



ACTIVIDAD *In vitro* DE DORIPENEM FRENTE A BACTERIAS GRAM NEGATIVAS  
CAUSANTES DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
SAN IGNACIO

LAURA ANGÉLICA NIÑO ANDRADE

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Bacteriología  
Bogotá, D.C.  
Abril de 2010



ACTIVIDAD *In vitro* DE DORIPENEM FRENTE A BACTERIAS GRAM NEGATIVAS  
CAUSANTES DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
SAN IGNACIO

LAURA ANGÉLICA NIÑO ANDRADE

TRABAJO DE GRADO  
Para optar por el título de  
Bacterióloga

---

CARLOS ARTURO ÁLVAREZ MORENO  
MD; Msc; DTM&H  
Director

---

LISBETH TERESA CASTRO GUTIÉRREZ  
Bacterióloga Msc  
Codirectora

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Bacteriología  
Bogotá, D.C.  
Abril de 2010



ACTIVIDAD *In vitro* DE DORIPENEM FRENTE A BACTERIAS GRAM NEGATIVAS  
CAUSANTES DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
SAN IGNACIO

LAURA ANGÉLICA NIÑO ANDRADE

---

CARLOS ARTURO ÁLVAREZ MORENO  
MD; Msc; DTM&H  
Director

---

LISBETH TERESA CASTRO GUTIÉRREZ  
Bacterióloga Msc  
Codirectora

---

MARILYN ELISEYEV HILDALGO DÍAZ  
Bacterióloga Msc; PhD  
Evaluadora

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Bacteriología  
Bogotá, D.C.  
Abril de 2010



ACTIVIDAD *In vitro* DE DORIPENEM FRENTE A BACTERIAS GRAM NEGATIVAS  
CAUSANTES DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
SAN IGNACIO

LAURA ANGÉLICA NIÑO ANDRADE

APROBADO

---

INGRID SCHULER GARCÍA Msc; PhD LUZ AMPARO MALDONADO Msc  
Decana Académica Facultad de Ciencias                      Directora Carrera Bacteriología

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Bacteriología  
Bogotá, D.C.  
Abril de 2010

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

*“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.*

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946.

## RESUMEN

La emergencia y rápida diseminación de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), producidas por algunos aislamientos de *Enterobacteriaceae*, han hecho que cefalosporinas de espectro extendido, y combinaciones de  $\beta$ -lactámicos más inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, sean menos efectivos. Este escenario ha requerido el uso de carbapenémicos para el tratamiento de infecciones causadas por tales microorganismos. En este estudio, la actividad *in vitro* de doripenem, y otros carbapenémicos como meropenem, fue evaluada y comparada frente a aislamientos de bacterias Gram negativas productoras de BLEE y KPC, provenientes de pacientes con infecciones intrahospitalarias. Se obtuvo un total de 50 aislamientos en un período de cuatro meses en el Hospital Universitario San Ignacio, a los cuales se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión de disco, y la concentración mínima inhibitoria (CIM) utilizando el método de gradiente de difusión *E-test*, siguiendo las recomendaciones y criterios interpretativos de acuerdo a lo recomendado por el CLSI y la FDA para meropenem y doripenem respectivamente. En general estos dos carbapenémicos tienen un espectro de actividad similar; no obstante, doripenem mostró una mejor actividad, con valores de CIM más bajos con respecto a meropenem, contra los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE (CIMs 0.023-0.5 ug/mL), y *Pseudomonas aeruginosa* (0.19-2 ug/mL), mientras que fue menos activo contra los aislamientos productores de KPC de *Klebsiella pneumoniae* (CIMs 1.5->64 ug/mL).

