:text=Helicobacter%20pylori%2C%20Staphylococcus%20aureus%2C%20Streptococcus,riesgo%20la%20salud%20de%20la>
- OPS, O. P. (2019). *Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022*. Washington D.C.: OPS.
- Rada, A. M., Hernández Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2018). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39(Supl.1):199-220.
- Sakurada, A. (2016). Protocolo simplificado de Carba NP para la detección de carbapenemasas directamente de cultivos. . *Revista chilena de infectología*, (33)1, 95.

- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibioticos en bacterias Gram negativas. *Asociación COlombiana de Infectología*, 227-232.
- Vera Leiva, A., Barria Loaiza, C., Carrasco Anabalón, S., Reyes Aguayo, A., Dominguez, M., Bello Toledo, H., & González Rocha, G. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 476-484.
- Wareham, D. W., & Abdul Momin, M. H. (2017). Rapid Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Evaluation of the Resist-3 O.K.N. (OXA-48, KPC, NDM) Lateral Flow Multiplexed Assay. *Jouran of Clinical Microbiology* , 1223-1225.
- Werth, J. B. (15 de 10 de 2022). *Maual MSD*. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/f%C3%A1rmacos-carbapen%C3%A9micos>
- Yu Lin, L., Hsien Meng, C., Ing Moi , H., & Po Ren, H. (2022). Carbapenemase-producing Enterobacteriales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volumen 59, Tema 2. Recuperado el 12 de Marzo de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857922000188>