

Artículo original

Primer aislamiento de *Escherichia coli* productora de carbapenemasa tipo New Delhi (NDM) en un hospital de Ciudad Guayana, Venezuela. A propósito de dos casos

Lilibeth De Sousa De Abreu^{a,b,*}, Mayling Ruth Josefina Chacare Herrera^{a,b},
Nirvia Margot Cuaical Ramos^c, José Micael Ashby^a

^aLaboratorio de Microbiología. Hospital Docente Asistencial Dr. Raúl Leoni Otero. Instituto Venezolano de los Seguros Sociales. Ciudad Guayana, Venezuela. ^bLaboratorio de Diagnóstico Especializado Quimbiocell. Ciudad Guayana, Venezuela. ^cLaboratorio de Aislamiento e Identificación Bacteriana. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Recibido 25 de mayo de 2016; aceptado 10 de noviembre de 2016

Resumen: El surgimiento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos como consecuencia de la adquisición de genes que codifican carbapenemasas es un problema mundial alarmante, ya que se asocia a altas tasas de mortalidad, elevados niveles de resistencia a otros antimicrobianos y alto potencial de diseminación. Informes recientes han demostrado un aumento de la prevalencia de carbapenemasas en distintos géneros de enterobacterias y más recientemente de una nueva metaloenzima denominada New-Delhi metalobetalactamasa (NDM). Se presentan los dos primeros casos de *Escherichia coli* productoras de metaloenzimas tipo NDM en el Hospital Dr. Raúl Leoni Otero de Ciudad Guayana en Venezuela, en pacientes hospitalizados en los servicios de traumatología y cirugía. Las cepas fueron aisladas de secreciones en los sitios de lesión y fueron resistentes a todos los antibióticos excepto tigeciclina. Por ensayos fenotípicos se evidenció la producción de metaloenzima, la cual fue caracterizada por PCR como carbapenemasa tipo NDM. En uno de los aislados se detectó la coexistencia de la betalactamasa CTX-M-1. Es necesario reforzar estrategias para prevenir y controlar la aparición y propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos en los hospitales.

Palabras clave: *Escherichia coli*, carbapenemasas, NDM, Venezuela.

First isolation of New Delhi carbapenemase (NDM) *Escherichia coli* in a hospital in Ciudad Guayana, Venezuela. About two cases

Abstract: The emergence of carbapenem-resistant Enterobacteria, as a result of the acquisition of genes encoding carbapenemase is an alarming global problem, associated with high mortality rates, big levels of resistance to other antimicrobial and enormous spreading potential. Recent reports have shown an increased prevalence of carbapenemas in different enterobacterial genus and more recently a new type named New Delhi metalloenzyme (NDM) was characterized. The first two isolates of *Escherichia coli* producing NDM type metalloenzymes were recovered by culture of wound secretions from patients hospitalized in the Trauma and Surgical wards at Dr. Raul Leoni Hospital in Ciudad Guayana, Venezuela. The two strains were resistant to all antibiotics exception made to tigecycline. Phenotypic assays showed metalloenzyme production, which was characterized by PCR as NDM-type carbapenemase. In one of the isolates, coexistence of NDM-type carbapenemase with CTX-M-1 beta-lactamase was detected. It is necessary to strengthen strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial resistant microorganisms in hospitals.

Keywords: *Escherichia coli*, carbapenemas, NDM, Venezuela.

* Correspondencia:

E-mail: lilibethdesousa@hotmail.com

Introducción

La aparición de enterobacterias productoras de carbapenemasas ha sido considerada uno de los mayores desafíos que enfrentan los hospitales en las últimas décadas, ya que los carbapenémicos han sido la principal

opción terapéutica frente a infecciones graves por microorganismos gramnegativos multiresistentes. Informes recientes han demostrado un aumento de la prevalencia de carbapenemasas en distintos géneros de enterobacterias [1-3]. Según la clasificación de Ambler, las carbapenemasas pueden agruparse en cuatro clases, siendo las de mayor

importancia las de clase A (KPC, SME, GES IMI, NMC), D (carbapenemasas tipo OXA) y B (IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, DIM, NDM). Estas últimas se conocen como metaloenzimas, pueden transferirse a través de plásmidos e hidrolizan la mayoría de los antibióticos betalactámicos a excepción del aztreonam [4]. La diferenciación de estas metalobetalactamasas se realiza por métodos moleculares que detectan genes específicos [5].

