



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Medicina
Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica
Trabajo Final Integrador

DETECCION DE CEPAS PRODUCTORAS DE
CARBAPENEMASAS KPC EN ENTEROBACTERIAS EN
EL HOSPITAL
SAN BERNARDO DE SALTA



Ana Laura Ramos

Luis Merino

2.018

Salta, Capital

INDICE:

Dedicatoria.....	pág. 3
Agradecimientos.....	pág. 3
Introducción.....	pág. 4 y 5
Justificación.....	pág. 6
Hipótesis.....	pág. 6
Objetivo general.....	pág. 6
Objetivos específicos.....	pág. 6
Materiales y Métodos.....	pág. 7, 8 y 9
Resultados.....	pág. 10 y 11
Discusión.....	pág. 12 y 13
Conclusión.....	pág. 13
Referencias bibliográficas.....	pág. 13, 14, 15, 16 y 17

DEDICATORIA

A Dios por guiar mi camino y mis estudios a lo largo de mi formación y a pesar de las dificultades, orientándome a ayudar a los pacientes desde mi trabajo cotidiano.

A mi madre, mentora de ideas y proyectos, quien siempre me alentó a seguir mis ideales y está a mi lado apoyando mi carrera y mis investigaciones.

A mi esposo y mis hijos, que apoyan incondicionalmente mi formación profesional, y son motivación de mi constante crecimiento.

A mis compañeras del Servicio de Microbiología, Bioquímicos, técnicos y a cada una de las personas que contribuyeron a mi formación con sus sabias enseñanzas y consejos, que fortalecieron mi crecimiento profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeras de trabajo por su ayuda en la recolección de muestras y de datos para la realización de este trabajo y por su apoyo constante en la investigación.

A los técnicos de laboratorio del Servicio de Microbiología por su ayuda incondicional.

INTRODUCCION.

La familia *Enterobacteriaceae* está constituida por un grupo heterogéneo y numeroso de bacterias gram negativas que se localizan habitualmente como saprófitos en el tubo digestivo de humanos y animales, aunque pueden encontrarse además, por su naturaleza ubicua, en el suelo, agua y la vegetación. ⁽¹⁾

Estas bacterias pueden estar implicadas en cualquier tipo de enfermedades infecciosas, recuperándose de diversas muestra clínicas de pacientes hospitalizados, inmunodeprimidos o debilitados. Y fueron adquiriendo diversos mecanismos de resistencia, a lo largo del tiempo.

Estos mecanismos se expandieron mundialmente debido a la exposición prolongada de los pacientes a los diferentes grupos antibióticos y a la expresión de enzimas bacterianas que desarrollaron las bacterias para poder resistir estos antimicrobianos. ^(2,3)

Así surgieron diversas enzimas, entre las cuales se encuentran: las Beta lactamasas predominantes en bacilos gram negativos, asociadas al uso masivo de aminopenicilinas y cefalosporinas de amplio espectro. Llamadas Beta lactamasas de espectro ampliado (BLEA) como las TEM y las SHV. ⁽⁴⁾

Seguidamente y por mutación genética, surgieron las beta lactamasas de espectro extendido (BLEE) que además de resistir las aminopenicilinas, mostraban resistencia a todas las cefalosporinas (de primera, segunda, tercera y cuarta generación) y al Aztreonam. ⁽⁵⁾

Todas ellas de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, mecanismo que favoreció su rápida diseminación.

Actualmente se sumaron las betalactamasas del tipo CTX-M filogenéticamente diferentes a las TEM y SHV. Como así también las Oxacilinasas (OXA) con un perfil superponible a las BLEE, pero mayormente asociadas a bacilos gram negativos no fermentadores. ^(6, 7, 8)

Debido a estas enzimas y sus resistencias demostradas, comenzaron a utilizarse como última opción terapéutica, para infecciones graves por Enterobacterias, los antibióticos carbapenémicos. Pero en poco tiempo y debido al uso indiscriminado y masivo de éstos, las bacterias comenzaron a desarrollar nuevas enzimas, conocidas como Carbapenemasas, que también son betalactamasas, pero que además de degradar los antibióticos carbapenémicos, hidrolizan a los betalactámicos.

