



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

“SALVADOR ZUBIRÁN”

INFECTOLOGÍA

TESIS DE POSGRADO

“Colonización por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos en pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán”

“QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA”

PRESENTA

DRA. MARÍA DOLORES NIEMBRO ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL

DR. LUIS ALFREDO PONCE DE LEÓN GARDUÑO

UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES
Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.



DR. GUILLERMO RUIZ PALACIOS Y SANTOS

Profesor Titular del Curso de Especialización en Infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



DR. ALFREDO PONCE DE LEÓN GARDUÑO
Tutor de Tesis

Jefe del Laboratorio de Microbiología Clínica
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"



DR. PEDRO TORRES GONZÁLEZ
Asesor de Tesis

Médico Adscrito de Infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Dedicatoria Especial

A **Rodrigo Calleja Torres**, mi mejor amigo, compañero y ahora estrella en el cielo.

Gracias por haberme acompañado en estos años en los que me ayudaste a ser un mejor ser humano, una profesionista que logra sus metas y a conocer personas maravillosas que estarán el resto de mi vida presentes.

Marcaste un antes y un después de ti, al igual que tu, disfruté la alegría de vivir a tu lado.

Estás cada día presente en mi mente y en mi corazón.

Agradecimientos

A mis padres por su ejemplo de amor, tenacidad y confianza. Hoy después de doce años de salir de casa puedo decir que concluyo una parte importante en mi formación gracias a su apoyo.

A Rober, Mica y el Fau por compartir su alegría de vivir y amor sincero; su perseverancia y gusto por el conocimiento, han sido un ejemplo inigualable.

A Lau, Alfredo, Bernie y Jorge por su valiosa amistad y apoyo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis maestros y compañeros por su enseñanza, exigencia y apoyo en el asombroso camino de la Infectología.

A mis pacientes por sus continuas lecciones de vida.

INDICE

1. Antecedentes.
 - 1.1. Antecedentes locales de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos.
2. Definición del Problema.
3. Justificación.
4. Pregunta de investigación.
5. Hipótesis.
6. Objetivos.
 - 6.1. Objetivo primario.
 - 6.2. Objetivos secundarios.
7. Métodos.
 - 7.1. Diseño general.
 - 7.2. Tamaño de la muestra.
 - 7.3. Grupos y áreas de riesgo.
 - 7.4. Duración del seguimiento individual.
 - 7.5. Criterios de selección.
 - 7.5.1. Criterios de inclusión.
 - 7.5.2. Criterios de exclusión.
 - 7.5.3. Criterios de eliminación.
8. Metodología.
 - 8.1. Descripción de la maniobra o intervención.
 - 8.2. Metodología dentro del Laboratorio de Microbiología Clínica.
 - 8.3. Análisis estadístico.
 - 8.4. Consideraciones éticas.
9. Resultados.
10. Discusión y conclusiones.
11. Referencias.

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, en el Departamento de Infectología y Laboratorio de Microbiología Clínica bajo la dirección del Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño

Este trabajo de Tesis presentado por la alumna María Dolores Niembro Ortega se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la Tesis Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño

Tutor Principal

Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño

Colaboradores

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO

Director de Medicina

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DRA. MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

Investigador en Ciencias

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DR. ARTURO GALINDO FRAGA

Sub-director de Epidemiología Hospitalaria

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DRA. ALETHSE DE LA TORRE ROSAS

Epidemiología Hospitalaria

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DRA. MARÍA DE LOURDES GUERRERO ALMEIDA

Investigador en Ciencias

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DR. MIGUEL CERVERA HERNANDEZ

Médico Pasante del Servicio Social

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DRA. MA. DE LA LUZ MORALES ORTEGA

Médico Pasante del Servicio Social

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DRA. YOVANNA RUEDA ESCOBEDO

Médico Pasante del Servicio Social

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

QC. FRANCISCO LEAL VEGA

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

TL. MIRIAM SIÉNEGA ESTIBUARTE

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

QFB. ESTRELLA TOVAR CALDERÓN

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Q. YVONNE VILLALOBOS ZAPATA

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

QFB. ANA LAURA MARTÍNEZ ROQUE

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

QFB. TERESA PASCUAL

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

“Colonización por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos en pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán”

1. Antecedentes.

La familia *Enterobacteriaceae* comprende algunas de las especies que con mayor frecuencia causan enfermedad en los humanos. Desde la aparición de los antibióticos, estos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia debido a la presión selectiva con antimicrobianos, entre otros factores.¹ Durante la última década, los aislados clínicos de Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación, por la actividad de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) se han diseminado a nivel mundial y en la actualidad son consideradas endémicas en muchos hospitales e incluso en la comunidad. La única opción terapéutica en la mayoría de los casos son los antibióticos conocidos como carbapenémicos, lo anterior debido a que al fenotipo BLEE comúnmente lo acompañan resistencia a otros fármacos como quinolonas y sulfonamidas. Sin embargo, durante los últimos años, se han informado cada vez con mayor frecuencia, la presencia de aislados clínicos de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE) principalmente en las especies *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos microorganismos se han reportado en la mayoría de las ocasiones en el contexto de brotes hospitalarios con altas tasas de mortalidad.²

En las Enterobacterias se han identificado diversos mecanismos moleculares que generan resistencia a los carbapenémicos, los principales son: (i) adquisición de genes que codifican para enzimas capaces de degradar carbapenémicos (carbapenemasas), (ii) disminución en el efecto antibiótico por deficiencia ya sea cualitativa y/o cuantitativa de expresión de porinas asociada a una sobre expresión de β -lactamasas con una baja afinidad por los carbapenémicos.³

Las carbapenemasas presentes en las Enterobacterias pertenecen a diversas clases de Ambler de las cuales, las que se consideran de mayor importancia por su capacidad de diseminación son: las carbapenemasas KPC, GES e IMI dentro de la clase A (utilizan serina en su sitio activo para facilitar la hidrólisis de β -lactámicos de amplio espectro); NDM, VIM, IMP de la clase B (metalo- β -lactamasas) y OXA-48, OXA-181, OXA-232 del grupo D (oxacilinasas).⁴

La carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) fue identificada por primera ocasión en el 2001 en Carolina del Norte, EUA, poco tiempo después, se informó sobre una gran cantidad de brotes hospitalarios en esa región y actualmente algunos hospitales de la zona consideran a estos microorganismos como endémicos. Entre los países con más alta prevalencia de KPC destacan el noreste de EUA, Grecia, Israel, Colombia y Puerto Rico.⁵ Algunos estudios que emplearon electroforesis en gel con campo pulsado (PFGE) han demostrado que existe una

relación clonal entre los aislados de diversos países, lo que sugiere una diseminación intercontinental de estos organismos.⁶ Estas enzimas se han encontrado predominantemente entre las *Enterobacteriaceae*, sobre todo en *K. pneumoniae* aunque también se han reportado en no fermentadores como *Pseudomonas spp* o *Acinetobacter spp*.⁷ Las KPC son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos y su actividad es inhibida por el ácido borónico y en menor medida por el ácido clavulánico y tazobactam.⁸

La clase B, también conocidas como metalo- β -lactamasas (MBLs), se caracterizan por tener la actividad más potente de las carbapenemasas así como por lograr una rápida diseminación. Su mecanismo de hidrólisis es dependiente de la interacción entre el β -lactámico y el zinc en su sitio activo, lo que explica su inhibición por EDTA, un quelante de cationes divalentes.⁹ Originalmente fueron descritas en bacterias no fermentadoras pero recientemente también han sido encontradas en *Enterobacteriaceae*. Son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, respetando únicamente la actividad de monobactámicos como aztreonam.¹⁰