En los últimos años se ha descrito el aumento de la prevalencia de carbapenemasas en distintos géneros de enterobacterias y más recientemente de una nueva metaloenzima denominada New-Delhi metalobetalactamasa (NDM) [1]. Hasta la fecha en el continente americano se ha reportado en 12 países, entre los cuales se encuentran Estados Unidos y Canadá en 2010, destacándose en pacientes que tenían antecedentes de haber recibido atención médica reciente en países fuera de la región [6].

Posteriormente se reportó en Guatemala, Colombia, Paraguay, Uruguay, Argentina, Brasil, México, Honduras, Nicaragua y Costa Rica. Las especies donde se han descrito incluyen principalmente enterobacterias que se aíslan frecuentemente en el laboratorio de bacteriología como *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*, así como también en bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa como *Acinetobacter pittii* y *A. baumannii* [7,8]. En Venezuela, según la literatura científica consultada, no se han descrito este tipo de aislados en enterobacterias provenientes de muestras clínicas, razón por la cual este sería el primer hallazgo que se describe en el país, en el Hospital Dr. Raúl Leoni Otero (HRL) del estado Bolívar.

Materiales y métodos

Se presentan 2 pacientes en los que se aisló *E. coli* productora de NDM.

Caso 1: Paciente masculino de 35 años de edad que ingresó al HRL en agosto de 2014, politraumatizado, con fractura supra e intercondilea abierta de fémur derecho III B, afebril en condiciones clínicas estables, permaneció hospitalizado y recibió distintos esquemas antibióticos a lo largo de su internación, iniciándose con ciprofloxacina 400 mg c/12 h y clindamicina 600 mg c/6h; posteriormente se administró ceftriaxona 1 gr c/8 h, vancomicina 500 mg c/8h y clindamicina 600 mg c/6h, rotando posteriormente a meropenem 500 mg c/8h y amikacina 500mg c/12h. El paciente egresó a los 30 días por presentar evolución satisfactoria, con indicación de cura y cita mensual.

Después de ocho meses acudió a la consulta externa del HRL presentando secreción a nivel de la herida quirúrgica, se tomó muestra para cultivo y se remitió al laboratorio de microbiología del HRL, aislándose *E. coli* multiresistente (EC1), sensible solo a tigeciclina. Debido al patrón de resistencia inusual, el aislado fue enviado al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR). Al paciente se le indicó terapia empírica oral con macrólido

de manera ambulatoria, a la espera de resultado de cultivo. En mayo de 2015 el paciente se mantuvo de manera ambulatoria y se realizó un nuevo cultivo de secreción de herida operatoria en laboratorio externo en el cual persistió *E. coli* multiresistente.

El paciente fue hospitalizado nuevamente por presentar rechazo a material de osteosíntesis y osteomielitis crónica, iniciándose tratamiento empírico con linezolid 600 mg/d. En dos cultivos posteriores, previa limpieza de la herida, se obtuvieron resultados similares, en consecuencia se rotó el tratamiento a tigeciclina 100 mg dosis inicial luego 50 mg c/12 h y levofloxacina 750 mg c/24 h por 8 semanas. El paciente fue dado de alta a las 5 semanas de tratamiento, por presentar mejoría clínica, con indicación de evaluación mensual.

Caso 2: Paciente masculino de 32 años de edad, que ingresó al HRL en julio de 2014 con antecedente de paraplejía de miembros inferiores desde hace 6 años, laminectomía y colocación de prótesis de estabilización en 2008, necrectomía y colocación de colgajo de avance en región sacra en 2012. El paciente refirió inicio de enfermedad actual hace 1 año por presentar dolor y aumento de volumen con salida de secreción purulenta en región sacra y glúteo derecho.

Se realizó cultivo de secreción purulenta en región sacra, donde se aisló *E. coli* productora de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) (por detección fenotípica) y sensible a aminoglucósidos y carbapenémicos, por lo que se indicó amikacina 500 mg e imipenem 1 gr, c/8 h, presentando evolución satisfactoria y disminución de exudado. En agosto de 2014 se rotó a ertapenem 1 gr c/24 h.