Estas Carbapenemasas pertenecen a cuatro clases de betalactamasas: A, B, C y D, según la clasificación molecular de Ambler, basada en la homología de las proteínas. Las clases A, C y D son serinobetalactamasas y la clase B son metolobetalactamasas.

Existe otra clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros que las divide en tres grupos y diversos subgrupos en base a sus propiedades físico químicas, el espectro de hidrolisis y la capacidad de ser inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam o quelantes de cationes divalentes como el EDTA. ^(6,9)

Hoy en día, las que presentan mayor importancia clínica dentro de las enzimas betalactamasas, son las carbapenemasas de tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas) que pertenecen a la clase A de Ambler, con gran poder de diseminación debido a la transferencia genética a través de plásmidos y otros elementos

genéticos móviles.^(6, 10,11) Confieren grados variables de resistencia a los antibióticos carbapenémicos y debido a su asociación frecuente con otros mecanismos de resistencias, se muestran como multirresistentes a los beta lactámicos y otras familias de antibióticos. Se evidencian fenotípicamente por inhibición con ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, también resultan inhibidas por el ácido borónico y derivados análogos.^(6, 12,13)

En el año 1996 se aisló la primera bacteria productora de la enzima Carbapenemasa KPC, a la cual se llamó KPC-1 debido a que se la detectó en una cepa de *Klebsiella pneumoniae*, en un hospital de Carolina del Norte (Estados Unidos). Luego se continuaron aislando estas enzimas de forma infrecuente hasta 2001, cuando se informaron brotes de Enterobacterias productoras de KPC en hospitales de Nueva York y Nueva Jersey, las cuales se diseminaron rápidamente. Hasta el presente se las reportó en veintisiete estados de Estados Unidos y en otros países incluidos China, Colombia, Israel, Brasil y Francia.^(14, 15,16)

América Latina también se vio afectada y nuestro país fue mostrando un desproporcionado y alarmante aumento de estas enzimas desde el año 2.006, reportando los primeros casos en la ciudad autónoma de Buenos Aires y Rio Negro.^(17, 18,19)

Las KPC son codificadas en el gen *bla KPC* y la posibilidad de que el elemento genético codificador de KPC se encuentre en un plásmido ha contribuido a esa rápida propagación. Debido a ello, comenzaron a reportarse aunque con menor frecuencia, en otras Enterobacterias como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*⁽²⁰⁾

La elevada resistencia de Enterobacterias portadoras de KPC, frente a Carbapenémicos, cefalosporinas, y resistencias asociadas a diversos grupos de antibióticos, generó la necesidad de elaborar alternativas terapéuticas.⁽²¹⁾ Como combinaciones sinérgicas de carbapenémicos con polimixinas o con aminoglucósidos, o administración de drogas como tigeciclina o fosfomicina.

La asociación antibiótica resultó ser efectiva, aún con riesgo de eventos adversos (nefrotoxicidad, ototoxicidad, etc), debido a que la monoterapia (incluso con colistina), se correlacionó con elevada mortalidad.⁽²²⁾

Sin embargo, cada vez existen más reportes de estas enzimas en cepas de Enterobacterias, que muestran fallas terapéuticas y elevados costos hospitalarios, cuando se comparan con cepas de iguales especies bacterianas que no producen enzimas carbapenemasas. Por todo esto, es menester detectarlas en nuestro nosocomio y dar alerta a los profesionales para evitar su diseminación, concientizando sobre el manejo y aislamiento de los pacientes afectados.^(23, 24)

Actualmente contamos con sistemas automatizados (Phoenix®) que pueden detectar estos aislamientos, pero con una sensibilidad variable de 7 - 87%, por lo cual se requieren pruebas fenotípicas complementarias para la confirmación de carbapenemasas KPC, como sinergia con ácido fenil borónico, Blue Carba, Hodge modificado, entre otras.^(25, 26)

JUSTIFICACION

A nivel nacional (Instituto Malbrán, Buenos Aires) no se registran casos de Carbapenemasas KPC provenientes de la provincia de Salta. Por lo cual se hace indispensable contar con estos datos epidemiológicos.

La mayoría de hospitales y clínicas privadas de nuestra provincia, detectan actualmente estas enzimas, pero no las reportan al Instituto Malbrán, por lo cual Salta aparece como una provincia libre de Carbapenemasas KPC, lo que no refleja nuestra situación actual.

