

Detección de los genes de carbapenemasas *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

Detection of carbapenemases genes *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* in *Klebsiella pneumoniae* isolates from the San Juan de Dios General Hospital at Guatemala City, Guatemala.

Tamara Velásquez Porta¹, Dalia Lau Bonilla²

¹Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

²Asociación de Salud Integral
tamyporta@gmail.com

Recibido: 30 de mayo 2016 • Aceptado: 23 de enero 2017

Resumen

La resistencia a los antibióticos constituye uno de los problemas más relevantes de salud pública en todo el mundo. Las enterobacterias productoras de carbapenemasas representan la mayor amenaza. Las carbapenemasas son potentes enzimas que inactivan los antibióticos carbapenémicos y en general, a todos los antibióticos betalactámicos. Las consecuencias para el tratamiento de las infecciones causadas por estas bacterias son relevantes, ya que los carbapenemes son de las últimas opciones disponibles para bacterias multirresistentes. Esta investigación tuvo como objetivos determinar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, la presencia de los genes de carbapenemasas *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) y *bla_{NDM}* (New Delhi Metalobetalactamasa) en aislamientos de *K. pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, caracterizar el tipo de muestra y definir el servicio del hospital donde se aislaron este tipo de bacterias. Se analizaron 54 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes (imipenem y/o meropenem), 49 (91%) fueron portadoras del gen *bla_{NDM}*. Estas bacterias se aislaron con más frecuencia en muestras de sangre (37%) y orina (14%). En esta investigación, el 53% de aislamientos se obtuvieron de pacientes de servicios de intensivos. Los resultados de este estudio indican que *K. pneumoniae* portadora del gen *bla_{NDM}* se ha diseminado dentro del Hospital General San Juan de Dios, desde el primer caso reportado hace cinco años, poniendo en riesgo de muerte a los pacientes, especialmente a los hospitalizados en los servicios de intensivos.

Palabras clave: imipenem, gen *bla_{NDM}*, gen *bla_{KPC}*, enterobacteria, sangre.

Abstract

Resistance to antibiotics is one of the most important public health problems worldwide. Enterobacteriaceae producing carbapenemases pose the greatest threat. The carbapenemases are powerful enzymes that inactivate carbapenem antibiotics and generally all beta-lactam antibiotics. The consequences for the treatment of infections caused by these bacteria are important because carbapenems are the latest options available for multidrug-resistant bacteria.

This research aimed to determine through endpoint polymerase chain reaction (PCR), the presence of the carbapenemases encoding genes *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) and *bla_{NDM}* (New Delhi metallo-β-lactamase) in *K. pneumoniae* isolates from San Juan de Dios General Hospital located in Guatemala City; and to characterize the sample type and define the service of the hospital where such bacteria were isolated. 54 *K. pneumoniae* isolates resistant to carbapenems (imipenem and / or meropenem), were analyzed. From these, 49 (91 %) were detected as *bla_{NDM}* gene carriers. These bacteria were isolated more frequently in blood samples (37%) and urine (14%). In this research, 53% of isolates were obtained from patients hospitalized in intensive care units. This study demonstrates that *K. pneumoniae* carrying the *bla_{NDM}* gene has spread within San Juan de Dios General Hospital, since the first reported case five years ago, risking the life of patients, especially of those hospitalized in intensive care services.

Keywords: imipenem, gen *bla_{NDM}*, gen *bla_{KPC}*, enterobacter, blood.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud declaró, en abril del 2014, que la resistencia a los antimicrobianos es una crisis a nivel mundial. Un problema importante y muy preocupante es la aparición y diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Horcajada, Torre-Cisneros, Peña, & Fariñas, 2014). Estos microorganismos causan infecciones asociadas a tasas altas de mortalidad, con frecuencia contienen otros genes de resistencia, por lo que las opciones de tratamiento son muy limitadas y tienen el potencial de diseminarse rápidamente, ya que las enterobacterias son una causa común de infecciones intrahospitalarias y de la comunidad (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2015)

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de los genes de carbapenemasas *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae*

carbapenemasa) y *bla_{NDM}* (New Delhi Metalobetalactamasa) en aislamientos de *K. pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

La bacteria seleccionada para este estudio fue *K. pneumoniae*, ya que es una causa importante de infecciones nosocomiales, principalmente neumonías y septicemias en recién nacidos y en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. Para la detección de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. Este estudio es de los pocos en los que se han aplicado técnicas moleculares para la detección de genes específicos en aislamientos bacterianos del Hospital General San Juan de Dios. Los resultados obtenidos en este estudio serán de beneficio para los pacientes y el personal del Hospital General

San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, principalmente porque apoyan la aplicación de las recomendaciones hechas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en los años 2012 y 2014 ante la transmisión de este tipo de bacterias multirresistentes, en donde los laboratorios de microbiología son la primera línea de contención a través de la detección oportuna de los mecanismos de resistencia bacteriana, lo que permitirá determinar la magnitud del problema y así orientar las medidas de control (OPS, 2012).

Materiales y métodos

Se recolectaron 54 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem, provenientes de diversas muestras clínicas, del Hospital General San Juan de Dios. El muestreo se realizó de enero a julio del 2014. Se utilizó la información del antibiograma obtenida del equipo automatizado MicroScan® WalkAway (Merck), se seleccionaron las cepas de *K. pneumoniae* que presentaron un resultado de imipenem y/o meropenem Concentración mínima inhibitoria (CIM) mayor o igual a 2-4 µg/mL, valores que se interpretan como intermedios y resistentes, respectivamente. El estudio es descriptivo, prospectivo.

Las cepas almacenadas en hisopos con agar Ames, se cultivaron en agar sangre de carnero 5% y se incubaron a 35° C por 24 h. Se efectuó un segundo cultivo en agar MacConkey que se incubó a 35° C por 24 h. Por último, se tomaron una o dos colonias crecidas en el agar MacConkey y se trasladaron a microtubos con 1.5 ml de caldo BHI, los cuales se incubaron por otras 24 h a 35° C. Posteriormente se procedió a congelar a -20° C los tubos conteniendo las cepas.

La extracción de ADN de las cepas en estudio se realizó con el Kit Wizard® Genomic DNA

Purification para bacterias Gram negativo. Se realizó control de extracción midiendo absorbancia a 260 nm (Promega Corporation, 2009).

Para la determinación genotípica se utilizó el protocolo de amplificación estandarizado en el Servicio de Antimicrobianos, Instituto de Salud, “Dr. Carlos Malbrán”, Buenos Aires, Argentina (Servicio Antimicrobianos, 2008). Los primers utilizados fueron: (KPC-Forward, secuencia 5’-3’ AACAAG GAATATCGTTGATG; KPC-Reverse, secuencia 5’-3’ AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA) para un producto de 916 bp; (NDM-Forward, secuencia 5’-3’ AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC; NDM-Reverse secuencia 5’-3’ GGC GTA GTG CTC AGT GTC) para un producto de 512 bp.

Para asegurar la calidad del proceso, los productos de PCR de 20 cepas seleccionadas al azar, se enviaron a MacroGen Inc. para la secuenciación respectiva y asegurar que se amplificaron las secuencias de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*.

La información correspondiente como tipo de muestra, servicio del hospital, susceptibilidad antibiótica, etc., se obtuvo directamente de la base de datos almacenada en el MicroScan® WalkAway. Los datos demográficos y clínicos se obtuvieron de la revisión de los expedientes correspondientes. Se realizó un análisis descriptivo a través de frecuencias, usando el programa Epi Info 7.

Resultados

Se analizaron 54 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem del Hospital General San Juan de Dios del año 2014. De estos, 49 (90.7%) presentaron el gen *bla_{NDM}*, mientras que en cinco aislamientos (9.3%) no se detectó ninguno de los genes investigados: *bla_{NDM}* y *bla_{KPC}*.

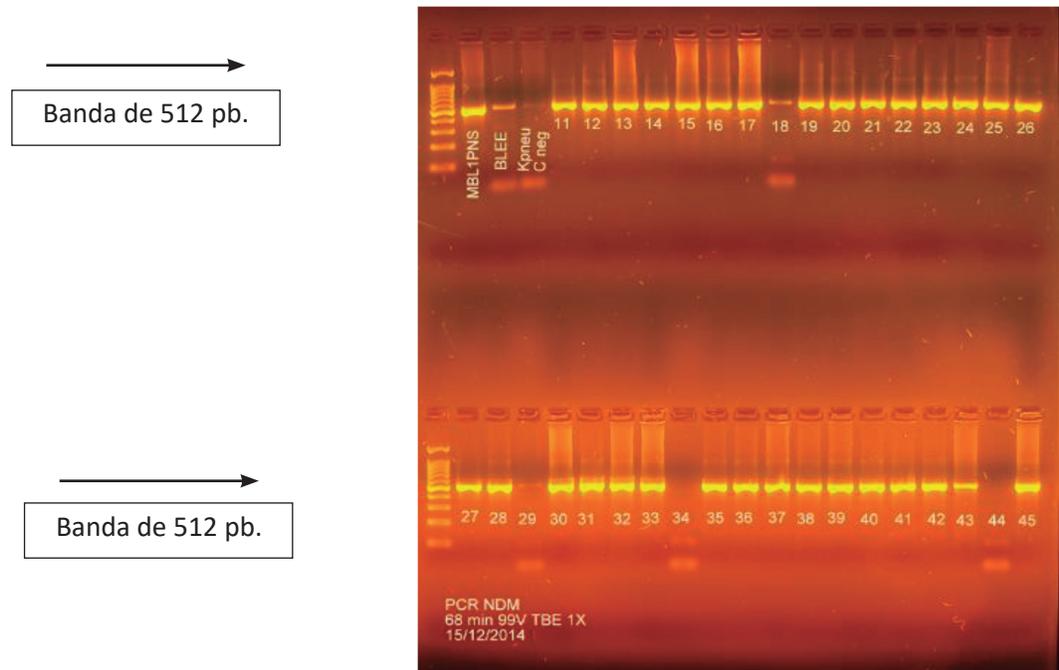


FIGURA 1. Resultados de los productos de PCR de punto final en gel de agarosa. Gen *bla*NDM, tamaño del amplicón 512 pb. Se muestran los resultados de las cepas de *K. pneumoniae* de la 11 a 45. En las cepas 29, 34 y 44 no se detectó el gen. MBL1PNS = control positivo, BLEE = cepa con betalactamasa de espectro extendido y gen *bla*NDM, Kpneu = control negativo.

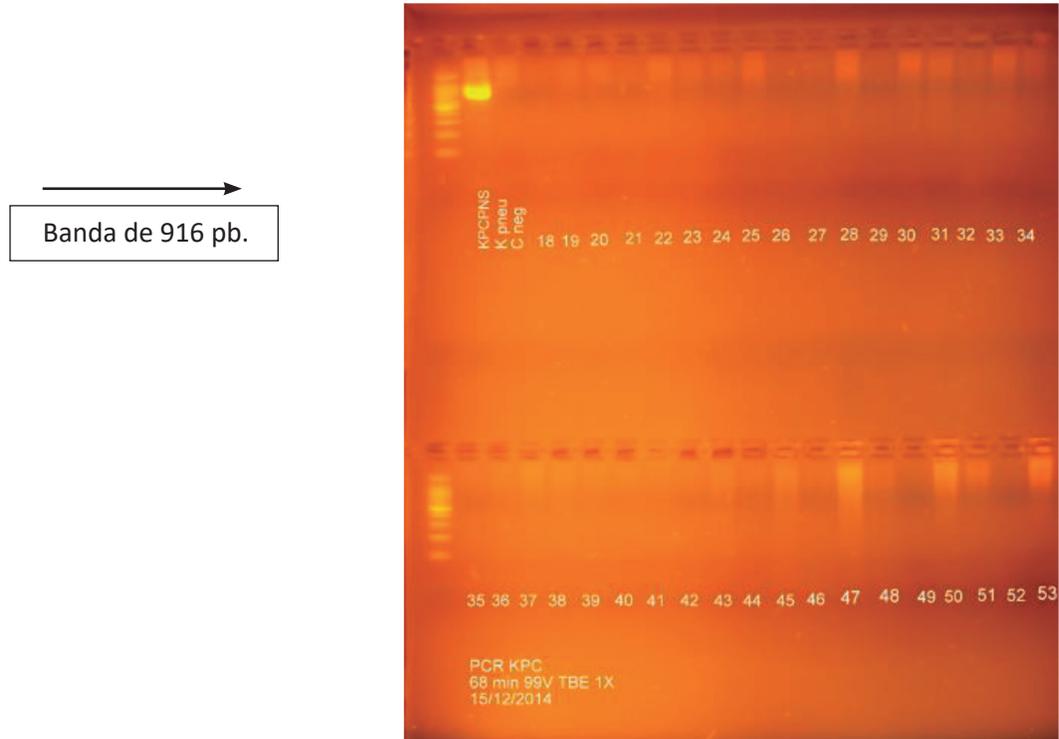


FIGURA 2. Resultados de los productos de PCR de punto final en gel de agarosa. Gen *bla*KPC, tamaño del amplicón 916 pb. Se muestran los resultados de las cepas de *K. pneumoniae* de la 18 a 53, en ninguna se detectó el gen *bla*KPC. KPCPNS = control positivo, Kpneu = control negativo.

De las 54 cepas estudiadas, 52 (94.5%) fueron resistentes al imipenem y 2 cepas presentaron un valor intermedio de CIM. En 49 (91%) de estas cepas se detectó la presencia del gen *bla_{NDM}*. Los resultados de susceptibilidad a meropenem estuvieron disponibles únicamente para 39 cepas (72%) y todas fueron resistentes

a este antibiótico, 34 (63%) de estas cepas presentaron el gen *bla_{NDM}*.

Las 5 cepas en las que no se detectaron los genes en estudio, fueron resistentes al imipenem y al meropenem (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de susceptibilidad a carbapenemes en cepas de *K. pneumoniae* analizadas para la presencia de genes de carbapenemasas (N = 54).

Carbapenemes	<i>bla_{NDM}</i> positivo n (%)	<i>bla_{NDM}/bla_{KPC}</i> negativo n (%)	Total n (%)
Imipenem			
Resistente CIM > 8 µg/ml	47 (87)	5 (9)	52(94.5)
Intermedio CIM = 8 µg/ml	2 (4)	0 (0)	2 (4)
Subtotal	49 (91)	5 (9)	54 (100)
Meropenem			
Resistente CIM > 8 µg/ml	34 (63)	5 (9)	39 (72)
Intermedio CIM = 8 µg/ml	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No determinado	15 (28)	0 (0)	15(28)
Subtotal	49 (91)	5 (9)	54(100)

En la Tabla 2 se observa la variedad de muestras en las que se aisló *K. pneumoniae* portadora del gen *bla_{NDM}*. La mayor frecuencia de

aislamientos se obtuvo de muestras de sangre (37%) y orina (14%). Otra fuente importante fueron las secreciones varias (10%).

Tabla 2. Muestras en las que se aisló *K. pneumoniae* portadora del gen *bla_{NDM}* (n = 49)

Tipo de muestra	n	%
Sangre	18	37
Orina	7	14
Secreciones varias	5	10
Líquidos ¹	4	8
Secreción orotraqueal	4	8
Herida operatoria	3	6
Cultivo de catéter	3	6
Otros ²	5	10
Total	49	100

¹Líquido cefalorraquídeo, líquido biliar, líquido pleural, líquido peritoneal.

²Cultivo de gramo por tejido, esputo, úlcera, aspirado bronquial.

Las cinco cepas que fueron negativas para los dos genes investigados, se aislaron de herida operatoria, orina, esputo y secreciones orotraqueales.

Las salas de cuidados intensivos fueron los servicios del Hospital General San Juan de Dios en el que se aislaron con mayor frecuencia cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen de carbapenemasas *bla_NDM*. En este estudio, 26 (53%) aislamientos realizados correspondieron a estos servicios y 13 (27%) a los servicios de hospitalizados no intensivos. También se encontraron 10 (20%) cepas en los servicios de emergencia.

Los datos demográficos y clínicos de las personas de las que se aisló *K. pneumoniae* portadora del gen *bla_NDM*, fueron recolectados únicamente de 23 registros a los cuales se tuvo acceso. La mayor parte de aislamientos de *K. pneumoniae* fue en mujeres (59%); el 48% de los pacientes tenía menos de 1 año de edad. La utilización de catéter central (96%) y ventilación mecánica (61%) fueron los procedimientos médicos más utilizados en este grupo de pacientes. La mediana del tiempo de hospitalización en este grupo de pacientes fue de 38 días (IQR = 22.5 a 93.5). El 74% de las personas egresaron vivas y el 26% falleció (Tabla 3).

Tabla 3. Datos demográficos y clínicos de pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* portadora del gen *bla_NDM*.

Datos demográficos	n	%
Sexo (n=49)		
Femenino	29	59
Masculino	20	41
Edad (n=23)		
< 1 año	11	48
1-80 años	12	52
Datos clínicos (n=23)		
Catéter central	22	96
Ventilación mecánica	14	61
Sonda urinaria	11	48
Infección de sitio quirúrgico	3	13
Mediana días de hospitalización	38	
Egreso (n=23)		
Vivo	17	74
Fallecido	6	26

En la Tabla 4 se muestra la comparación entre los resultados de PCR punto final y la secuenciación. Los controles y la mayoría de las cepas concordaron en los resultados de ambas pruebas. En las cepas 52 y 58 no se detectó el gen *bla_NDM* por PCR punto final, sin embargo la secuenciación permitió evidenciar la presencia

del gen. Estas dos cepas fueron registradas como positivas para el gen *bla_NDM* tomando como válido el resultado de la secuenciación.

Tabla 4. Comparación entre resultados de PCR punto final y secuenciación (n = 20)

Identificación de cepa	PCR punto final	Secuenciación Sanger
BLEE	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
Control negativo	Negativo	Negativo
Control positivo	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
1	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
5	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
9	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
14	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
18	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
24	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
29	Negativo	Negativo
31	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
34	Negativo	Negativo
36	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
41	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
49	Negativo	Negativo
51	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
52	Negativo	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
58	Negativo	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>
60	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>	Positivo para gen <i>bla_{NDM}</i>

Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación exponen que de 54 cepas de *K. pneumoniae* recolectadas de enero a julio del 2014, el 91% (49) presentan el gen *bla_{NDM}*. Esto demuestra la diseminación que ha tenido este mecanismo de resistencia en cinco años desde el primer caso reportado en el Hospital General San Juan de Dios en Guatemala (Pasteran et al., 2012). Estos resultados además concuerdan con los reportes de varios países del mundo sobre la rápida propagación de las enterobacterias productoras de carbapenemasas, especialmente del tipo NDM (Johnson & Woodford, 2013). La diversidad de características genéticas asociadas con el gen *bla_{NDM}* puede explicar su elevada tasa de expansión en todo el mundo. Este gen posee gran diversidad clonal y se encuentra en diferentes tipos de plásmidos, como: IncA/C, IncF, IncL/M o incluso en algunos que no han podido ser tipificados. Los estudios de epidemiología molecular indican

que el plásmido IncA/C es el responsable de la diseminación del gen *bla_{NDM}* entre las enterobacterias (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

En el 2011, se realizó un estudio con el objetivo de determinar la presencia de carbapenemasas por métodos fenotípicos en 62 aislamientos de *Klebsiella* sp y *Escherichia coli* resistentes a carbapenemes, provenientes del Hospital General San Juan de Dios. Los resultados mostraron que 14 (23%) aislamientos de *Klebsiella* sp. con presencia de carbapenemasas, de los cuales 13 (93%) eran productores de carbapenemasa tipo MBL (Metalobetalactamasa) y 1 (7%) productor de carbapenemasa tipo KPC. De estos, la única especie del género *Klebsiella* que se identificó fue *K. pneumoniae* (Garrido-Ortega, 2014). Estos hallazgos son congruentes con los resultados obtenidos en este estudio.

Aunque se han reportado aproximadamente 30 genes de carbapenemasas, este estudio investigó la presencia de dos: *bla_{NDM}* y *bla_{KPC}*.

El gen *bla_{NDM}* se seleccionó porque fue el reportado en cepas de *K. pneumoniae*, en 2010, en el mismo hospital en el que se realizó este estudio y es de interés conocer la diseminación de las bacterias portadoras de este gen en los años posteriores. El gen *bla_{KPC}* se seleccionó debido a que codifica a la carbapenemasa de la clase A más diseminada en el mundo y su presencia ha sido reportada en un número creciente de enterobacterias y bacilos Gram negativo no fermentadores, pero los informes siguen predominando en *K. pneumoniae*, por lo que también era importante conocer si bacterias portadoras de este gen estaban presentes en el Hospital General San Juan de Dios.

En cinco aislamientos de *K. pneumoniae*, de los 54 analizados, no se detectó la presencia de ninguno de los genes mencionados, a pesar que fenotípicamente estos aislamientos demostraron ser resistentes a imipenem y meropenem. Esto podría ser explicado por la presencia de otros mecanismos de resistencia que no sea la producción de carbapenemasas o por la existencia de otros genes codificadores de carbapenemasas que deberían ser investigados en el futuro, como: OXA-48, SME, IMI, GES, etc. (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas se pueden presentar con diferentes cuadros clínicos, aunque suelen ser más frecuentes las infecciones respiratorias, urinarias y septicemias, ya sea primaria o asociada a catéter. Su adquisición es habitualmente nosocomial (Paño-Pardo, Villar, Ramos-Ramos, & Pintado, 2014). Esta información concuerda con lo que muestran los resultados obtenidos respecto al tipo de muestra en el que fueron encontradas las 49 cepas de *K. pneumoniae* con el gen *bla_{NDM}*, en donde la sangre (37%) y la orina (14%) fueron las más frecuentes.

Al igual que otras bacterias en entornos

sanitarios *K. pneumoniae* puede propagarse fácilmente entre los pacientes, la transmisión de microorganismos entre un hospedero susceptible y una persona colonizada es frecuente en actividades que impliquen contacto directo, dando lugar a brotes nosocomiales. Esta situación ocurre en las unidades de cuidados intensivos y de atención neonatal (Pitout, Nordmann, & Poirel, 2015), como se evidencia con los resultados obtenidos en este estudio, en el que el 53% de las cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen *bla_{NDM}* provenían de los servicios de intensivos, tanto de adultos como de niños.

El Hospital General San Juan de Dios es un centro clínico de tercer nivel de atención y de referencia nacional, se atienden aproximadamente 1,100 personas al día entre consultas externas, emergencias y personas en servicios internos. El hospital cuenta con 84 camas en los intensivos de niños y adultos, y con otras 900 camas para los otros servicios de hospitalización. El porcentaje de ocupación general es del 96% y la estancia promedio por paciente es de 12 días, situación que aumenta el riesgo de contraer una infección nosocomial. (Hospital General San Juan de Dios, 2015).

Actualmente el hospital atraviesa una crisis financiera sin precedentes, todos los insumos y recursos son escasos, desde la comida que se ofrece a los pacientes hasta el más costoso de los antibióticos (Coronado, 2015). Esta situación, además del tamaño y complejidad del hospital, han hecho difícil la vigilancia y el control de las infecciones, lo que resulta en la diseminación de bacterias con mecanismos de resistencia tan complicados como las encontradas en el presente estudio.

Esta investigación tuvo algunas limitaciones, dentro de las más importantes está la recolección incompleta de datos demográficos, clínicos y epidemiológicos de los pacientes. Actualmente, el registro de todos estos datos

se hace en forma manual y el almacenamiento de las historias clínicas es en forma física, no digital, por lo que se dificulta el acceso a las mismas. Esto limita la calidad de la información epidemiológica obtenida.

A pesar de las limitaciones, el impacto de los resultados de esta investigación radica principalmente en que demuestra que en los cinco años posteriores al primer reporte, *K. pneumoniae* portadora del gen *bla_{NDM}* se ha diseminado dentro del hospital, poniendo en riesgo de muerte a los pacientes, especialmente a los hospitalizados en los servicios de intensivos. Esta diseminación sin control llevará en un futuro cercano a la aparición de infecciones adquiridas en la comunidad debidas a bacterias portadoras de carbapenemasas y en este caso específico a portadoras del gen *bla_{NDM}*. Para prevenir una epidemia en Guatemala por estas bacterias multirresistentes es necesaria una respuesta rotunda, bien coordinada y protocolizada de todos los profesionales sanitarios y autoridades nacionales implicadas. Iniciando donde todo empezó, el Hospital General San Juan de Dios.

Agradecimientos

Al Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios, Laura Valenzuela, supervisora del área de Microbiología, a Marina Ruano y Luis Aguirre, al Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación de Salud Integral, Remei Gordillo y Rosa Cortés del Hospital Roosevelt y Claudia Valenzuela del Laboratorio Nacional de Salud.

Referencias

Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC). 2015. *Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)*. Atlanta: Autor.

Coronado, E. (2015). Salvar vidas en un hospital en donde no sirve ni el ascensor. *Revista Contrapoder*, 110

Garrido Ortega, M. A. (2014). *Determinación de carbapenemasas en aislamientos de Escherichia coli y Klebsiella sp. aisladas en el Hospital General San Juan de Dios*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Hospital General San Juan de Dios, Departamento de Informática. (2015). *Reporte 2015 de producción Hospital General San Juan de Dios*. Guatemala: Autor.

Johnson, A. P., & Woodford, N. (2013). Global spread of antibiotic resistance: The example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4), 499–513. doi:10.1099/jmm.0.052555-0

Martínez-Martínez, L., & González-López, J. J. (2014). Carbapenemasas in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(4), 4–9. doi:10.1016/S0213-005X(14)70168-5

Organización Panamericana de la Salud. (2012). Alerta epidemiológica: transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/03/Transmisi%C3%B3n-de-bacterias-multirresistentes-tipo.pdf>

Paño Pardo, J. R., Villar, S. S., Ramos Ramos, J. C., & Pintado, V. (2014).

Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32 Suppl 4(4), 41–8. doi./10.1016/S0213-005X(14)70173-9

Pasteran, F., Albornoz, E., Faccone, D., Gomez, S., Valenzuela, C., Morales, M., ... Corso, A. (2012). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, (7), 1795–1797. doi./10.1093/jac/dks101

Pitout, J. D. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5873–5884. doi:10.1128/AAC.01019-15

Promega Corporation. (2009). *Wizard*® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA. Solutions. Madison: Autor.

Rosales, M. (2015). Crisis hospitalaria en Guatemala es la peor de su historia. Recuperado de <http://www.telesurtv.net/news>

Servicio Antimicrobianos, I. N. de E. I.-A. “Dr. C. G. M. (2008 y 2012). Protocolo de PCR para la detección del gen *kpc* en aislamientos de bacilos gram-negativos. *Instituto de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán.”* Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Detección-KPC.pdf>