

Diseminación clonal de KPC-2 en *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos

María Yauri^{1,*}, Mercedes Rodríguez¹, Iliana Alcocer¹

Resumen

Objetivo: Determinar los mecanismos de resistencia antibiótica y la epidemiología molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos.

Materiales y métodos: 30 aislados multirresistentes de *K. pneumoniae* fueron obtenidos a partir de: urocultivo, aspirado traqueal, secreción de herida, sonda vesical, hemocultivo, líquido peritoneal, punta de catéter, colección abdominal y secreción bronquial. Los aislados fueron colectados de noviembre de 2012 a abril de 2013. La identificación y susceptibilidad antibiótica fue determinada por el sistema automatizado VITEK 2. Para la amplificación de genes de resistencia se empleó PCR, la determinación de las Secuencias Tipo (ST) fue obtenida por tipificación multilocus de secuencias (MLST) y la relación clonal fue establecida por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Resultados: Todos los aislados mostraron fenotipos multirresistentes, excepto a colistina y tigeciclina. El 100% de los aislados fue productor de la carbapenemasa KPC-2. La determinación de la presencia de genes codificantes de β -lactamasas de Espectro Extendido mostró que el 67% de los aislados fue positivo para el gen *bla*_{CTX-M}, el 100% fue positivo para el gen *bla*_{SHV} y 93% fue positivo para el gen *bla*_{TEM}. El análisis de la relación clonal de los 30 aislados agrupó a 20 en un mismo pulso tipo. El análisis por MLST demostró que la ST predominante fue ST258 presente en el 60% de la población, seguida de ST1199 presente en el 20% de la población analizada.

Conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran la importancia de implementar y combinar estudios epidemiológicos, clínicos y moleculares para comprender la distribución de la resistencia entre bacterias de interés clínico.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, resistencia a carbapenémicos, tipificación multilocus de secuencias, ST258.

Clonal dissemination of KPC-2 in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*

Abstract

Objective: To determine the mechanism of antibiotic resistance and molecular epidemiology of carbapenem resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and Methods: 30 multidrug resistant isolates of *K. pneumoniae* were obtained from urine culture, tracheal aspirate, wound secretion, bladder catheter, blood culture, peritoneal fluid, catheter tip, abdominal collection, and bronchial secretion. *K. pneumoniae* isolates were collected between November 2012 and April 2013. Identification and susceptibility were determined by the VITEK 2 system. Resistance genes were identified by PCR, sequence type (ST) was established by multilocus sequence typing (MLST), and clonal relationship was defined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Results: All isolates were multidrug resistant and susceptible to colistin and tigecycline. 100% of isolates produced KPC-2 carbapenemase. This study detected Extended Spectrum β -Lactamases encoding genes. 67% of isolates were positive for *bla*_{CTX-M}, 100% were positive for *bla*_{SHV}, and 93% of isolates were positive for *bla*_{TEM}. Analysis of the clonal relationship clustered 20 isolates in the same clonal complex. Multilocus sequence typing showed the predominant sequence type ST 258 in 60% of population. ST 1199 were present in 20% of bacterial population.

Conclusion: Molecular epidemiology, clinical research and molecular biology studies improve understanding of mechanisms of resistance distribution among bacteria of clinical interest.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenem resistance, multilocus sequence typing, ST 258.

Introducción

Klebsiella pneumoniae es una de las enterobacterias más comúnmente asociada con infecciones adquiridas en la comunidad y en el hospital. Es el bacilo gram negativo clínicamente más importante caracterizado por su alto grado de multirresistencia. Es un patógeno oportunista ya que afecta, en su mayoría, a pacientes debilitados. *Klebsiella pneumoniae* es responsable de infecciones al tracto urinario, tracto respiratorio, infecciones intraabdominales, bacteriemia y neumonía¹.

Los β -lactámicos son los antibióticos más utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias, destacándose los carbapenémicos. Este grupo de antimicrobianos es comúnmente utilizado como último recurso en el tratamiento de infecciones en pacientes críticos. En los últimos años, las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia contra estos antimicrobianos, como: alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas, presencia de bombas de flujo, hiperproducción de β -lactamasas tipo Amp-C y producción de enzimas inactivadoras².

1 Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mfyaurib@puce.edu.ec

Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de octubre 1076 y Roca. Quito, Ecuador.

