



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Instituto Mexicano del Seguro Social

Centro Médico Nacional La Raza

Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández

PREVALENCIA DE CARBAPENEMASAS EN *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* AISLADOS DE HEMOCULTIVOS

Tesis para obtener el grado de:

Especialista en Infectología

Presenta:

Adriana Salazar Duarte

Asesora:

MC. Elena Urdez Hernández



Ciudad de México, a 15 de febrero de 2016



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.

-
Dr. Elfego Bautista Cortés
Coordinación de Educación e Investigación en Salud

-
MC. Elena Urdez Hernández
Profesora Titular del Curso de Infectología

-
MC. Elena Urdez Hernández
Asesora de Tesis

-
Q.F.B. Eva Aurora Sánchez Hernández
Asesora de Tesis

-
Dr. Enrique Alcalá Martínez
Asesor de Tesis

-
Dra. Adriana Salazar Duarte
Residente del segundo año de Infectología

Número de registro: R-2015-3502-146

DATOS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES

Investigador responsable: Adriana Salazar Duarte

Cargo: Médica residente de infectología, Centro Médico Nacional La Raza,
Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández

Matrícula del IMSS: 99264865

Dirección: Esquina Jacarandas y Seris S/N. Col. La Raza, Del. Azcapotzalco, DF.
CP 02990.

Teléfono: (55)57245900 Ext. 23924.

Correo electrónico: adysalazar@hotmail.com

Investigador asesor o tutor: MC. Dra. Elena Urdez Hernández

Cargo: Médica adscrita al servicio de infectología, Centro Médico Nacional La Raza, Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández Profesora titular del curso de la especialidad de Infectología de adultos. Facultad de Medicina UNAM.

Matrícula del IMSS: 3264173

Dirección: Esquina Jacarandas y Seris S/N. Col. La Raza, Del. Azcapotzalco, DF.
CP 02990.

Teléfono: (55) 57245900 Ext. 23924.

Correo electrónico: elena_urdez_hdz@yahoo.com.mx

Asesora: Q.F.B. Eva Aurora Hernández Sánchez

Cargo: Químico Clínico. Jefa de sección de bacteriología sanitaria del laboratorio clínico del Hospital de infectología Dr. Daniel Méndez Hernández Centro Médico Nacional La Raza.

Matrícula del IMSS: 99361312

Dirección: Esquina Jacarandas y Seris S/N. Col. La Raza, Del. Azcapotzalco, DF.
CP 02990.

Teléfono: (55) 55832211 Conmutador 57821088 y 57245900. Extensión: 23942

Correo electrónico: qfb_evaura@yahoo.com.mx

Asesor: Dr. Enrique Alcalá Martínez

Cargo: Médico epidemiólogo, adscrito al servicio de Medicina Preventiva y Epidemiología hospitalaria, Hospital de infectología Dr. Daniel Méndez, Centro Médico Nacional La Raza.

Matrícula del IMSS: 99092891

Dirección: Esquina Jacarandas y Seris S/N. Col. La Raza, Del. Azcapotzalco, DF. CP 02990.

Teléfono:(55) 55832211

Correo electrónico: roldan79@hotmail.com

COLABORADORES

QBP. Sandra Leticia Sánchez Tejeda.

Cargo: Adscrita al servicio de laboratorio clínico en el Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret Centro Médico Nacional La Raza.

Matrícula del IMSS: 9215794

Dirección: Seris S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, Ciudad de México.

Teléfono celular: 044 5528113273

Correo electrónico: Sandrita_sánchez_2001@yahoo.com.mx

QFB. Ana Patricia Escorza Meneses

Cargo: Adscrita al servicio de laboratorio clínico del Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret Centro Médico Nacional La Raza.

Matrícula del IMSS: 98361111

Dirección: Seris S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, Ciudad de México.

Teléfono: 57820129. Ext. 23090. Teléfono celular: 044 5566943700

Correo electrónico: Pat.escorza@gmail.com

QFB. María del Carmen Melchor Díaz

Cargo: Jefa de sección de Bacteriología del Laboratorio Clínico. Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret Centro Médico Nacional La Raza.

Matrícula del IMSS: 9737421

Dirección: Seris S/N Col. La Raza, Del. Azcapotzalco, Ciudad de México.

Teléfono: 57820129. Ext. 23090

Correo electrónico: calloyis@yahoo.com.mx

*Este trabajo lo dedico a mis pacientes, mi compromiso a ser mejor profesional
cada día es con ellos*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Gustavo Barriga por su apoyo en este proyecto.

Gracias especiales al QFB Eduardo Esparza y al auxiliar de laboratorio José Luis Cuevas por su invaluable ayuda.

A mis profesoras y tutoras, su compromiso y esfuerzo se ven reflejados en este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
ANTECEDENTES	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
<i>Acinetobacter baumannii</i>	13
Resistencia a los antimicrobianos.....	14
Resistencia antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter spp.</i>	16
Impermeabilidad de la membrana externa, mutaciones y resistencia	16
Las mutaciones en las proteínas de los sistemas de eflujo activo de antibióticos.....	16
Mutaciones múltiples y multidrogo-resistencia.....	17
Genes adquiridos y multidrogo-resistencia	18
Carbapenémicos y carbapenemasas.....	19
Características de las carbapenemasas	21
Carbapenemasas clase A (KPC)	21
Carbapenemasas clase B	22
Carbapenemasas clase D.....	23
IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.....	23
Métodos genotípicos	24
Métodos fenotípicos	24
Prueba de Hodge modificada (PHM)	24
Pruebas con inhibidores de carbapenemasas	25
Prueba del disco potenciado o combinado	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
PREGUNTA DE INVESTIGACION	28
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	29
Objetivo Principal	29
Objetivos Específicos.....	29
METODOLOGÍA.....	30
Tipo de estudio	30
Población de estudio.....	30
Criterios de selección de muestras.....	30
Ubicación espacio-temporal.....	31
Definición de las variables	31
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	32
ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES.....	34

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	39
ANEXOS.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	44

RESUMEN

Introducción. Las infecciones nosocomiales ocurren en todo el mundo con tasas del 5 al 25%, y conllevan altos índices de morbi-mortalidad. Entre las bacterias causales más comunes se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*, que han demostrado resistencia creciente a antimicrobianos. En estas infecciones, los carbapenémicos son el último recurso terapéutico; sin embargo, los mecanismos de resistencia que poseen las bacterias, entre otros la producción de carbapenemasas, pueden nulificar el efecto terapéutico esperado. Las carbapenemasas conocidas pertenecen a los grupo A, B y D de la clasificación de Ambler. En *Pseudomonas aeruginosa* predominan las del grupo B. En *Acinetobacter*, las del grupo D. La detección de dichas enzimas se realizan por métodos fenotípicos y genotípicos. Entre los primeros, más accesibles, se cuenta con la prueba de escrutinio de Hodge modificada (PHM) y la del sinergismo con disco combinado.

Objetivos. Determinar la producción de carbapenemasas del grupo B y D en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* aislados de hemocultivos en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza.

Material y Métodos. En bacterias viables aisladas de hemocultivos consecutivos, se determinó la susceptibilidad a imipenem y meropenem por el método VITEK-2. Se realizó la detección fenotípica de carbapenemasas mediante la PHM (cualitativa) y la del disco combinado. Para esta se colocaron dos discos de imipenem 10 µg separados sobre una placa de agar Mueller Hinton. Uno de los discos se combinó con EDTA 730 µg, para identificar metalobetalactamasas (MBL), o con oxacilina 1000 µg para las oxacilinasas y se incubaron a 35-37°C durante 16-18 h, para *P. aeruginosa*, y 20-24 h para *Acinetobacter spp.* La evidencia de una hendidura en la parte proximal de disco o forma de trébol definió la presencia de carbapenemasas en la PHM; el incremento en el halo de inhibición ≥ 5 mm del disco combinado con EDTA ó ≥ 3 mm del disco combinado con oxacilina identificó a las carbapenemasas del grupo B y D, respectivamente.

