

## **TITULO**

# **CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS EN UN HOSPITAL DE ADULTOS Y EN UN HOSPITAL DE NIÑOS**

## **AUTORES**

TORTONE, Marcos<sup>1</sup>; SAKA, Héctor Alex<sup>2</sup>.

## **COLABORADORES**

FIGUEROA, Myrian<sup>1</sup>; PAREDES, Marisa<sup>3</sup>; CALIVA AGÜERO, Sebastián<sup>3</sup>; SOLA, Claudia del Valle<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Misericordia Nuevo Siglo.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup>Servicio de Microbiología. Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.

## **RESUMEN**

**INTRODUCCION:** Las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasa (EPC) son un desafío a la salud pública debido a las escasas opciones terapéuticas, internación prolongada, altos costos y tasas de morbimortalidad. En este trabajo se llevó a cabo la caracterización fenotípica y molecular de EPC de pacientes adultos y pediátricos de dos hospitales. **MATERIAL Y METODOS:** Se analizaron 72 y 15 cepas de EPC de pacientes adultos del Hospital Misericordia (HM) y de pacientes pediátricos del Hospital de Niños (HN), respectivamente, obtenidas de diciembre de 2017 a marzo de 2021. La tipificación de especies se realizó por Vitek2, la sensibilidad antimicrobiana se determinó usando Vitek2 y difusión en agar. La producción de carbapenemasa se detectó por los métodos Hodge-modificado, carba-blue, carba-NP y/o mCIM. El fenotipo de carbapenemasa se estudió mediante discos combinados de meropenem con inhibidores (ácido borónico, EDTA, cloxacilina y tazobactam). El tipo de carbapenemasa se identificó por PCR con oligonucleótidos específicos para KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48/163. **RESULTADOS:** Las EPC se aislaron de los siguientes materiales clínicos (HM/HN): orina (32%/60%), secreciones respiratorias (26%/0%), bacteriemias (22%/7%), otros materiales (20%/33%). Las especies de EPC aisladas fueron (HM/HN): *Klebsiella pneumoniae* (76%/33%), *Klebsiella aerogenes* (8%/0%), *Enterobacter cloacae* complex (7%/47%), *Escherichia coli* (6%/13%), otras (3%/7%). La distribución por tipo de carbapenemasa fue (HM/HN): KPC (96%/60%), NDM (3%/40%), OXA-48/163

(1%/0%). No se detectaron carbapenemasas del tipo VIM ni IMP. Las resistencias acompañantes en estas bacterias fueron (HM/HN): gentamicina (100%/80%), trimetoprima-sulfametoxazol (90%/80%), ciprofloxacina (88%/60%), tigeciclina (33%/7%), colistina (18%/7%), amikacina (18%/60%), fosfomicina (7%/7%). En ambos hospitales, más del 90% de las EPC no fueron aptas para tratamiento combinado con meropenem, por presentar concentraciones inhibitorias mínimas mayores o iguales a 16 mg/L. CONCLUSION: Hubo diferencias notables en las EPC del HM y el HN, ya que la carbapenemasa ampliamente predominante en el HM fue KPC, mientras que en el HN no hubo diferencias significativas entre KPC y NDM. En el HM, la principal especie implicada fue claramente *K. pneumoniae* mientras que en el HN predominó *E. cloacae* complex. En cuanto a los perfiles de resistencia, las mejores opciones terapéuticas en ambas instituciones fueron tigeciclina, fosfomicina y colistina. En el HN, se observó alta resistencia a amikacina (60%) en EPC, mientras que, en el HM, la resistencia a amikacina fue menor (18%) y solo se presentó en *K. pneumoniae*. La epidemiología de las EPC presenta marcadas diferencias a nivel regional y local, por lo que es de importancia caracterizar a estos microorganismos a nivel hospitalario, a los fines de generar herramientas para diseñar estrategias de control de infecciones y determinar las mejores opciones terapéuticas en cada centro.

## **INTRODUCCION**

En la última década, la resistencia a los antibióticos tuvo un aumento a nivel mundial, destacándose entre las resistencias emergentes la debida a enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC). Estas bacterias producen enzimas que hidrolizan a casi toda la familia de los beta-lactámicos, incluidos los carbapenemes, limitando considerablemente las opciones terapéuticas [1-3]. A su vez, frecuentemente presentan resistencia a otras familias de antibióticos, por lo que es habitual estar en presencia de cepas multirresistentes, habiéndose también documentado cepas extremadamente resistentes o incluso pan-resistentes [4]. Dentro de las bacterias productoras de carbapenemasas, las enterobacterias son sin dudas las que causan el mayor impacto clínico [5-7].

Las carbapenemasas son un tipo específico de beta-lactamasas, que se clasifican según Ambler en tres grupos: Grupo A, donde predominan las carbapenemasas tipo KPC, Grupo B o metalo-beta-lactamasas, donde se destacan las de tipo NDM, VIM e IMP, y Grupo D u oxacilinasas, las cuales presentan actividad hidrolítica más débil que las anteriores siendo las carbapenemasas tipo OXA-48, las de mayor prevalencia en este grupo [8, 9].