Los resultados presentados en este estudio, podrían justificar que doripenem sea considerado como una alternativa o para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas productoras de BLEE, frecuentemente involucradas en procesos intrahospitalarios.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de los altos niveles de control y atención hospitalaria que hay en la actualidad, las infecciones intrahospitalarias siguen siendo un problema de Salud Pública de gran impacto económico y social, consecuencia del aumento del número de servicios médicos y la complejidad de estos, la introducción de técnicas invasivas necesarias para el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías, la mayor utilización de las unidades de cuidados intensivos, el uso extensivo de fármacos inmunosupresores, entre otros. (Bennett, 1982). El uso frecuente de agentes antimicrobianos cada vez más potentes para prevenir o tratar dichas infecciones, favorecen el surgimiento de cepas multirresistentes a los antimicrobianos, incluso cuando son utilizados apropiadamente (Ferro *et al.*, 1998; Swartz, 1994; Paterson, 2002; Lasso, 2003).

Sin duda, uno de los grandes retos terapéuticos actuales de las infecciones complicadas, no sólo intrahospitalarias sino de la comunidad, no sólo es su curación sino minimizar el impacto de la resistencia. En algunos casos infortunadamente no hay opciones terapéuticas adecuadas.

Por todo lo anterior y por la necesidad de establecer nuevas alternativas para el manejo de infecciones severas causadas por patógenos de manejo complicado, las industrias farmacéuticas productoras de antibióticos se encuentran en constante investigación y desarrollo de nuevas moléculas que sean capaces de tratar dichos microorganismos. Es el caso de doripenem, carbapenémico de amplio espectro que está indicado en infecciones severas respiratorias, intrabdominales y urinarias complicadas, entre otras.

El objetivo de este trabajo es precisamente, evaluar la actividad *in vitro* de este nuevo antibiótico carbapenémico, doripenem, en bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)), aisladas a partir de infecciones intrahospitalarias en pacientes del Hospital Universitario San Ignacio.

## MARCO TEÓRICO

Una infección nosocomial o intrahospitalaria puede definirse como: una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado. Comprende las infecciones contraídas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento. Estas infecciones ocurren entre 48 a 72 horas después del internado (Benenson, 1995).

Esta complicación no deseada del proceso asistencial agrava el pronóstico del paciente. Constituye un grave problema de salud pública, pues ocasiona una morbilidad importante y puede provocar en última instancia, directa o indirectamente la muerte del paciente (Hernández, 2001); Aunado a esto, las complicaciones infecciosas entrañan sobrecostos ligados a la prolongación de la estadía hospitalaria, están asociadas también con los antibióticos costosos, las reintervenciones quirúrgicas, sin contar con los costos sociales dados por pérdidas de salarios, de producción, etc (Bruin, 1994).

Además, las infecciones intrahospitalarias son un indicador que mide la calidad de los servicios prestados. Actualmente la eficiencia de un hospital no solo se mide por los índices de mortalidad y aprovechamiento del recurso cama, sino también se toma en cuenta el índice de infecciones hospitalarias (MINSAP, 1998).

A medida que han ido transcurriendo los años, se observa el carácter creciente de las infecciones intrahospitalarias. De acuerdo con estudios realizados por los *Centers for Diseases Control* (CDC) de Atlanta, se determinó que la infección nosocomial afecta en promedio 5 de cada 100 pacientes que egresan de los hospitales del mundo (CDC, 1991.).

En estudios de la *Organización Mundial de la Salud* (OMS), y en otros se ha demostrado que la máxima prevalencia de infecciones intrahospitalarias ocurre en unidades de cuidados intensivos (UCI) y en pabellones quirúrgicos de atención de enfermedades agudas (OMS, 2005; Garner *et al.*, 1988). En los países industrializados, las infecciones intrahospitalarias se producen en un 2 a 12% de los pacientes hospitalizados, con tasas de infección nosocomial en la UCI, que van desde 7.7% hasta 16.5%; mucho más bajas, en comparación con el estudio retrospectivo realizado en China entre 2003 y el 2007, en el cual, la tasa de infección nosocomial fue del 26.8% (Richards *et al.*, 1999; Dettenkofer *et al.*, 1999; Ding *et al.*,

2009.), cifra que también superó la tasa de 14.7%, observada en 55 UCIs de países sudamericanos (Rosenthal *et al.*, 2006.), y la tasa de 12% de infección nosocomial en nueve hospitales colombianos reportada en estudio realizado por Álvarez *et al.*, en el 2006.