La más frecuente en esta clase es la de tipo VIM (Verona integron-encoded MBLs), sin embargo la de tipo NDM-1 identificada por primera vez en Suecia en el 2008 en un aislado de *K. pneumoniae* de un paciente hospitalizado en Nueva Delhi se ha reportado ya en 40 países del mundo, más extensamente en lugares como el Reino Unido, India y Pakistán.¹¹ La expansión del gen bla_{NDM-1} involucra transmisión de plásmidos entre diversas cepas, bacterias de diferente especie e incluso entre bacterias de diferente género.¹² En la mayoría de los casos se ha identificado una relación con el subcontinente Indio, aunque también se ha informado de casos sin ninguna relación con éste.¹³ Notablemente algunos de los aislados productores de NDM en pacientes de la India estaban relacionados a infecciones adquiridas en la comunidad, lo cual llevó a identificar estos microorganismos en el agua potable y de riachuelos en este país considerado como área endémica.¹⁴

Finalmente las β -lactamasas clase D (oxacilinasas) se han descrito con mayor frecuencia en *Pseudomonas spp* y *Acinetobacter spp*, sin embargo recientemente la carbapenemasa OXA-48 y enzimas estrechamente relacionadas a esta (OXA-48 like: OXA-181, OXA-232 principalmente) ha sido detectada en *Enterobacteriaceae*.¹⁵ Este grupo de enzimas presentan un patrón de resistencia peculiar, debido a que, en ausencia de otro mecanismo de resistencia, los aislados son susceptibles a ceftazidima e hidrolizan débilmente cefotaxima.⁹ Estas carbapenemasas han sido identificadas principalmente en la cuenca del mediterráneo, así como en algunos países de Europa.¹⁶

La mayoría de los mecanismos de resistencia previamente descritos se han asociado con brotes intrahospitalarios y en ocasiones han desplazado la microbiota local y se han convertido en cepas endémicas en algunos hospitales.^{17, 18, 19} Las CRE con frecuencia son portadoras de mecanismos adicionales de

resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos, lo cual genera perfiles de multi-resistencia, con opciones terapéuticas limitadas.²⁰

Al igual que en el caso de otros microorganismos multi-resistentes (MDR), es prioritario el control de las CRE en el contexto hospitalario debido a la capacidad de estos microorganismos para ocasionar brotes.^{21 10} Se considera que previo a desarrollo de una infección por CRE, los individuos son colonizados por estos microorganismos, principalmente en el tracto gastrointestinal. La identificación temprana los sujetos colonizados por CRE representa una oportunidad para prevenir la diseminación dentro de los hospitales.²²

La mayoría de las carbapenemasas han sido descritas prácticamente en todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.^{23, 24} Sin embargo, la detección de pacientes infectados o colonizados por *E. coli* y *K. pneumoniae* son consideradas prioritarias por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), debido a su frecuencia y capacidad de diseminación clonal.²⁵

Los factores asociados a la infección y colonización por CRE son similares a los de muchas otras infecciones intrahospitalarias ocasionadas por gérmenes MDR, sin embargo, los Centros Europeos para el Control y la Prevención de Enfermedades señalan los siguientes factores asociados a colonización y/o infección por CRE: exposición previa a antimicrobianos (principalmente carbapenémicos, fluoroquinolonas, cefalosporinas, penicilinas anti-pseudomonas y metronidazol), presencia de dispositivos invasivos, gravedad de la enfermedad, ingreso a UTI, hospitalización prolongada, pobre estado funcional, traslados entre unidades hospitalarias, cirugías previas, antecedente de trasplante de órgano sólido o de médula ósea reciente, presencia de catéteres biliares y ventilación mecánica.^{22, 26}

Las medidas de control hospitalario de este tipo de infecciones, también comparte muchas de las estrategias empleadas para el control de otras infecciones ocasionadas por microorganismos MDR.²⁷ Sin embargo debido a su reciente aparición y la falta de estudios comparativos, es difícil en este momento evaluar la efectividad de algunas de estas medidas.^{20, 28}

Las guías internacionales tanto de la CDC como las europeas recomiendan la implementación de programas de control que requieren múltiples intervenciones que incluyen: la vigilancia activa de este tipo de infecciones, detección de los individuos colonizados hospitalizados en las áreas de riesgo (UCI, Unidad de trasplantes, trasladados de otras instituciones y/o con factores de riesgo), la implementación de precauciones de contacto y cohortes tanto del personal de salud a cargo de estos pacientes así como de los mismos pacientes colonizados y/o infectados.²⁹

Son pocos los estudios que han evaluado la eficacia de estas medidas, un estudio publicado recientemente, informó sobre el impacto que tuvieron este conjunto de medidas establecidas a nivel nacional con lo cual lograron demostrar una disminución en la tasa mensual de infección nosocomial de 55.5 casos/100 000 pacientes-día a una tasa de 4.8 casos/100 000 pacientes día.³⁰

La detección de los pacientes colonizados se lleva a cabo mediante la realización de hisopados rectales o peri-rectales, lo anterior debido a que el mayor reservorio de Enterobacterias es fundamentalmente el intestino.³¹ Se han descrito diferentes métodos para la detección en el laboratorio de este tipo de aislados en los hisopados rectales.³² Sin embargo, no existe un estándar de referencia para determinar colonización. Algunos autores han descrito la utilización de medios selectivos (SUPERCARBA medium) o cromogénicos (CHROMagar KPC; ChromID ESBL CHROMagar; Paris, France) muchos de los cuales fueron originalmente diseñados para la detección de las Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido.³³⁻³⁵ Algunos otros medios fueron desarrollados comercialmente específicamente para la detección de las enterobacterias KPC. El método recomendado por la CDC consiste en la incubación del hisopo con la muestra en caldo soya tripticasa al cual se le agrega un disco de ertapenem de 10 μ g. La gran desventaja de este método es que requiere hasta 72 horas para confirmar la presencia de carbapenemasas.³⁶

1.1 Antecedentes locales de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos.

Durante el segundo semestre del año 2013 se observó una tendencia creciente de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos en los aislados clínicos procesados en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto por lo cual se implementó la metodología para la detección fenotípica y molecular de estos aislados. Desde el mes de mayo de 2013 hasta febrero 2014 se han presentado 15 casos de infecciones en los pacientes del Instituto ocasionadas por CRE. Los mecanismos de resistencia identificados hasta el momento son: cuatro NDM, cuatro OXA-232, dos KPC. El resto se encuentran en proceso de identificación. En algunos de los casos se ha demostrado la clonalidad de las cepas, lo cual indica la presencia de un brote por este tipo de aislados.

Debido a lo anterior, a partir enero de 2014, de acuerdo con la Dirección de Medicina y la Sub-dirección de Epidemiología Hospitalaria, se ha implementado como estándar de manejo la vigilancia y cohorte de los pacientes a quienes se identifican infectados o colonizados por CRE.

2. Definición del problema.

Se ha detectado un incremento en las infecciones ocasionadas por CRE en el INCMNSZ durante el último semestre. Estas infecciones son de difícil manejo

debido a las escasas o nulas opciones terapéuticas. En algunos de estos casos se ha demostrado la clonalidad de las cepas involucradas lo cual indica la presencia de un brote hospitalario. Los pacientes colonizados por CRE, así como los que presentan infección pueden excretar gran cantidad de bacterias, las cuales colonizan el ambiente y a otros pacientes. Si los enfermos colonizados no son identificados tempranamente, esta fuente de transmisión puede pasar inadvertida y perpetuar la diseminación de estos microorganismos dentro de los hospitales.

3. Justificación.

Las estrategias empleadas para el control de infecciones hospitalarias ocasionadas por bacterias MDR incluye la detección de los pacientes colonizados. Sin embargo, en el caso de las CRE, la tasa de colonización, los factores de riesgo y la diferencia en transmisibilidad entre los diferentes mecanismos de resistencia no han sido suficientemente estudiados. A pesar de que el empleo de cultivos de vigilancia en las áreas de riesgo fue descrito hace tiempo como parte de las políticas de control de infecciones en muchas regiones del mundo, en los hospitales de México no se realiza rutinariamente. La incorporación de esta estrategia en el INCMNSZ permitirá servir de modelo para su implementación en otras instituciones.