Es importante detectar estas enzimas por que inhiben la acción de los antibióticos carbapenémicos, última alternativa terapéutica en pacientes críticos, generando un peligro para ellos.

Así mismo es necesario seguir detectándolas e informándolas, para dar a conocer a los hospitales y a la comunidad de Salta en general, la prevalencia de estas enzimas en Enterobacterias y para que se puedan tomar medidas preventivas al respecto.

HIPOTESIS

Existen cepas productoras de Carbapenemasas KPC en los diferentes servicios del Hospital San Bernardo.

OBJETIVO GENERAL

Detectar y estudiar cepas productoras de mecanismos de resistencia antibiótica en los diferentes servicios del Hospital San Bernardo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Detectar cepas productoras de carbapenemasas KPC en Enterobacterias, empleando diferentes métodos fenotípicos.
- ✓ Evidenciar la Enterobacteria productora de carbapenamasa KPC con mayor prevalencia, el servicio hospitalario del cual proviene y tipo de muestra más frecuente donde se las detectó.
- ✓ Estudiar mecanismos de resistencias acompañantes de las cepas seleccionadas.
- ✓ Comunicar la información de los datos obtenidos a los diferentes servicios del Hospital San Bernardo y a la comunidad en general, a fin de contribuir a la prevención, evitando así la diseminación de estas especies bacterianas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

- Tipo de Estudio

Descriptivo, retrospectivo y de corte transversal.

Descriptivo debido a que describe la frecuencia de los hallazgos de las Carbapenemasas en una población definida (pacientes del hospital San Bernardo). De corte transversal por que determina la prevalencia de las enzimas en cuestión, en un intervalo determinado de tiempo (desde el 2013 al 2017). Retrospectivo debido a que permite determinar la causa del aumento de carbapenemasas KPC a partir de un efecto inicial (aumento de cepas de Enterobacterias multirresistentes).⁽²⁷⁾

- Población y Muestra:

La población bajo estudio estuvo conformada por cultivos positivos de pacientes provenientes de los diferentes servicios del Hospital San Bernardo: Consultorio externo, Clínica Médica, Cirugía General, Cirugía Especial, Terapia Intensiva, Terapia intermedia, Unidad Coronaria y Servicio de Quemados, recolectados retrospectivamente desde el año 2013 hasta el 2.017.

De esta población – un total aproximado de 2400 cultivos positivos - que fueron procesados en el Servicio de Microbiología, se seleccionaron 200 casos con desarrollo de Enterobacterias en los cultivos primarios y cuyos antibiogramas mostraron resistencia a los antibióticos carbapenémicos (IMI, MER o ERTA), utilizando un equipo automatizado (Phenix). Es decir que el grupo bajo estudio quedó conformado por cultivos positivos obtenidos de diferentes muestras bacteriológicas (Urocultivos, Hemocultivos, Catéteres, Espustos, y Líquidos de punción), con desarrollo de Enterobacterias y cuyas CIM (concentraciones inhibitorias mínimas) para los antibióticos carbapenémicos fueron mayores o iguales a 4 ug/ml.

- Metodología

A las muestras seleccionadas mediante el equipo Phenix, se les practicó el método manual de difusión por discos, confirmando que los halos de inhibición de IMI o MEM fueron menores o iguales a 21 mm.

Además, se procedió a detectar la presencia de enzimas Carbapenemasas KPC mediante demostración de sinergia con ácido fenil borónico (APB), hisopando placas de agar Mueller Hinton, con una suspensión 0.5 de la escala de Mac Farland de los aislamientos en estudio. Luego se colocó el disco de APB de 300 ug., a una distancia de 2 cm., centro a centro, frente a los discos de cada carbapenem (IMI y MER), y posteriormente se incubaron 24 horas, a 35°C, en estufa de cultivo. La comprobación del ensanchamiento del halo de inhibición del carbapenem hacia el disco del inhibidor (APB), se interpretó como positivo (sinergia), según las recomendaciones del CLSI para esta metodología.⁽²⁸⁾



Grafico I: Demostración de sinergia entre el ácido fenil borónico y los carbapenemes.