Por otro lado, se afirma que en casi todos los hospitales del mundo la mayor parte de los casos de infección nosocomial e infección complicada, la constituye la infección del tracto urinario hasta con un 40%, con el 80% asociado a catéter, y el microorganismo más frecuentemente implicado es la enterobacteria *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, aunque también se han aislado *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, y otras *Enterobacteriaceae* como *Citrobacter spp* y *Serratia spp* (Esposito *et al.*, 2008.); sin embargo la neumonía es la principal causa de infección nosocomial en la UCI, y ocurre (en más del 90% de los casos, en pacientes que han sido sometidos a intubación endotraqueal y ventilación mecánica.) (Durán *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009).

Uno de los más grandes retos para el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias y complicadas es la resistencia bacteriana a antimicrobianos, y a pesar de las medidas destinadas a limitar la aparición y la propagación de bacterias resistentes a los antimicrobianos, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus* resistentes a la vancomicina y diversos bacilos Gram negativos, *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, la recuperación de estos patógenos sigue aumentando rápidamente (NNISS, 2003; Webb, 2005.), debido a que estos microorganismos, se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y son capaces de sobrevivir en el ambiente hospitalario: infusiones, agua destilada, soluciones salinas, tubuladuras, superficies húmedas, humidificadores, incubadoras, nebulizadores, catéteres y aún en soluciones desinfectantes (Von Graevenitz, 1985.); y se transmiten al paciente a través del personal sanitario, las visitas, el equipamiento sanitario, dispositivos médicos, u otros enfermos, en cuyo caso se denominan infecciones cruzadas (López *et al.*, 2002.); igualmente, es importante señalar que estos microorganismos resistentes coexisten con la microbiota habitual en piel, vías respiratorias, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, y generalmente son seleccionados como resultado de una presión antimicrobiana y pueden llegar a transformarse en microbiota dominante. Estos eventos de colonización durante varias hospitalizaciones son un escenario mucho más común que la resistencia por mutaciones *de novo*. Los cambios en el sistema inmunológico del hospedero debido a edades extremas, estrés, desnutrición, padecimientos crónicos, estados de

inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, procedimientos invasivos y heridas quirúrgicas pueden favorecer el sobrecrecimiento bacteriano o la introducción de bacterias hacia sitios estériles, y así mismo todos estos constituyen factores de riesgo que conducen consecuentemente al difícil control de estas infecciones (Ludsky *et al.*, 2002; Toltzis y Blumer, 2001.).

### **Antibióticos $\beta$ -lactámicos**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la biosíntesis de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Ejercen su efecto antimicrobiano uniéndose covalentemente a los residuos de serina del sitio activo de la penicilil serina transferasa (transpeptidasa). La enzima resultante acil modificada covalentemente es inactiva durante la división celular, inhibiendo así el entrecruzamiento de los peptidoglicanos causando la muerte celular (Goffin y Ghuyesen, 1998; Massova y Mobashery, 1998). Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones clásicas, las cefalosporinas lo son en la profilaxis quirúrgica y en infecciones comunitarias graves, los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas permiten el uso eficaz de las amino y ureido penicilinas en infecciones de gran relevancia y, los carbapenémicos en infecciones intrahospitalarias mixtas y por bacterias multirresistentes (Marín y Gudiol, 2003.); estos últimos son antibióticos  $\beta$ -lactámicos derivados de la tienamicina, un producto del metabolismo del microorganismo *Streptomyces cattleya*. Al igual que las penicilinas poseen el anillo  $\beta$ -lactámico heterocíclico con tres átomos de carbono y uno de nitrógeno (el cual proporciona afinidad por la PBPs), unido al anillo de tiazolidina, que difiere de las penicilinas por tener un átomo de carbono que sustituye al azufre en posición 1, y entre las posiciones 2 y 3 presenta un enlace insaturado, este es el anillo carbapenémico que aumenta el espectro de actividad y aumenta la potencia (Zhanel *et al.*, 2007.).