4. Pregunta de Investigación.

¿Cuál es la incidencia de colonización por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (CRE) en pacientes hospitalizados en áreas (o población) de riesgo en el INCMNSZ entre enero y mayo de 2014?

5. Hipótesis.

La incidencia de colonización por CRE determinada mediante cultivo de hisopado rectal en los pacientes hospitalizados en áreas (o población) de riesgo en el INCMNSZ entre enero y mayo del 2014 es de al menos 2%.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo primario: Determinar la la tasa de incidencia de colonización por CRE en pacientes en áreas de riesgo hospitalizados en el INNSZ de enero a mayo de 2014.

6.2 Objetivos específicos:

1. Describir los factores asociados a la colonización por CRE.
2. Describir los mecanismos moleculares de resistencia y la epidemiología molecular de los aislados CRE en pacientes colonizados.

3. Determinar el riesgo de infección por CRE en pacientes previamente colonizados.
4. Determinar la transmisión y riesgo de colonización entre los pacientes epidemiológicamente relacionados (con casos o con portadores).

7. Métodos.

7.1 Diseño general: Estudio de cohorte.

7.2 Tamaño de la muestra: De acuerdo a los datos obtenidos hasta enero de 2014, se calculó una tasa de pacientes colonizados por CRE de 2% (1/52 pacientes). En base a estos datos se calculó un tamaño de muestra de 753 individuos con una precisión entre 1% y 3%.

7.3 Grupos y áreas de riesgo:

- a. Trasplante de hígado, riñón y/o médula ósea en los últimos 6 meses.
- b. Traslados interhospitalarios.
- c. Ingreso a UTI y/u Hospitalización de urgencias.
- d. Peritonitis secundaria o terciaria.
- e. Neutropenia grave y fiebre.
- f. Pacientes relacionados epidemiológicamente (comparten el mismo cuarto) con caso clínico infectado confirmado.

7.4 Duración del seguimiento individual.

El seguimiento de los pacientes se realizará desde el ingreso a las áreas de riesgo y hasta su egreso hospitalario o del área de riesgo de manera semanal mientras tenga hisopado negativo; un resultado positivo no requiere hisopados de seguimiento.

7.5 Criterios de selección.

7.5.1 Criterios de inclusión.

- Hombres y mujeres mayores de 18 años que ingresen al INCMNSZ en el periodo de enero a mayo de 2014 y que cumpla con alguna de las siguientes características:
 - Trasplante de hígado, riñón y/o médula ósea en los últimos 6 meses
 - Traslado interhospitalario
 - Internamiento en UTI y/u hospitalización de urgencias
 - Peritonitis secundaria o terciaria
 - Pacientes neutropénicos (neutrófilos totales $<500 \text{ cel/mm}^3$)
 - Relacionados epidemiológicamente con un paciente colonizado o infectado por CRE

7.5.2 Criterios de exclusión.

- Pacientes hemodinámicamente inestables o con parámetros de ventilador altos que no permitan la movilización del paciente para la toma del hisopado
- Pacientes que anatómicamente no sea posible la toma de la muestra (ej. Gangrena Fournier)
- Pacientes que no acepten se les realice el hisopado rectal

7.5.3 Criterios de eliminación.

- Pacientes que no cuenten con la información completa en el expediente médico

8. Metodología.

8.1 Descripción de la maniobra o intervención:

- Tamizaje mediante hisopado rectal en todo paciente en áreas de riesgo al momento de la admisión hospitalaria
- Periodo: enero-mayo 2014
- Detección de CRE en Laboratorio de Microbiología Clínica
- Notificación inmediata al servicio de Epidemiología Hospitalaria al momento de la identificación de un probable caso de colonización por CRE
- Aplicar precauciones de contacto y cohorte de los pacientes colonizados por CRE
- Aplicación de cuestionario para identificación de factores de riesgo

8.2 Metodología dentro del Laboratorio de Microbiología Clínica

El hisopado rectal se coloca en medio con 5ml de caldo soya tripticasa (OXOID LTD, Basings, Hampshire, England) al cual se le agrega un disco de ertapenem de 10µg momentos previos a la toma de la muestra. Se incuba durante la noche a 37°C. Al día siguiente se agita la muestra mediante vórtex y se toman 100µL de la suspensión y se inoculan mediante estría de separación en agar McConkey, el cual se incuba durante la noche. El día siguiente se revisa el agar para determinar si presenta crecimiento de colonias lactosa positivas, en este caso dichas colonias se separan, se identifican y se realiza susceptibilidad mediante el equipo automatizado Vitek® 2 (bioMérieux). A los aislados identificados como resistentes por lo menos a un carbapenémico (según puntos de corte de CLSI 2011) se les realiza pruebas fenotípicas, con el fin de orientar en el posible mecanismo de resistencia implicado, mediante la prueba de 12 discos, prueba modificada de Hodge y prueba con EDTA.

Extracción de ADN bacteriano.

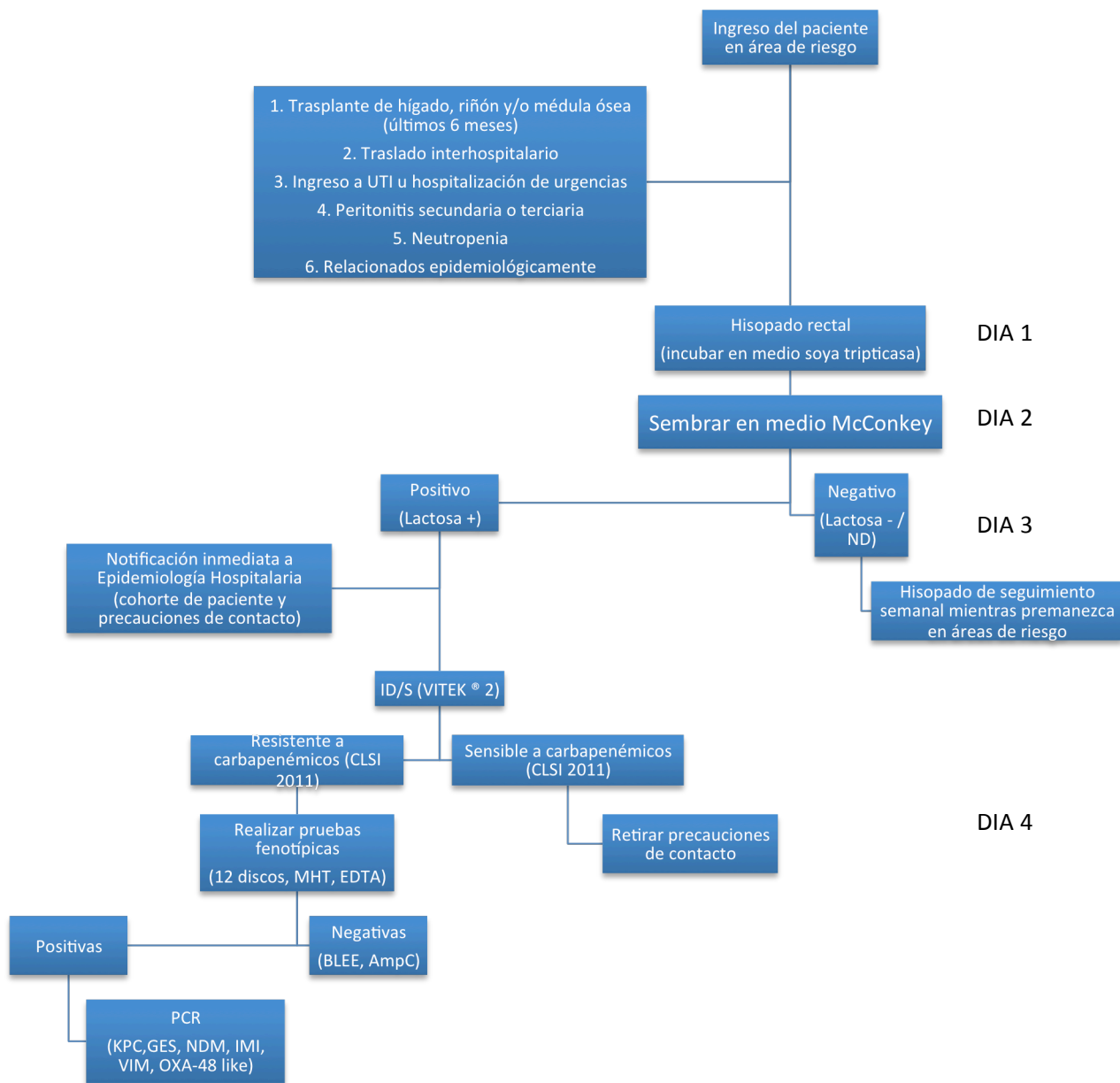
En un tubo de microcentrifuga de polipropileno de capacidad de 1.5 ml, se le agregó 500µl de TE(Tris-HCl-EDTA pH8) 1:10mM, al cual se le adiciona con un aplicador de madera estéril una pequeña porción de 2 ó 4 colonias crecidas en agar McConkey o agar sangre de carnero, se resuspendieron homogéneamente, posteriormente se colocan en baño maría a 95°C durante 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se colocaron en hielo por 10 minutos; una vez transcurrido este tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 8000 revoluciones por minuto (R.P.M.), se separó la fase del sobrenadante en otro tubo de microcentrifuga de polipropileno de 1.5 ml estéril correctamente identificado, se guardó a 4°C hasta su uso.