Seguidamente se realizaron los métodos de Hodge Modificado y el de Blue Carba, para corroborar fenotípicamente la detección de la enzima. ^(25,26)

En el Método de Hodge Modificado se hisoparon placas de agar Mueller Hinton con un inóculo 0.5 Mc Farland de una cepa de Enterobacteria ATCC, y se colocó posteriormente un disco de MEM en el centro de la placa. Luego se descargó una anzada de la Enterobacteria sospechosa desde el centro del disco, en línea recta hacia afuera. Se incubó a 35 °C durante 24 horas, obteniéndose la deformación del halo de inhibición del antibiótico, en forma de trébol, como resultado positivo. ^(29,30)



Gráfico II: Demostración del Test de Hodge con cepas de Carbapenemasas KPC.

En el caso del Blue Carba, para cada cepa sospechosa se prepararon dos tubos: uno con 1 ml de una solución A (tubo control), y otro con 1 ml de solución A más 1 mg de IMI (tubo de reacción). A ambos se le agregó una suspensión de la cepa sospechosa y se incubó 2 horas a 35 °C. El viraje de color del azul al amarillo se interpretó como positivo. ^(31,32)

Aquí se tuvo en cuenta el tiempo que tardó cada cepa para cambiar de color, ya que un tiempo de 2 a 30 minutos en el viraje de color se correlaciona con mecanismos de Carbapenemasas KPC, mientras que luego de 30 minutos y hasta las 2 horas se asocia a otros mecanismos de resistencias como Metalobetalatasas u Oxacilinasas. ⁽³³⁾



Gráfico III: Demostración del método de Blue Carba para detección de Carbapenemasas KPC.

Las 200 cepas que resultaron positivas por estos tres métodos, fueron luego analizadas para comprobar si presentaban resistencias acompañantes para otros grupos de antibióticos. Para ello se ensayaron por el método de difusión de discos, según recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* ⁽²⁵⁾, los siguientes

antimicrobianos: Imipenem 10 ug (IMI), Ceftazidima 30 ug. (CAZ), Cefotaxima 30 ug. (CTX) y Amoxicilina/ácido clavulánico 10/10 ug (AMC), ubicados estratégicamente para la detección fenotípica de los siguientes mecanismos de resistencia:

- Beta lactamasa de espectro extendido tipo GES con actividad carbapenemasa: discos de IMI de 15 a 20 mm de distancia del disco de CAZ.
- Beta lactamasa de espectro extendido (BLEE): discos de CAZ y CTX de 15 a 20 mm de distancia del disco de AMC.

Como así también resistencias acompañantes de otros grupos antibióticos: ciprofloxacina y ácido nalidíxico, amicacina y gentamicina, piperacilina/tazobactam, trimetoprima/sulfametoxazol, colistina y fosfomicina.

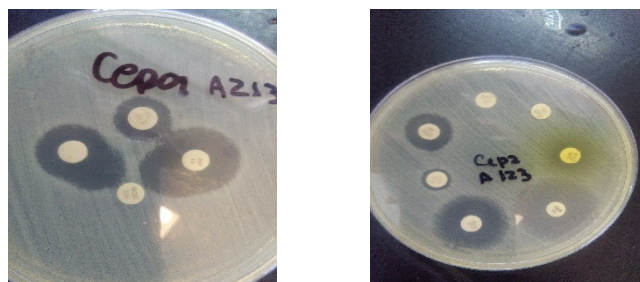


Gráfico IV: Método de difusión por discos para detección de las resistencias antibióticas acompañante.

- Análisis de los datos

A partir de los análisis detallados anteriormente, se llevó a cabo un tratamiento estadístico de tipo descriptivo (porcentajes) de los resultados obtenidos, detectando un panorama general de la existencia y comportamiento de las enzimas estudiadas (Carbapenemasas KPC) en Enterobacterias.

RESULTADOS

A partir del análisis realizado, se determinó que el mayor porcentaje de carbapenemasas KPC correspondió a *Klebsiella pneumoniae* (92,5%), mientras que el resto estuvo representado por un menor porcentaje de otros géneros y especies de Enterobacterias (Tabla 1).

Tabla N° 1: Prevalencia de bacterias portadoras de carbapenemasas KPC en el Hospital San Bernardo de Salta. (n: 200)

Especies	Aislamientos	
	n	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	185	92,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	3,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	2,0
<i>Escherichia coli</i>	2	1,0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0.5
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0.5
<i>Serratia marcescens</i>	1	0.5

De los diferentes servicios hospitalarios estudiados, el de Terapia Intensiva aportó el mayor número de muestras positivas, seguido por el Servicio de Cirugía y Clínica Médica (Gráfico N° V).