Recibido: 11/05/2018; Aceptado: 24/02/2019

Cómo citar este artículo: M. Yauri, et al. Diseminación clonal de KPC-2 en *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos. Infectio 2020; 24(1):42-49

En la producción enzimática, las enzimas más relevantes son las carbapenemasas tipo KPC, NDM, IMP, VIM y OXA. Estas enzimas son capaces de hidrolizar a los antibióticos carbapenémicos, inactivando su efecto contra los microorganismos. La producción de estas enzimas es considerada el principal mecanismo de resistencia contra este importante grupo de antibióticos y es producido principalmente por miembros de la familia Enterobacteriaceae³.

El reciente aumento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) ha dejado a los médicos con opciones limitadas de tratamiento para combatir infecciones bacterianas. La enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) producida principalmente por *K. pneumoniae* convierte a esta bacteria en uno de los patógenos ERC más ampliamente diseminado y asociado con altas tasas de morbilidad y mortalidad⁴.

*La carbapenemasa KPC es una enzima presente en plásmidos y pertenece a la Clase A de la clasificación de Ambler. Fue reportada por primera vez en Estados Unidos en 1996 y en pocos años se diseminó por todo el mundo, observándose en varias especies de bacilos gram negativos*².

La diseminación de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos es causado por clones epidémicos o por difusión horizontal de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción (SI). Su rápida diseminación, la convierte en una verdadera amenaza a la salud pública⁵.

Materiales y Métodos

Población de estudio

De noviembre de 2012 a abril de 2013 fueron obtenidos 30 aislados no duplicados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. Los aislados clínicos fueron obtenidos de diferentes casas de salud de las ciudades de Quito y Guayaquil. Todos los aislados fueron determinados por identificación de la morfología de las colonias sobre placas de agar Eosina Azul de Metileno (BBL™), pruebas bioquímicas y tarjetas VITEK® 2 GN ID (bioMérieux, Inc.). La identificación bacteriana por pruebas bioquímicas fue adicional a la identificación por el método automatizado VITEK 2. Los aislados bacterianos se conservan a temperatura ambiente y en congelación formando parte de la Colección Bacteriana-Quito Católica (CB-QCA). El comité de ética eximió a este estudio de revisión por cuanto se trabajó únicamente con aislados bacterianos.

Prueba de Susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos de todos los aislados analizados empleó el sistema automatizado VITEK2® (bioMérieux, Inc.). Las tarjetas AST-N272 fueron empleadas en la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los antimicrobianos probados fueron: Ampicilina/Sulbactam (SAM); Piperacilina/Tazobactam (TZP); Cefoxitina (FOX); Cef tazidima (CAZ); Ceftriaxona (CRO); Cefepima (FEP); Doripe-

nem (DOR); Ertapenem (ETP); Imipenem (IPM); Meropenem (MEM); Amicacina (AMK); Gentamicina (GEN); Ciprofloxacina (CIP); Tigeciclina (TGC) y Colistina (COL).

La susceptibilidad y puntos de corte de cada antibiótico probado fue interpretado con el manual del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI M100 2018)⁶. Para la susceptibilidad antibiótica a la colistina y tigeciclina se emplearon los puntos de corte del Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), respectivamente. Las cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli* y ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* se utilizaron como control interno de las pruebas de susceptibilidad.

Los aislados clínicos que mostraron una reducción en la susceptibilidad de alguno de los carbapenémico probado (Imipenem CIM 4 µg/mL, meropenem CIM 4 µg/mL y ertapenem CIM 2µg/mL) fueron considerados como posibles productores de carbapenemasas.

Detección de genes de resistencia a antibióticos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada para la detección de genes que codifican β-lactamasas de Espectro Extendido BLEE (*bla*_{CTX-M'}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM})⁷ y carbapenemasas (*bla*_{KPC'}, *bla*_{IMP'}, *bla*_{VIM'}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA})^{8,9,10}.

Los productos de amplificación fueron enviados a purificar y secuenciar a la empresa MacroGen Inc., Corea del Sur. Los resultados del secuenciamiento fueron alineados y analizados en el programa Geneious Pro 5.6.4. y comparadas con secuencias obtenidas a partir de la base de datos del GenBank por Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Genotipificación por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La preparación del ADN cromosomal de los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* siguió el protocolo estandarizado por la red internacional PulseNet de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). El protocolo empleado es el recomendado en la subtipificación de *E. coli* O157:H7, *E. coli* Non-0157, *Salmonella*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*. Para la normalización y comparación exacta de las imágenes del gel obtenido por Campo Pulsado se empleó como estándar la cepa sugerida por PulseNet Internacional: *Salmonella* serovar Braenderup (H9812). Los fragmentos obtenidos producto de la digestión con la enzima de restricción *Xba*I fueron comparados con la cepa estándar. Los patrones de restricción fueron analizados por el software BioNumerics Seven (Applied Math, Sint-Maten-Latem, Belgium).

Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

Los aislados fueron analizados siguiendo el protocolo descrito para la tipificación multilocus de secuencias (MLST) de *K. pneumoniae* de la página web (<https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/>). Para el estudio fueron empleados siete genes

conservados housekeeping: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los perfiles alélicos disponibles en la página web MLST de *Klebsiella pneumoniae* del Instituto Pasteur en Paris, Francia. El número alélico que confiere la secuencia tipo (ST) fue determinada para cada secuencia obtenida por PCR Tabla 1.

Resultados

Población de Estudio

Los 30 aislados bacterianos no duplicados de *Klebsiella pneumoniae* procedieron de: urocultivo (n=5), aspirado traqueal (n=5), secreción de herida (n=5), sonda vesical (n=4), hemocultivo (n=4), líquido peritoneal (n=2), punta de catéter (n=2), colección abdominal (n=1), trasplante renal (n=1) y secreción bronquial (n=1) Figura 1.

Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana

En la detección de la susceptibilidad antibiótica por el sistema automatizado VITEK2® el 100% de los aislados bacterianos fue resistente a los 3 carbapenémicos probados (ertapenem, meropenem e imipenem). Todos los aislados mostraron resistencia a todos los antibióticos probados excepto a colistina y dos (6 %) aislados fueron resistentes a tigeciclina Tabla 2.

Detección de Genes de Resistencia a antibióticos

Todos los aislados bacterianos amplificaron el gen *bla*_{KPC}. La variante alélica identificada por secuenciamiento fue KPC-2.

En la amplificación de genes que codifican carbapenemasas ningún aislado mostró la presencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}. En dos aislados (6 %, 2/30) se amplificó el gen *bla*_{OXA}. La variante alélica fue OXA-1

De los 30 aislados analizados, (67 %, 20/30) fueron positivos para el gen *bla*_{CTX-M} (100%, 30/30) fueron positivos para el gen *bla*_{SHV} y 28 (93 %, 28/30) fueron positivos para el gen *bla*_{TEM}.

El 63% (19/30) de los aislados presentó amplificación simultánea de 3 genes que codifican para BLEE: *bla*_(TEM/SHV/CTX); el 30% (9/30) de los aislados mostraron la amplificación simultánea de 2 genes codificantes de BLEE: *bla*_(TEM/SHV); un aislado mostró la combinación de los genes BLEE *bla*_(SHV/CTX) y un aislado mostró la presencia de un solo gen BLEE: *bla*_(SHV) Figura 1.

Genotipificación por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

El dendrograma obtenido a partir de los 30 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* analizados mostró diseminación clonal. El dendrograma reveló 7 pulsotipos: PT1 (5 aislados), PT2 (20 aislados) y PT3 a PT7 (con un aislado cada uno). Los aislados que pertenecían al mismo grupo (PT2) clonal mostraron una relación entre ellos de más de 98.8% de similitud según el análisis obtenido con el Coeficiente de Sorensen-Dice como indicador de similitud de los patrones de bandas Figura 1.

Tabla 1. Genes housekeeping y cebadores empleados para Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) de *Klebsiella pneumoniae*

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño productos PCR	Tm (°C)	Función
<i>rpoB</i>	rpoB-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA	1119	50	Subunidad beta de la ARN polimerasa, la cual es el centro activo
	rpoB-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC			
<i>gapA</i>	gapA-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG	706	50	Gen codificante para Gliceroldehído 3 -fosfato deshidrogenasa
	gapA-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT			
<i>mdh</i>	mdh-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTTCAG	800	50	Codifica Malato deshidrogenasa
	mdhR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCGCAGCAGCAG			
<i>pgi</i>	pgi-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGTGGC	610	50	Codifica Fosfoglucoasa isomerasa
	pgi-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT			
<i>phoE</i>	phoE-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	646	50	Fosforina E
	phoE-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAAGTGGTGGTAT			
<i>infB</i>	infB-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG	506	50	Factor de iniciación de la traducción 2
	infB-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCTTCAGCTCAAGAACTTC			
<i>tonB</i>	tonB-F	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	583	50	Transductor de energía periplásmico
	tonB-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG			