Se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar los diferentes genes que les podría conferir resistencia a las cepas bacterianas, se corrieron PCRs para los genes: bla-KPC, bla-GES, bla-OXA-48, bla-NDM; el producto de estas amplificaciones se corrió en gel de agarosa al 2% junto con los controles positivos para cada gen. Las cepas que mostraron genes positivos para carbapenemasas, sus productos de amplificación fueron secuenciados por medio de electroforesis capilar, el resultado de estas secuencias fueron comparados en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para corroborar los resultados obtenidos.

Fármaco	Puntos de corte actuales (M100-S22) MIC (µg/mL)		
	Susceptible	Intermedio	Resistente
Doripenem	≤1	2	≥4
Ertapenem	≤0.5	1	≥2
Imipenem	≤1	2	≥4
Meropenem	≤1	2	≥4

Figura 1. Puntos de corte actuales de carbapenémicos en *Enterobacteriaceae* según CLSI a partir de 2011.

Figura 2. Algoritmo de metodología a seguir dentro del Laboratorio de Microbiología Clínica.



8.3 Análisis estadístico.

- Se determinará la tasa de incidencia por año/persona con IC 95% de colonización por CRE en los pacientes hospitalizados en el INCMNSZ en el periodo entre enero y mayo de 2014
- Se empleará estadística descriptiva para reportar las características demográficas y clínicas de la población de estudio, se empleara mediana o media como medida de tendencia central en las variables continuas y desviación estándar o intervalos intercuartilares para determinar la dispersión, dependiendo de la distribución de las variables
- Las variables dicotómicas o categóricas se informarán como proporciones.
- Para la comparación de variables entre los casos colonizados y no colonizados se aplicaran las pruebas t student o U de Mann Whitney según corresponda y Chi cuadrada de Pearson en el caso de las dicotómicas o categóricas
- Se calculará el Rate Ratio (RR) y sus intervalos de confianza (95%) para mostrar la asociación entre las variables clínicas y la presencia de colonización
- Se realizará un análisis multivariado mediante regresión logística para las variables que muestren una $p \leq 0.2$ en el análisis bivariado o que sean biológicamente significativas
- El tamaño de la muestra se calculó mediante el software Epidat 4.0 (OPS 2013) y el resto del análisis se llevará a cabo en el programa STATA 11 (StataCorp, College Station EUA)

8.4 Consideraciones éticas

Por tratarse de un estudio de vigilancia epidemiológica y control de brote se realizó consentimiento informado verbal.

9. Resultados.

Se realizaron 493 hisopados a 330 pacientes. La incidencia de colonización por CRE entre los pacientes hospitalizados en el INCMNSZ entre enero y mayo de 2014 fue de 17% (56/330), con un Rate Ratio (RR) de 3.83 por año/persona (IC 95% 2.95-4.97) de colonización por CRE, con tiempo de seguimiento de 14.63 meses. La incidencia en cada área de riesgo se muestra en la Figura 3.

La tasa de adquisición global (TAG) en aquellos pacientes con por lo menos dos hisopados fue de 20% (17/85); en la Gráfica 1 se muestra la TAG por cada grupo considerado de riesgo. Un tercio de los pacientes infectados no se identificaron como colonizados por CRE. El mecanismo molecular de resistencia más frecuente fue OXA-232 (Gráfica 2).

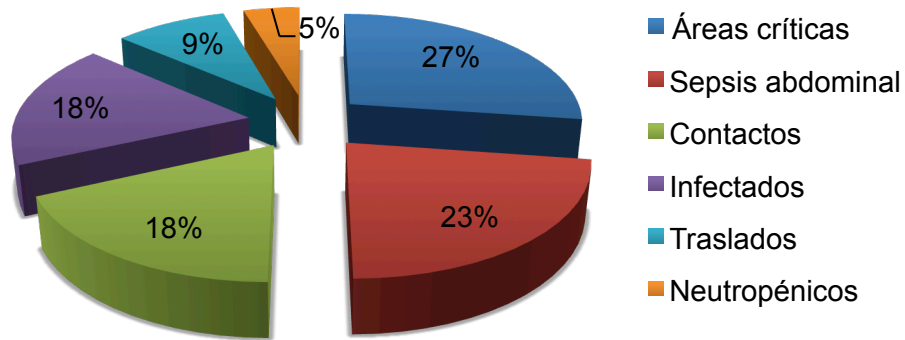
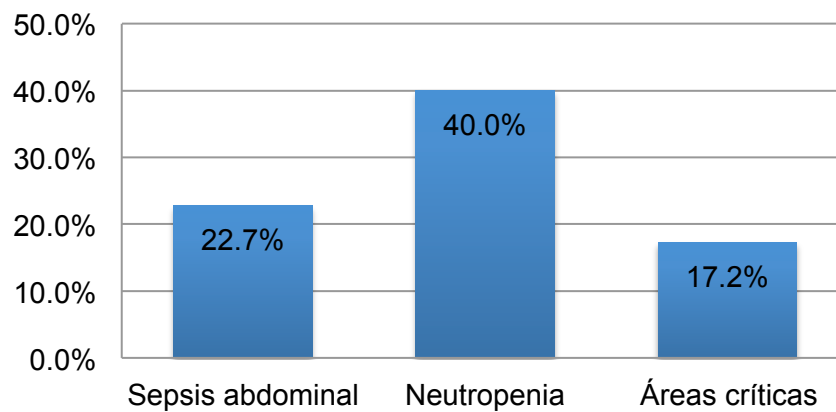
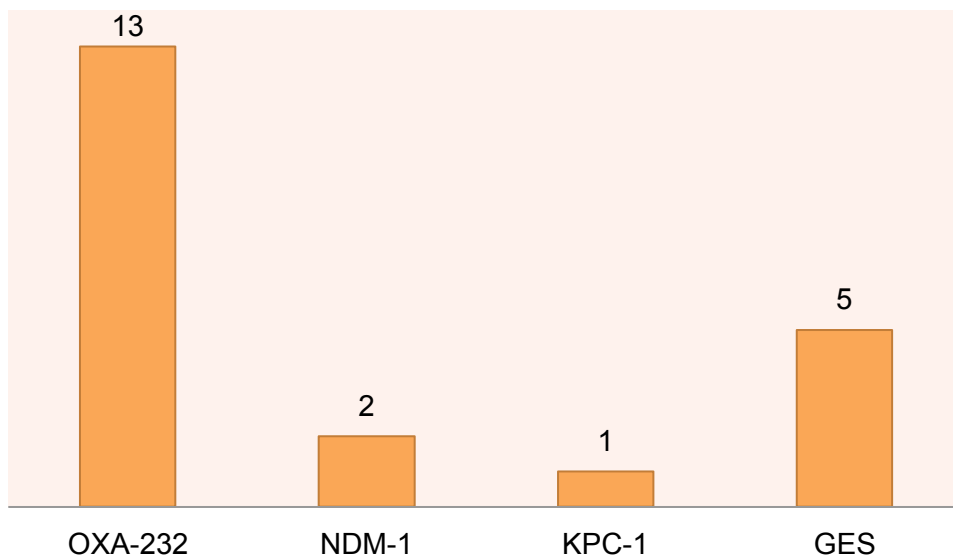