Las infecciones por EPC generan un gran problema a nivel hospitalario, ya que producen aumento en el tiempo de internación, fallas de terapias empíricas, tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro y necesidad de recurrir a opciones terapéuticas inusuales, las que muchas veces se encuentran insuficientemente caracterizadas en su farmacocinética y farmacodinamia. En este contexto, las infecciones por EPC se asocian a mayores costos hospitalarios y a mayores tasas de morbi-mortalidad comparadas con sus homólogas sensibles. Esta problemática es consecuencia de la continua evolución y rápida diseminación, tanto intra como interhospitalaria, de estos microorganismos [10, 11]. Dicha diseminación se ve favorecida por plataformas genéticas móviles, como plásmidos conjugativos, transposones e integrones, que pueden transferirse horizontalmente entre diferentes especies, géneros e incluso familias de bacterias, facilitando así la adquisición de los genes que codifican a las carbapenemasas [12-14]. Por otro lado, se ha descrito que las EPC tienen gran viabilidad en materiales inertes, como por ejemplo instrumental quirúrgico, vestimenta y piel del equipo médico, entre otros, lo cual también favorece su diseminación y transmisión en el contexto de las actividades relacionadas al cuidado de la salud en las instituciones sanitarias [10, 11]

Según las organizaciones internacionales de la salud, como la OMS y la OPS, la resistencia a antibióticos por EPC es motivo de preocupación mundial, ya que, desde los primeros reportes, el número de casos aumentó drásticamente [15, 16]. Si bien la epidemiología y la distribución geográfica varía para las diferentes carbapenemasas, la mayoría de ellas surgieron en los primeros años del siglo XXI y en tan solo una década se distribuyeron mundialmente, causando brotes en la mayoría de los países [17, 18].

Desde el primer aislamiento de KPC a principios de los 2000 en los EE. UU. de América [19, 20], los reportes aumentaron considerablemente en los hospitales siendo hoy en día la principal carbapenemasa encontrada a nivel global [21, 22]. Las metalo-beta-lactamasas se documentaron por primera vez en 2008 en enterobacterias en nuestro país, y desde ese momento año a año se detectan nuevos casos, con una clara tendencia ascendente [23]. OXA-163 es una carbapenemasa relacionada a OXA-48 con actividad sobre cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam y baja actividad sobre carbapenemes. Esta enzima es particularmente relevante en Argentina, donde fue identificada en *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* complex en 2011, demostrándose su capacidad para transferirse horizontalmente [24].

A nivel nacional los casos o brotes de EPC se incrementan día a día. Sin embargo, existen escasos datos sobre las características fenotípicas y genotípicas de las EPC a nivel local, así como sobre las posibles variaciones en la epidemiología de las EPC entre diferentes hospitales de la ciudad de Córdoba. En este estudio nos propusimos analizar a nivel fenotípico y genotípico cepas de EPC recuperadas a partir de muestras clínicas en un hospital de adultos (Hospital Misericordia Nuevo Siglo) y un hospital pediátrico (Hospital de Niños de la Santísima Trinidad) de la ciudad de Córdoba.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Tipo de estudio y cepas analizadas**

Mediante un estudio de tipo descriptivo y observacional, se analizó un total de 87 cepas de EPC criopreservadas, 72 cepas provenientes del Hospital Misericordia Nuevo Siglo (HM) y 15 del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (HN), las cuales representan las EPC aisladas de diciembre de 2017 a marzo de 2021 y de diciembre de 2017 a octubre de 2019, respectivamente. Además, se recolectaron retrospectivamente datos epidemiológicos de todos los aislamientos de EPC incluidos en el estudio.

### **Caracterización fenotípica de las EPC**

La identificación a nivel de especie y la sensibilidad antimicrobiana se llevaron a cabo por medio del sistema automatizado Vitek 2C (Biomérieux) según las recomendaciones del fabricante, y/o por el método de difusión en agar según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [25]. Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: cefotaxima, ceftazidima, amoxicilina-clavulánico, imipenem, meropenem, gentamicina, amikacina, ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol, fosfomicina, tigeciclina. Además, se estudió la sensibilidad a colistina por el método de pre-difusión según lo recomendado por el Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (*Insert for Kit for Detection of COLISTIN resistance in Enterobacteriaceae, P. aeruginosa and Acinetobacter-98018*). La producción de carbapenemasa se detectó por los métodos de Tritón Hodge Test (THT) modificado [26], Carba-NP [27], Blue-Carba test [28] y/o mCIM [29], según disponibilidad en los nosocomios. El fenotipo de carbapenemasa se estudió por pruebas de inhibición (sinergia) con monodiscos de ácido fenil-borónico y EDTA colocados estratégicamente junto a carbapenemes y método de discos combinados de meropenem con y sin inhibidores (ácido fenil-borónico, EDTA, cloxacilina y tazobactam) siguiendo

las instrucciones del fabricante (DCM-Brit, Britania). Según la disponibilidad, en algunos casos, se utilizó equipo de diagnóstico rápido inmunocromatográfico “Resist-3 O.O.K. K-Set” (Britania) para determinar el tipo de carbapenemasa.