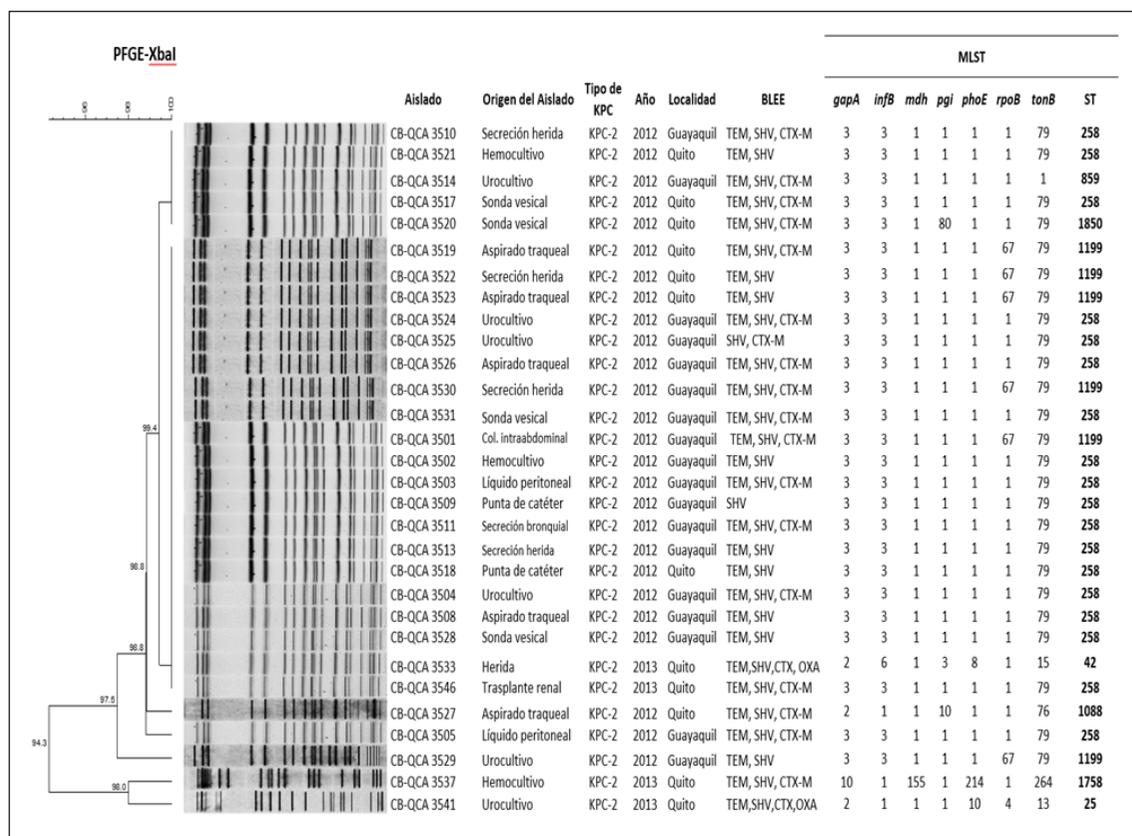


Figura 1. Dendrograma obtenido con el programa BioNumerics 7.0 donde se observa la relación clonal de cada uno de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de KPC-2, su origen, tipos de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y secuencia tipo (ST) obtenidas por tipificación multilocus de secuencias (MLST).

Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

El estudio demostró que la secuencia tipo predominante fue ST258 encontrada en el 60% (18/30) de los aislados estudiados de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC. La segunda secuencia tipo más abundante fue ST1199 presente en el 20% (6/30) de los aislados. Se determinaron secuencias únicas ST1758, ST25, ST859, ST1088, ST42 y ST1850 (Figura 1).

Discusión

Klebsiella pneumoniae es la principal enterobacteria productora de la enzima carbapenemasa KPC, el mecanismo más importante de resistencia a los carbapenémicos. El presente estudio trabajó con 30 aislados resistentes a carbapenémicos y los resultados revelaron que el mayor número de aislados resistentes fueron obtenidos a partir de muestras de urocultivo, aspirado traqueal y secreción de herida. Esto indicaría una mayor exposición a factores de riesgo de contraer bacterias resistentes como *Klebsiella pneumoniae*. A este patógeno se le atribuye una amplia gama de infecciones en el tracto urinario, respiratorio, en la sangre, asociadas a la atención en salud³.