Figura 3. Incidencia de colonización con CRE en pacientes hospitalizados en el INCMNSZ entre enero y mayo 2014 divididos por áreas de riesgo.



Gráfica 1. Tasa de adquisición de colonización por CRE en las principales áreas de riesgo.



Gráfica 2. Mecanismos moleculares de resistencia identificados hasta el momento en los aislados de los pacientes colonizados por CRE.

Gráfica 3. Casos clínicos de pacientes infectados por CRE en el INCNSZ entre pacientes hospitalizados de julio 2013 a abril de 2014.

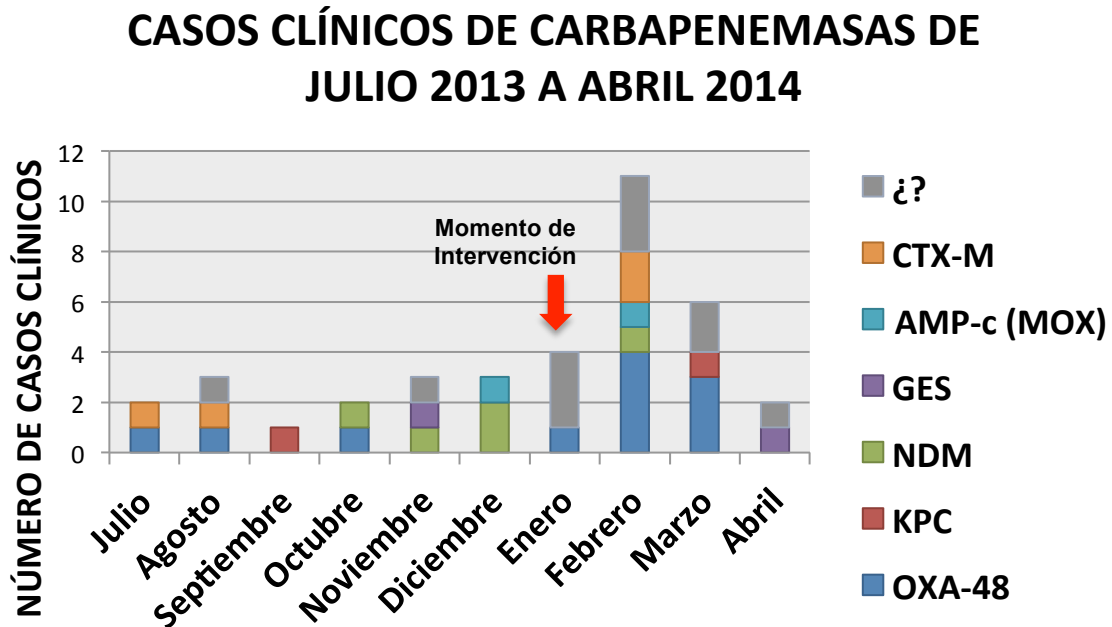


Tabla 1. Tasa estimada por año/persona de colonización por CRE en pacientes hospitalizados en el INCMNSZ en el periodo entre enero y mayo de 2014 (n=330).

D	Y	Rate ratio	(IC 95%)
56	14.63	3.83	2.95-4.97

Tabla 2. Características demográficas y análisis bivariado de factores de riesgo asociados a colonización por CRE en los pacientes hospitalizados en el INCMNSZ entre enero y mayo 2014.

Característica	N=56	Tiempo de seguimiento (meses)	Rate Ratio	(IC 95%)	P
Sexo					
Hombre			2.20	1.29-3.76	0.0032
Edad			0.99	0.98-1.01	0.4476
COMORBILIDADES					
Diabetes					
Si	9	3.66	0.57	0.28-1.17	0.1214
No	47	10.97			
Insuficiencia cardiaca					

	Si	8	1.67	1.291	0.61-2.73	0.5024
	No	48	12.96			
Hepatopatía						
	Si	7	2.02	0.89	0.40-1.97	0.7763
	No	49	12.61			
Enfermedad gastrointestinal						
	Si	12	2.15	1.58	0.83-3.00	0.1570
	No	44	12.48			
Enfermedad renal crónica						
	Si	8	2.23	0.93	0.44-1.96	0.8467
	No	48	12.41			
Neumopatía						
	Si	5	2.40	0.50	0.20-1.25	0.1306
	No	51	12.23			
Infección por VIH						
	Si	2	0.18	2.96	0.72-12.15	0.1134
	No	54	14.45			
Trasplante renal						
	Si	0	0.25	0.00	-	0.3193
	No	56	14.38			
Trasplante médula ósea						
	Si	0	0.69	0.00	-	0.0960
	No	56	13.94			
Trasplante hepático						
	Si	1	0.41	0.63	0.09-4.58	0.6486
	No	55	14.22			
Cáncer						
	Si	5	1.73	0.73	0.29-1.83	0.5019
	No	51	12.90			
Enfermedad hematológica						
	Si	19	3.62	1.56	0.90-2.71	0.1118
	No	37	11.01			
Enfermedad neurológica						
	Si	2	0.84	0.61	0.15-2.50	0.4877
	No	54	13.79			
Enfermedad reumatológica						
	Si	7	2.50	0.69	0.31-1.53	0.3620
	No	49	12.13			
ANTECEDENTES						
Hospitalización en los 3 meses previos						
	Si	17	4.90	0.87	0.49-1.53	0.6167
	No	39	9.73			
Uso de antibióticos en los 3 meses previos						
	Si	22	4.64	1.39	0.82-2.38	0.2236
	No	34	10.00			
Aislamiento MDR previo en los últimos 3 meses						
	Si	28	6.83	1.41	0.68-1.93	0.6213
	No	28	7.80			