### **Identificación de los determinantes genéticos de carbapenemasas**

La identificación molecular del tipo de carbapenemasa se llevó a cabo por reacciones en cadena de polimerasa (PCR) con oligonucleótidos (*primers*) específicos para detectar la presencia de *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOXA-48/163* y *blaIMP* (**Tabla 1**). La extracción de ADN se realizó por la técnica de “boiling”. Brevemente, a partir de cultivos frescos en agar Mueller-Hinton, se suspendieron 5 ó 6 colonias en 100 µl de agua 18 veces destilada estéril en tubos eppendorf. La suspensión se sometió a 95°C por 10 minutos en baño seco y se centrifugó a 15.000 x g durante 3 minutos. El sobrenadante (extractos crudos de ADN) se transfirió a un nuevo tubo eppendorf estéril y se preservó -20°C hasta su uso. Las mezclas de reacción (Master Mix) para las PCRs se obtuvieron con el agregado de *buffer* de reacción 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,2 mM c/u), *primers* Forward y Reverse (0,4 mM c/u), 0,04 UI/µl de Taq polimerasa (Pegasus) y agua milliQ estéril en cantidad suficiente. En cada tubo de reacción se adicionaron 23 µl de Master-Mix y 2 µl de extracto de ADN (volumen final, 25 µl). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador “BioRad C1000”. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x, teñidos con SybrSAFE (Invitrogen) y visualizados en un transiluminador “UVP Transiluminator”. Para las reacciones de PCR se utilizaron controles positivos, negativos y controles sin ADN. Para la identificación del tamaño molecular se utilizó un marcador de 100 pb (MA02 Ladder 100 pb, PBL).

### **Análisis estadístico**

Para la comparación estadística de los datos se utilizó el programa MedCalc 10.2.0.0. La prueba utilizada fue Chi cuadrado ( $X^2$ ). Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ . Excel del paquete Office Profesional Plus 2016 se utilizó para confeccionar la base de datos de las cepas, donde se colectaron todas las variables analizadas en el estudio, y para el armado de las figuras.

## **RESULTADOS**

Durante el periodo estudiado, se identificaron un total de 87 cepas de EPC, 72 cepas provenientes del HM de pacientes adultos y 15 cepas del HN de pacientes pediátricos. En ambos nosocomios, la mayor proporción de aislamientos se observó en

sexo biológico masculino, aunque solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación al origen de los aislamientos según sexo en los pacientes del HM ( $p < 0,05$ ) (**Tabla 2**).

En el HM las EPC se presentaron en mayor frecuencia en muestras de orina (32%), seguido de secreciones de vías respiratorias (26%), sangre (22%) y otros materiales (20%). En el HN sucedió algo similar, donde las muestras de orina presentaron el mayor porcentaje de aislamiento de EPC (60%) seguido por otros materiales (33%). Los aislamientos encontrados en muestras de sangre fueron menores que en el HM (7%) y no se recuperaron EPC en muestras respiratorias (**Tabla 2**). Por lo tanto, en ambos hospitales la mayor proporción de EPC se recuperó a partir de orina, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, cabe destacar que la proporción de EPC aisladas a partir de sangre fue mayor en pacientes adultos.

Ampliamente el principal microorganismo productor de carbapenemasa aislado en el HM fue *Klebsiella pneumoniae*, presentándose en más de un 70% de los casos. En menor medida se aisló *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae* complex, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella oxytoca*. En contraste, *Enterobacter cloacae* complex fue la EPC más frecuente en el HN, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii*, observándose menor diferencia porcentual entre especies (**Figura 1**). Comparando ambas instituciones, se encontró que la proporción de *K. pneumoniae* (76%) fue mayor en el HM, mientras que la proporción de *Enterobacter cloacae* complex (47%) fue mayor en el HN ( $p < 0,05$ ). Esto indica que existen diferencias marcadas respecto de las especies de EPC predominantes al comparar ambas instituciones.

La producción de carbapenemasa se confirmó en la totalidad de los aislamientos por métodos de Tritón Hodge Test (THT) modificado, Carba-NP, Blue-Carba test y/o mCIM. En lo que respecta al tipo de carbapenemasa, hubo notables diferencias entre los hospitales. Más del 90% de las EPC correspondió a serinocarbaenemasa tipo KPC en el HM, identificando solo 2 cepas productoras de NDM, recuperadas en una muestra de orina y una muestra de secreciones respiratorias. Además, por PCR se detectó una sola cepa con carbapenemasa tipo OXA-48/163, luego identificada como OXA-163 mediante inmunocromatografía (*Resist-3 O.O.K. K-set*), recuperada de una muestra de material periprotésico, siendo la primera cepa de este tipo aislada en el HM. En el HN el predominio de KPC no llegó a ser estadísticamente significativo debido a una importante prevalencia de la metalo-beta-lactamasa tipo NDM y no se hallaron EPC

tipo OXA. Cabe destacar que en ninguna institución se detectaron carbapenemasas tipo VIM e IMP en el periodo estudiado (**Figura 2**). Ante este contexto, puede deducirse que la amplia mayoría de casos de infecciones por EPC en el HM, se deben a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC, mientras que en el HN no se observa el mismo patrón.