Los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos por la producción de la enzima KPC están relacionados con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Estudios demostraron que los aislados de *K. pneumoniae* que adquieren genes

que codifican la producción de estas enzimas aumentaron la gravedad de las infecciones al complicar los tratamientos¹¹.

La variante KPC-2 fue el alelo predominante del gen *bla*_{KPC}. Esta variante estuvo presente en los 30 aislados analizados en el estudio. Su importante presencia se puede explicar por la facilidad de transmisión intraespecífica que se presenta entre los miembros de la especie *Klebsiella pneumoniae*¹².

Los 20 aislados agrupados en el pulsotipo PT2, que se observa en el dendrograma obtenido por electroforesis en gel de campo pulsado, pusieron en evidencia diseminación clonal. Los aislados involucrados provenían de dos ciudades del país: Quito y Guayaquil, con la participación de diferentes instituciones de salud. Para la ciudad de Guayaquil, los aislados procedían de dos instituciones y para la ciudad de Quito de tres instituciones. A pesar de la separación geográfica que existe entre las dos ciudades de estudio, la dispersión del clonal fue eficiente.

En países como: Colombia, Brasil, Estados Unidos, Argentina, Puerto Rico, Grecia, Israel y China, KPC es considerada endémica, gracias a su habilidad de propagación. En Argentina, la emergencia de KPC que registró este país se debió a dos patrones importantes de dispersión de resistencia: la propagación del gen *bla*_{KPC} a través del plásmido pK048 y la dispersión clonal de la secuencia tipo ST258¹³.

Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.

Código CB-QCA	Identificación	Genotipo KPC-2	SAM		TZP		FOX		CAZ		CRO		FEP		ETP		IPM		MEM		AMK		GEN		CIP		TGC		COL	
			CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación	CIM	Interpretación
CB-QCA 3501	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3502	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	4	I	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3503	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3504	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	4	I	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3505	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 64	R	32	R	16	R	4	R	≥ 16	R	8	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S
CB-QCA 3508	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3509	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3510	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	8	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3511	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	16	R	≥ 64	R	32	R	4	R	≥ 8	R	8	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S
CB-QCA 3513	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	8	R	8	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	4	I	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3514	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	8	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3517	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3518	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	4	I	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3519	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3520	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3521	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3522	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	≥ 8	R	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3523	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3524	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	16	R	≥ 64	R	32	R	4	R	≥ 8	R	8	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	2	I	1	S	≤ 0,5	S
CB-QCA 3525	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	8	R	8	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3526	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	8	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3527	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3528	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	8	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3529	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3530	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3531	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	16	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 8	R	8	R	8	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S
CB-QCA 3533	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	16	R	≥ 64	R	≥ 64	R	32	R	4	R	≥ 16	R	≥ 16	R	8	S	≥ 16	R	≥ 4	R	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
CB-QCA 3537	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	16	R	≥ 64	R	32	R	4	R	≥ 8	R	8	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	2	I	1	S	≤ 0,5	S
CB-QCA 3541	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	4	R	≥ 16	R	≥ 16	R	32	I	≥ 16	R	≥ 4	R	≥ 8	R	≤ 0,5	S						
CB-QCA 3546	<i>K. pneumoniae</i>	+	≥ 32	R	≥ 128	R	≥ 64	R	≥ 8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 4	R	2	S	≤ 0,5	S						

CB-QCA: Colección Bacteriana-Quito Católica; **KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; **(+):** positivo; **(-):** negativo; **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima; **S:** sensible; **I:** intermedio; **R:** Resistente; **SAM:** ampicilina/sulbactam; **TZP:** piperacilina/tazobactam; **FOX:** ceftoxitina; **CAZ:** ceftazidima; **CRO:** ceftriaxona; **FEP:** cefepime; **DOR:** doripenem; **ETP:** ertapenem; **IPM:** imipenem; **MEM:** meropenem; **AMK:** amicacina; **GEN:** gentamicina; **CIP:** ciprofloxacina; **TGC:** tigeciclina; **COL:** colistina.

La incidencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) ha aumentado notablemente en todo el mundo durante la última década. Durante el año 2008 países como Colombia, Argentina, Uruguay y Brasil experimentaron incrementos considerables de microorganismos KPC positivos, alcanzando porcentajes de hasta 800%¹⁴. Los reportes demostraron que la variante enzimática producida por estos aislados fue KPC-2. La variante también es común en otros países de Latinoamérica, diseminándose entre aislamientos de la misma especie y espe-

cies diferentes. KPC ha sido identificada en diversas especies bacterianas como *Enterobacter spp.*, *Escherich coli*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas spp.*²².