Antecedente de viajes recientes						
	Si	7	1.50	1.25	0.57-2.76	0.5796
	No	49	13.13			
DURANTE LA HOSPITALIZACIÓN						
Repite cama						
	Si	29	5.53	1.76	1.04-2.98	0.03
	No	27	9.10			
Infección por CRE						
	Si	13	1.35	2.97	1.60-5.52	0.0003
	No	43	13.28			
Sepsis abdominal durante hospitalización						
	Si	19	6.09	0.72	0.41-1.25	0.2420
	No	37	8.54			
Drenaje de sepsis abdominal						
	Si	4	1.75	0.57	0.21-1.57	0.2668
	No	52	12.88			
Cirugía por sepsis abdominal						
	Si	4	1.52	0.66	0.24-1.84	0.4264
	No	52	13.11			
Cualquier cirugía durante la hospitalización						
	Si	20	5.52	0.92	0.53-1.58	0.7541
	No	36	9.11			
Hospitalización durante brote						
	Si	5	0.67	2.06	0.82-5.16	0.1155
	No	51	13.97			
Neutropenia						
	Si	14	2.60	1.54	0.84-2.82	0.1562
	No	42	12.03			
Neumonía						
	Si	24	4.60	1.64	0.97-2.78	0.0647
	No	32	10.04			
Ingreso a Hospitalización Urgencias						
	Si	14	2.56	0.56	0.30-1.02	0.0543
	No	42	4.59			
Ingreso UTI						
	Si	25	7.82	0.70	0.41-1.19	0.1849
	No	31	6.81			
Permanencia en áreas críticas >=7 días previos a HR						
	Si	18	7.56	0.44	0.25-0.78	0.0035
	No	38	7.07			
Traslado hospitalario						
	Si	16	2.84	1.66	0.93-2.96	0.0836
	No	40	11.79			

PROCEDIMIENTOS O DISPOSITIVOS						
Hemodiálisis						
	Si	5	1.079	1.23	0.49-3.09	0.6559
	No	51	13.55			
Broncoscopia						
	Si	14	2.92	1.24	0.73-2.45	0.3441
	No	42	11.71			
USTE						
	Si	3	0.70	1.12	0.35-3.59	0.8480
	No	53	13.92			
CPRE						
	Si	6	1.89	0.81	0.35-1.89	0.6239
	No	50	12.74			
Endoscopia						
	Si	8	2.74	0.27	0.34-1.53	0.3920
	No	48	11.89			
Colonoscopia						
	Si	4	0.83	1.28	0.46-3.53	0.6336
	No	52	13.80			
Algún dispositivo						
	Si	23	8.13	0.56	0.33-0.95	0.0289
	No	33	6.50			
CVC						
	Si	49	13.02	0.86	0.40-1.91	0.7168
	No	7	1.61			
Catéter urinario						
	Si	34	10.88	0.53	0.31-0.91	0.0193
	No	22	3.75			
Drenajes						
	Si	18	6.21	0.64	0.37-1.13	0.1183
	No	38	8.42			
Traqueostomía						
	Si	2	1.54	0.32	0.08-1.30	0.0908
	No	54	13.10			
NET						
	Si	20	7.44	0.54	0.31-0.93	0.0232
	No	36	7.19			
NPT						
	Si	6	4.05	0.31	0.13-0.73	0.0046
	No	50	10.58			
INMUNOSUPRESORES						
Prednisona						
	Si	11	4.19	0.61	0.32-1.18	0.1368
	No	45	10.44			
Ciclosporina						
	Si	3	7.23	1.32	0.41-4.22	0.6404
	No	53	168.35			
Tacrolimus						
	Si	2	6.60	0.95	0.23-3.89	0.9405
	No	54	168.97			
Mofetil micofenolato						
	Si	2	1.08	0.47	0.11-1.91	0.2782
	No	54	13.56			
Quimioterapia						

	Si	11	2.36	1.27	0.66-2.45	0.4774
	No	45	12.27			
Otros inmunosupresores						
	Si	11	4.15	0.62	0.32-1.19	0.1483
	No	45	10.48			
ANTIBIÓTICOS						
Uso de β-lactámicos						
	Si	31	9.56	0.658	0.39-1.11	0.1163
	No	25	5.07			
Uso de cefalosporinas						
	Si	12	4.53	0.61	0.32-1.15	0.1219
	No	44	10.10			
Uso de carbapenémicos						
	Si	47	11.49	1.43	0.70-2.91	0.3257
	No	9	3.14			
>10 días						
	Si	21	7.05	0.65	0.36-1.11	0.1089
	No	35	7.58			
>21 días						
	Si	6	4.38	0.28	0.12-0.66	.0017
	No	50	10.26			
Uso de vancomicina						
	Si	39	10.82	0.81	0.46-1.43	0.4625
	No	17	3.81			
Uso de macrólidos						
	Si	9	2.69	0.85	0.42-1.74	0.6586
	No	47	11.95			
Uso de linezolid						
	Si	15	4.39	0.85	0.47-1.54	0.5980
	No	41	10.24			
Uso de aminoglucósidos						
	Si	8	2.84	0.69	0.33-1.46	0.3327
	No	48	11.79			
Uso de metronidazol						
	Si	15	4.74	0.76	0.42-1.38	0.3700
	No	41	9.90			
Uso de TMP/SMX						
	Si	10	4.14	0.55	0.28-1.09	0.0829
	No	46	10.49			
Uso de quinolonas						
	Si	11	3.93	0.67	0.34-1.29	0.2213
	No	45	10.70			

Figura 4. Plano del servicio de Urgencias (Anexos, Exploraciones, RCP, Camillas), Hospitalización Urgencias y UTI. Se marca con círculo las camas por donde los pacientes que resultaron colonizados por CRE habían estado durante su hospitalización hasta el momento del resultado positivo; en rojo donde hubo más de un caso reportado y en amarillo donde solo hubo un caso reportado.