Después de dos meses de estancia hospitalaria y bajo tratamiento antibiótico, el paciente comenzó a presentar fiebre y leucocitosis con hemocultivo negativo. Permaneció hospitalizado durante 2 meses más y recibiendo varios esquemas de antibióticos durante su internación que incluyeron gentamicina 80 mg c/8h, levofloxacina 750 mg c/8h, piperacilina-tazobactam 450 mg c/8h y por último tigeciclina 100 mg c/12h basado en resultado de cultivo que reportó Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* multiresistente. Por presentar mejoría clínica, se indicó alta médica con tratamiento ambulatorio y revisión periódica en consulta externa.

En marzo de 2015 ingresó nuevamente al HRL por presentar infección de piel y partes blandas, escara sacra grado IV y escara en glúteo grado II. En el cultivo de secreción de escara sacra se aisló *E. coli* productora de BLEE y *Enterococcus faecalis* por lo que se administró vancomicina 1 gr c/12h, amikacina 1 gr c/8h e imipenem 500 mg c/6h. Un mes después se realizó nuevamente cultivo de secreción y de tejido de región sacra, en el primero se aisló *E. coli* multiresistente, (EC2) (cepa enviada al INHRR), y el segundo se reportó sin crecimiento bacteriano. Se decidió dar de alta al paciente por presentar condiciones clínicas estables.

Diagnóstico microbiológico:

Cultivo y aislamientos: Las muestras de secreciones fueron sembradas en medios de agar sangre, MacConkey y caldo tioglicolato y se les realizó coloración de Gram, según protocolo estandarizado para el HRL. Estos protocolos fueron diseñados tomando en cuenta las recomendaciones descritas en los manuales de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [9] y de la Universidad de los Andes para el procesamiento de muestras [10].

Identificación de los aislados: Los microorganismos aislados fueron identificados con equipo automatizado MicroScan® (Beckman Coulter Inc., USA) empleando paneles para bacilos gramnegativos. Para el control de calidad de los paneles se emplearon las cepas de *E. coli* ATCC® 29212 y *E. coli* ATCC® 35218 según especificaciones de la casa comercial.

Determinación de la susceptibilidad: Para la determinación de la susceptibilidad se utilizó el sistema automatizado MicroScan® (Beckman Coulter Inc., USA), el cual reporta Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Los antimicrobianos evaluados en el panel fueron: amikacina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftazidima/ácido clavulánico, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacilina-tazobactam, trimetoprima/sulfametoxazol y tigeciclina. Los resultados fueron interpretados según el documento M100-S25 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [11] y la *Food and Drug Administration* (FDA) [12].

Detección fenotípica de betalactamasas de espectro expandido (BLEE): Se realizó por el método de doble disco como indica la tabla 3A del documento M100-S25 del CLSI [11]. Se empleó los discos de ceftazidima (CAZ 30 µg) y ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/AMC 30/10 µg) de la marca Bioanalyse®. Para control de calidad de los inhibidores se empleó una cepa de *E. coli* (CTX-M-2), caracterizada molecularmente en el INHRR.

Detección fenotípica de carbapenemasas: La investigación de serinocarbapenemasas se realizó empleando el inhibidor ácido 3-aminofenil-borónico de 300 µg/mL (APB) mientras que para la búsqueda de metaloenzimas se empleó etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio 1.000 mM (EDTA) como se ha descrito previamente [13-15]. Para controlar los factores inherentes a la técnica se realizó control de calidad a los discos de antimicrobianos con las cepas ATCC® 25922 de *E. coli* y ATCC® 27853 de *P. aeruginosa*. Para controlar la actividad de los diferentes inhibidores se empleó un aislado de *K. pneumoniae* (KPC), obtenido en el laboratorio. Todos los controles fueron facilitados por el Departamento de Bacteriología del INHRR.

Detección molecular de betalactamasas: Se realizó mediante PCR punto final empleando cebadores para la detección de *bla*_{NDM}. El ADN bacteriano se obtuvo mediante ebullición por 10 min de una suspensión de dos colonias de

la cepa en estudio en 100 µL de agua calidad molecular y centrifugada posteriormente por 2 minutos a 10.000 r.p.m. Para la detección del gen CTX-M-1 las secuencias empleadas fueron CTX-M-1F 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' y CTX-M-1R 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' (550 pb) [16]. Las secuencias utilizadas para la detección del gen que codifican la metaloenzima NDM fueron NDM-F 5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3' y NDM-R 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3' (621 pb) [17]. Las reacciones de amplificación se realizaron con: 16,35 µL de agua calidad molecular; 2,5 µL de buffer taq 10X; 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 1 µL de dNTPs 2,5 mM; 0,5 µL de iniciador F 10 pmol/µL; 0,5 µL de iniciador R 10 pmol/µL; 0,15 µL de Taq polimerasa 5 U/µL y 3 µL de templado. Todos los reactivos empleados fueron de la marca Sigma®, a excepción de los dNTPs (Invitrogen®).