Resultados. Se incluyeron 76 aislados, 50 *P. aeruginosa* y 26 *Acinetobacter spp.* En el primer grupo, la tasa de resistencia a carbapenémicos fue de 54%; las MBL se detectaron en el 85% y oxacilinasas en 7.4%. En el segundo grupo, la tasa promedio de resistencia fue de 75%; 97% expresaron MBL y 77% oxacilinasas.

Conclusión. Entre *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* resistentes a carbapenemes, la producción de metaloenzimas es alta. Considerando que la adquisición de este rasgo de resistencia es transferible, para limitar la diseminación resulta imperativo tanto implementar métodos diagnósticos rápidos como hacer efectivo el lavado de manos.

ANTECEDENTES

INFECCIONES NOSOCOMIALES

Las infecciones intrahospitalarias (IIH), también llamadas nosocomiales, son complicaciones que los enfermos desarrollan cuando son atendidos en un centro sanitario. Dichas entidades se caracterizan por lo siguiente: ocurren mundialmente, estimando en 1.4 millones las personas afectadas, con prevalencias oscilantes de 5% en hospitales de países desarrollados a más del 25% de los ingresos en comunidades pobres; generalmente se afectan hospederos vulnerables, ya sea por comorbilidades, procedimientos invasivos, edad, el estado de inmunidad, cualquier enfermedad subyacente y las intervenciones diagnósticas y terapéuticas, pacientes en extremos de la vida, enfermedad crónica, como tumores malignos, leucemia, diabetes mellitus, insuficiencia renal o VIH/SIDA. Los microorganismos más frecuentes involucrados en las infecciones nosocomiales son generalmente bacterias Gram negativas, entre las que se encuentran: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii*. [1] Finalmente, en las IIH existe un aumento creciente de las resistencias a los antimicrobianos, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, como son *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y las enterobacterias, referidos como grupo ESKAPE. Por lo tanto, las características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las IIH conllevan elevada mortalidad, del 27.96% (*Pseudomonas aeruginosa*) al 52% (*Acinetobacter spp.*). [2][3][4][5][6][7]

CARACTERÍSTICAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y DE *ACINETOBACTER SPP.*

Son bacterias que comparten los siguientes rasgos: son Gram negativas, no fermentan la glucosa, son aerobias, existen en el suelo y en el agua, tienen requerimientos nutricionales mínimos, con frecuencia expresan multirresistencia o panresistencia a los antimicrobianos, pueden colonizar las superficies cutáneo-

mucosas de los enfermos, se comportan como patógenos oportunistas ya que se requiere previa ruptura de las barreras del hospedero y son miembros del grupo de bacterias con reto terapéutico.[8]

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Taxonomía

Reino: *Bacteria*

Fillum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Pseudomonadaceae*

Género: *Pseudomonas* [9]

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es la especie más importante del género *Pseudomonas* caracterizada por lo siguiente: es un bacilo Gram negativo recto o ligeramente curvo y móvil, típicamente se dispone en parejas. Aunque su desarrollo óptimo es a 37°C puede crecer a 42°C. Da positiva la prueba de oxidasa. Produce exopolisacáridos mucoides y pigmentos como la pioverdina y la piocianina, además de elastasas, proteasas, citotoxinas y hemolisinas. Finalmente, *P. aeruginosa* posee una resistencia intrínseca a las concentraciones altas de sal, a colorantes, antisépticos, a muchos antibióticos comunes y puede adquirir otros factores de resistencia durante el tratamiento. [8][10][11] En algunos centros *P. aeruginosa* alcanza un 8% (51,000 casos/año) de todas las IIH reportadas; predominan las neumonías, infecciones del torrente sanguíneo, de vías urinarias y del sitio quirúrgico. El 13% de las bacterias son resistentes a aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenemes. [12]

ACINETOBACTER BAUMANNII

Taxonomía

Reino: *Bacteria*

Fillum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Moraxellaceae*

Género: *Acinetobacter* [13]

Acinetobacter spp. es una bacteria Gram negativa, con forma de bacilo durante la fase exponencial del desarrollo y de cocobacilo en la fase estacionaria; es inmóvil, da positiva la prueba de la catalasa y negativa la de la oxidasa. Resiste la desecación, está dotada de fimbrias, produce biocapas (cápsula) y bacteriocinas. Mediante estudios de hibridación se han identificado hasta 33 genoespecies. Las genoespecies 2, 3 y 13 no se pueden diferenciar fenotípicamente por lo que forman el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*. De este complejo, el miembro de mayor importancia clínica es *A. baumannii*. En el pasado se le consideraba una bacteria comensal de baja virulencia y actualmente se reporta como causa de la mayoría de los brotes de casos. En algunas áreas las IIH causadas por *Acinetobacter* son de 12,000/año. Aunque representan el 2% de todas las IIH reportadas, alcanzan hasta un 7% entre los pacientes críticos con apoyo ventilatorio. Las infecciones principales son neumonía e infecciones del torrente sanguíneo; el 63% de los microorganismos son resistentes al menos a 3 clases de antimicrobianos (multirresistentes). [6][14][15]

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Durante las últimas 7 décadas los antibióticos han sido clave en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias y otros microorganismos incrementando la esperanza de vida. Sin embargo, la introducción de cada nuevo antimicrobiano ha sido seguida del surgimiento de microorganismos resistentes. Las tasas de resistencia a los fármacos nuevos es del 1%; sin embargo, dentro de los primeros 8-12 años del uso extenso de los antibióticos la resistencia a varios antimicrobianos suele incrementarse. La proporción de multidrogo-resistencia alcanzada por algunas bacterias es tan alta que ya no se cuenta con un antimicrobiano útil para tratar las infecciones que causa. La resistencia a los antimicrobianos es una respuesta natural de los microorganismos que ocurre cuando éstos se vuelven inmunes al efecto de un fármaco al que previamente

eran sensibles. La resistencia antimicrobiana de las bacterias puede ser de dos tipos: La resistencia inherente, también conocida como intrínseca o natural y la adquirida. En la primera la bacteria está dotada naturalmente de rasgos que le confiere resistencia a un antibiótico específico. Tales rasgos pueden ser el poseer una membrana impermeable a la entrada del antibiótico, la carencia de un sistema de transporte para éste o el carecer de un sitio blanco propio del fármaco. Esta información ya se conoce por lo que puede guiar la prescripción de antibióticos, ya que el empleo de estos seleccionará a las bacterias con resistencia intrínseca (oportunistas). En la segunda el microorganismo se vuelve inmune al efecto de un fármaco al que previamente era sensible. Tal fenómeno es acelerado por la presión selectiva ejercida por el abuso así como por el mal uso de los antimicrobianos y surge cuando el microorganismo cambia su material genético, ya sea por mutaciones o por adquirir genes de resistencia. [16][17][18][19][20] La mutación espontánea para la resistencia a los antibióticos se presenta en 1 de cada 10^8 - 10^9 bacterias que causan infección. Sin embargo, la resistencia en la población bacteriana se puede extender fácilmente dada la rápida multiplicación de las bacterias (cada 20 min) y particularmente con el uso de antibióticos como la rifampicina, ácido fusídico, quinolonas y cefalosporinas. Los genes de resistencia han existido desde antes que se emplearan los antibióticos siendo productos naturales y las bacterias necesitan protegerse. El material genético está contenido en paquetes de DNA que pueden transferirse tanto entre bacterias de la misma especie como entre bacterias de especie diferente. El intercambio genético se realiza mediante plásmidos, trasposones e integrones. El plásmido es un fragmento de DNA autoreplicativo, pequeño, circular, separado del genoma bacteriano. El trasposón es una sección de DNA del plásmido que se transfiere entre plásmidos (“salta”). Los integrones son secuencias de DNA transportados por los plásmidos o trasposones que se involucran en la movilización e inserción en un sitio específico de secuencias genéticas. Desde el punto de vista epidemiológico la resistencia transferible es relevante ya que la diseminación es fácil pudiéndose originar brotes.