Los porcentajes de resistencia a antibióticos no beta-lactámicos en estos aislados fueron en general muy elevados, dejando pocas opciones terapéuticas, siendo tigeciclina, fosfomicina y colistina los que presentaron mayor actividad en ambos hospitales. En el HM las EPC presentaron elevada resistencia a gentamicina (100%), trimetoprima-sulfametoxazol (90%) y ciprofloxacina (88%), teniendo diferencias estadísticamente significativas en comparación a las menores proporciones de resistencia observadas para tigeciclina (33%), colistina (18%), amikacina (18%) y fosfomicina (7%) ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar, que la resistencia a colistina en EPC se encontró exclusivamente en aquellos materiales distintos a sangre. Las dos EPC de tipo NDM presentaron sensibilidad solo a fosfomicina y tigeciclina, siendo resistentes a todos los antibióticos no carbapenémicos probados en el estudio. En cuanto a la EPC de tipo OXA-163, es importante remarcar que presentó CIMs a carbapenemes en el rango de sensibilidad (meropenem: CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ , imipenem: CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  y ertapenem: CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ ). Además, el aislamiento fue sensible a amikacina (CIM = 4  $\mu\text{g/mL}$ ), fosfomicina (CIM  $\leq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ), tigeciclina (CIM = 1  $\mu\text{g/mL}$ ) y colistina (CIM  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ ). En el HN la resistencia acompañante mostró los siguientes porcentajes: gentamicina (80%), trimetoprima-sulfametoxazol (80%) y ciprofloxacina (60%). Solo una cepa fue resistente a fosfomicina (8%), una cepa a tigeciclina (8%) y una cepa a colistina (7%), siendo estas tres EPC de tipo KPC. La totalidad de las EPC de tipo NDM presentes en el HN, fueron resistentes a amikacina y sensibles a fosfomicina, tigeciclina y colistina. Los datos de resistencia acompañante obtenidos del HN no pudieron ser analizados estadísticamente debido al bajo número de cepas. Comparando ambos hospitales, el HN tuvo un elevado porcentaje de resistencia a amikacina, mientras que, en el HM, la resistencia a este antibiótico fue menor y solo se presentó en *K. pneumoniae*. Otro dato a destacar, es que entre los antibióticos ensayados, colistina, fosfomicina y tigeciclina mostraron los mejores porcentajes de sensibilidad frente a estas bacterias en ambas instituciones (**Figura 3**). Finalmente, solo cinco EPC presentaron valores de CIM a meropenem  $< 16$   $\mu\text{g/mL}$  siendo de tipo KPC (n=4) y OXA-163 (n=1). Sin embargo, el tratamiento combinado

con dicho antibiótico no aparece como una opción recomendable en ninguna de las dos instituciones debido a que superaron el 90% las EPC con CIM a meropenem  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4).

## **DISCUSION**

En los últimos años se han incrementado los casos de infecciones por EPC acompañadas de resistencia a múltiples antibióticos. En este estudio se realizó la caracterización microbiológica de las EPC recuperadas en dos hospitales de la ciudad de Córdoba, un hospital pediátrico y un hospital de adultos, encontrándose claras diferencias al comparar ambas instituciones.

El predominio de EPC en el sexo biológico masculino, sugiere que la pertenencia a este sexo podría considerarse un factor de riesgo, sin embargo, no puede afirmarse tal conjetura en base a nuestros datos considerando que no se tuvieron en cuenta en el análisis otros factores predisponentes o co-morbilidades. En Colombia obtuvieron los mismos resultados, pero sin encontrar asociación entre el sexo y las EPC. [30].

La mayor parte de las EPC de pacientes pediátricos analizadas en este trabajo provinieron de muestras de orina, distinto a lo ocurrido con las EPC de pacientes adultos, donde los aislamientos urinarios no tuvieron un predominio muy marcado respecto de los de vías respiratorias o sangre, algo que también se evidencio en un estudio realizado en un hospital de adultos de la ciudad de Córdoba [31].

La distribución de especies de EPC aisladas, demuestra que en el HM existe un claro predominio de *K. pneumoniae*, siendo a su vez KPC el tipo de carbapenemasa ampliamente dominante. Datos similares se han reportado en otros trabajos publicados en nuestro país y en otros países de la región [30-33]. Es importante destacar que las EPC que presentaron NDM y OXA en el HM se aislaron al final del periodo estudiado, lo que indicaría la emergencia más reciente de estas cepas, como se mencionó en otros estudios [23]. En claro contraste, la EPC más frecuentemente detectada en el HN correspondió a *E. cloacae* complex, mientras que el tipo de carbapenemasa KPC, si bien, fue el más común, no presentó diferencias significativas respecto de NDM. Esto podría sugerir que en pediatría el predominio de KPC es menos marcado que en adultos en nuestra población, sin embargo es necesario realizar estudios con mayor número de aislamientos pediátricos para establecer si esta tendencia es estadísticamente significativa. En la actualidad, se ha reportado la emergencia de aislamientos de EPC

con más de un tipo de carbapenemasas en Sudamérica, incluyendo Argentina [30, 34, 35], sin embargo no es el caso de nuestro estudio.

La resistencia a antibióticos no beta-lactámicos en los aislamientos de EPC fue notablemente elevada en ambos nosocomios, lo que pone de manifiesto la complejidad que implica la escasez de opciones terapéuticas en estos casos. Los menores porcentajes de resistencia a tigeciclina, colistina y fosfomicina colocaron a estos antibióticos como una de las mejores opciones. Cabe remarcar, amikacina aparece como una buena opción a considerar ante la sospecha de EPC en el HM (sobre todo en aislamientos de bacteriemia), no así en el HN. Por otro lado, en el HM como en el HN, gentamicina, trimetoprima-sulfametoxazol y ciprofloxacina no constituyen alternativas terapéuticas recomendables para el tratamiento empírico de infecciones por EPC.[36, 37].