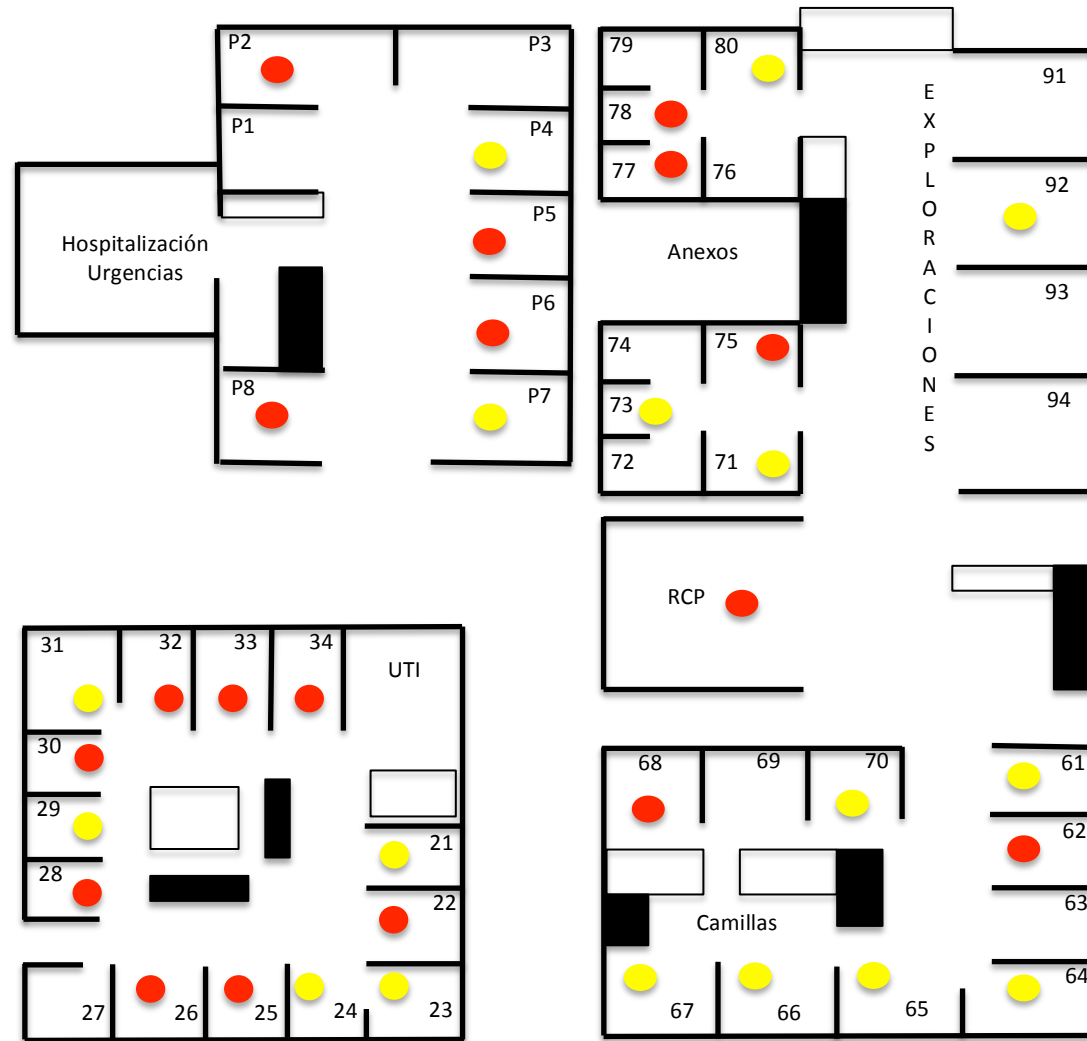


Figura 5. Plano del primer piso de hospitalización. Se marca con círculo las camas por donde los pacientes que resultaron colonizados por CRE habían estado durante su hospitalización hasta el momento del resultado positivo; en rojo donde hubo más de un caso reportado y en amarillo donde solo hubo un caso reportado.



Figura 6. Plano del segundo piso de hospitalización. Se marca con círculo las camas por donde los pacientes que resultaron colonizados por CRE habían estado durante su hospitalización hasta el momento del resultado positivo; en rojo donde hubo más de un caso reportado y en amarillo donde solo hubo un caso reportado.



Figura 7. Plano del tercer piso de hospitalización. Se marca con círculo las camas por donde los pacientes que resultaron colonizados por CRE habían estado durante su hospitalización hasta el momento del resultado positivo; en rojo donde hubo más de un caso reportado y en amarillo donde solo hubo un caso reportado.

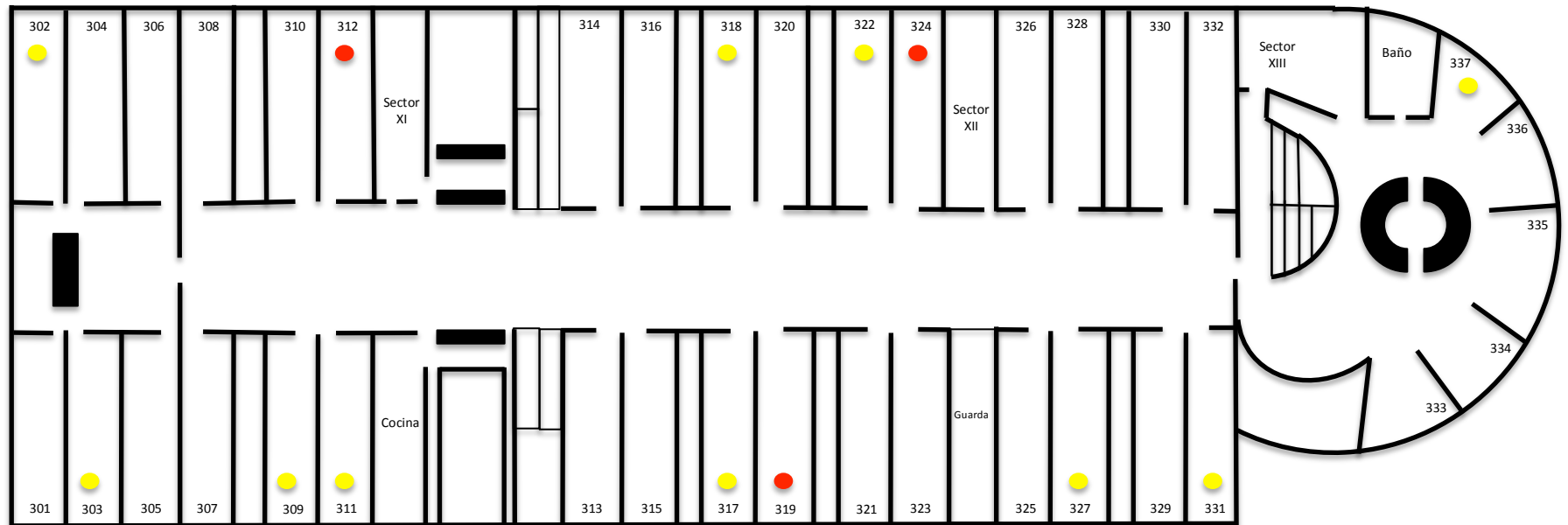
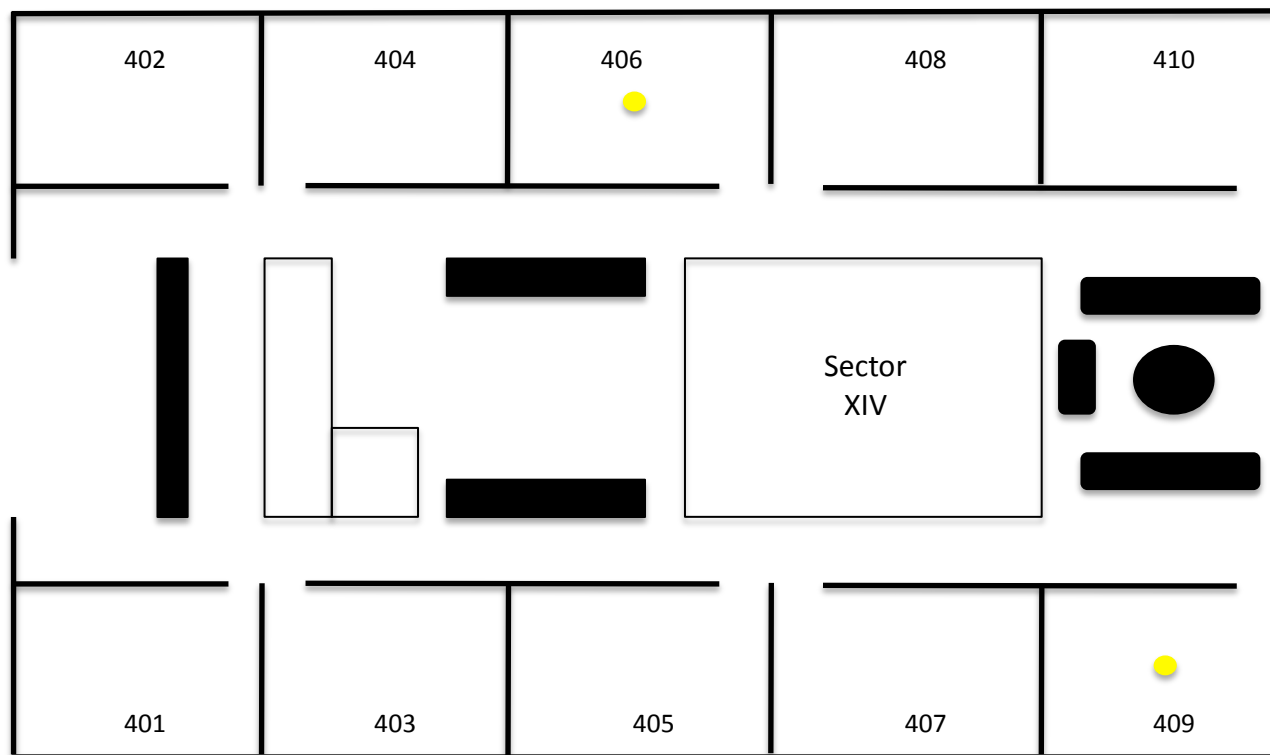


Figura 8. Plano del cuarto piso de hospitalización. Se marca con círculo las camas por donde los pacientes que resultaron colonizados por CRE habían estado durante su hospitalización hasta el momento del resultado positivo; en rojo donde hubo más de un caso reportado y en amarillo donde solo hubo un caso reportado.