La resistencia múltiple en Gram negativos es producto de una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de ellos inherentes a la especie y otros adquiridos. Los mecanismos de resistencia adquirida que se han identificado son cinco:

Reducción de la entrada del antibiótico por disminución de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria.

Expulsión del antibiótico mediante la expresión de bombas de eflujo.

Modificación o producción de un nuevo sitio blanco del antibiótico.

Sobreexpresión del sitio blanco.

Modificación enzimática o destrucción del antibiótico. [17][20][21]

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *P. AERUGINOSA* Y *ACINETOBACTER SPP.*

En estas especies de bacterias no fermentadoras se pone en evidencia un gran sinergismo de la resistencia intrínseca con la adquirida.

IMPERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA, MUTACIONES Y RESISTENCIA

La membrana externa constituye una barrera semipermeable a los antimicrobianos, particularmente en *P. aeruginosa* cuya permeabilidad promedio es de 12 a 100 veces menor que la de *E. coli*. Varias penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactames, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas logran superar la resistencia inherente; sin embargo, existe una proclividad para la resistencia por mutaciones. Así, las mutaciones en la topoisomerasa II y IV que ocasionan resistencia a las fluoroquinolonas se producen más fácilmente en *P. aeruginosa* que en las enterobacterias. El grado de desrepresión de la β -lactamasa cromosomal AmpC que reduce sensibilidad a penicilinas y cefalosporinas es más variable que en *Enterobacter*.

LAS MUTACIONES EN LAS PROTEÍNAS DE LOS SISTEMAS DE EFLUJO ACTIVO DE ANTIBIÓTICOS

Este es un mecanismo de los microorganismos que contribuye a la resistencia múltiple a los antibióticos antipseudomonas y es mediado por cuatro sistemas de

tres componentes genéticamente diferentes que pertenecen a la familia RND (Resistance-Nodulation-Division): MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-Opr, MexE-MexF-OprN y MexXA-MexY-OprM. Estos sistemas de eflujo tiene tres componentes: una proteína localizada en la membrana citoplasmica (MexB, MexD, MexF y MexY) que opera como una bomba dependiente de energía con una amplia especificidad de sustratos. El segundo componente es una proteína de membrana externa (OprM, OprJ, OprN y OprM). La tercer proteína (MexA, MexC, MexE y MexX) se localiza en el espacio periplásmico y une las otras dos.

Los sistemas de eflujo MexA-MexB-OprM y MexX-MexY-OprM participan simultáneamente en los mecanismos de resistencia antimicrobiana natural y adquiridos de *P. aeruginosa*, mientras que MexC-MexD-OprJ y MexE-MexE-MexF-OprN actúan solo en la resistencia adquirida. Entre los sustratos de los componentes de los sistemas de eflujo se encuentran la mayoría de los grupos de antimicrobianos (fluoroquinolonas, β -lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, novoviocina, lincomicina). La sobreexpresión de los sistemas de eflujo con un perfil amplio de sustratos es un importante mecanismo de mutación en *P. aeruginosa*. Muchos aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a Imipenem se caracterizan por deficiencia de OprD (porina D2). La pérdida de OprD determina la resistencia a carbapenemes solo en casos de que se exprese la β -lactamasa cromosomal AmpC, demostrando la cooperación entre estos dos mecanismos.

MUTACIONES MULTIPLES Y MULTIDROGO-RESISTENCIA

La sobreexpresión de los sistemas de eflujo pueden afectar simultáneamente a las fluoroquinolonas y a casi todos los β -lactámicos dejando útiles a los aminoglucósidos y al imipenem. Una combinación de la sobreexpresión de los sistemas de eflujo, pérdida de la OprD e impermeabilidad a los aminoglucósidos comprometerá a casi todas las clases de antimicrobianos con excepción de las polimixinas. Las mutaciones que afectan la sobreexpresión de los sistemas de eflujo pueden actuar aditivamente con las que afectan la permeabilidad, la

expresión de β -lactamasas o la de topoisomerasas. La acumulación de mutaciones secuenciales se facilita en bacterias hipermutantes. [22]

GENES ADQUIRIDOS Y MULTIDROGO-RESISTENCIA

La producción de enzimas es el mecanismo de resistencia adquirida a los β -lactámicos que más se ha estudiado en *P. aeruginosa*. Esta bacteria ha adquirido material genético para producir enzimas β -lactamasas y modificadoras de aminoglucósidos. Uno de los más importantes mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) es la hidrólisis por β -lactamasas. Los genes que codifican para estas enzimas mutan continuamente en respuesta a la fuerte presión del uso de antimicrobianos que conduce al desarrollo de nuevas β -lactamasas con mayor espectro de actividad. Hasta la fecha 4 clases de β -lactamasas son reconocidas (A-D). Las clases A, C y D actúan mediante un mecanismo basado en serina; las de clase B, requieren de zinc para su acción. Un significativo número de β -lactamasas de las cuatro clases moleculares se encuentran en *P. aeruginosa* incluyendo β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) de las clases A, B y D. [23][24][25]

β -LACTAMASAS CLASE A

Se incluyen 4 β -lactamasas que hidrolizan la carbenicilina: PSE-1, PSE-4, CARB-3, y Carb-4. El perfil de sustratos incluye carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y cefsulósine. β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), a diferencia de las anteriores condicionan resistencia no sólo de carboxipenicilina sino también de cefalosporinas de amplio espectro (cefazidima, cefepime, cefpirome) y aztreonam. Tienen baja afinidad por los carbapenemes. Su actividad in vitro se inhibe por el ácido clavulánico y tazobactam. Las BLEEs en *Pseudomonas* se detectaron después de 1990. Además de los tipos TEMx y SHVx, que son bien conocidos entre las enterobacterias, en *P. aeruginosa* se han identificado los tipos PER, VEB, GES/IBC y BEL. [26]

β-LACTAMASAS CLASE B (CARBAPENEMASAS)

También conocidas como metaloenzimas por la presencia de Zn^{2+} en su centro activo, determina la resistencia a todos los β-lactámicos, incluyendo los carbapenemes imipenem y meropenem. [26]

β-LACTAMASAS CLASE C (CEFALOSPORINASAS)

P. aeruginosa es naturalmente sensible a las carboxypenicilinas, ceftazidima y aztreonam. Adquiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación a través de hiperproducción constitutiva de la β-lactamasa AmpC. Como algunas especies de la familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter spp*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Yersinia enterocolitica*), *P. aeruginosa* produce β-lactamasa inducible codificada cromosomalmente, cuya producción puede aumentar de 100 a 1000 en presencia de β-lactámicos inductores, especialmente imipenem. [26]

β-LACTAMASAS CLASE D (OXACILINASAS)

Las OXA clásicas (OXA-1, Oxa-2, OXA-10) determinan resistencia a carboxypenicilina y ureidopencilina, pero no a ceftazidima. El espectro de hidrólisis se ha extendido a ceftazidima, cefotaxima, cefepime, cefpirome, aztreonam y moxalactam. La mayoría de oxacilinasas de espectro extendido son codificadas por genes localizados en plásmidos o integrones, lo que facilita una fácil diseminación. [26]

CARBAPENÉMICOS Y CARBAPENEMASAS

Los carbapenemes son los agentes antimicrobianos más efectivos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp*; al igual que todos los β-lactámicos, inhiben la síntesis de la pared bacteriana; sin embargo, su estructura molecular única les confiere una excepcional estabilidad a la hidrólisis de las β-lactamasas, abarcando a las AmpC y a la mayoría de BLEEs [27][28] por lo que frecuentemente se emplean como el

último recurso para tratar infecciones muy graves o con sospecha de patógenos multidrogo-resistentes. [29][30]

RESISTENCIA A LOS CARBAPENÉMICOS

La resistencia a los carbapenemes en bacterias Gram negativas ocurre por la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único. En general, los mecanismos de resistencia combinables son 2: no mediados o mediados por carbapenemasas.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS NO MEDIADOS POR CARBAPENEMASAS