KPC-3 es la segunda variante mayormente reportada y se asocia también con aislados resistentes a carbapenémicos¹⁵. La variante KPC-3 y KPC-2 difieren en un solo aminoácido (H272Y). Así, el reporte de esta variante en estudios similares realizados en Latinoamérica puede deberse a eventos mutacionales y propagación clonal¹⁶.

A nivel mundial, la propagación de la carbapenemasa KPC, se explica a través de la asociación del gen bla_{KPC-2} a un elemento genético importante: el transposón *Tn4401*. El transposón *Tn4401* se relaciona con una amplia variedad de plásmidos que varían en tamaño, naturaleza y estructura. En la mayoría de los casos, los plásmidos son autotransferibles, principalmente a miembros de la especie *Escherichia coli*¹⁷, contribuyendo, aún más, con la propagación de estas enzimas. En la actualidad, estas plataformas génicas se identifican en numerosas enterobacterias, incluyendo el género *Salmonella* y bacilos gram negativos no fermentadores del género *Pseudomonas*¹⁷. Los plásmidos identificados y asociados con el gen bla_{KPC} y el transposón *Tn4401* llevan a su vez genes que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, inhibidores de betalactamasas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas¹⁸.

El éxito epidemiológico del ST258 ha sido relacionado con factores cromosómicos y plasmídicos, más allá de la resistencia a antibióticos. Estos factores estarían incrementando la aptitud de la cepa bacteriana y proporcionando una ventaja que favorece su prevalencia. La propagación de *K. pneumoniae* productora de KPC se explicaría por su asociación a un tipo de secuencia multilocus ST258 y sus variantes relacionadas. Estos aislados están distribuidos alrededor del mundo por diseminación de clones, donde ST258 ha alcanzado un estado epidémico. A pesar de su baja virulencia, las altas tasas de mortalidad que exhibe este clon se relacionan con fracaso terapéutico debido a los altos niveles de resistencia a múltiples fármacos¹⁹.

La secuencia tipo ST258 circula en más de 20 países del mundo y es miembro del grupo clonal GC258. Este grupo clonal alberga varios tipos de secuencias vinculados con brotes. Esto sugiere que estas cepas pueden compartir características genéticas que las predispone a la patogenicidad o a un incremento en la transmisibilidad. Se presume que el surgimiento de este patógeno emergente es el resultado de eventos de recombinación homóloga que derivó en el clon híbrido ST258 de *Klebsiella pneumoniae* compuesto de un 80% del genoma de ST11 y 20% del genoma de ST442²⁰.

La segunda secuencia tipo reportada con mayor frecuencia en la población de estudio fue ST1199. Estudios afirman que ST512 y ST1199 son el resultado de mutaciones puntuales de ST258. ST1199 forma parte del linaje de ST258 y se encuentran estrechamente relacionadas formando parte de un mismo grupo ancestral²⁰.

Un solo aislado presentó el ST25. Esta secuencia tipo se caracteriza por formar parte de la población de ST que cuentan con aislados bacterianos hipervirulentos e hipermucosos y se diferencia de las poblaciones conformadas por ST11 y ST258 asociadas a multiresistencia. Otros miembros de la población hipervirulenta comprenden ST23, ST86, ST65 y ST375. El estudio no reportó la presencia de este tipo de secuencias, como ST23, cuyos aislados exhiben fenotipos hipermucoviscosos¹⁹.

Informes recientes revelaron la convergencia de virulencia y resistencia antimicrobiana. Este fenómeno da como resultado de transferencia de genes mediada por plásmidos y la aparición de cepas hipervirulentas y multiresistentes de *Klebsiella pneumoniae*. Estas bacterias son identificadas como ST11 y han sido reportadas en China, lo que plantea un peligro en la aparición de nuevos organismos híbridos²¹.

El estudio también reportó cinco casos únicos de ST: 1850, 1088, 42, 1758 y 859. Estudios relacionados con estas secuencias tipo no fueron encontrados.