10. Discusión y conclusiones.

La incidencia de colonización por CRE en los pacientes hospitalizados en el INCMNSZ durante los cinco meses evaluados (enero a mayo de 2014), fue mucho mayor a lo esperado (RR de 3.83 año/persona) con una incidencia de 17%.

Basados en la literatura publicada se consideraron seis “áreas de riesgo” para incluir a los participantes del estudio (sepsis abdominal, traslados hospitalarios, neutropenia, trasplante, ingreso a áreas críticas y pacientes relacionados epidemiológicamente con caso colonizado o infectado por CRE).

En el análisis bivariado los factores relacionados con mayor riesgo de colonización por CRE (con $P < 0.05$) fueron: el repetir cama, es decir el ser hospitalizado en alguna cama en la que previamente había estado un paciente colonizado por CRE (RR 1.76, IC 95% 1.04-2.98, P 0.03) y el ser hombre (RR 2.20, IC 95% 1.29-3.76, P 0.0032).

Otros factores asociados ($P < 0.2$) fueron la infección por VIH (RR 2.96, IC 95% 0.72-12.15, P 0.1134), enfermedad hematológica (RR 1.56, IC 95% 0.90-2.71, P 0.1118), uso de antibióticos en los 3 meses previos (RR 1.39, IC 95% 0.82-2.38, P 0.2236), ser hospitalizado al momento de un brote hospitalario de colonización/infección por CRE (RR 2.06, IC 95% 0.82-5.16, P 0.1155), neutropenia (RR 1.54, IC 95% 0.84-2.82, P 0.1562), neumonía (RR 1.64, IC 95% 0.87-2.78, P 0.0647) y traslado hospitalario (RR 1.66, IC 95% 0.93-2.96, P 0.0836).

El hecho de que el “repetir cama” sea el factor de riesgo más importante asociado a colonización por CRE, independientemente de las comorbilidades o complicaciones que pudiera presentar el paciente durante su hospitalización, hace reflexionar sobre los protocolos de limpieza que se están siguiendo en el Instituto una vez que el paciente desocupa la habitación, ya que como es sabido las bacterias pueden permanecer sobre las superficies inertes durante algún tiempo, por lo que es de vital importancia que se sigan todas las medidas de higiene recomendadas.

Así mismo se confirmó lo reportado en estudios previos, que el estar colonizado por CRE confiere un mayor riesgo para adquirir alguna infección por estos mismos microorganismos (RR 2.97, IC 95% 1.60-5.52, P 0.0003).

Entre las fortalezas del estudio se encuentran el que sea una cohorte de pacientes en la que se establecieron los criterios de inclusión al inicio del mismo y el seguimiento de los participantes fue similar, concluyendo al momento de identificarse como colonizado por CRE o el “salir” del área de riesgo debido a su resolución, alta hospitalaria y/o muerte.

Como ha sido el caso en otros países en los que se han tenido que enfrentar a brotes hospitalarios de infecciones por CRE, considero que vale la pena mencionar que el resultado de este trabajo es debido a la suma de esfuerzos de

varias personas y el establecer “bundles of care” o una serie de medidas de cuidado, desde la toma de los hisopados rectales, la captura de la información de los pacientes, la manipulación y análisis de las muestras por parte del personal del laboratorio hasta su identificación final, el apoyo por parte del servicio de Epidemiología Hospitalaria y de todos los médicos y enfermeras a cargo de los pacientes para realizar la cohorte de los mismos y el seguimiento de las precauciones de contacto.

Todas estas medidas fueron realizadas durante el estudio con lo cual se logró controlar el brote y no tener otro caso de paciente infectado por CRE mientras se aplicó el protocolo.

Consideramos importante que aunado a la mejora de la limpieza de todas las áreas en las que un paciente permanezca hospitalizado, se debe establecer de manera rutinaria y universal el realizar hisopado rectal a todo paciente que sea hospitalizado en el INCMNSZ para identificar de manera temprana a los pacientes colonizados por CRE y que se continúe de manera permanente las medidas de vigilancia establecidas contando con la valiosa participación de todo el personal que tenga contacto con el paciente en las distintas áreas de trabajo. Además de que este modelo pueda repetirse y establecerse en otros centros hospitalarios que enfrenten la difícil situación de pacientes infectados por CRE u otros microorganismos MDR.

11. Referencias.

1. Wellington EM, Boxall AB, Cross P et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases* 2013; **13**: 155-65.
2. Gupta N, Limbago BM, Patel JB et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; **53**: 60-7.
3. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine* 2012; **18**: 263-72.
4. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Current opinion in infectious diseases* 2008; **21**: 367-71.
5. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. *The Lancet infectious diseases* 2013; **13**: 785-96.
6. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**: 818-20.

7. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases* 2009; **9**: 228-36.
8. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases* 2011; **17**: 1791-8.
9. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; **18**: 432-8.
10. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews* 2012; **25**: 682-707.
11. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**: 5046-54.
12. Moellering RC, Jr. NDM-1--a cause for worldwide concern. *The New England journal of medicine* 2010; **363**: 2377-9.
13. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases* 2010; **10**: 597-602.
14. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases* 2011; **11**: 355-62.
15. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012; **67**: 1597-606.
16. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H et al. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**: 2950-4.
17. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology* 2013; **62**: 499-513.
18. Chiu SK, Wu TL, Chuang YC et al. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PloS one* 2013; **8**: e69428.
19. Drew RJ, Turton JF, Hill RL et al. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a UK paediatric hospital. *The Journal of hospital infection* 2013; **84**: 300-4.

20. Savard P, Perl TM. A call for action: managing the emergence of multidrug-resistant Enterobacteriaceae in the acute care settings. *Current opinion in infectious diseases* 2012; **25**: 371-7.
21. Gaibani P, Ambretti S, Farruggia P et al. Outbreak of *Citrobacter freundii* carrying VIM-1 in an Italian Hospital, identified during the carbapenemases screening actions, June 2012. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2013; **17**: e714-7.
22. Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M et al. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2013; **19**: 451-6.
23. Protonotariou E, Tsalidou M, Vitti D et al. First identification of VIM-1-producing *Citrobacter freundii* in Greece. *International journal of antimicrobial agents* 2008; **32**: 460-1.
24. Cai JC, Zhou HW, Zhang R et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**: 2014-8.
25. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2009; **58**: 256-60.
26. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010; **16**: 102-11.
27. Munoz-Price LS, Quinn JP. Deconstructing the infection control bundles for the containment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Current opinion in infectious diseases* 2013; **26**: 378-87.
28. Apisarnthanarak A, Hsu LY, Khawcharoenporn T et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: how to prioritize infection prevention and control interventions in resource-limited settings? *Expert review of anti-infective therapy* 2013; **11**: 147-57.
29. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014; **20 Suppl 1**: 1-55.

30. Schwaber MJ, Carmeli Y. An ongoing national intervention to contain the spread of carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; **58**: 697-703.
31. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011; **66**: 2288-94.
32. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *International journal of antimicrobial agents* 2010; **36**: 205-10.
33. Wilkinson KM, Winstanley TG, Lanyon C et al. Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 2012; **50**: 3102-4.
34. Vielmetter J, Stolze B, Bonhoeffer F et al. In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Experimental brain research* 1990; **81**: 283-7.
35. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L et al. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 2008; **46**: 3110-1.
36. Landman D, Salvani JK, Bratu S et al. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *Journal of clinical microbiology* 2005; **43**: 5639-41.
37. Nordmann P, Poirel L, Carrer A et al. How to detect NDM-1 producers. *Journal of clinical microbiology* 2011; **49**: 718-21.
38. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2007; **20**: 440-58, table of contents.