En aislados clínicos de *P. aeruginosa* se han demostrado varias combinaciones de sobreproducción de la β -lactamasa AmpC, producción disminuida de la porina OprD que forma el canal de entrada para el imipenem y la activación de sistemas de eflujo como el MexAB-OprM. [17][19][20][19][31][32] Las β -lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenemes; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenemes. Los β -lactámicos difieren en su habilidad como inductores. Las bencilpenicilinas, ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas como cefazolina y cefalotina son fuertes inductores y buenos sustratos para AmpC. La ceftioxitina y el imipenem también son fuertes inductores, pero más estables. [33]

RESISTENCIA A LOS CARBAPENÉMICOS MEDIADA POR CARBAPENEMASAS

Las carbapenemasas son β -lactamasas específicas con habilidad para hidrolizar carbapenémicos. Representan el mecanismo más extendido de resistencia a los carbapenemes. Un considerable número de carbapenemasas que pertenecen tanto a la clase A, B y D de la clasificación funcional de las β -lactamasas, ha emergido durante los últimos años, particularmente entre las bacterias no fermentadoras. Casi todos los tipos de carbapenemasas transferibles se han

reportado mundialmente entre *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* Sin embargo, las metalobetalactamasas (MBL, carbapenemasas del grupo B) se consideran como las carbapenemasas de mayor relevancia clínica para *P. aeruginosa*, mientras que las oxacilinasas (carbapenemasas del grupo D) lo son para *Acinetobacter spp.* [28]

CARACTERÍSTICAS DE LAS CARBAPENEMASAS

Dentro de la familia de β -lactamasas, las más versátiles son las carbapenemasas, con una amplitud de espectro inigualable por otras enzimas hidrolizantes de β -lactámicos. La clasificación de las carbapenemasas se basa principalmente en dos propiedades, funcional y molecular. Esta clasificación divide a las carbapenemasas en cuatro grupos funcionales principales (1-4), y se encuentran principalmente en los grupos 2f y 3. La clasificación molecular comprende las clases A-D. Las β -lactamasas de clase A, C y D tienen serina en su grupo activo y las del grupo B tienen zinc en su sitio activo, de ahí el nombre de metaloenzimas.[34]

CARBAPENEMASAS CLASE A (KPC)

Las carbapenemasas de la clase A pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush et al, y comprenden cinco grupos: SME (*Serratia marscescens* enzyme), IMI (Imipenem-hydrolizing B-lactamase), NMC (not metalloenzyme carbapenemase), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) y GES/IBC (Guiana extended spectrum/ integron borne cephalosporinase). En general, hidrolizan todos los β -lactámicos, aunque la eficacia catalítica o de hidrólisis sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación es bastante modesta. Los grupos SME, IMI y NMC son principalmente de codificación cromosómica, y nunca se han detectado en *Pseudomonas*. Las carbapenemasas tipo KPC se describieron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* y se han ido detectando periódicamente y en diferentes variantes, hasta ahora, hay descritas de la KPC-1 a la KPC-10, principalmente en enterobacterias. Se han detectado prácticamente en todo el mundo, con mayor frecuencia en Norteamérica. En *P. aeruginosa*, la

primera KPC (KPC-2) se detectó inicialmente en Colombia [33]; dicha enzima tiene una tasa de hidrólisis para los carbapenémicos tan alta que no requiere de mecanismos adicionales de resistencia. En Puerto Rico se ha identificado la KPC-5. Otras enzimas de esta clase como la GES/IBC pueden ser de importancia clínica cuando se combinan con permeabilidad de la membrana disminuida o con la sobre-expresión de los sistemas de eflujo. Las carbapenemasas KPC son plasmídicas en todos los casos estudiados. Su espectro de hidrólisis incluye todos los β -lactámicos, si bien la eficacia de hidrólisis sobre las carbapenemes y los monobactámicos es hasta 10 veces menor que sobre las penicilinas y las cefalosporinas. Son inhibidas por clavulanato y tazobactam. [34]

CARBAPENEMASAS CLASE B

Las carbapenemasas de clase B (en concreto, las de la subclase B1), más conocidas como MBL, son quizá el grupo más relevante de carbapenemasas, tanto por diversificación en diferentes variantes aminoacídicas como por su diseminación prácticamente mundial, y entre diferentes géneros y especies bacterianas. Así pues, todas las MBL tienen también en común su inhibición por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Dentro de ellas, se distinguen ocho grupos: IMP (active on imipenem), VIM (Verona integron encoded), SPM (Sao Paulo metallo- β -lactamase), SIM (Seoul imipenemase), GIM (German-imipenemase), AIM (Adelaide imipenemase), DIM (Dutch imipenemase), KHM (Kyorin Hospital metallo-B-lactamase) y NDM (New Delhi Metallo-B-Lactamase). Todas las MBL transferibles, excepto SIM-1, se han encontrado en aislados de *P. aeruginosa* en diversas partes del mundo. El predominio de cierto tipo, parece ser geográfico. Las carbapenemasas del grupo IMP y VIM, son las más prevalentes: las tipo IMP predominan en Asia, pero también se han identificado en Brasil; las VIM, en Europa, aunque actualmente la diseminación es global, encontrando VIM-2 en los 5 continentes. VIM-1 parece hidrolizar mejor a prácticamente todos los β -lactámicos (sobre todo, a ciertas cefalosporinas) que VIM-2, lo cual parece explicarse por cambios de aminoácidos cercanos o en el propio centro activo de la enzima. Las IMP en general parecen

tener una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM. Las MBL tipo SPM1 han causado brotes epidémicos en Brasil. [34]

CARBAPENEMASAS CLASE D

Las β -lactamasas tipo OXA se detectan sobre todo en *A. baumannii*. Sin embargo, también se han encontrado en *P. aeruginosa* y otras especies como *Ralstonia* o *Aeromonas*. Hasta la fecha se han descrito más de 100 variantes aminoacídicas de OXA. De estas, al menos 37 se han identificado como carbapenemasas. La primera OXA con actividad carbapenemasa, inicialmente denominada ARI-1 y posteriormente renombrada como OXA-23, fue descrita en 1993 por Paton et al en una cepa de *A. baumannii*. Desde 1998 se han descrito brotes causados por *Acinetobacter spp* productores de OXA 23 en Brasil, Reino Unido, Korea, Tahiti, España, Portugal y Estados Unidos. La diversificación de las oxacilinasas ha sido enorme y las nuevas variantes se han clasificado en nueve subfamilias. Los miembros de cada subfamilia tienen una identidad en aminoácidos de aproximadamente un 92%, mientras que la identidad entre miembros de distintas subfamilias varía entre un 40 y un 70%. Las subfamilias son: a) OXA-23 (incluyendo las -23, -27 y -49); b) OXA-24 (incluyendo -24, -25, 26-, -40 y -72); c) OXA-51 (incluyendo -51, de -64 a -71, de -75 a -78, -83, -84, -86 a -89, -91, -92, -94, y -95); d) OXA-58; e) OXA-55 (incluyendo -55 y -SHE [de *Shewanella algae*]); f) OXA-48 (incluyendo -48, -54 y -SAR2); g) OXA-50 (incluyendo de -50a a -50d, conocidas como enzimas PoxB); h) OXA-60 (incluyendo de -60a a -60d), e i) OXA-62. Se describen como capaces de hidrolizar la oxacilina y cloxacilina, son inhibidas pobremente por ácido clavulánico y EDTA. [34]

IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

La detección de microorganismos productores de carbapenemasas en el laboratorio de microbiología clínica es de gran importancia ya que permite la selección de un esquema terapéutico útil y la implementación de medidas para control de las infecciones. [36][37] Los métodos para detectar la producción de carbapenemasas son de dos tipos: genotípicos y fenotípicos.