El programa de corrida en el termociclador (Bio-Rad®) fue 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 55 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5 % y teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/mL. La corrida electroforética se realizó a 90 voltios en buffer TBE 0,5X durante 1 h. El registro fotográfico se realizó en un equipo Gel Doc® 2000 (Bio-Rad®). El marcador de peso molecular empleado fue DNA Ladder 100 pb (Promega®). Se empleó *K. pneumoniae* INH 79534 N como control positivo. Todos los controles pertenecen al banco de cepas del Departamento de Bacteriología del INHRR.

Resultados

En ambos casos se obtuvieron colonias con morfología

Tabla 1. Patrón de susceptibilidad de los aislados clínicos de *Escherichia coli* EC1 y EC2 por concentración mínima inhibitoria. Hospital Dr. Raúl Leoni Otero, estado Bolívar.

Antibiótico	CIM (µg/mL)	
	EC1	EC2
Amikacina	>32	>32
Ampicilina/Sulbactam	>16/8	>16/8
Ampicilina	>16	>16
Aztreonam	>16	>16
Cefazolina	>16	>16
Cefepime	>16	>16
Cefotaxima	>32	>32
Ceftazidima	>16	>16
Ceftriaxona	>32	>32
Cefuroxima	>16	>16
Ciprofloxacina	>2	>2
Ertapenem	>4	>4
Gentamicina	>8	>8
Imipenem	>8	>8
Levofloxacina	>4	>4
Meropenem	>8	>8
Piperacilina/Tazobactam	>64	>64
Trimetoprima/Sulfametoxazol	>2/38	>2/38
Tigeciclina	≤2	≤2

de bacilos gramnegativos, fermentadoras de la lactosa en medio selectivo. Los aislados fueron identificados como *E. coli* y designados EC1 y EC2. En la tabla 1, se muestran los resultados obtenidos para cada una de las cepas en la determinación de CIM. Los dos aislados presentaron resistencia a los antibióticos evaluados, incluyendo betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas. Se observó únicamente sensibilidad a tigeciclina. En ambos se detectó la producción de metaloenzimas y solo en uno la producción de BLEE (EC1), en la cual se detectó el gen que codifica para CTX-M-1.

En el ensayo microbiológico, se obtuvo resultado positivo en la inhibición con EDTA y no se observó sinergia en el ensayo para la detección de serinocarbenemasas (Figura 1). En cuanto a la caracterización molecular, se detectó el gen que codifica para la carbapenemasa tipo NDM en los dos aislados como se muestra en la figura 2, mientras que el gen CTX-M-1 se detectó en EC1.

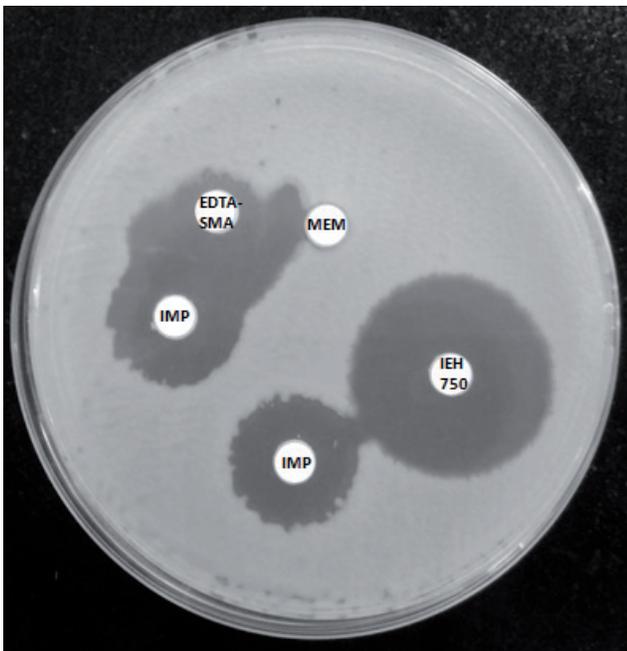


Figura 1. Detección fenotípica de metalobetalactamasa del aislado clínico de *Escherichia coli* EC1: prueba de sinergia carbapenémico-EDTA y test de metalobetalactamasa: imipenem-EDTA/imipemem. EDTA-SMA: ácido etilendiaminotetraacético-mercaptoacético de sodio (750/2000 µg). MEM: meropenem (10 µg). IMP: imipenem (10 µg). IEH 750: imipenem-EDTA (10/750 µg)