El primer representante de los carbapenémicos fue la tienamicina con gran actividad antimicrobiana, pero químicamente inestable; luego en el año 1985, se desarrolló imipenem

(Figura 1) un derivado estable de la tienamicina, al igual que la molécula madre, es de amplio espectro, pero presenta un elevado metabolismo renal, el imipenem es susceptible a la degradación de la enzima dehidropeptidasa-1 (DHP-1), la cual se localiza en la superficie luminal de las células del túbulo contorneado proximal, dando lugar a una escasa eliminación urinaria del carbapenémico y formación de productos nefrotóxicos. Para resolver este inconveniente, imipenem requiere la co-administración de cilastatina, el cual es un inhibidor de la DHP-1, esto permite un aumento en la concentración plasmática y aumento en su vida media (Kahan *et al.*, 1983; Zhanel *et al.*, 2007.). Imipenem, muestra elevada afinidad por las PBP-2 y PBP-4 de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, también muestra apreciable afinidad hacia las transpeptidasas PBP-1a y PBP-1b (dos de las proteínas de soporte de la pared bacteriana); y hacia las carboxipeptidasas PBP-4 y 5 (Hashizume, *et al.*, 1984.)

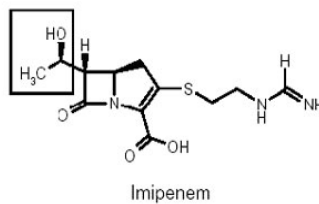


Figura 1. Estructura química imipenem

Posteriormente se desarrolló meropenem, el cual se administra sin necesidad de inhibidor enzimático, ya que es estable a la DHP-1, debido a la introducción del grupo metilo en la posición 1 (Figura 2.) (Wiseman *et al.*, 1995.). Meropenem se une a varias de las PBPs en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, teniendo una gran afinidad hacia las PBP-1a, PBP-1b, PBP-2, PBP-3 (a diferencia del imipenem que tiene una baja afinidad hacia esta última), PBP 4 y 5; además muestra afinidad a PBP 1, 2 y 4 de *Staphylococcus aureus*.

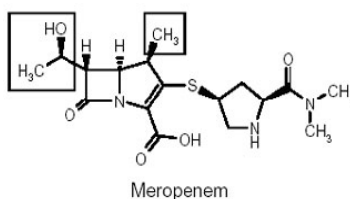


Figura 2. Estructura química meropenem

Estos dos carbapenémicos son activos contra bacilos Gram negativos no fermentadores (*Acinetobacter spp*, *Pseudomonas spp*), y especies de *Enterococcus*, aunque meropenem es mucho más activo contra el género *Enterobacteriaceae* (Wiseman *et al.*, 1995; Edwards, 1995.).

En el año 2001, aparece ertapenem, el cual tampoco necesita del inhibidor enzimático, gracias al grupo metilo, además posee una cadena lateral con benzoato lo cual modifica la carga molecular, aumentando la unión a proteínas plasmáticas alargando su vida media, y esto permite que solo sea administrado una vez al día (Figura 3.). Este carbapenémico, indicado en infecciones adquiridas en comunidad, tiene actividad limitada contra bacilos Gram negativos no fermentadores (Shah e Isaacs, 2003; Cunha, 2002.). Por esto, ertapenem no debe usarse empíricamente en infecciones intrahospitalarias, neumonía asociada a ventilación mecánica o infecciones adquiridas en unidades de cuidados intensivos, debiendo esperar resultados microbiológicos para su uso en estos casos (Morales, 2003.). Al igual que meropenem, muestra afinidad hacia las PBPs 1a, 1b, 2, 3, 4 y 5 en *Escherichia coli*, con especial preferencia por las PBPs 2 y 3 (Motyl *et al.*, 2003.).