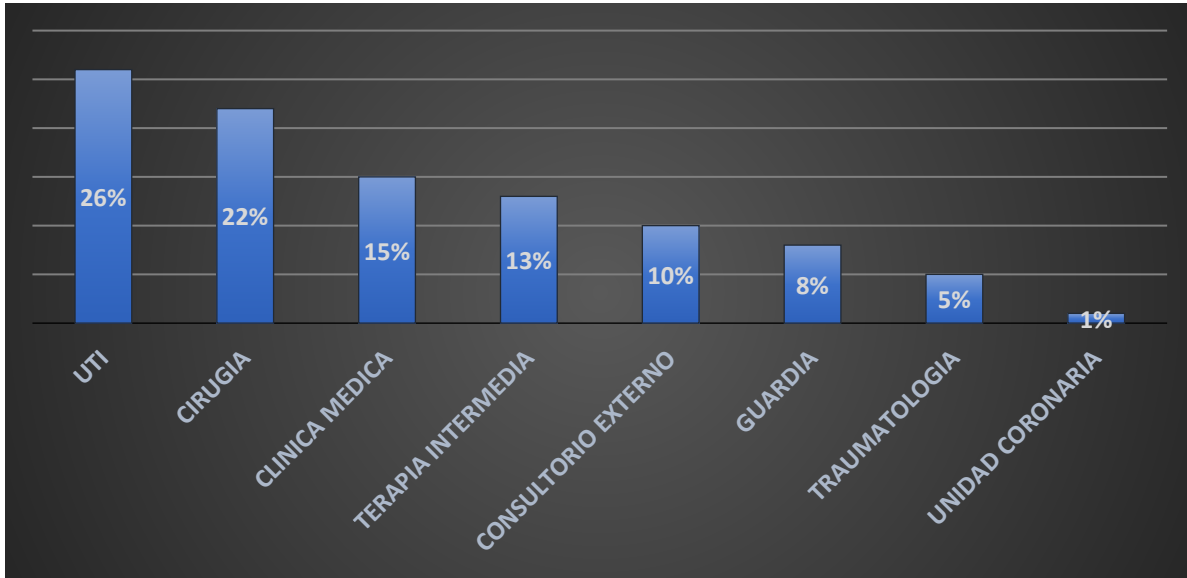


Grafico V: Prevalencia de Carbapenemasas KPC en los diferentes servicios. (n:200)

Según el tipo de muestras bacteriológicas estudiadas, se halló que el 52% de los aislamientos se realizaron en muestras de urocultivos, seguidas por hemocultivos y aspirados traqueales (Gráfico N° VI).