Discusión

El uso incorrecto de los antibióticos puede englobar diferentes causas como la prescripción innecesaria, retraso en su administración en pacientes en estado crítico, utilización de antibióticos de amplio espectro con demasiada generosidad, o uso incorrecto de antibióticos de espectro reducido, empleo de dosis de antibiótico inferior o superior a la adecuada, duración del tratamiento antibiótico demasiado corta o demasiado prolongada y el tratamiento antibiótico no ajustado según los datos del cultivo microbiológico [18].

Por otra parte algunos autores han mencionado que la

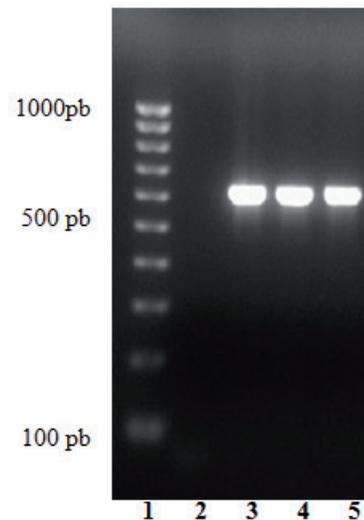


Figura 2. Detección de *bla*_{NDM} por PCR en los aislados de *E. coli* EC1 y EC2. Carriles: 1) Marcador de Peso Molecular (100pb); 2) Control negativo; 3) INH 79534 NDM; 4) EC1; 5) EC2.

resistencia a los antibióticos surge a través de mecanismos tales como la selección de mutantes resistentes de origen natural y la transferencia horizontal de genes. Recientemente se ha mencionado que los niveles subletales de antibióticos bactericidas inducen mutagénesis, lo que resulta en aumentos heterogéneos en la concentración inhibitoria mínima para un rango de antibióticos, independientemente de la diana del fármaco, lo que tiene importantes implicaciones para el uso generalizado y mala utilización de los antibióticos [19].

El problema es de mayor gravedad considerando que múltiples estudios evidencian, que siendo estos mecanismos de resistencia codificados en plásmidos conjugativos, le confieren a las bacterias un gran potencial de diseminación a otros patógenos nosocomiales, lo que hace difícil su control [20]; es por esta razón que las enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo NDM se han convertido en un reto importante en los servicios de atención de salud ya que están asociadas con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente entre pacientes con hospitalización prolongada, enfermedad grave y exposición a procedimientos invasivos.

En *E. coli* esta enzima ya ha sido documentada en otros países de Suramérica como Nicaragua, Costa Rica, Perú y Antillas Francesas [5,6,21,22], pero en Venezuela este estudio constituye el primer reporte de carbapenemasa tipo NDM en especies de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas de muestras clínicas.

Se infiere que posiblemente en los casos estudiados se conjugaron varios de los factores mencionados anteriormente. Ambos pacientes estuvieron sometidos a larga estancia hospitalaria (más de 2 meses), procedimientos quirúrgicos, tratamiento antibiótico prolongado (conjuntamente con subdosificación) y con diferentes tipos de antimicrobianos incluyendo carbapenémicos, lo que hace imperiosa la revisión de los procedimientos para el uso de antibióticos a nivel hospitalario y la necesidad de consenso para disminuir el riesgo de diseminación de mutantes resistentes [19]. Entre

las estrategias de abordaje múltiple se incluyen la formación continua, directrices y políticas de uso de antibióticos en el medio hospitalario basadas en pruebas científicas, medidas restrictivas y consultas con especialistas en enfermedades infecciosas, microbiólogos y farmacéuticos.

Conclusiones

Se demostró la circulación de cepas de enterobacterias productoras de metalobetalactamasas tipo NDM. Este hallazgo, no reportado antes en nuestra región, es un mecanismo emergente y de alta capacidad de diseminación, que hace necesario que los centros de atención de salud establezcan y refuercen medidas de prevención y control, donde se implementen métodos microbiológicos que monitoricen los mecanismos de resistencia que generen mejores prácticas de prescripción de antibióticos y controlen la diseminación de mutantes resistentes en el ambiente hospitalario.