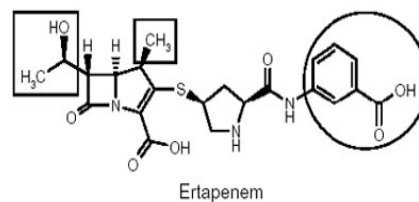


Figura 3. Estructura química ertapenem

Doripenem (Figura 4), es un antibiótico parenteral de amplio espectro, de efecto bactericida, que inactiva múltiples proteínas esenciales de unión de la penicilina PBPs, similar a otros carbapenémicos como meropenem y ertapenem. Doripenem en bacterias Gram negativas (al igual que otros carbapenémicos), muestra afinidad por la PBP 2 y 4 tanto en *Escherichia coli* como en *Pseudomonas aeruginosa*. En este último microorganismo, existe también una unión relevante a la PBP 3 (Keam, 2008).

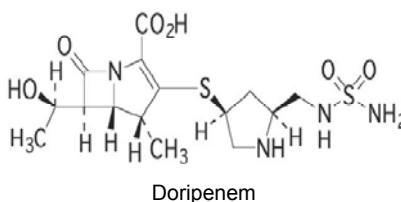


Figura 4. Estructura química doripenem

Doripenem es activo contra los patógenos más relevantes asociados con neumonía nosocomial, incluyendo *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (SAMS), familia *Enterobacteriaceae* (p. ej., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter spp.*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Walsh, 2007). Doripenem es activo contra los patógenos prevalentes, productores

de infecciones complicadas urinarias e infecciones intrabdominales complicadas, incluyendo *Escherichia coli* y otras *Enterobacteriaceae* (Mushtaq y Livermore, 2004), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus fragilis* susceptibles a ampicilina. La actividad adicional *in vitro* de doripenem incluye a los estreptococos (incluyendo a *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina), *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria spp.*, *Bordetella spp.*, y un amplio rango de anaerobios que incluyen *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Clostridium spp.*, y otros anaerobios Gram positivos. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs), a las cuales se inhibe el 90% de las cepas probadas (CIM<sub>90</sub>) son generalmente  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  para las especies anteriores (Credito, 2008). Doripenem al igual que otros carbapenémicos no es activo *in vitro* contra estafilococos resistentes a meticilina (SAMR), el *Enterococcus faecalis* resistente a ampicilina. También es inactivo contra la mayoría de *Enterococcus faecium*, *Corynebacterium spp.*, y *Stenotrophomonas maltophilia*. La CIM<sub>90</sub> del doripenem para estos organismos es  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ . Doripenem es estable a la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas, incluyendo a las penicilinasas, cefalosporinasas y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC (Keam, 2008); de esta forma doripenem conserva la actividad contra la mayoría de bacilos Gram negativos resistentes a cefalosporinas. Tal como otros carbapenémicos, doripenem es inestable contra algunas enzimas como las metalo- $\beta$ -lactamasas producidas por *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas aeruginosa*, y carbapenemasas del tipo KPC producida por *Klebsiella pneumoniae*. La potencia antimicrobiana *in vitro* de doripenem, se compara favorablemente con la de otros carbapenémicos. Contra las bacterias Gram negativas, doripenem es similar a meropenem, y similar o más activo que imipenem y ertapenem. Contra las bacterias Gram positivas, doripenem es ligeramente menos activo que imipenem, pero más activo que meropenem y ertapenem. Doripenem es generalmente de 2 a 4 veces más potente contra los aislamientos de *Pseudomonas*, que imipenem o meropenem (Mushtaq y Livermore, 2004). Doripenem exhibe una actividad bactericida dependiente del tiempo contra los patógenos comunes como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*. Se observó un persistente efecto post-antibiótico (EPA) *in vivo* e *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además *in vitro* doripenem demuestra sinergia con agentes antibacterianos glicopeptídicos (p. ej., vancomicina, teicoplanina) contra el SAMS. Junto con su actividad *in vitro*, doripenem ha demostrado ser muy efectivo en diversos modelos animales de infección bacteriana, incluyendo modelos de neumonía y sepsis en ratones y un modelo de peritonitis, en el cual fue efectivo tanto contra infecciones bacterianas Gram positivas como Gram negativas (Keam, 2008).