Reportes sobre el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas sugieren la utilización de terapias combinadas entre un carbapenem y un antibiótico de otra familia activo *in vitro* [38, 39], sin embargo en nuestro estudio se observó un alto porcentaje de EPC con CIM a meropenem  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , por lo que esta opción no sería de gran utilidad a nivel local. Esto implica que se debería recurrir a otras alternativas como colistina, aminoglucósidos, fosfomicina o tigeciclina.

La aparición de nuevos antibióticos, como es el caso de ceftacídima-avibactam, representa un avance promisorio, debido a su buena actividad frente a bacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC y OXA. En el presente estudio, no se ensayó la sensibilidad a ceftacídima-avibactam debido a la falta de disponibilidad del mismo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la necesidad de estudiar y caracterizar las EPC, ya que se observan marcadas diferencias no solo a nivel regional y local, sino también entre instituciones de una misma zona. La caracterización detallada de los aislamientos locales de EPC, proporciona herramientas útiles para diseñar estrategias de control de infecciones y para determinar las opciones terapéuticas más convenientes en el marco de nuestra propia realidad epidemiológica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece especialmente el apoyo económico brindado por la Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica en Bacteriología, lo que contribuyó a hacer posible la detección de carbapenemasas por PCR llevada a cabo en este trabajo.

Se agradece al Servicio de Microbiología del Hospital Misericordia Nuevo Siglo y del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad por permitir el acceso a las cepas de EPC.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017;8(4):460-9. Epub 2016/09/07. doi: 10.1080/21505594.2016.1222343. PubMed PMID: 27593176; PubMed Central PMCID: PMC5477705.
2. Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014;32:17-23. doi: 10.1016/s0213-005x(14)70170-3.
3. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 2017;215(suppl\_1):S28-S36. Epub 2017/04/05. doi: 10.1093/infdis/jiw282. PubMed PMID: 28375512; PubMed Central PMCID: PMC5853342.
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. PubMed PMID: 21793988.
5. Carrara E, Savoldi A, Piddock LJV, Franceschi F, Ellis S, Sharland M, et al. Clinical management of severe infections caused by carbapenem-resistant gram-negative bacteria: a worldwide cross-sectional survey addressing the use of antibiotic combinations. *Clin Microbiol Infect*. 2021. Epub 2021/05/12. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.002. PubMed PMID: 33975010.
6. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(1):7-16. doi: 10.1016/j.jgar.2013.01.005. PubMed PMID: 27873609.
7. Suay-Garcia B, Perez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3). Epub 2019/08/23. doi: 10.3390/antibiotics8030122. PubMed PMID: 31430964; PubMed Central PMCID: PMC6784177.
8. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09. PubMed PMID: 19995920; PubMed Central PMCID: PMC2825993.
9. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014;32:4-9. doi: 10.1016/s0213-005x(14)70168-5.
10. Lazovski J, Corso A, Pasteran F, Monsalvo M, Frenkel J, Cornistein W, et al. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. *Rev Panam Salud Publica*. 2017;41:e88. Epub 2017/06/19. doi: 10.26633/RPSP.2017.88. PubMed PMID: 31391822; PubMed Central PMCID: PMC6660862.
11. Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance--problems, progress, and prospects. *N Engl J Med*. 2014;371(19):1761-3. Epub 2014/10/02. doi: 10.1056/NEJMp1408040. PubMed PMID: 25271470.
12. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1520-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x. PubMed PMID: 21851480.
13. Pasteran F, Meo A, Gomez S, Derdoy L, Albronz E, Faccone D, et al. Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *J*

- Glob Antimicrob Resist. 2014;2(4):344-5. Epub 2014/12/01. doi: 10.1016/j.jgar.2014.07.003. PubMed PMID: 27873702.
14. Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, De Belder D, et al. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2013;19(5):E233-5. Epub 2013/02/14. doi: 10.1111/1469-0691.12142. PubMed PMID: 23402333.
  15. Group GaPH. UK 5 Year Antimicrobial Resistance (AMR) Strategy 2013-2018 - third annual progress report, 2016. 2016.
  16. National Strategy for Combating Antibiotic Resistant Bacteria. The White House. Washington, 2014.
  17. Garcia-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Expert Rev Anti Infect Ther. 2021;19(2):197-213. Epub 2020/08/20. doi: 10.1080/14787210.2020.1813023. PubMed PMID: 32813566.
  18. Branas P, Gil M, Villa J, Orellana MA, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infection/colonisation in a hospital in Madrid. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2018;36(2):100-3. Epub 2016/11/22. doi: 10.1016/j.eimc.2016.10.004. PubMed PMID: 27866753.
  19. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(4):1151-61. doi: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001. PubMed PMID: 11257029; PubMed Central PMCID: PMC90438.
  20. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(12):3881-9. doi: 10.1128/aac.47.12.3881-3889.2003. PubMed PMID: 14638498; PubMed Central PMCID: PMC90438.
  21. Jure MA, Castillo ME, Musa HE, Lopez CG, Caceres MA, Mochi SD, et al. Novel patterns in the molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tucuman, Argentina. J Glob Antimicrob Resist. 2019;19:183-7. Epub 2019/03/27. doi: 10.1016/j.jgar.2019.02.015. PubMed PMID: 30910742.
  22. De Belder D, Lucero C, Rapoport M, Rosato A, Faccone D, Petroni A, et al. Genetic Diversity of KPC-Producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* Isolates from Argentina. Microb Drug Resist. 2018;24(7):958-65. Epub 2017/12/14. doi: 10.1089/mdr.2017.0213. PubMed PMID: 29236574.
  23. Gomez S, Rapoport M, Togneri A, Viegas-Caetano J, Faccone D, Corso A, et al. Emergence of metallo-beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(1):94-7. Epub 2010/12/15. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.025. PubMed PMID: 21146720.
  24. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(6):2546-51. doi: 10.1128/AAC.00022-11. PubMed PMID: 21422200; PubMed Central PMCID: PMC3101449.
  25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. , 2020 2020. Report No.

26. Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, Bahr G, Vila AJ, Corso A. Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):640-9. Epub 2016/01/01. doi: 10.1128/JCM.01298-15. PubMed PMID: 26719442; PubMed Central PMCID: PMC4767956.
27. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol.* 2015;53(12):3908-11. Epub 2015/10/02. doi: 10.1128/JCM.02032-15. PubMed PMID: 26424841; PubMed Central PMCID: PMC4652111.
28. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015;53(6):1996-8. Epub 2015/03/27. doi: 10.1128/JCM.03026-14. PubMed PMID: 25809971; PubMed Central PMCID: PMC4432054.
29. Butler-Wu SM, Abbott AN. Is This the Carbapenemase Test We've Been Waiting for? A Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2309-12. doi: 10.1128/JCM.00538-17. PubMed PMID: 28615469; PubMed Central PMCID: PMC5527408.
30. Guerra-Sarmiento M, Ruíz-Martin F, Arzuza-Ortega LL, Maestre-Serrano R. Caracterización de bacilos gramnegativos multi-resistentes, aislados en pacientes hospitalizados en instituciones de salud de Barranquilla (Colombia). *Rev Chilena Infectol.* 2021;38:189-96.
31. Muñoz V, Vacaflor L, Olococo C, Aguirre A. Enterobacterias Productoras de Carbapenemasa en el Hospital San Roque de Córdoba (2010-2017). Presencia Bioquímica Medio de difusión de la Asociación Bioquímica de Córdoba. 2019;316:5-12.
32. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-Gonzalez A, Gutierrez-Fernandez J. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units in Ecuador: Results from a multicenter study. *J Infect Public Health.* 2020;13(1):80-8. Epub 2019/07/03. doi: 10.1016/j.jiph.2019.06.013. PubMed PMID: 31262670.
33. Lipari FG, Hernandez D, Vilaro M, Caeiro JP, Saka HA. Clinical, epidemiological and microbiological characterization of bacteremia produced by carbapenem-resistant enterobacteria in a university hospital in Córdoba, Argentina. *Rev Chilena Infectol.* 2020;37(4):362-70. Epub 2021/01/06. doi: 10.4067/S0716-10182020000400362. PubMed PMID: 33399656.
34. Gomez-Gamboa L, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Sanchez-Perez A, Reyna-Flores F, Perozo-Mena A, et al. Molecular and genetic characterization of carbapenemase-producing bacteria in Venezuela. *J Chemother.* 2019;31(6):349-53. Epub 2019/05/03. doi: 10.1080/1120009X.2019.1607452. PubMed PMID: 31046636.
35. Alerta Epidemiológica. Emergencia de Enterobacteriales Doble Productores de Carbapenemasas. Laboratorio Nacional de Referencia. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Servicio de Antimicrobianos. , 2021 Contract No.: 4.
36. Alvim ALS, Couto B, Gazzinelli A. Epidemiological profile of healthcare-associated infections caused by Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Rev Esc Enferm USP.* 2019;53:e03474. Epub 2019/07/11. doi: 10.1590/S1980-220X2018001903474. PubMed PMID: 31291394.
37. Aires-de-Sousa M, Ortiz de la Rosa JM, Goncalves ML, Pereira AL, Nordmann P, Poirel L. Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Hospital, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9):1632-8. Epub 2019/08/24. doi:

- 10.3201/eid2509.190656. PubMed PMID: 31441424; PubMed Central PMCID: PMC6711212.
38. Aguilera-Alonso D, Escosa-Garcia L, Goycochea-Valdivia WA, Soler-Palacin P, Saavedra-Lozano J, Rodrigo C, et al. [Position statement of the Spanish Association of Paediatrics-Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (AEP-SEIP) on the treatment of multidrug-resistant bacterial infections]. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2019;91(5):351 e1- e13. Epub 2019/10/23. doi: 10.1016/j.anpedi.2019.08.002. PubMed PMID: 31635925.
  39. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-San Francisco C, Gudiol C, et al. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(5):337 e1- e21. Epub 2015/01/21. doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.009. PubMed PMID: 25600218.