Las opciones en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos ERC son limitadas porque la resistencia a múltiples familias de antibióticos es mediada por una variedad de mecanismos de resistencia. En el Ecuador, el tratamiento de microorganismos resistentes como *K. pneumoniae* se basa en aspectos como: el tipo de resistencia que presenta la bacteria, la aplicación de dosis máximas de cada fármaco utilizado y el tiempo requerido de tratamiento (10 – 14 días), según la evolución clínica del paciente. En el Ecuador, la terapia antibiótica combinada es empleada con los siguientes fármacos: carbapenémicos (imipenem, meropenem), polimixinas (colistina), gliciliclinas (tigeciclina), aminoglucósidos (amikacina), fosfomicina y/o rifampicina²³. La combinación de tratamientos entre polimixina, gliciliclinas y carbapenémicos es sugerida por autores, gracias a los resultados favorables observados contra aislados resistentes^{13,28}.

Las polimixinas son importantes agentes antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas resistentes. La microdilución es el método de referencia empleado en la determinación de la susceptibilidad antibiótica. Métodos automatizados como Vitek-2 han demostrado errores importantes en la obtención de la susceptibilidad de este antibiótico. Sin embargo, para análisis de aislados de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, el sistema Vitek-2 mostró un mejor rendimiento en la obtención de la CIM comparado con los resultados obtenidos para bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*. Estudios sugieren que todos los aislados resistentes a colistina por Vitek 2 deben ser confirmados a través del método de referencia: por microdilución. La precisión en la obtención de la susceptibilidad de los métodos automatizados aún no está clara²⁴.

Ante la prevalencia de patógenos productores de carbapenemasas, el uso de tratamientos alternativos como: ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam o meropenem/vaborbactam promueven el ahorro de carbapenémicos empleados en el tratamiento de infecciones resistentes. Estas nuevas alternativas terapéuticas no han sido implementadas en el país²⁵. Estos medicamentos han demostrado una eficiente acción contra la síntesis de la pared celular bacteriana y una alta estabilidad contra la hidrólisis producida por betalactamasas²⁶.

A pesar de la autorización de uso y reconocida eficacia de estos antibióticos en otros países de la región, en Ecuador, el posicionamiento terapéutico de estos nuevos antimicrobianos es nulo²⁷. La terapia combinada sigue siendo el principal sistema de control de infecciones resistentes.

La producción de carbapenemasas puede ser identificada a través de pruebas fenotípicas implementadas en los laboratorios de microbiología. Debido a la versatilidad de estas enzimas, hasta la fecha, no existe una sola prueba fenotípica con la suficiente capacidad de detección y diferenciación de todos los tipos de enzimas que existen. En la actualidad, el uso de plataformas moleculares basados en reacción en cadena de la polimerasa constituye la técnica más confiable de detección de este tipo de enzimas. La elevada especificidad y sensibilidad, y el poco tiempo requerido, hacen de las técnicas moleculares las más apropiadas^{28,29}.

El estudio del funcionamiento de los factores de resistencia y su diseminación permitirá una mejor comprensión de la epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC. Esto ayudará en la implementación de medidas efectivas para su control y prevención. Los resultados obtenidos demuestran la importancia de implementar y combinar estudios clínicos, moleculares y epidemiológicos que permitan entender de manera precisa la distribución de la resistencia entre las bacterias.

La salud pública requiere herramientas de detección rápidas, completas y eficaces que ayuden a rastrear y generar información oportuna para el control de las infecciones. Un adecuado conocimiento de la epidemiología molecular y los principales mecanismos de resistencia que exhiben las bacterias proporcionan adecuadas guías en el tratamiento de las infecciones.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes. Los pacientes autorizaron que sus datos fueran incluidos con un consentimiento informado en posesión de los autores.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes que permitan su identificación

Fuente de financiación. Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Conflictos de interés. Los autores declaran que no existen conflictos de interés de ninguna índole

Agradecimientos

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por las facilidades financieras, investigativas y logísticas en la ejecución del presente trabajo.