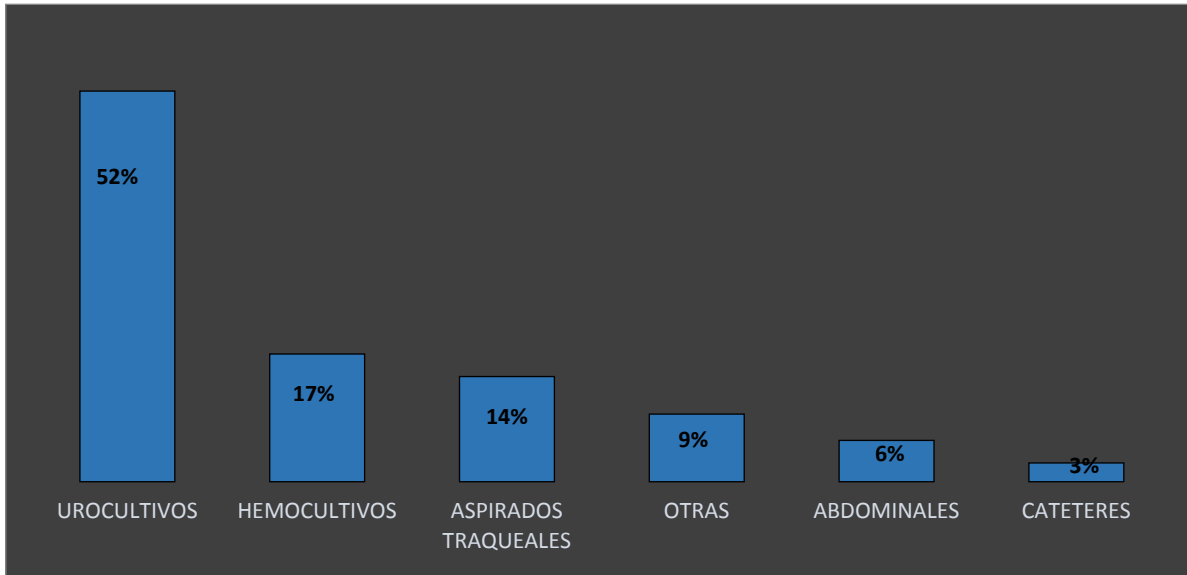


Grafico VI: Muestras clínicas de las que se aislaron Enterobacterias portadoras de Carbapenemasas KPC (n:200)

Al estudiar otros mecanismos de resistencia asociados se encontró que el 39,5% de los aislamientos de *K. pneumoniae* portadoras de carbapenemasas presentaban además

una beta lactamasas de espectro extendido (BLEE), mientras que solo el 20% de las demás Enterobacterias que producían Carbapenemasas producía además una BLEE.

Finalmente los resultados de resistencias a otros grupos de antibióticos por el método de Kirby Bauer, mostraron un mayor porcentaje de resistencias acompañantes para Piperacilina/tazobactam, Trimetoprima/Sulfametoxazol y las Quinolona (Grafico VII)

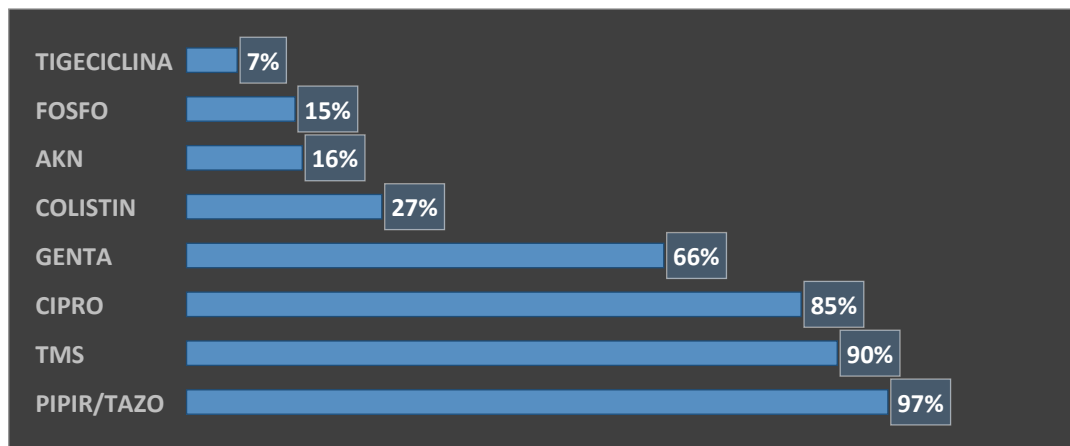


Grafico VII: Porcentaje de resistencia de cepas KPC a otros antibióticos (n:200).

DISCUSIÓN

Este estudio demostró la presencia de cepas de Enterobacterias portadoras de carbapenemasas de tipo KPC en un hospital de la provincia de Salta, implicando principalmente a *Klebsiella pneumoniae*.

Estos hallazgos son coincidentes con los de otras investigaciones, debido a que *Klebsiella pneumoniae* es una de las Enterobacterias que más frecuentemente se aísla de infecciones nosocomiales y la que se asocia con mayor prevalencia a las Carbapenemasas tipo KPC^(34,35,36).

En cuanto al material clínico más prevalente de donde se aislaron Enterobacterias portadoras de Carbapenemasas tipo KPC, no encontramos coincidencia con un estudio realizado en Colombia por Montúfar y col.⁽³⁷⁾, debido a que en Salta se encontró un 52% de estos aislamientos en muestras de urocultivos, en contraposición a los estudios de Colombia con mayor asociación a bacteriemias. Una posible explicación a estas diferencias puede deberse a que en nuestro hospital, la mayoría de los pacientes ingresados a las diferentes salas son rápidamente sometidos a sondaje vesical. Por lo cual esta maniobra invasiva se convierte en la primera puerta de entrada para estas bacterias. Además, no se tuvo en cuenta si los pacientes estaban colonizados o infectados con las cepas KPC y las estadías hospitalarias no superaron los 21 días. Mientras que en los casos colombianos, solo se consideraron pacientes infectados con dichas cepas, con estadías hospitalarias superiores a los 54 días, la mayoría de ellos inmunodeprimidos, lo cual predispone una situación de riesgo para desarrollar bacteriemias por KPC, reflejadas en muestras de hemocultivos.