**Tabla 1. Oligonucleótidos (*primers*) utilizados en las reacciones de PCR para la identificación molecular del tipo de carbapenemasa.**

CARBAPENEMASA	PRIMER	SECUENCIA	AMPLICON (pb)
KPC	FkpcHAS	5'-CAA GGA ATA TCG TTG ATG TCA CTG	932
	RkpcHAS	5'-GCC AAT AGA TGA TTT TCA GAG CC	
NDM	NDM-F	5'-AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC	512
	NDM-R	5'-GGC GTA GTG CTC AGT GTC	
VIM	VIM-F	5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	261
	VIM-R	5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC	
IMP <sup>1</sup>	IMP-UF1	5'-GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA	404
	IMP-UR1	5'-GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT	
OXA	OXA48-F <sup>2</sup>	5'-ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG G	775 <sup>3</sup>
	OXA48-R <sup>2</sup>	5'- TGA GCA CTT CTT TTG TGA TG	763 <sup>4</sup>

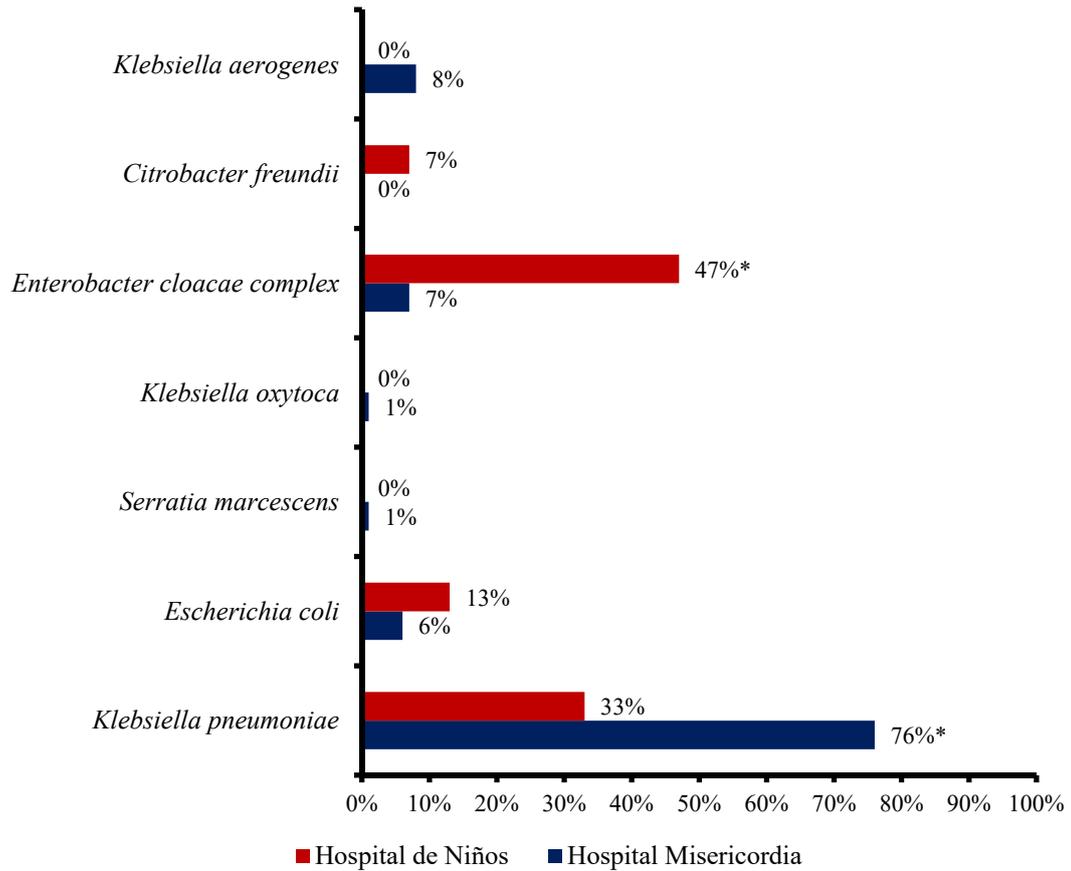
<sup>1</sup>IUPAC código de nucleótidos: R= A o G, Y= C o T, S= G o C, W= A o T, K= G o T, M= A o C, B= C o G o T, D= A o G o T, H= A o G o T, V= A o C o G, N= Cualquier base. <sup>2</sup>Detectan tanto OXA-48 y OXA-163.

<sup>3</sup>Tamaño amplicón OXA-48. <sup>4</sup>Tamaño amplicón OXA-163. pb: pares de bases.

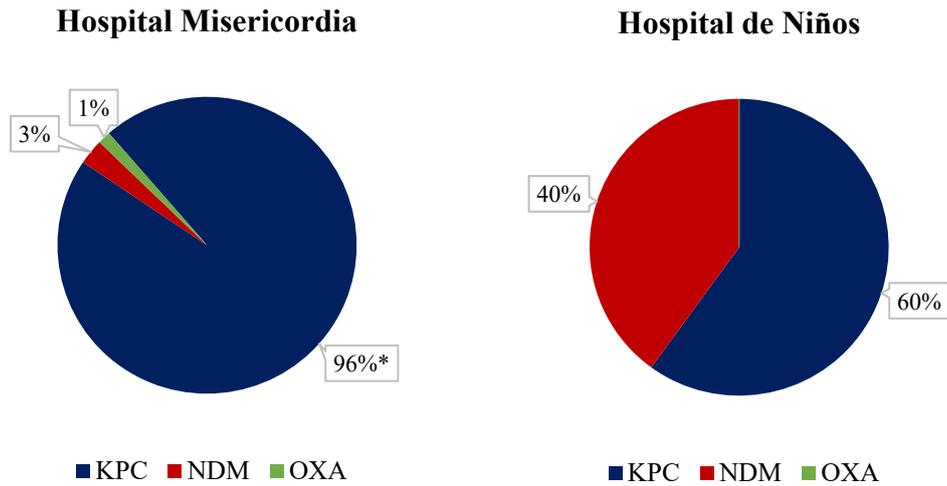
**Tabla 2. Sexo biológico de los pacientes y materiales clínicos a partir de los cuales se aislaron las EPC.**