Se sugiere determinar la relación clonal entre los aislamientos de ambos pacientes, lo cual permitirá ampliar el alcance de estos hallazgos, de tal manera que sirvan de referencia para el control y vigilancia epidemiológica.

Agradecimientos

Para la realización de este trabajo contamos con la asesoría médica del infectólogo Gerardo Ibarra por lo que agradecemos su colaboración. Igualmente al Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel por su apoyo como centro de referencia para confirmación de cepas derivadas por métodos fenotípicos y moleculares. Por último y por eso no menos importante, al Hospital Dr. Raúl Leoni por brindarnos los insumos e infraestructura para realizar la presente investigación.

Referencias

1. Pesesky M, Tahir H, Wallace M, Wang B, Andleeb S, Burnham CAD *et al.* KPC and NDM-1 genes in related *Enterobacteriaceae* strains and plasmids from Pakistan and the United States. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21:1034-7.
2. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC and OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. *Pak J Pharm Sci.* 2015; 28:1127-33.
3. Cifuentes M, García P, San Martín P, Silva F, Zúniga J, Reyes S y col. Primer caso de detección de *bla*_{KPC} en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Rev Chil Infectol.* 2012; 29:224-8.
4. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014; 44:51-6.
5. He S, Hang JP, Zhang L, Yu BQ, Yuan F. Diagnostic value of a multiplex real-time PCR assay for rapid detection and typing of gene-encoding metallo-β

- lactamase. *Int Med J.* 2016; 23:14-7.
6. Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D *et al.* New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using google maps. *Euro Surveill.* 2014; 19:pii:20809.
7. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 249856. doi: 10.1155/2014/249856.
8. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Actualización epidemiológica: Carbapenemasas tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM). [Online]; 2014. Disponible en: antimicrobianos.com.ar/ATB/wp./2014/03/Carbapenemasas-tipo-New-Delhi1.pdf. Acceso: 19 de febrero 2016.
9. Burillo A, Moreno A, Salas C. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de la infecciones de piel y tejidos blandos. [Online]; 2006. Disponible en : <https://www.seimc.org./procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologico>. Acceso marzo 2015.
10. Velasco J, Araque MdC, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramírez AC y col. Manual práctico de bacteriología clínica. Primera edición. Mérida: Colección Textos Universitarios ULA Vicerrectorado Académico; 2008.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement. M100-S26. Wayne PA, USA; 2016.
12. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos. Boletín informativo N 1. [Online].; 2011. Disponible en: antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/.01/Boletín-1-PCC-Lat-junio20111.pdf. Acceso enero 2015.
13. Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET-Argentina. Flujograma para detección de carbapenemasas en enterobacterias. Protocolo de trabajo de la red Whonet-Argentina. [Online].; 2011. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2014/10/protocolo-de-trabajo-red-whonet-argentina/>. Acceso marzo 2015.
14. Asociación Argentina de Microbiología. Caracterización de la resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. [Online]. Disponible en : http://www.aam.org.ar/vermas-otras_publicaciones.php?n=76. Acceso septiembre 2008.
15. Lee K, Lim Y, Yong D, Yum J, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4623-9.
16. González-Mejía EB, Valenzuela EM, Mantilla-Anaya JR, Leal-Castro AL, Saavedra-Trujillo CH, Eslava-Schmalbach J y col. Resistencia a cefepime en aislamientos de *Enterobacter cloacae* provenientes de

- hospitales de Bogotá, Colombia. Rev Salud Publica. 2006; 8:191-9.
17. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman M, Walsh T. How to detect NDM-1 producers. Clin Microbiol. 2011; 49:718-21.
 18. Gyssens IC, Van den Broek PJ, Kullberg BJ, Hekster Y, Van der Meer JW. Optimizing antimicrobial therapy. A method for antimicrobial drug use evaluation. J Antimicrob Chemother. 1992; 30:724-7.
 19. Kohanski MA, DePristo MA, Co JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. Mol Cell. 2010; 37:311-20.
 20. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol. 2008;153(Suppl 1): S347-57.
 21. Bastian S, N, Creton E, Malpote E. First case of NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Caribbean islands. Int J Infect Dis. 2015; 34:33-54.
 22. Cuzon G, Bonnin R, Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. PLoS ONE. 2013; 8:e61322.doi.org/10.1371/journal.pone.0061322.