Referencias

1. Wu H, Wang M, Liu Y, Wang X, Wang Y, Lu J, et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* species isolated from chicken broilers. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. 2016 Sep 2 [cited 2019 Jun 20];232:95–102. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051630294Xc>
2. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Jun 13];22(12):686–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365952/>
3. Castillo LA, Birnberg-Weiss F, Rodriguez-Rodriguez N, Martire-Greco D, Bigi F, Landoni VI, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 Negatively Regulates the Oxidative Burst in Human Neutrophils. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Apr 26 [cited 2019 Jun 19];10:929. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00929/full>
4. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PLOS ONE* [Internet]. 2015 Jul 21 [cited 2019 Jun 20];10(7):e0133727. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133727>
5. Iovleva A, Mettus RT, McElheny CL, Mustapha MM, Van Tyne D, Shields RK, et al. Reduced ceftazidime and ertapenem susceptibility due to production of OXA-2 in *Klebsiella pneumoniae* ST258. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2019 May 24 [cited 2019 Jun 18];dkz183. Available from: <https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkz183/5498603>
6. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement M100-S28. 28 ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
7. Dalenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* marzo de 2010;65(3):490-5.
8. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129–3135. doi:10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005
9. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* [Internet]. julio de 2008 [cited 2019 Sep 5]; 14(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2600346/>
10. Mlynarcik P, Roderova M, Kolar M. Primer Evaluation for PCR and its Application for Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2 de enero de 2016;9(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4834133/>
11. Clemente AM, Castronovo G, Antonelli A, D'Andrea MM, Tanturli M, Perissi E, et al. Differential Th17 response induced by the two clades of the pandemic ST258 *Klebsiella pneumoniae* clonal lineages producing KPC-type carbapenemase. *PLoS ONE* [Internet]. 6 de junio de 2017 [citado 18 de junio de 2019];12(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460819/>
12. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2009 [cited 2019 Sep 5];53(1):333-4. Available from: <https://aac.asm.org/content/53/1/333.long>
13. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 29];7 (895) 1-30. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00895/full>
14. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* septiembre de 2013;13(9):785-96.
15. Rodríguez E, Saavedra S, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valderrama, et al. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica.* enero de 2014;34(0), 224–31. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1696>
16. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains in an Israeli Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 2007;51(8):3026-9.

17. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas M-V, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase blaKPC-2 Gene. *Emerg Infect Dis.* septiembre de 2010;16(9):1349-56.
18. Zhang X, Chen D, Xu G, Huang W, Wang X. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China. *PLOS ONE.* 20 de marzo de 2018;13(3):e0194000.
19. Cejas D, Elena A, Nuñez DG, Platero PS, De Paulis A, Magariños F, et al. Changing Epidemiology of KPC Producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of Hypermucoviscous ST25 and High Risk Clone ST307. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 13 de junio de 2019 [citado 18 de junio de 2019]; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716519301481>
20. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PLOS ONE.* 21 de julio de 2015;10(7):e0133727.
21. Yu F, Lv J, Niu S, Du H, Tang Y-W, Pitout JDD, et al. Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenem-Resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and Hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. *J Clin Microbiol.* 1 de septiembre de 2018;56(9):e00731-18.
22. Hazen TH, Mettus R, McElheny CL, Bowler SL, Nagaraj S, Doi Y, et al. Diversity among bla KPC -containing plasmids in *Escherichia coli* and other bacterial species isolated from the same patients. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Jul 6 [cited 2019 Aug 29];8(1):1-11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28085>
23. Protocolo para la atención de pacientes con cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas-CRE. (MSP) Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2016).
24. Raquel Girardello*, Ana Paula Cury, Maria Renata Gomes Franco, Thais Romano Di Gióia, João Nóbrega de Almeida Jr, Maria Rita Elmor de Araújo, et al. Colistin susceptibility testing and Vitek-2TM: is it really useless?- ClinicalKey [Internet]. [cited 2019 Sep 5]. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0S0732889318301123?returnurl=https%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0732889318301123%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F>
25. Carmeli Y, Armstrong J, Laud P, Newell P, Stone G, Wardman A, Gasink L. Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a randomised, pathogen-directed, phase 3 study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 661-73. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30004-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30004-4)
26. Petty LA, Henig O, Patel TS, Pogue JM, Kaye KS. Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2018 Sep 12 [cited 2019 Aug 27];11:1461-72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6140735/>
27. Olarte-Luis T, Cáceres-Galíndez D. y Cortés J. Nuevas cefalosporinas [Internet]. *Rev Chilena Infectol* 2018; 35 (5): 465-475. 2019 [cited 2019 Sep 5]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/329460311_Nuevas_cefalosporinas
28. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter S. & Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae [Internet]. *Gut pathogens* 2014; 6, 13 [cited 2019 Sep 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4032584/>
29. Villegas MV, Jiménez A, Esparza G, Appel TM. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: A diagnostic, epidemiological and therapeutic challenge. *Infectio* [Internet]. 2019 Aug 2 [cited 2019 Aug 27];23(4):358-68. Available from: <https://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/808>