<b>Sexo<sup>1</sup></b>	<b>Hospital Misericordia</b>	<b>Hospital de Niños</b>
	n=72	n=11
Masculino	74% <sup>2</sup>	73% <sup>3</sup>
Femenino	26%	27%
<b>Materiales</b>		
Orina	32%	60%
Secreciones Respiratorias	26%	0%
Sangre	22%	7%
Otras <sup>4</sup>	20%	33%

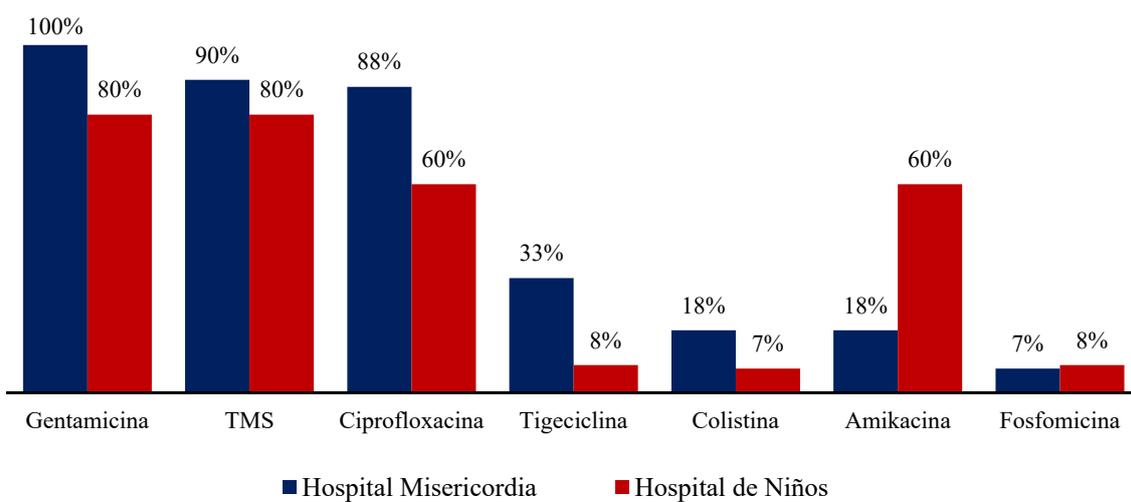
<sup>1</sup>No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los hospitales en la proporción de EPC por sexo. <sup>2</sup>Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de sexo masculino en del Hospital Misericordia ( $p=0,0001$ ); prueba de  $X^2$ . <sup>3</sup>No hubo diferencias estadísticamente significativas en la procedencia de los aislamientos según el sexo en el Hospital de Niños ( $p=0,1321$ ); prueba de  $X^2$ . <sup>4</sup>Otras: catéteres, retrocultivos, materiales varios, líquido cefalorraquídeo y portaciones anales.



**Figura 1. Distribución de especies de EPC en ambos hospitales.** Se observa un predominio de *K. pneumoniae* en el Hospital Misericordia y de *E. cloacae complex* en el Hospital de Niños. \*  $p < 0,05$ , prueba de  $X^2$ .

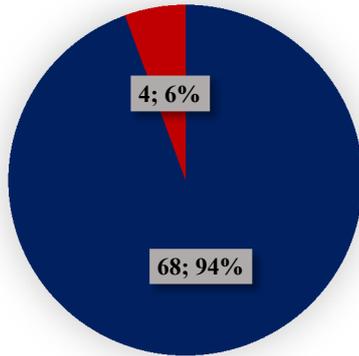


**Figura 2. Distribución de tipos de carbapenemasas en ambos hospitales.** \*Diferencia estadísticamente significativa entre KPC y NDM u OXA en el Hospital Misericordia ( $p < 0,05$ ). En el Hospital de Niños no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre KPC y NDM, y no se detectó ningún aislamiento productor de OXA. No se detectaron VIM o IMP en el Hospital Misericordia ni en el Hospital de Niños.

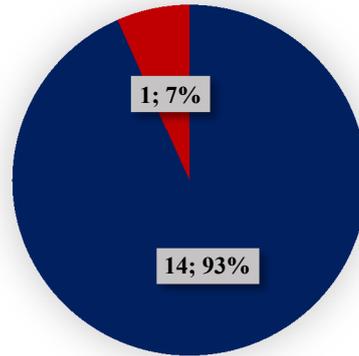


**Figura 3. Perfiles de resistencia acompañante.** Porcentajes de resistencia de las EPC aisladas frente a antibióticos no beta-lactámicos frecuentemente utilizados para este tipo de microorganismos. TMS: Trimetroprima-sulfametoxazol.

### Hospital Misericordia



### Hospital de Niños



■ Meropenem CIM  $\geq 16$  ■ Meropenem CIM  $< 16$

■ Meropenem CIM  $\geq 16$  ■ Meropenem CIM  $< 16$

**Figura 4. Distribución de EPC en función de valores de CIM a meropenem.** Porcentaje de aislamientos de EPC considerados aptos y no aptos para tratamiento combinado con meropenem en base a los valores de CIM (apto:  $< 16 \mu\text{g/ml}$ , no apto:  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ).