



Caracterización molecular y fenotípica de bacterias gram negativas resistentes a carbapenemicos por serin carbapenemasas tipo KPC en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia durante el periodo 2018 a 2021

Autor:

Smith Yesid Chaparro Zuñiga

Trabajo presentado como requisito para optar por el  
título de Especialista en Infectología

Bogotá - Colombia

2022

Caracterización molecular y fenotípica de bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos por serin carbapenemasas tipo KPC en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia durante el periodo 2018 a 2021

Autor

Smith Yesid Chaparro Zuñiga

Tutores

Dr Jairo Enrique Pérez Franco

Dr Nicolás Molano

Facultad de Ciencias de la salud

Especialización en Infectología

Universidad del Rosario

Bogotá - Colombia

2022

## **Identificación del proyecto**

Institución académica: Universidad El Rosario

Dependencia: Facultad de ciencias de la salud

Título de la investigación: Caracterización molecular y fenotípica de bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos por serin carbapenemasas tipo KPC en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia durante el periodo 2018 a 2021

Instituciones participantes: Fundación Cardioinfantil

Tipo de investigación: Estudio descriptivo observacional transversal

Investigador principal: Smith Yesid Chaparro Zuñiga

Investigadores asociados:

Asesor clínico o temático: Dr Jairo Enrique Pérez Franco

Asesor metodológico: Dr Nicolás Molano

## 1 Tabla de contenido

1. Introducción .....	8
1.1 Planteamiento del problema.....	8
1.2 Justificación .....	11
2. Marco Teórico .....	12
3. Pregunta de investigación.....	16
4. Objetivos .....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos específicos .....	17
5. Formulación de hipótesis .....	18
6. Metodología .....	18
6.1 Tipo y diseño de estudio .....	18
6.2 Población y muestra.....	18
6.3 Criterios de inclusión y exclusión .....	18
6.3.1 Criterios de inclusión: .....	18
6.3.2 Criterios de exclusión.....	18
6.4 Tamaño de muestra .....	19
6.5 Muestreo .....	19
6.6 Definición y operacionalización de variables .....	19
6.6.1 Definiciones: .....	19
Resistencia a carbapenemicos: MIC en rango intermedio o resistente a carbapenemicos según puntos de corte del CLSI 2021.....	19
Test de captura: test de hodge modificado. ....	19
Test de diferenciación: acido fenil borónico, EDTA .....	19
Gen específico para carbapenemasa: gen KPC en panel molecular.....	19
Tipo de bacteria: aislamientos de bacterias gram negativas que son detectados por el panel molecular sepsis.....	19

6.6.2	Operacionalización de variables.....	20
6.7	Técnicas, procedimientos e instrumentos de la recolección de datos .....	22
6.8	Plan de procesamiento de muestras biológicas .....	22
6.9	Plan análisis de datos .....	22
6.10	Alcances y límites de la investigación .....	23
7.	Aspectos éticos .....	24
8.	Administración del proyecto .....	26
8.1	Presupuesto .....	26
8.2	Cronograma.....	26
9.	Resultados.....	28
10.	Discusión.....	31
11.	Conclusiones.....	35
12.	Referencias .....	36

## Resumen

**Introducción:** La resistencia a carbapenémicos por bacterias gram negativas, supone una pérdida importante de medicamentos de última línea para su manejo. Adicionalmente, los métodos diagnósticos actuales para la identificación de estos mecanismos, no se encuentran ampliamente difundidos en las entidades hospitalarias. El conocimiento de la epidemiología local, permite orientar tratamientos anticipados, disminuyendo morbilidad y mortalidad asociada.

**Objetivos:** Describir la distribución del gen KPC en bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos y su relación con las pruebas fenotípicas de identificación y diferenciación.

**Métodos:** Se realizó un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal. La población a estudio, estuvo conformada por las bacterias gram negativas, resistentes a carbapenémicos, con identificación del gen KPC, por panel molecular, en pacientes adultos que estuvieron hospitalizados, en la Fundación cardiointantil durante los años 2018 a 2021.

**Resultados:** se evaluaron 135 paneles moleculares sepsis, de los cuales, 41 detectaron el gen KPC. *K. pneumoniae* fue el germen principalmente encontrado de manera global (60.9%) y en cada uno de los servicios estudiados (UCI 68%, hospitalización 45.5% y urgencias 60%). Las pruebas fenotípicas, específicamente el test de hodge y ácido borónico, tuvieron una concordancia del 93.8% con la prueba molecular.

**Conclusiones:** *K. pneumoniae* continua siendo el principal germen resistente a carbapenémicos por serin carbapenemasas tipo KPC.

**Palabras clave:** Bacterias gram negativas, gen KPC, serin carbapenemasas, panel molecular, test de hodge, EDTA y ácido borónico.

**Abstract:**

**Introduction:** Resistance to carbapenems by gram-negative bacteria represents a significant loss of last-line drugs for its management. In addition, the current diagnostic methods for the identification of these mechanisms are not widely used in hospital entities. The knowledge of the local epidemiology allows to guide anticipated treatments, reducing associated morbidity and mortality.

**Objectives:** To describe the distribution of the KPC gene in gram-negative bacteria resistant to carbapenems and its relationship with phenotypic identification and differentiation tests.

**Methods:** An observational, descriptive, cross-sectional study was carried out. The study population consisted of gram-negative bacteria, resistant to carbapenems, with identification of the KPC gene, by molecular panel, in adult patients who were hospitalized at the Fundación cardiovascular during the years 2018 to 2021.

**Results:** 135 sepsis molecular panels were evaluated, of which 41 detected the KPC gene. *K. pneumoniae* was the germ mainly found globally (60.9%) and in each of the services studied (ICU 68%, hospitalization 45.5% and emergency room 60%). The phenotypic tests, specifically the Hodge and boronic acid tests, had a 93.8% concordance with the molecular test.

**Conclusions:** *K. pneumoniae* continues to be the main germ resistant to carbapenems due to KPC-type serine carbapenemases.

**Keywords:** Gram negative bacteria, KPC gene, serine carbapenemases, molecular panel, Hodge test, EDTA and boronic acid.

## 1. Introducción

### 1.1 Planteamiento del problema

Las betalactamasas son el principal determinante de resistencia de los antibióticos betalactámicos en bacterias gram negativas. Estas son enzimas antiguas cuyos orígenes se remontan a millones de años atrás. Actualmente cuentan con casi 2.800 proteínas únicas y se sabe que surgieron inicialmente de fuentes ambientales, con mayor probabilidad para proteger a una bacteria del ataque de betalactámicos naturales. Sus antepasados fueron presumiblemente proteínas de unión a penicilina que comparten la homología de secuencia con las betalactamasas que poseen una serina de sitio activo. También existen metalo betalactamasas, con uno o dos iones de zinc catalíticamente funcionales (1). Por otro lado, la diseminación de estos patrones de resistencia se realiza predominantemente por genes móviles llamados plásmidos(1). Estas partículas de material genético permiten una amplia diseminación de información en el hospedero y en el ambiente(12).

Las carbapenemasas son una amplia familia de enzimas pertenecientes a las betalactamasas, distribuidas en los grupos de ambler A, B y D, distribuidas entre las serin carbapenemasas y metalo betalactamasas que tiene la propiedad de hidrolizar medicamentos betalactámicos, en particular carbapenémicos(2).

En nuestro país en el tercer trimestre de 2012, comenzó a operar el Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en las infecciones asociadas a la atención en salud, con el fin de recabar y analizar la información referente al problema en Colombia. Una investigación en particular llevada a cabo entre los años 2012 y 2014 por el Instituto Nacional de Salud (INS) aportó valiosa información sobre nuestra situación para esa fecha. Las carbapenemasas más frecuentes encontradas en enterobacterias fueron la KPC , seguida de la New Delhi metallobetalactamases (NDM) ; en *P. aeruginosa*, la Verona integron coded

metalloβ-lactamasas (VIM) y la KPC, y en *A. baumannii*, la OXA-23. Se detectaron varias combinaciones de carbapenemasas, siendo la de KPC y VIM la más frecuente en *Pseudomonas spp.*, y en enterobacterias. Por lo general, los aislamientos que presentan combinaciones tienen mayor resistencia, lo cual limita las opciones terapéuticas. Además, la amenaza de diseminación de este tipo de microorganismos en los hospitales es preocupante. Las serin carbapenemasas tipo KPC son las enzimas más prevalentes en bacterias gram negativas. Estos hallazgos evidencian un problema de salud pública debido a la alta prevalencia de la resistencia de las enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadores a los antibióticos de importancia hospitalaria(3).

En infecciones por estos microorganismos, las opciones terapéuticas se ven reducidas a combinaciones de medicamentos que llevan a mayor morbilidad y mortalidad llegando a ser hasta el 50% cuando se compara con nuevas estrategias terapéuticas(4)(5). El retraso de inicio de una terapia antimicrobiana apropiada también impacta negativamente en la mortalidad(6)(7).

El diagnóstico de bacterias gram negativas productoras de carbapenemasas en el laboratorio clínico es difícil porque pueden ser susceptibles a los carbapenémicos a pesar de la presencia de una carbapenemasa, de acuerdo con los puntos de corte de concentración mínima inhibitoria (MIC) definidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), provocando una “difusión silenciosa” en muchos hospitales(8). Las nuevas estrategias terapéuticas como ceftazidime avibactam, activas contra serin carbapenemasas se convierten en opciones alentadoras con mejoría en mortalidad en varios trabajos(9). Nuevas pruebas diagnósticas permiten la identificación molecular de patrones de resistencia de manera rápida y con buena sensibilidad y especificidad, mejorando desenlaces para los pacientes. Entre estos encontramos gran variedad de pruebas moleculares como bioMérieux FilmArray® en sus diferentes paneles y Cepheid Xpert Carba R® entre otros (10)(8). Estos paneles tienen la capacidad de identificar las bacterias gram negativas más prevalentes y las serin carbapenemasas tipo KPC. Basado en lo anterior, este estudio pretende mostrar la situación

actual de carbapenemasas tipo KPC en bacterias gram negativas obtenidas a partir de hemocultivos y llevadas a identificación con panel molecular en una institución de cuarto nivel de la ciudad de Bogotá Colombia desde su implementación.

## *1.2 Justificación*

El conocimiento amplio de la epidemiología local permite la generación objetiva de protocolos y guías de terapia empírica en los diferentes escenarios de las instituciones prestadoras de salud, lográndose inicio de terapias dirigidas lo cual permite direccionar el manejo inicial de los pacientes impactando en mortalidad y morbilidad, y adicionalmente disminuyendo estancias hospitalarias y costos para las instituciones. La concientización sobre este aspecto es de vital importancia para promover campañas de encaminadas al uso racional de antimicrobianos, lavado de manos entre otras. La caracterización molecular y fenotípica nos permite tener un amplio panorama de la ecología bacteriana de la institución estudiada, logrando mostrar una realidad objetiva haciendo mas fácil la estrecha vigilancia epidemiológica de la dinámica de las infecciones generadas por bacterias gram negativas productoras de carbapenemasas. Este trabajo pretende mediante la caracterización fenotípica y molecular de bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos por serin carbapenemasas tipo KPC, en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia desde la implementación del FilmArray® panel sepsis en hemocultivos, brindar las herramientas necesarias para la generación de estos documentos.

## 2. Marco Teórico

La prevalencia de organismos multidrogosresistentes (MDR) es una importante amenaza para la salud pública, la cual continúa en ascenso a nivel global y se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas(11). A nivel mundial el principal problema en cuanto a resistencia en gram negativos son los enterobacteriales, específicamente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cefalosporinas y resistentes a carbapenémicos (12). La serin carbapenemasa tipo KPC en *Klebsiella pneumoniae* al día de hoy es la mas prevalente en el mundo, volviéndose endémica en algunas áreas de las Américas, el sur de Europa, China e Israel(13). La epidemiología cambia dependiendo del área estudiada, siendo en América del sur hasta un 20% la resistencia en enterobacteriales, pero llegando a ser tan alta como un 59% en el continente asiático, específicamente en India(12). Por otro lado en los gram negativos no fermentadores encontramos la *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en un 17% a nivel global, pero llegando a tasas tan altas como un 41.1% en América latina(14). Un problema no menor lo plantea *Acinetobacter baumannii* con resistencia a carbapenémicos que suele estar principalmente asociado a infecciones en unidades adquiridas en unidades de cuidados intensivos(15). Globalmente encontramos tasas de resistencia entre un 40 - 70% y para América latina llegando a ser hasta del 80%(16).

En Colombia, los *Enterobacterales* (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp*) ocupan los primeros lugares en la epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y de las adquiridas en comunidad (17). Nuestro país, como ya se mencionó, hace parte de las regiones endémicas de las Américas para el gen KPC principalmente encontrado en *Klebsiella pneumoniae*, describiéndose el primer caso de este mecanismo de resistencia en América del Sur en 2005 en la ciudad de Medellín (17)(18). Dos años mas tarde se documentaria por primera vez en el mundo, la presencia de esta enzima en *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro país (19).

Datos reportados por el INS en 2017, mostró que las carbapenemasas más frecuentes encontradas en el territorio nacional en enterobacterias fueron la KPC , seguida de la NDM; en *P. aeruginosa*, la VIM y la KPC , y en *A. baumannii*, la OXA-23. Adicionalmente se detectaron varias combinaciones de carbapenemasas, siendo la de KPC y VIM la más frecuente en *Pseudomonas spp.*, y en enterobacterias(17).

Uno de los puntos mas importantes desde el punto de vista clínico, es la relación de estos mecanismos de resistencia a carbapenémicos, dado que su presencia se relaciona con mortalidad que puede ascender hasta un 50% (4). Los mecanismos de resistencia mas importantes los podemos dividir en enzimáticos y no enzimáticos de la siguiente manera:

Mecanismos de resistencia enzimáticos:

Se basan en la presencia de enzimas diferenciadas desde el punto de vista estructural en serin carbapenemasas y las metaloenzimas, las cuales tienen una gran capacidad de hidrolizar los carbapenémicos(20). En estos grupos las enzimas *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) *Verona integron-mediated metallo-  $\beta$ -lactamase* (VIM), *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase* (NDM), *Imipenemase* (IMP) y *oxacillinase-48-like carbapenemase* (OXA-48) son las que mayor relevancia clínica tiene por su prevalencia y asociación con peores desenlaces(8). En bacterias gram negativas su diseminación se logra a través de elementos móviles llamados plásmidos, que contienen información genética para la producción de estas enzimas(1).

Los factores de riesgo mas importantes para la adquisición de estos mecanismos de resistencia son estar críticamente enfermo, requerimiento de dispositivos invasivos (catéter urinario, catéter venoso central, ventilación mecánica invasiva), alta carga de comorbilidades y uso de antimicrobianos de amplio espectro, entre ellos de manera importante el uso de carbapenémicos, principalmente carbapenémicos, los cuales son usados ampliamente para infecciones severas en unidades de cuidados intensivos (21)(22).

Mecanismos de resistencia no enzimáticos:

Son basados en la presencia de bombas de eflujo específicas para carbapenémicos que sacan al exterior de la bacteria el antibiótico, así como cierre de porinas que impiden la entrada de estos antimicrobianos. Estos sistemas hacen parte importante de los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*(23).

Métodos Diagnóstico

En la actualidad de manera convencional, se sigue utilizando la identificación de bacterias a partir de hemocultivos positivos, los cuales son llevados a incubación y posteriormente según los puntos de corte de sensibilidad que posean a carbapenémicos, serán llevados a realización de pruebas de detección y diferenciación, procedimientos que pueden llevar entre 48 y 72 horas de tiempo, sin precisar realmente la enzima implicada en la resistencia(8)(24). Sistemas relativamente nuevos, basados en biología molecular como el FilmArray BCID (BioFire, Salt Lake City, UT) y el Verigene Blood culture system (Luminex®) entre otros, se basan en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, logrando la identificación de diversas bacterias, entre ellas los principales gram negativos implicados en infecciones de la comunidad y nosocomiales y aquellos genes de resistencia de mayor prevalencia. FilmArray BCID tiene la capacidad de detectar 23 patógenos, de los cuales 11 son bacterias gram negativas. Adicionalmente tiene tres dianas genéticas de resistencia, entre ellas el gen KPC (25)(26).

Los métodos de diagnóstico molecular han mostrado beneficios en acortar el tiempo de diagnóstico, direccionamiento de la terapia antimicrobiana de manera temprana y el conocimiento de la epidemiología local, esto último, permitiendo generar políticas dirigidas al manejo y prevención de las infecciones por los gérmenes y mecanismos de resistencias más prevalentes en las instituciones(8)(26).

En Colombia en Instituto Nacional de Salud (INS) en su último informe del año 2018, reporta que en enterobacteriales resistentes a carbapenémicos el 66% se encontró relacionado con KPC, el 23% con NDM y 6% con VIM (17).

En cuanto a tratamiento de estas bacterias, las opciones terapéuticas cada vez se ven mas reducidas. Las terapias combinadas son usualmente utilizadas como armamentario para su tratamiento dentro de los cuales encontramos polimixinas, carbapenémicos, aminoglucósidos, fosfomicina y tigeciclina (27). Estas combinaciones, especialmente cuando se asocian a polimixinas, sabemos hoy en día que aumentan la morbilidad y la mortalidad de los pacientes (5). Nuevas moléculas como cefatzidime avibactam, ya disponible en el país, se convierten en opciones prometedoras para el tratamiento de estas cepas, especialmente las productoras de serin carbapenemasas haciendo necesaria su identificación para el direccionamiento antimicrobiano(20).

Con el tiempo se ha creado conciencia de la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos, haciéndose creciente entre la comunidad médica y el público en general. El impacto de la resistencia a los antimicrobianos sobre los resultados clínicos y económicos es el tema de investigación actual a nivel mundial. Generar conciencia del efecto de la resistencia a los antimicrobianos tiene varios beneficios potenciales, entre ellos, el conocimiento de las implicaciones de la resistencia a carbapenémicos en relación a los desenlaces clínicos del paciente, puede instar a los hospitales y proveedores de atención médica a iniciar y apoyar iniciativas para prevenir tales infecciones (por ejemplo, programas de control de infecciones y agentes antimicrobianos programas de gestión)(28).

### **3. Pregunta de investigación**

¿Cuales son las características moleculares y fenotípicas de las bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos por serin carbapenemasas tipo KPC en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia durante el periodo 2018 a 2021?

## 4. Objetivos

### 4.1 *Objetivo general*

Describir la distribución del gen KPC en bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos y mostrar su expresión fenotípica en pruebas de captura y diferenciación en bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos identificadas por panel molecular en hemocultivos en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia durante el periodo 2018 a 2021

### 4.2 *Objetivos específicos*

1. Identificar las diferentes bacterias gram negativas en hemocultivos a las cuales se les realizo panel molecular durante el periodo 2018 – 2021
2. Determinar la distribución del gen KPC en bacterias gram negativas identificadas por panel molecular.
3. Describir la relación del gen KPC con su expresión fenotípica en pruebas de captura y diferenciación.
4. Brindar información sobre la distribución del gen KPC en las diferentes bacterias gram negativas por método molecular, encontradas en los servicios de atención médica de adultos en una institución de cuarto nivel de Bogotá Colombia durante el periodo 2018 a 2021.

## 5. Formulación de hipótesis

No aplica

## 6. Metodología

### 6.1 Tipo y diseño de estudio

Estudio descriptivo observacional transversal

### 6.2 Población y muestra

Bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos por serin carbapenemasas tipo KPC aislados en hemocultivos en pacientes adultos de la Fundación cardiovascular durante el periodo 2018 a 2021.

### 6.3 Criterios de inclusión y exclusión

#### 6.3.1 Criterios de inclusión:

- Bacterias gram negativas aisladas en pacientes mayores de 18 años de la Fundación Cardioinfantil durante el periodo 2018 a 2021.
- Bacterias gram negativas con identificación del gen KPC por panel molecular en hemocultivos.

#### 6.3.2 Criterios de exclusión:

- Bacterias gram negativas detectadas por el panel sin identificación de especie y no confirmados por cultivo.

#### *6.4 Tamaño de muestra*

Según registro histórico hay 782 muestras. Se tomarán todas aquellas que cumplan criterios de inclusión.

#### *6.5 Muestreo*

No aplica

#### *6.6 Definición y operacionalización de variables*

##### *6.6.1 Definiciones:*

Resistencia a carbapenémicos: MIC en rango intermedio o resistente a carbapenémicos según puntos de corte del CLSI 2021.

Test de captura: test de hodge modificado.

Test de diferenciación: ácido fenil borónico, EDTA

Gen específico para carbapenemasa: gen KPC en panel molecular.

Tipo de bacteria: aislamientos de bacterias gram negativas que son detectados por el panel molecular sepsis.

## 6.6.2 Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

Nombre de la variable	Definición	Naturaleza	Escala	Unidades o categorías
Edad	Tiempo que ha vivido una persona y/o ser vivo contando desde su nacimiento	cuantitativa	Razón	Años
Sexo	condición orgánica que distingue a los hombres de las mujeres.	cualitativa	Nominal	Masculino, Femenino
Test de hodge	Prueba de captura para carbapenemasas	cualitativa	Nominal	Positivo, negativo
Acido fenil borónico	Prueba de diferenciación	cualitativa	Nominal	Positivo, negativo
EDTA	Prueba de diferenciación	cualitativa	Nominal	Positivo, negativo
Gen <i>bla</i> KPC	Gen específico de carbapenemasa identificado en panel molecular	cualitativa	Nominal	Detectado, No detectado
Bacteria gram negativa	Tipo de bacteria identificada por el panel molecular.	cualitativa	Nominal	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>

Nombre de la variable	Definición	Naturaleza	Escala	Unidades o categorías
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Complejo Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus</i> <i>Serratia marcescens</i>
No Identificado	Enterobacteriales sin identificación de especie por el panel	Cualitativa	Nominal	Si, No
Servicio de hospitalización	Servicio donde estaba hospitalizado el paciente al momento del diagnóstico	Cualitativa	Nominal	-UCI -Sala hospitalización general -Urgencias

### *6.7 Técnicas, procedimientos e instrumentos de la recolección de datos*

Se realizará una búsqueda en la base de datos del panel molecular sepsis del laboratorio de biología molecular de la fundación Cardioinfantil, de todos los estudios que documenten bacterias gram negativas con detección del gen KPC. Posteriormente se realizara la búsqueda de dichos aislamientos en la base de datos generada por el software WHONET, la cual permite discriminar la realización o no de pruebas de captura y diferenciación a los hemocultivos y realizar el filtrado de estos datos para posteriormente extraer la información referente a estos puntos. (WHONET: Software gratuito desarrollado por el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos a partir de las bases de datos generadas por los laboratorios de microbiología). Así mismo los datos referentes a edad, sexo y el área específica de toma de muestra en la institución.

### *6.8 Plan de procesamiento de muestras biológicas*

No aplica

### *6.9 Plan análisis de datos*

Estadísticas descriptivas serán calculadas para las diferentes variables del estudio. Para las variables cualitativas se reportaran las frecuencias absolutas y relativas. Para las variables cuantitativas se reportara el promedio y la desviación estándar o la mediana y el rango intercuartilico dependiendo de la normalidad de la distribución de la variable, evaluada a través de la prueba de Shapiro-Wilk.

La presencia del gen KPC será descrita en cada una de las especies de bacterias gram negativas y la asociación de la presencia de dicho gen con el antibiograma se describirá a través de tablas de contingencia y gráficos de mosaico.

Todos los análisis estadísticos se realizan en el software R versión 4.1.2

Una vez obtenida la base de datos, se iniciara depuración de los mismos, eliminación de datos repetidos. Se excluirán aquellos que no cuenten con test de captura o diferenciación.

Se realizara una discriminación según el tipo de bacteria, edad, sexo y área de hospitalización del paciente del cual proviene la muestra. Se correlacionarán los hallazgos del panel molecular con los test de captura y diferenciación (expresión fenotípica) obtenidos en el antibiograma.

Con lo anterior, realizaremos un análisis descriptivo retrospectivo de la información, tomaremos de las variables blanco y realizaremos un análisis univariado que permita ver cada variable descrita y evaluar las frecuencias, porcentajes e intervalos de confianza.

#### *6.10 Alcances y límites de la investigación*

Con el presente proyecto se pretende realizar un trabajo como producto final de la especialización en Infectología. Proyecto que se propondrá como trabajo a presentar en el congreso nacional de Enfermedades de la Asociación Colombiana de Infectología ACIN. Adicionalmente los datos serán socializados con el servicio de epidemiología e Infectología de la Fundación Cardioinfantil con el fin de ser utilizado en guías y protocolos institucionales a fines a este trabajo.

## 7. Aspectos éticos

El estudio se realizó dentro de los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos según la Declaración de Helsinki - 64a Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013 (29).

Se tuvo en cuenta las regulaciones locales del Ministerio de Salud de Colombia Resolución 8430 de 1993 en lo concerniente al Capítulo I “De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos”(30).

La presente investigación es clasificada dentro de la categoría sin riesgo, dado que toda la información se toma a partir de fuente secundaria, y en ningún momento se tendrá contacto directo con el paciente. De todas formas, se garantizará la confidencialidad de la información y se contará con el permiso de la Institución y del Comité de ética de la investigación para su realización.

Se limitará el acceso de los instrumentos de investigación únicamente a los investigadores según Artículo 8 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud(30).

Será responsabilidad de los investigadores el guardar con absoluta reserva la información contenida en las historias clínicas y a cumplir con la normatividad vigente en cuanto al manejo de la misma reglamentados en los siguientes: Ley 100 de 1993, Ley 23 de 1981, Decreto 3380 de 1981, Resolución 008430 de 1993 y Decreto 1995 de 1999.

Los datos serán anonimizados dado que se eliminará cualquier dato personal que permita hacer rastreo o identificación del paciente. Para efectos de este estudio, el único dato personal que se tomará será el número de cédula el cual será eliminado y posteriormente aleatorizada la información de los pacientes.

La custodia de la información corresponde a los Dres. Smith Yesid Chaparro Zuñiga - Médico internista Fellowship en Infectología de la Universidad del Rosario y Jairo Enrique

Pérez Franco – Médico Internista Infectólogo - Fundación Cardioinfantil, se guardará en un formato de Excel con clave de seguridad, reservando la información anonimizada en un disco duro externo de mi propiedad. La custodia de la información se reservará por 2 años posterior a la publicación del trabajo y luego será eliminada del disco duro sin dejar alguna copia existente.

Todos los integrantes del grupo de investigación estarán prestos a dar información sobre el estudio a entes organizados, aprobados e interesados en conocerlo siempre y cuando sean de índole académica y científica, preservando la exactitud de los resultados y haciendo referencia a datos globales y no a pacientes o instituciones en particular.

Se mantendrá absoluta confidencialidad y se preservará el buen nombre institucional profesional.

El estudio se realizará con un manejo estadístico imparcial y responsable.

No existe ningún conflicto de interés por parte de los autores del estudio que deba declararse.

## 8. Administración del proyecto

### 8.1 Presupuesto

Rubro	Fuente de Financiación	Total
Personal	Propios	10.000.000
Equipos (computadores)	Propios	4.000.000
Software	Propios	1.500.000
Materiales	Propios	500.000
Material Bibliográfico	Propios	1.000.000
Internet	Propios	1.000.000
<b>Total</b>	<b>Propios</b>	<b>18.000.000</b>

### 8.2 Cronograma

Actividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Realización Protocolo de Investigación																									
Sometimiento del protocolo al comité técnico científico y de ética																									
Piloto de formatos de recolección de información																									
Recolección de información																									



## 9. Resultados

Entre los años 2018 y 2021 se realizaron 782 paneles moleculares sepsis en hemocultivos tomados a adultos hospitalizados en los diferentes servicios de la Fundación Cardio infantil – Instituto de Cardiología, dentro de los cuales se encontraron 135 paneles positivos para bacterias gram negativas. El germen más frecuentemente detectado fue *E. coli* con un 35.5% seguido por *K. pneumoniae* con un 28.8% y en tercer lugar el complejo *E. cloacae* con un 11.1%. Un 1.4% de las bacterias fueron identificadas dentro de la familia de *enterobacteriaceae* sin determinar el género y especie por el panel, pero posteriormente identificadas por cultivo como *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter koseri* (Figura 1).

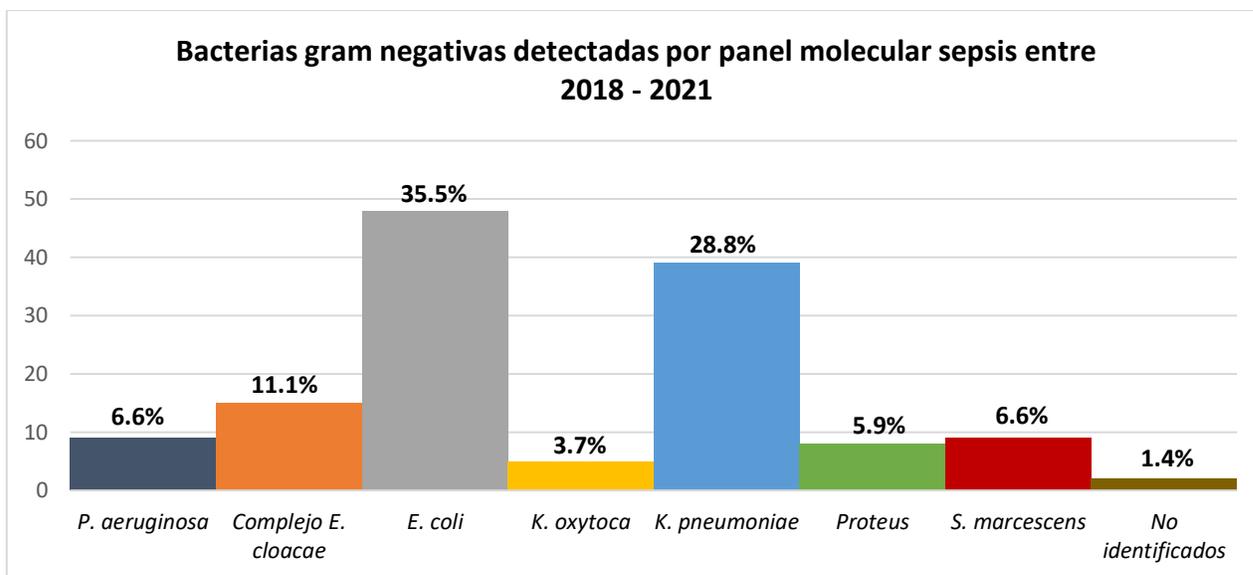


Figura 1. Bacterias gram negativas detectadas por panel molecular sepsis entre 2018 - 2021

## Distribución del gen KPC

La resistencia a carbapenémicos mediada por carbapenemasas tipo KPC fue documentada en el 30.3% de los aislamientos, siendo más frecuente su detección en el servicio de unidad de cuidados intensivos en un 61% seguido por el área de hospitalización con un 26.8% y por el servicio de urgencias con 12.2%. En cuanto a distribución por sexo fue más frecuentemente encontrado este mecanismo de resistencia en hombres con un 60.97%. La distribución por gérmenes encontró el gen KPC de manera más frecuente en *K. pneumoniae* con un 60.9% seguido por Complejo *E. cloacae* 19.5%, *E. coli* 7.4%, bacterias no identificadas por el panel 4.9%, *S. marcescens* 4.9% y por ultimo *P. aeruginosa* con 2.4% cada una (tabla 1, figura 2). En cuanto a la distribución por área de servicio, la *K. pneumoniae* fue la el gram negativo predominante en los tres servicios (tabla 2). Dentro de las bacterias no identificadas por el panel molecular, se documentaron por cultivo *E. aerogenes* y *C. koseri*. Las pruebas de captura se realizaron en el 39% de los paneles moleculares positivos para detección del gen KPC, siendo positivo el test de hodge y el Ácido borónico en el 93.8%. La negatividad de estas pruebas se encontró en un aislamiento de Complejo *E. cloacae* para el test de hodge y de *K. pneumoniae* para el ácido borónico únicamente.

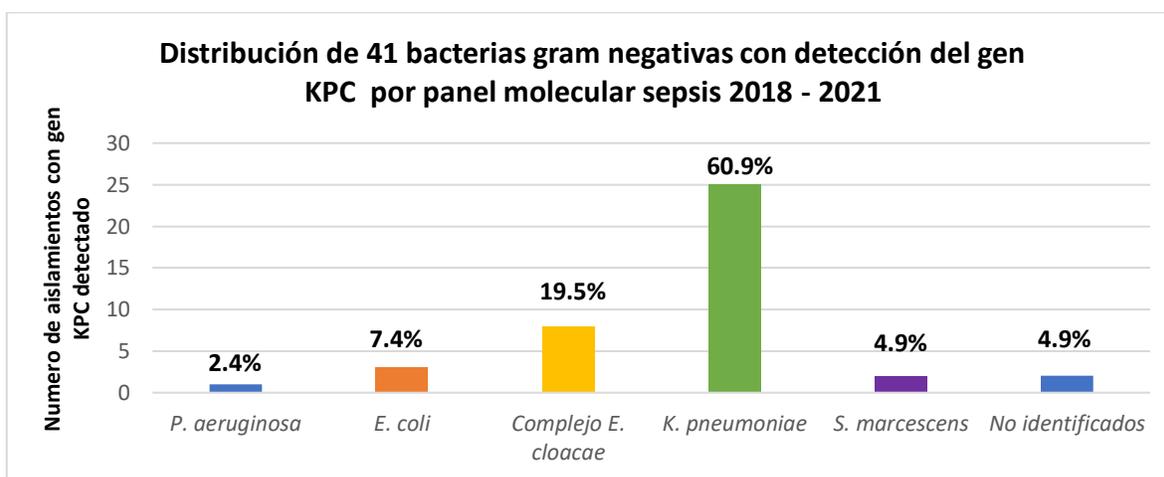


Figura 2. Distribución de 41 bacterias gram negativas con detección del gen KPC por panel molecular sepsis 2018 - 2021

Servicio y Germen identificado	n	%
<b>UCI</b>	<b>25 (n = 41)</b>	<b>61%</b>
<i>K. pneumoniae</i>	17	68%
Complejo <i>E. cloacae</i>	6	24%
<i>S. marcescens</i>	2	8%
<b>Hospitalización</b>	<b>11 (n = 41)</b>	<b>26.8%</b>
<i>K. pneumoniae</i>	5	45.5%
<i>E. coli</i>	3	27.3%
<i>P. aeruginosa</i>	1	9.1%
No identificado	2	18.1%
<b>Urgencias</b>	<b>5 (n = 41)</b>	<b>12.2%</b>
<i>K. pneumoniae</i>	3	60%
Complejo <i>E. cloacae</i>	2	40%

Tabla 1. Distribución de 41 bacterias gram negativas con identificación del gen KPC en los diferentes servicios de la Fundación Cardioinfantil entre 2018 a 2021

Variable	n	%
<b>Sexo</b>	<b>n = 41</b>	<b>%</b>
Femenino	16	39%
Masculino	25	61%
<b>Servicio</b>	<b>n = 41</b>	<b>%</b>
UCI	26	63.4%
Hospitalización	10	24.4%
Urgencias	5	12.2%
<b>Bacteria</b>	<b>n = 41</b>	<b>%</b>
<i>P. aeruginosa</i>	1	2.4%
Complejo <i>E. cloacae</i>	8	19.5%
<i>E. coli</i>	3	7.4%
<i>K. pneumoniae</i>	25	60.9%
<i>S. marcescens</i>	2	4.9%
No identificados	2	4.9%

Tabla 2. Distribución de 41 bacterias gram negativas con identificación del gen KPC en los diferentes servicios de la Fundación Cardioinfantil entre 2018 a 2022.

## 10. Discusión

El presente estudio descriptivo, de corte transversal, recopiló la información de los paneles moleculares sepsis, con detección de bacterias gram negativas y presencia del gen KPC, en un centro de alta complejidad de la ciudad de Bogotá durante un periodo de 4 años. Se recolectó información de un total de 135 paneles que documentaron bacterias gram negativas, dentro de los cuales, 41 (30.3%) detectaron el gen KPC. Dentro de estos aislamientos, 40 pertenecían a la familia de los enterobacteriales y 1 fue identificado como *P. aeruginosa* (29.6% y 0.74% respectivamente del global de aislamientos), siendo este último, el único bacilo gram negativo no fermentador detectado en el estudio.

Estos datos, concuerdan a lo documentado en la epidemiología global con respecto a la familia de los enterobacteriales, sin embargo, contrasta con los datos referentes a *P. aeruginosa*, ya que en esta investigación, se evidenció un menor porcentaje resistencia a carbapenémicos por esta bacteria gram negativa, a lo reportado en la literatura. Lo anterior, se encuentra posiblemente asociado, al enfoque del presente estudio, en el cual se orientó, a detección de resistencia a este grupo de antimicrobianos, por panel de sepsis únicamente (12)(14). Al comparar con la epidemiología Colombiana, el INS mostró de igual manera el predominio de aislamientos de enterobacteriales, y entre ellos, *K. pneumoniae* como el principal gram negativo portador del gen KPC en entidades hospitalarias de nuestro país (17).

La distribución en los servicios de esta institución, documentó que la unidad de cuidados intensivos tuvo la mayor detección de bacterias gram negativas con un 61% de total de gérmenes con presencia del gen KPC. Clásicamente este servicio, ha sido descrito en la literatura como el área donde se encuentra la mayor prevalencia de resistencia a carbapenémicos por mecanismos enzimáticos, dado por la asociación con factores de riesgo ampliamente conocidos como estar críticamente enfermo, requerimiento de dispositivos invasivos (catéter urinario, catéter venoso central, ventilación mecánica invasiva), alta carga de comorbilidades y uso de antimicrobianos de amplio espectro, entre ellos de manera importante el uso de carbapenémicos (21)(22).

Dentro de las bacterias gram negativas, *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC, es uno de los mayores problemas en cuanto a infecciones nosocomiales a nivel global, teniendo en cuenta la morbilidad y mortalidad asociada a infecciones por este germen, que asciende hasta un 52%, y la facilidad de generar brotes, por la rápida diseminación de mecanismos de resistencia, por medio de plásmidos que estas pueden generar (31)(32). Este bacilo gram negativo, fue el germen aislado con mayor frecuencia en la unidad de cuidados intensivos, seguido por el complejo *E. cloacae* (68% y 24% respectivamente), reflejando los datos del INS en su reporte de 2018, donde de igual manera encabezan la lista bacterias portadoras del gen KPC, en infecciones reportadas en los servicios de pacientes críticamente enfermos(17).

Las áreas de hospitalización, continúan siendo escenarios importantes para la aparición de infecciones, por gérmenes resistentes a carbapenémicos, mediados por enzimas. Encontramos diversos factores de riesgo, como hospitalizaciones a repetición, estancias hospitalarias prolongadas, y los ya mencionados, como alta carga de comorbilidades, y uso de antimicrobianos de amplio espectro (22). En este estudio, fue el segundo servicio con mayor detección de bacterias gram negativas KPC positivas, manteniéndose en primer lugar, *K. pneumoniae* con este mecanismo de resistencia, sin embargo, mostro un cambio en la distribución con la aparición de *E. coli* en segundo lugar de detección con el gen KPC (45.5% y 27.3% respectivamente), similar a lo reportado en la epidemiología local (17). Adicionalmente, fue el único servicio donde se encontró *P. aeruginosa* con este gen de resistencia a carbapenémicos. Se debe tener en cuenta que para este bacilo gram negativo no fermentador, portar el gen KPC, no es su principal mecanismo de resistencia enzimático a carbapenémicos, y que el panel molecular utilizado en el presente estudio, carece de identificación de otros genes para metaloenzimas como VIM y NDM, los cuales pueden coexistir, y estar presentes con el gen KPC, y predominar en *P. aeruginosa* (33)(34).

Los paneles moleculares actuales, tiene la limitante de identificar un numero especifico de bacterias, así como genes de resistencia (35). En el servicio de hospitalización, se

identificaron dos enterobacteriales sin determinar su especie, que posteriormente fueron identificados como *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter koseri* por medio de cultivo.

En los servicios de urgencias, las infecciones por gram negativos resistentes a carbapenémicos presenta aun prevalencias bajas, sin embargo creciente. Los factores predominantemente encontrados, son alta carga de comorbilidades, uso reciente de antimicrobianos y hospitalizaciones en el último mes (36). Este trabajo documentó un 12.1% de aislamientos positivos para detección del gen KPC por panel molecular sepsis, distribuidos entre *K. pneumoniae* y complejo *E. cloacae* (60% y 40% respectivamente). En la literatura, se encontró un trabajo local, reportando un mayor porcentaje de aislamientos en los servicios de urgencias. Se debe aclarar de que en dicho estudio, se evaluaron diferentes muestras (orina, sangre, esputo), ante la disponibilidad de métodos moleculares diferentes, con detección de un número mayor de genes de resistencia a carbapenémicos (37).

Las pruebas fenotípicas, para evaluar resistencia a carbapenémicos, son usadas para documentar la presencia de un mecanismo enzimático (test de hodge), sin embargo, no permiten especificar el tipo de enzima involucrada, pero si, orientar el grupo enzimático involucrado (ácido borónico: serincarbapenemasas como KPC y OXA. EDTA: metaloenzimas como NDM y VIM). En los paneles que detectaron el gen KPC, solo se encontró un 39% de pruebas fenotípicas realizadas. El test de hodge y ácido borónico, tuvieron una concordancia del 93.8% con la prueba molecular. Ningún aislamiento tuvo positividad para EDTA. Un aislamiento de *K. pneumoniae*, fue positivo para test de hodge, con negatividad para ácido borónico, y el único aislamiento de *C. koseri*, presento test de hodge negativo, y ácido borónico positivo, lo cual es esperable ante la sensibilidad variable reportada en la literatura de estas dos pruebas (72 al 100% y 92 al 95% respectivamente) (38).

### Limitaciones:

El presente trabajo, es un estudio descriptivo, de corte transversal, realizado con panel molecular sepsis, que tiene como único gen para detección de carbapenemasas, el gen KPC. Si bien en la actualidad, es la enzima más prevalente a nivel mundial en relación con resistencia a carbapenémicos, es importante destacar, la creciente prevalencia de otras enzimas que hidrolizan este mismo grupo de antibióticos, que no se logran identificar por este medio diagnóstico, limitando la exploración de diferentes mecanismos enzimáticos al descrito en este trabajo (13).

Por otro lado, esta investigación se limita el escenario de bacteriemias, sin que se pueda explorar otros procesos infecciosos como neumonía, ante ausencia de métodos moleculares dirigidos a este foco infeccioso, el cual podría ampliar la información sobre el gen KPC en otros sistemas.

Finalmente, Al ser una investigación de un solo centro de cuarto nivel, refleja una parte de la epidemiología molecular, de las bacteriemias de esta institución únicamente, lo cual limita la información descrita, a un uso exclusivo de esta entidad.

## 11. Conclusiones

Dado la morbilidad y mortalidad asociada a infecciones por bacterias resistentes a carbapenémicos, el conocimiento de la epidemiología local en relación a gérmenes y patrones de resistencia, hacen parte fundamental para el direccionamiento de los lineamientos y políticas institucionales sobre uso racional de antimicrobianos (8). La presencia del gen KPC, en esta investigación, se detectó en el 30.3% del total de los paneles moleculares sepsis, que detectaron bacterias gram negativas, durante los 4 años estudiados. El principal germen documentado, fue *K. pneumoniae*, manteniéndose como la bacteria gram negativa portadora de este gen, predominante en los tres servicios evaluados (UCI, hospitalización y urgencias). La anterior información, coincide con los datos reportados en diversos trabajos, donde *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC, continua siendo el germen resistente a carbapenémicos, más prevalente a nivel mundial y en Colombia (13)(17).

Las pruebas fenotípicas, específicamente el test de hodge y ácido borónico, tuvieron una concordancia del 93.8% con la prueba molecular, porcentajes esperados, ante la posibilidad de falsos negativos, y sensibilidad de estas pruebas reportada en la literatura (38).

## 12. Referencias

1. Bush K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. Vol. 62, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018. p. 1–20.
2. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440–58.
3. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Resultados de vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana. *Biomedica*. 2017;37:473–85.
4. Teo J, Cai Y, Lim T-P, Tan T, Kwa A. Carbapenem Resistance in Gram-Negative Bacteria: The Not-So-Little Problem in the Little Red Dot. *Microorganisms*. 2016;4(1):13.
5. salme, Timmusk. Efficacy of ceftazidime-avibactam plus aztreonam in patients with bloodstream infections caused by MBL- producing Enterobacterales. *Front Plant Sci*. 2012;0954162(478):1–4.
6. Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance: An Update for the Practicing Clinician. *Mayo Clin Proc [Internet]*. 2015;90(3):395–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.12.002>
7. Falcone M, Bassetti M, Tiseo G, Giordano C, Nencini E, Russo A, et al. Time to appropriate antibiotic therapy is a predictor of outcome in patients with bloodstream infection caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Crit Care*. 2020;24(1):1–12.
8. Villegas MV, Jiménez A, Esparza G, Appel TM. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: A diagnostic, epidemiological and therapeutic challenge. *Infectio*. 2019;23(4):388–98.
9. Vasiliki Tsolaki, a Konstantinos Mantzarlis, a Athanasios Mpakalis, a Ergina Malli, b Fotios Tsimpoukas, c Athanasia Tsirogianni, c Constantinos Papagiannitsis, b Paris

- Zygoulis, a Maria-Eirini Papadonta, a Efthimia Petinaki, b Demosthenes Makris a  
EZ. crossm Ceftazidime-Avibactam To Treat Life-Threatening Infections by  
Carbapenem-Resistant Pathogens in Critically Ill Mechanically. 2020;64(3):1–11.
10. Yee R, Dien Bard J, Simner PJ. The Genotype to Phenotype Dilemma: How Should Laboratories Approach Discordant Susceptibility Results? *J Clin Microbiol*. 2021;(January).
  11. 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):S28–36.
  12. Zhu Y, Huang WE, Yang Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Infect Drug Resist*. 2022;15(March):735–46.
  13. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017;50(2):127–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.012>
  14. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;609–16.
  15. Lynch JP, Zhanel GG, Clark NM. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options. *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38(3):311–25.
  16. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics*. 2019;8(2).
  17. INS. Informe De Resultados De La Vigilancia Por Laboratorio De Resistencia Antimicrobiana En Infecciones Asociadas a La Atención En Salud (Iaas) 2018 Dirección. *Epidemiol las Infec Asoc a la atención en salud*. 2019;29–44.
  18. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2880–2.

19. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1553–5.
20. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- $\beta$ -lactamases: Structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(10):1–20.
21. Rojo V, Vázquez P, Reyes S, Fuertes LP, Cervero M. Risk factors and clinical evolution of carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae* infections in a university hospital in Spain. Case-control study. *Rev Esp Quimioter*. 2018;31(5):427–34.
22. Friedman ND, Carmeli Y, Walton AL, Schwaber MJ. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: A strategic roadmap for infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(5):580–94.
23. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015;5(1).
24. Sze DTT, Lau CCY, Chan TM, Ma ESK, Tang BSF. Comparison of novel rapid diagnostic of blood culture identification and antimicrobial susceptibility testing by Accelerate Pheno system and BioFire FilmArray Blood Culture Identification and BioFire FilmArray Blood Culture Identification 2 panels. *BMC Microbiol* [Internet]. 2021;21(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02403-y>
25. Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, DesJarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):687–98.
26. Schneider JG, Wood JB, Schmitt BH, Emery CL, Davis TE, Smith NW, et al. Susceptibility Provision Enhances Effective De-escalation (SPEED): Utilizing rapid phenotypic susceptibility testing in Gram-negative bloodstream infections and its potential clinical impact. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74:I16–23.

27. Bassetti M, Peghin M. How to manage KPC infections. *Ther Adv Infect Dis*. 2020;7:1–12.
28. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis*. 2006;42(SUPPL. 2):82–9.
29. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013 Sep 22;310(20):2191–4.
30. Ministerio de salud. RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993. Ministerio de salud. 1993;1–19.
31. Sotgiu G, Are BM, Pesapane L, Palmieri A, Muresu N, Cossu A, et al. Nosocomial transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Italian university hospital: a molecular epidemiological study. *J Hosp Infect* [Internet]. 2018;99(4):413–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.033>
32. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ, Sotgiu G, Are BM, et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2018;53(4):413–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.033>
33. Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Holger D, Rebold N, Rybak MJ. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis Ther* [Internet]. 2022;11(2):661–82. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00591-2>
34. Esparza G. Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenemicos en Colombia: un desafío continuo al sistema de salud. *Infectio*. 2020;24(2):55–6.
35. Marco F. Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(9):586–92.
36. Salomão MC, Guimarães T, Duailibi DF, Perondi MBM, Letaif LSH, Montal AC, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in patients admitted to the emergency department: prevalence, risk factors, and acquisition rate. *J Hosp Infect*.

2017;97(3):241–6.

37. Remolina S, Escobar C. DESCRIPCIÓN DE TIPOS DE CARBAPENEMASAS EXPRESADAS EN *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* EN HOSPITALES DE TERCER NIVEL DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ, ESTUDIO DESCRIPTIVO. Univ Nac Colomb. 2018;
38. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2018;56(11):1–13.