MÉTODOS GENOTÍPICOS

Detectan los genes que codifican las carbapenemasas. La técnica más empleada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es muy exacta y confiable; es la única que detecta la producción de múltiples carbapenemasas por bacteria; pero frecuentemente sólo es accesible para laboratorios de referencia. [38]

MÉTODOS FENOTÍPICOS

Se han desarrollado varias técnicas para la detección fenotípica de las carbapenemasas; las técnicas se basan en la actividad sinérgica entre un sustrato base (carbapenémico) y un inhibidor selectivo, evidenciada mediante difusión de disco, dilución en caldo o sistemas comerciales (E-test). Entre las técnicas que ponen en evidencia la existencia de las carbapenemasas mediante difusión de discos se encuentran la prueba de Hodge modificada y las pruebas basadas en la inhibición de las carbapenemasas.

PRUEBA DE HODGE MODIFICADA (PHM)

También se conoce como prueba de la hoja de trébol. Es un procedimiento donde las bacterias se prueban con imipenem sobre una placa de agar. El desarrollo alterado (indentación similar a la hoja de trébol) de una bacteria indicadora no productora de carbapenemasas (*E. coli* ATCC 25922) alrededor del disco de imipenem denota un resultado positivo. Por este método se pueden detectar enzimas cuya actividad como carbapenemasas es débil como son OXA-23, GES-5 y GES-6. [34] Es una prueba barata, accesible a todos los laboratorios clínicos; es el método fenotípico recomendado por el CLSI para detectar las carbapenemasas en las enterobacterias [39]; la lectura a veces es difícil y subjetiva. [40] Otros estudios han demostrado resultados falsos positivos en presencia de BLEEs y de β -lactamasas AmpC. [41] Para *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*, la prueba modificada de Hodge ha sido utilizada por varios investigadores como método para cribar la existencia de las carbapenemasas; el sustrato más empleado ha sido el imipenem, con sensibilidad oscilante de 78 a 94%. El empleo de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como cepa indicadora en la prueba de Hodge

modificada ha mejorado el desempeño de la prueba al comparar con los resultados obtenidos con *E. coli* ATCC 25922, sensibilidad 100 vs 78%, especificidad 97 vs 57% y resultados indefinidos de 0 vs 32%). [42] Se le propone como método complementario.

PRUEBAS CON INHIBIDORES DE CARBAPENEMASAS

El centro activo de las enzimas carbapenemasas puede tener serina, como ocurre en las clases A y D (serinoenzimas), o Zinc que es característico de las carbapenemasas clase B o MBL. Dicho constituyente determina la afinidad de los elementos inhibidores que se pueden emplear en las pruebas.

INHIBICIÓN DE LAS CARBAPENEMASAS

Para evidenciar la actividad de las serino-enzimas se cuenta con lo siguiente: ácido 3-amino-fenil-borónico, que inhibe a las carbapenemasas del grupo A (KPC) y a la B-lactamasa del grupo C; cloxacilina, antimicrobiano que inhibe a la B-lactamasa clase C.

INHIBICIÓN DE LAS CARBAPENEMASAS CLASE B

La actividad de todas las MBL es afectada por la remoción de Zn^{2+} del sitio activo. Se han empleado varias combinaciones de agentes quelantes con β -lactámicos, para detectar MBL. Entre los agentes quelantes que inhiben específicamente metaloenzimas (carbapenemasas del grupo B), se encuentra el ácido etilendiamino-tetracético (EDTA), el ácido 2-mercaptopropiónico, mercaptoacetato de sodio y el ácido dipicolínico. En *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*, el más estudiado ha sido el EDTA. [43][44][45][46][47] Sin embargo, la inhibición de las metaloenzimas varía con cada quelante, por lo que se sugiere utilizar una combinación de quelantes. [48] Entre los sustratos se han utilizado el imipenem, ceftazidima y meropenem. El imipenem ha sido el sustrato más empleado.

PRUEBA DEL DISCO POTENCIADO O COMBINADO

Es un método en el que se compara la zona de inhibición del desarrollo bacteriano generada por el disco con antimicrobiano con la zona de inhibición que condiciona otro disco con el mismo antimicrobiano, al cual se ha adicionado el inhibidor. Se le considera como el mejor método de escrutinio, porque es simple de realizar, los insumos son baratos y su lectura es objetiva, con sensibilidad y especificidad oscilantes del 94% al 100% y del 81% al 98%, respectivamente. [39][48][49][50][51] Últimamente, con la realización concomitante de la PHM y las pruebas de disco potenciado se reporta una sensibilidad y especificidad del 94% al 100% para la detección de carbapenemasas clase A, B y D. [52]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones contraídas en los establecimientos de atención de salud tienen una prevalencia promedio de 8.7% y son causa de mayor morbi-mortalidad. Los microorganismos causales más frecuentes son bacterias Gram negativas, entre las que se encuentran: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter baumannii*.

P. aeruginosa y *Acinetobacter spp.* generalmente son patógenos humanos oportunistas que muestran resistencia creciente a los antimicrobianos, por lo que actualmente se consideran como una amenaza seria para las instituciones de salud en los Estados Unidos. Uno de los mecanismos de resistencia a los beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) más estudiado es la hidrólisis por β -lactamasas. Los carbapenémicos resisten la hidrólisis de la mayoría de β -lactamasas, incluyendo las BLEE y las AmpC, por lo que suelen emplearse como último recurso en las infecciones causadas por bacilos gram negativos multi-resistentes. Sin embargo, se reporta incremento gradual de la resistencia a los carbapenémicos, sobre todo en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* El mecanismo de resistencia a carbapenémicos mediado por carbapenemasas, es el más importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que generalmente son enzimas codificadas por elementos genéticos móviles con tan alta capacidad de diseminación que ya se han identificado en varios países. Las infecciones por microorganismos resistentes se asocian con aumento en la morbi-mortalidad, periodos de estancia intrahospitalaria prolongados, mayor utilización de recursos e incremento en los costos para los sistemas de salud. Aunque la detección óptima de carbapenemasas requiere de técnicas moleculares, existen métodos fenotípicos accesibles a los laboratorios clínicos, como la PHM y la prueba del disco potenciado.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la prevalencia de carbapenemasas en aislados clínicos de *P. aeruginosa* y de *Acinetobacter spp.* obtenidos de hemocultivos?

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de una infección con un antimicrobiano al cual el agente causal es resistente, no sólo resulta en falla terapéutica sino que también es causa de que el microorganismo se disemine.

En el caso de los carbapenémicos el contar con datos exactos de la susceptibilidad pudiera permitir proporcionar una terapia efectiva. Sin embargo, dicha susceptibilidad generalmente se realiza mediante sistemas automatizados, no siempre confiables para determinar la resistencia a carbapenémicos. Aún en el caso de contar con una prueba de susceptibilidad exacta, la CMI para los carbapenémicos puede oscilar de 0.12 a >256 mg/L en bacterias productoras de carbapenemasas. Por lo tanto, se requiere utilizar métodos especiales, accesibles para detectar la presencia de carbapenemasas, por lo que se elabora este proyecto.

Los beneficios esperados de la realización del presente trabajo, son los siguientes:

1. Evaluar la importancia de las carbapenemasas como mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en los casos estudiados.
2. Reforzar la actividad del Comité de Control de Antimicrobianos ya que se podrá optimizar el empleo de los carbapenémicos y reforzar las medidas de control de las infecciones.
3. Contribuir al conocimiento de la resistencia antimicrobiana en nuestro contexto, ya que hasta ahora la información en nuestro país es escasa.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo Principal

- Determinar la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* aislados de hemocultivos en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional la Raza.

Objetivos Específicos

En *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* aislados de sangre, detectar lo siguiente:

- La generación de carbapenemasas de clase B
- La producción de carbapenemasas de clase D

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

Por incluir un grupo de estudio es descriptivo, por la manipulación de la maniobra observacional, por las mediciones realizadas transversal y por recuperación de la información prolectivo.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cepas de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp* aislados de hemocultivos.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS

Criterios de inclusión

Bacterias identificadas como:

- *Acinetobacter spp. y*
- *Pseudomonas aeruginosa* aislados de sangre

Criterios de exclusión

- Ninguno

Criterios de eliminación

- Pérdida de la viabilidad bacteriana al momento de su conservación, así como pérdida de la información.

UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio clínico del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, en *Acinetobacter spp.* y *P. aeruginosa* obtenidos de hemocultivos consecutivos, colectados durante el periodo comprendido de diciembre del 2013 a junio de 2015.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

Carbapenemasas

Definición conceptual: grupo de enzimas que representan la familia más versátil de las B-lactamasas; tienen capacidad para hidrolizar casi todos los antibióticos B-lactámicos incluyendo los carbapenémicos. Tienen sitio activo que puede estar constituido por serina o por zinc.

Definición operacional: crecimiento de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico (imipenem) y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal del disco o en forma de trébol.

Indicador: sí, no

Escala de medición: nominal

Carbapenemasa clase B

Definición conceptual: betalactamasa transferible con capacidad para hidrolizar la mayoría de betalactámicos incluyendo carbapenémicos. Su centro activo está constituido por zinc y universalmente inhibidas por etileno-diamino-tetra-acético (EDTA).

Definición operacional: la evidencia de aumento en el halo de inhibición del crecimiento bacteriano cuando se compara el efecto de un carbapenémico con y sin EDTA. El incremento de ≥ 5 mm en el halo de inhibición, sumado a una PHM positiva define a la bacteria como productora de carbapenemasa clase B.

Indicador : sí, no

Escala de medición: nominal

Carbapenamasa clase D

Definición conceptual: betalactamasa transferible, capaz de hidrolizar la oxacilina, la cloxacilina y los carbapenémicos. Tiene un sitio activo constituido por serina pobremente inhibido por EDTA y ácido clavulánico.

Definición operacional: una prueba de Hodge modificada positiva pero sin evidencia de sinergismo entre imipenem/imipenem + AAFB, ni entre imipenem/imipenem + EDTA, denota que la bacteria produce carbapenemasas tipo D.

Indicador: sí, no

Escala de medición: nominal

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Previa identificación de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* aislados de sangre, se procedió a conservarlos en medio BHI y tripticaseína con glicerol al 5% a -20°C (ver anexo 1). La reactivaron las cepas conservadas mediante una resiembra inicial en caldo BHI y otra en COS y CPS con incubación a 35-37°C por 24 h (ver anexo 2). Luego, se efectuaron pruebas de sensibilidad a imipenem y meropenem con método automatizado VITEK-2.

Para la identificación de carbapenemasas se realizó lo siguiente:

1) Prueba de Hodge modificada. Previa dilución 1:10 de una suspensión al 0.5 de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL), se efectuó una siembra masiva de la cepa indicadora (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, sobre una placa de agar Mueller Hinton. Posterior al secado se colocó un disco de imipenem 10µg en el centro. Se inocularon 2-3 colonias de las bacterias problema, desde el borde del disco hacia la periferia de la placa. De la misma manera se inoculó la cepa control negativo (*P. aeruginosa* ATCC 2785. En el caso de *Acinetobacter spp.* se adicionó 10µL de ZnSO₄, 50 mM al disco de imipenem. La incubación se realizó a 35-37°C durante 16 a 18 h para *P. aeruginosa* y 20-24 h para *Acinetobacter spp.* La evidencia de

una hendidura proximal al disco (hoja de trébol) cataloga al aislado como productor de carbapenemasa (ver anexo 5).

2) Prueba del disco combinado con EDTA o con oxacilina. Previa siembra masiva de las cepas problema en agar Mueller Hinton, se colocaron dos discos de imipenem 10µg por placa, con una distancia interdisco de 30 mm. Uno de los discos se adicionó con EDTA 730 µg o con oxacilina 1000µg. Posteriormente se incubaron a 35-37°C durante 16-18 h para *P. aeruginosa* y de 20-24 h para *Acinetobacter spp.* Cepas control: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (control negativo) y *E. coli* ATCC 25922 (control negativo). Lectura: el incremento en el halo de inhibición ≥ 5 mm de los discos de imipenem con EDTA denotó la presencia de carbapenemasas del grupo B. El aumento de ≥ 3 mm en el halo de inhibición del disco combinado de imipenem con oxacilina definió a la bacteria como productora de carbapenemasa del grupo D (ver anexo 6).

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

En base a la ley general de salud en el capítulo de investigación en el artículo 17, el grado de riesgo para el paciente en el estudio es *Sin Riesgo*, por lo que no se requirió consentimiento informado por escrito, debido a que se trabajó con los resultados de estudios de laboratorio de los pacientes durante y después de su atención médica.

No hubo implicaciones éticas para este estudio ya que no se requirió interacción directa con el paciente. Cumplió con los requisitos señalados en la declaración de Helsinki, revisada en 2000, y la ley general de salud en materia de investigación al cumplir con todos los lineamientos requeridos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon frecuencias simples y se aplicó prueba de Z para comparar proporciones.

RESULTADOS

Se incluyó un total de 80 cepas aisladas de hemocultivos consecutivos colectadas de diciembre 2013 a junio del 2015, 50 (65%) *P. aeruginosa* y 26 (35%), *Acinetobacter spp.* Cuatro aislados, dos de cada bacteria, no fueron viables, por lo que se sólo se estudiaron 76 microorganismos.

En el grupo de *P. aeruginosa*, la tasa de resistencia a carbapenémicos fue del 54% (27/50), entre los cuales la proporción de metaloenzimas alcanzó el 85% (23/27) y la de oxacilinasas el 7.4% (2/27) (Tabla 1). De acuerdo a los resultados de la prueba de escrutinio y de la búsqueda de carbapenemasas del grupo B y D se observaron 5 fenotipos. En el fenotipo 1 (PH (-), B(-) y D(-), un 40%, (9/22) y 81% (18/22) fueron sensibles a imipenem y meropenem, respectivamente (Tabla 1). La relación entre la presencia de MBL y el patrón de susceptibilidad a imipenem y meropenem, las 23 cepas de *P. aeruginosa* positivas fueron resistentes a ambos carbapenémicos. De las 27 cepas negativas a metalobetalactamasas, 11 (40.7%) son sensibles a imipenem y 23 (85%) a meropenem (Tabla 2).

Tabla 1. Relación entre los fenotipos de carbapenemasas y la susceptibilidad a carbapenemes en 50 aislados de *P. aeruginosa*.

Fenotipos	Imipenem				Meropenem			
	S	I	R	P*	S	I	R	P*
1. PHM (-) B (-) D (-) (n=22)	9	9	4	0.001	18	0	4	0.001
2. PHM (-) B (+) D (-) (n=8)	0	0	8	0.009	0	0	8	0.009
3. PHM (-) B (+) D (+) (n=2)	0	0	2	0.47	0	0	2	0.47
4. PHM (+) B (+) D (-) (n=13)	0	0	13	0.001	0	0	13	0.001
5. PHM (+) B (-) D (-) (n=5)	2	3	0	0.06	5	0	0	0.06

S: sensible, I: intermedio, R: resistente, *Z: comparación de proporciones, PHM: prueba de Hodge modificada, B: carbapenemasa del grupo B o MBL, D: carbapenemasa del grupo D u oxacilinasas

Tabla 2. Relación entre la detección de MBL y la susceptibilidad a carbapenémicos en 50 aislados de *P. aeruginosa*

MBL	Imipenem				Meropenem			
	S	I	R	P*	S	I	R	P*
Positiva	0	0	23	<0.001	0	0	23	<0.001
Negativa	11	12	4	<0.001	23	0	4	<0.001
Total 50	11	12	27		23	0	27	

MBL: metalobetalactamasa, S: sensible, I: intermedio, R: resistente, *Z: comparación de proporciones

En los aislados de *Acinetobacter spp.*, la tasa promedio de resistencia a carbapenémicos fue de 75% (imipenem 73% y meropenem 76.9%). Entre estos, un 97.5% en promedio expresó metalobetalactamasas; las oxacilinas se evidenciaron en el 77% (Tabla 3).

De acuerdo a los resultados de las pruebas previamente mencionadas se expresaron 4 fenotipos, predominando el grupo con carbapenemasas detectadas con las tres pruebas (10/26). En los aislados sin aparente producción de carbapenemasas 7/7 fueron sensibles a imipenem y solo 4/7, a meropenem (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre los fenotipos de carbapenemasas y la susceptibilidad a carbapenemes en 26 aislados de *Acinetobacter spp.*

Fenotipos	Imipenem				Meropenem			
	S	I	R	P*	S	I	R	P*
1. PHM (-) B (-) D (-) (n=7)	7	0	0	0.01	4	2	1	0.11
2. PHM (-) B (+) D (+) (n=5)	0	0	5	0.06	0	0	5	0.06
3. PHM (+) B (+) D (+) (n=10)	0	0	10	0.002	0	0	10	0.002
4. PHM (+) B (+) D (-) (n=4)	0	0	4	0.12	0	0	4	0.12

S: sensible, I: intermedio, R: resistente, *Z: prueba de proporciones, PHM: prueba de Hodge modificada, B: carbapenemasa del grupo B o MBL, D: carbapenemasa del grupo D u oxacilinasas

DISCUSIÓN

Entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* la producción de carbapenemasas representa un problema terapéutico de importancia creciente detectado mundialmente con tasas muy variables, por lo que se realizó este trabajo, con los siguientes datos relevantes:

En *Pseudomonas aeruginosa*, la proporción de carbapenemasas del grupo B y D entre los aislados resistentes fue de 85% y 7.4%, respectivamente. Mientras las metaloenzimas superan la tasa máxima reportada por otros investigadores, 77%, [53] el porcentaje de las oxacilinasas, es casi idéntico al 7.6% referido por Gomes Franco et. al. [54]

En *Acinetobacter spp.* la tasa de metaloenzimas alcanzó el 97% y la de oxacilinasas, el 77%. La primera proporción se encuentra dentro del rango referido por otros autores, que oscila del 17 al 98% [55][56][57]. La segunda, se ubica en el rango de 49 al 100% reportado en otros centros mediante métodos moleculares. [56][57] Para *Acinetobacter spp.* lo ideal es efectuar la detección molecular tanto de metaloenzimas, como de oxacilinasas. De las primeras hasta el 100% de los fenotipos positivos no se confirma genóticamente. De las segundas, porque no existe ningún método fenotípico probado que correlacione con el genotipo.

Limitaciones del estudio: las carbapenemasas del grupo A, KPC, no fueron investigadas, pero ya han sido identificadas en no fermentadores. La no existencia de métodos estandarizados para realizar las pruebas fenotípicas en estas bacterias, propiciaría errores en la detección de carbapenemasas, máxime si consideramos que lo más común es la coexistencia de más de dos mecanismos de resistencia a los carbapenémicos.

CONCLUSIONES

En la población de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* aislados de sangre, resistentes a carbapenémicos, la proporción de carbapenemasas es alta, con predominio de las metaloenzimas en ambos grupos bacterianos

La evidencia de sinergismo en la prueba del disco combinado con EDTA identificó todas las bacterias resistentes a carbapenemes.

Las oxacilinasas en el grupo de *P. aeruginosa*, aunque en mínima proporción, ya existen en nuestro medio.

La evidencia de aislados resistentes a carbapenémicos, con fenotipos negativos para la producción de carbapenemasas sugiere la presencia de otros mecanismos de resistencia como pudieran ser pérdida de porinas, bombas de eflujo, entre otros.

Sugerencias. La diseminación de bacterias productoras de carbapenemasas es posible limitarla mediante dos estrategias:

1. Implementación de un método para la detección rápida de los aislados productores de carbapenemasas, lo que evitaría el uso inútil de los carbapenémicos.
2. Apego estricto a las medidas reiteradamente recomendadas durante la práctica clínica, como son las precauciones de contacto. En lo particular, lavado de manos.

1. Conservación de los bacilos gramnegativos

- De cepas puras de 24 h se conservaron en congelación a -20°C por duplicado en tubos Eppendorf conteniendo caldo con soya tripticaseína con glicerol al 5% (CST-G) y con caldo BHI con glicerol al 5% (BHI-G).
- Se tomaron de una a dos asadas del cultivo puro para realizar una suspensión densa en los medios de cultivo previamente mencionados, los cuales se incubaron por 24 h a una temperatura de $35-37^{\circ}\text{C}$.
- Se sacaron de la estufa los medios de cultivo y pasaron posteriormente a congelación a una temperatura de -20°C .

2. Activación y purificación de cepas

- Se tomó un tubo de las cepas congeladas y frente a mechero se tomó con un hisopo estéril parte del medio de cultivo el cual se colocó en un tubo con 5 ml de caldo BHI, estéril, atemperado. Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas estudiadas.
- Se agitaron los tubos de BHI con vortex de 30 a 60" y posteriormente se incubaron en estufa de $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.
- Se revisó la formación de turbidez (crecimiento bacteriano) en los tubos de BHI y frente a mechero los que presentaron turbidez positiva se sembraron en placas de gelosa sangre.
- Se sembraron por estría cruzada, posteriormente se incubaron de $35-37^{\circ}\text{C}$ por 24 h.
- Posterior a la incubación, se revisó la pureza del cultivo, en los casos necesarios se llevó a cabo un nuevo aislamiento en otra placa de gelosa sangre, bajo las mismas condiciones mencionadas en el punto previo.

3. Preparación de agar Mueller Hinton (AHM)

- Pesar 38 g de polvo de AHM y diluir en 1 lt de agua estéril.
- Mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente hasta ebullición.
- Checar pH con un potenciómetro hasta ajustar a un pH de 7.2 a 7.4
- Esterilizar a 121°C 15 minutos 121 Lb
- Una vez estéril el medio, enfriar de 40 a 45°C para realizar el vaciado en placa frente a mechero
- Colocar una placa petri, esteril sobre una balanza granataria que se encuentre en una superficie plana para poder pesar la cantidad de AHM, con la finalidad de estandarizar el peso del medio con un grosor final de entre 3 a 4 mm (22 g ajustado a placas de 88 mm de diámetro)
- Una vez vaciado el agar en las placas, dejar gelificar a temperatura ambiente, etiquetar y almacenar el medio en refrigeración de 4 a 8°C hasta su uso.

4. Preparación de soluciones

- Solución madre de ácido fenilborónico (APBA). Pesar 6 g y disolver en 100 ml de agua inyectable que equivale a una solución 0.04 M.
- Solución madre de EDTA. Considerando la pureza del 99%, pesar 7.38 g y disolver en 100 ml de agua inyectable que equivalen a una solución de 0.5 M.
- Solución madre de oxacilina. Considerando la pureza del 95%, pesar 2.6315 g y disolver en 25 ml de agua inyectable.
- Solución madre de Sulfato de Zinc. Considerando la pureza del 99%, pesar 9.06 g y disolver en 100 ml de agua inyectable para tener una concentración de 0.05 M.

Esterilizar las soluciones mediante técnica de filtración de membrana (0.22 micras) y depositar en alícuotas de 5 ml en tubos cónicos estériles para mantener en congelación a -20°C hasta su uso.

5. Prueba de Hodge Modificada (PHM)

- Atemperar AHM y discos de imipenem y solución $ZnSO_4$
- De la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7006003 (indicadora), hacer una suspensión al 0.5 de McFarland y de esta realizar una dilución 1:10 (1 ml de la suspensión en 9 ml de solución salina estéril).
- Con un hisopo estéril, humedecerlo con la suspensión diluida y quitar el excedente en las paredes del tubo, realizar una siembra masiva en el AHM. Dejar evaporar 3 minutos.
- Con pinzas estériles colocar en el centro de la placa un disco de imipenem de 10 mcgr.
- De cultivos puros de 24 h, tomar de entre 2 a 3 colonias con una asa estéril la cepa control negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706), iniciando un estriado desde el borde del disco (sin tocarlo) hacia la periferia de la placa; este mismo procedimiento se realiza para las cepas problema. Se montarán 4 cepas problema por placa con la finalidad de poder observar la formación de la hoja de trébol.
- Para las cepas de *Acinetobacter spp.* se agregará $ZnSO_4$ 0.05 mM al
- Incubar de 35°C a 37°C para las cepas de *Pseudomonas* 16 a 18 h. Para *Acinetobacter* 20 a 24 h.

6. Prueba de disco combinado

- A las cepas con PHM positiva realizar las pruebas con inhibidores de la siguiente forma:
- Para la búsqueda de carbapenemasas del grupo B o metalobetalactamasas: A un disco de imipenem de 10 µg agregar EDTA 730 µg y dejar secar. En una placa de AHM con pinza estéril, colocar un disco de imipenem de 10 µg y un disco de imipenem + EDTA 730 µg/ µl a una distancia de 30 mm de borde a borde.
- Detección de carbapenemasas del grupo D en *P. aeruginosa*: a un disco de imipenem de 10 µg agregar oxacilina 1000 µg y dejar secar. En una placa de

AHM con pinza estéril, colocar un disco de imipenem de 10 µg y un disco de imipenem + oxacilina 1000 µg/ µl a una distancia de 30 mm de borde a borde.

- Para carbapenemasas del grupo D en *Acinetobacter spp.*: a un disco de imipenem 10 µg agregar oxacilina 1000 µg y dejar secar. En una placa de AHM con pinza estéril, colocar un disco de Imipenem de 10 µg y un disco de imipenem + oxacilina 1000 µg/ µl a una distancia de 30 mm de borde a borde.
- Incubar de 35°C a 37°C para las cepas de *Pseudomonas* 16 a 18 h. Para *Acinetobacter* 20 a 24 h.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Guía para prevención de Infecciones nosocomiales: Guía práctica. WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12.
2. Boucher H, Talbot G, Bradley JS, Edwards JE Jr, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *CID* 2009;48:1-12.
3. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we?. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12, No. 22:1-15.
4. Gómez J, Alcántara M, Simarro E, Martínez B, Ruiz J, Guerra B. Bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiología, clínica y tratamiento. Estudio prospectivo de siete años. *Rev Esp Quimioterap* 2002;15: 360-365.
5. Fariñas M, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31:402-409.
6. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J Clin Cases* 2014;2:787-814.
7. O'Neill J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. United Kingdom 2014
8. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Inc, 2010: 2835-2860.
9. National Center for Biotechnology Information [Serie en internet]; [actualizado U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 [actualizado 2014 Nov; consultado 2014 Nov 03] Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=287&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
10. *Pseudomonas* y bacterias relacionadas. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. Barcelona, España: Elsevier Inc, 2009: 333-341.
11. Medina-Polo J, Guerrero-Ramos F, Pérez-Cadavid S, Arrébola A, Sopena R, Benítez R, et al. Community-associated urinary infections requiring hospitalization: Risk factors, microbiological characteristics and patterns of antibiotic resistance. *Actas Urol Esp* 2015;39:104-111.
12. Centers for Disease Control and Prevention [Sitio de internet] [actualizado 2014 May 07; consultado 2015 May 02] [1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027] Disponible en:
<http://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
13. National Center for Biotechnology Information [Serie en internet]; [actualizado U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 [actualizado 2014 Nov; consultado 2014 Nov 03] Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Acinetobacter+sp>

14. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats. [monografía en internet]. USA: CDC 2013. [consultado 2015 May 02]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
15. Allen DM, Hartman BJ. Género *Acinetobacter* Mandell *Acinetobacter*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Inc, 2010: 2883-2887.
16. Barker KF. Antibiotic resistance: a current perspective. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:109-124.
17. Suárez C, Kattán J, Guzmán A, Villegas M. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. *Infectio* 2006;10:85-93.
18. Opazo A, Mella S, Domínguez M, Bello H, González G. Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Rev Chil Infect* 2009;26:499-503.
19. Zhang HZ, Zhang JS, Qiao L. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. *World J Emerg Med* 2013;4:169-174.
20. Taylor PK, Yeung AT, Hancock RE. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol* 2014;191:121-130.
21. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio* 2008;12:217-226.
22. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2002; 34:634-640.
23. van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2011;2:1-27.
24. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to B-lactams, glycopeptides and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* 2012;87:198-208.
25. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:219-226.
26. Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28: 726-736.
27. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *P. aeruginosa*. *Hypokratia* 2012;16:303-307.
28. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present and future. *Antimicrob Agents and Chemother* 2011;55:4943-4960.
29. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000;6:460-643.

30. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteremia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67: 2793-2803.
31. Hammami S, Ghazzi R, Burghoffer B, Arlet G, Redjeb S. Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol Biol (Paris)* 2009;57:530-5.
32. Orozco Rico Miguel, "Acinetobacter baumannii multidrogo resistente y pandrogo resistente: perspectiva, mecanismos de resistencia y tratamiento", *Rev Med MD* 2011;3:44-49.
33. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:161-182.
34. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-458.
35. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapeneme-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1553-1555.
36. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et. al. Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:112-122.
37. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S. Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:102-111.
38. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2006;44:3139-3144.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute. Confirmatory test for suspected carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*. Wayne, Pa 2014
40. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positives results. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:249-251.
41. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:659-667.
42. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol* 2011;49:4301-4303.
43. Galloso PC, Lezcano MT, Quiroga M. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-beta-lactamasas. *Rev Cienc Tecnol* 2010;14:8-13.

44. Saavedra SY, Duarte C, González MN, Realpe ME. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica* 2014;34:217-223.
45. Kumar AV, Pillai VS, Dinesh KR, Karim S. The phenotypic detection of carbapenemase in meropenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a tertiary care hospital in South India. *J Clin Diagn Res* 2011;5:223-226.
46. Shivaprasad A, Antony B, Shenoy P. Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of metallo- β -lactamase production in *Acinetobacter baumannii*” *J Clin Diagn Res* 2014;8:5-8.
47. Aksoy MD, Çavuşlu Ş, Tuğrul HM. Investigation of metallo beta lactamases and oxacilinasas in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from inpatients. *Balkan Med J* 2015;32:79-83.
48. Kim SY, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2007;45:2798-2801.
49. Goyal R, Thakur R, Sarma S. The existence of metallo- β -lactamases in carbapenem susceptible Gram negative bacilli: a cause for concern. *J Clin Diagn Res* 2010;4:2679-2684.
50. Lucena A, Dalla-Costa LM, Nogueira Kda S, Matos AP, Gales AC, Raboni SM. Comparison of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32:625-630.
51. Solanki R, Vanjari L, Subramanian S, BA, EN, Lakshmi V. Comparative evaluation of multiplex PCR and routine laboratory phenotypic methods for detection of carbapenemases among Gram negative bacilli. *J Clin Diagn Res* 2014;8:23-26.
52. Song W, Hong SG, Yong D, Jeong SH, Kim HS, Kim JS, et. al. Combined use of the modified Hodge test and carbapenemase inhibition test for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. *Ann Lab Med* 2015;35:212-219.
53. Gomes Franco MR, Caiaffa Filho HH, Nascimento Burattini M, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. *Clinics* 2010;65:825-829.
54. Esenkaya TF, Ozdemir M. The presence of OXA type carbapenemases in *Pseudomonas* strains: first report from Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:26-34.
55. Vanegas-Múnera JM, Roncacio-Villamil G, Jiménez-Quiceno JN. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnostic. *CES Medicina* 2014;28:233-246.
56. Alcántar-Curiel MD, García-Torres LF, González-Chávez MI, Morfín-Otero R, Gayosso-Vázquez C, Jarillo-Quijada MD, et. al. Molecular mechanisms associated with nosocomial carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. *Arch Med Res* 2014;45:553-560.
57. Aksoy MD, Cavuslu S, Tugrul HM. Investigation of metallo beta lactamases and oxacilinasas in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from inpatients. *Balkan Med J* 2015; 32:79-83.