Por otro lado, encontrar estas bacterias productoras de KPC en los aislamientos clínicos generó gran preocupación, debido a que ellas presentaron además, otros mecanismos de resistencias asociados, como beta lactamasas de espectro extendido, resistencia a aminoglucósidos y a quinolonas, entre otros, generando mayor riesgo para los pacientes hospitalizados. Esto se puede observar en el gráfico VII, donde piperacilina/tazobactam presenta una de las más elevadas resistencias acompañantes (97%), seguida por trimetoprima/sulfametoxazol (90%) y ciprofloxacina (85%).

Debido a esto, se comenzaron a utilizar otros antimicrobianos como tigeciclina, fosfomicina y colistina con probable acción sobre estos aislamientos, pero que evidenciaron en este trabajo un porcentaje de resistencia como se puede observar en el mismo gráfico.

Además tigeciclina y fosfomicina presentan escasa disponibilidad farmacéutica en nuestro país y una farmacodinamia aún no bien dilucidada, así como efectos adversos y regímenes de aplicación poco estudiados, por lo que resultaron poco eficaces en bacteriemias e infecciones urinarias, cuando se los utilizó como monodrogas. El éxito terapéutico se vió en combinaciones antibióticas con colistina o rifampicina.

Por otro lado, del total de carbapenemasas aisladas, el 92,5% se encontró en *Klebsiella pneumoniae*, con alta sospecha de ser carbapenemasas KPC al igual que las restantes enterobacterias aisladas, debido a que en la prueba del Blue Carba viraron de color dentro de los primeros 30 minutos de reacción. Sin embargo esto no se pudo confirmar debido a que el Hospital San Bernardo de Salta, no cuenta con métodos de biología molecular hasta el presente.

CONCLUSION

Este trabajo permitió evidenciar la importancia en la detección temprana de cepas KPC en Enterobacterias, evitando así una rápida diseminación de las mismas y una posterior colonización de pacientes y unidades de cuidados críticos.

La presencia de estas enzimas estuvo presente en un porcentaje elevado en aislamientos de *K. pneumoniae*.

Para evitar la diseminación de este grupo de bacterias, en nuestro hospital fue necesario implementar medidas de control infectológico, creando equipos multidisciplinarios que incluyeron la rápida detección de las mismas, para que las intervenciones terapéuticas y el aislamiento de los pacientes fueran realizados de una manera eficaz.

A partir del aumento de casos de Enterobacterias con Carbapenemasas KPC, se implementaron hisopados rectales de vigilancia epidemiológica, a todo paciente con ingreso por guardia o derivado de otro nosocomio. Permitiendo este accionar controlar la diseminación de estas enzimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Koneman E W. Winn W C. Allen S D. Janda W M. Procop G W. Cschrenckenberger P. Woods G L. Diagnóstico microbiológico. 6ta edición. Argentina. Editorial medica Panamericana. p.204.
2. Sanders CC, Moellering RC Jr, Martin RR, et al. Resistancento cefamandole: a collaborative study of emerging clinical problems. J Infect Dis. 1982; 145: 118 -125.
3. Sanders CC, Sanders WE Jr. Emergence of resistance during drug therapy with newer beta lactam antibiotics: role of inducible beta lactamases and implications for the future. Rev Infect Dis 1983; 5:639-648.
4. Livermore DM. The impact of carbapenemes on antimicrobial development and therapy. Curr Opin Investig Drugs. 2002; 3:218-24.
5. Kim J, Lee H. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β lactamases by ligase chain reaction. Antimicrob Agents CHEMOTHER. 2000; 44 (7): 1860 – 4.
6. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20:440-58.
7. Mattar S, Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las beta lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiologia. Infectio. Infectio 2007; 11(1): 23-35.
8. Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, Yinnon AM. Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30: 534-42.
9. Robilotti E, Deresinski S. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. F1000 Prime Rep.2014; 6:80.
10. Nordman P, Carrer A. Les carbapenemases des enterobacteries. Archives de Padatre. 2010; 17:S154-S162.
11. Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D et al. Emergence of carbapenem-resistant Klebsiella species possessing the class A carbapenem- hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin. Infect. Dis. 2004: 39:55-60.

12. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM -30 β -lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 55-60.
13. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
14. Chen L. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase: Extended-spectrum β - lactamase continues to go global. *Medscape Infect Dis* 2009; 14: 1-10
15. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Koren J Inter Med*. 2012; 27(2):128-142.
16. Muñoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13 (9): 785-796.
17. Pasteran F, Faccone D, Gomez S, De Bunder S, Spinelli F, Rapoport M, Petroni A, Galas M, Corso A. Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67 (5): 1291-1293.
18. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología INEI ANLIS "Dr. Carlos G Malbrán". Alerta epidemiológica: Emergencia de carbapenemasa tipo Nueva Delhi Metallo-beta-lactamasa. Boletín 3, junio 2013. Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/category/alerta/>.
19. Castanheira M, Costello AJ, Deshpande LM, Jones RM, Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(3): 1668-1669.

20. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9: 228-36.
21. Jorge Velásquez,¹ Rosa Hernández,¹ Oscar Pamo,¹ Mario Candiotti,¹ Yvett Pinedo,¹ Rosa Sacsquispe, ² Lesly Suárez,¹ Nathaly Fernández. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Disponible en <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v26n4/pdf/a07v26n4.pdf>
22. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11(2):159-177.
23. Villalobos A, Díaz M, Barrero L, Rivera S, Herriquez D, Villegas M, et al. Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad en Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2011; 30 (6).
24. Hernández C, Blanco V, Mota G, Correa A, Maya J, de la Cadena E, et al. Evolución de las resistencias antimicrobianas de bacilos gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica.* 2014; 34 (1): 91-100.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. January, 2013.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 7th ed. Approved standard M7-A7. CLSI. (sn); 2006.
27. Sampieri R.H, Collado C.F., Baptista L.M. Metodología de la investigación. 5ta edición. México. Editorial Mc Graw-Hill/ Interamericana editores, S.A. DE C.V. p 76.
28. Flujograma para detección de carbapenemasas en enterobacterias. Protocolo de trabajo de la red Whonet-Argentina. 2011.

29. Fernández E, Bustamante Z, Zamora J, et al. Determining carbapenemases and its relation ship to genetic structures in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* at hospitals in the city of Cochabamba. *Biofarbo*. 2009; 17 (1): 308.
30. Bacterias gram negativas no fermentadoras productoras de carbapenemasas, aisladas de los servicios de cuidados críticos UCI-UCIN y emergencias, Hospital Regional Lambayeque- Diciembre 2.014 – Julio 2.015. Disponible en <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/775>.
31. -Blue Carba- Detección rápida de carbapenemasas directo de placa de cultivo. Protocolo del Servicio ANTIMICROBIANOS, Laboratorio Nacional de Referencia en antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”. Adaptado de Pires J. y cols¹. Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/BLUE-CARBA-.pdf>.
32. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”. TABLETAS ROSCO: RAPID CARB BLUE Kit (Catalogo 98023). Traducción del protocolo del fabricante. Evaluación y comentarios del Servicio de Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia (LRN). Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/.../BLUE-CARBA-ROSCO-version-4.pdf>.
33. - Blue Carba – Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo. Disponible en antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/BLUE-CARBA-.pdf. Protocolo del Servicio ANTIMICROBIANOS, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”. Adaptado de Pires J. y col.
34. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacteria. Disponible en <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n5/0716-1018-rci-34-05-0476.pdf>. *Revista chilena de infectología*, 2.017.
35. Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. Disponible en www.ins.gov.py/revistas/index.php/rspp/artic_le/view/22. *Rev. Salud Pública Parag.* 2013; Vol.3, Nº 1; Enero-Julio 2013/ pag.30-35.
36. Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). Disponible en www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/publicaciones/.../KPC_pacieletal.pdf. *Rev. Tendencias*, 2011 (IN PRESS).

37. "Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia". Montúfar F. y col. Disponible en <http://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-articulo-experiencia-clinica-...>