Las diferencias fundamentales entre los distintos carbapenémicos dependen de las cadenas laterales C2 y C6. Todos los carbapenémicos en C6 poseen la misma cadena lateral hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo  $\beta$ -lactámico, dándole estabilidad frente a las  $\beta$ -lactamasas, la configuración estereoquímica de la cadena lateral en C2 incrementa la actividad frente a Gram negativos como *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Zhan et al., 2007.).

Los carbapenémicos sólo carecen de actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), *Enterococcus* resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y son poco activos frente a *Clostridium difficile* (Marin et al., 2003.), sin embargo, han sido los antibióticos de mayor actividad, evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana.

### **Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana**

De manera particular la resistencia múltiple a  $\beta$ -lactámicos en microorganismos Gram negativos, como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, es producto de una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de ellos inherentes a la especie (resistencia natural o intrínseca), y otros adquiridos (resistencia adquirida por plásmidos o transposones), que finalmente se manifiestan como resistencia a una amplia gama de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Suarez et al., 2006.), lo cual ocasiona que la utilidad de estos se vea reducida; y ha conducido a que periódicamente se tengan que modificar los esquemas de tratamiento en función de la resistencia bacteriana local de cada hospital (Warren y Fraser, 2001; Drusano, 2003.).

Los mecanismos de resistencia más importantes que las bacterias Gram negativas poseen, que impiden de una u otra manera que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos puedan alcanzar su sitio de acción y ejercer su acción son:

- 1. Hidrólisis Enzimática del Antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad. Las Beta-lactamasas son las más prevalentes (Livermore, 1995. Tafur, 2008.).
- 2. Bombas de Expulsión:** bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizan bombas de membrana de tres componentes para exportar del espacio periplásmico al exterior, toxinas y pequeños productos químicos nocivos, incluyendo drogas antimicrobianas. Por lo tanto, son fundamentales tanto para

la resistencia a múltiples fármacos, como para la patogenicidad (Higgins *et al.*, 2004; Vila *et al.*, 2007. Tafur, 2008.).

3. **Cambios en la Permeabilidad de la Membrana:** las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Vila *et al.*, 2007; Tafur, 2008.).
4. **Modificación del Sitio Blanco:** las proteínas esenciales de unión de la penicilina PBPs, las cuales son el sitio blanco de todos los  $\beta$ -lactámicos, pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por el antimicrobiano, pero no afectan su actividad. Aunque, este no es un mecanismo de resistencia común entre los Gram negativos, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años (Vila y Marco, 2002; Tafur, 2008.).

## 1. Hidrólisis Enzimática del Antibiótico

**$\beta$ -lactamasas:** las enzimas responsables de proporcionar resistencia contra los antibióticos anteriormente mencionados, son las  $\beta$ -lactamasas que destruyen el anillo  $\beta$ -lactámico de grupos de antibióticos como penicilinas y cefalosporinas (Cohen, 1992; Neu, 1992.), hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporánico, produciendo derivados ácidos, sin propiedades antibacterianas (Ambler, 1980.). Las  $\beta$ -lactamasas son ubicuas de las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones (Tafur, 2008).

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican de acuerdo a dos esquemas: la clasificación molecular de Ambler y la clasificación funcional de Bush, Jacoby y Madeiros (Ambler *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1995.). La clasificación de Ambler divide las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D), la cual se basa en la homología de las proteínas (similitud en la secuencia de aminoácidos). Las clases A, C y D poseen serina en su centro activo, que reacciona con el anillo  $\beta$ -lactámico, abriéndolo irreversiblemente e inactivando el antibiótico; mientras que las enzimas de clase B o metalo- $\beta$ -

lactamasas contienen zinc en su centro activo el cual reacciona con el grupo carbonil del enlace amida del  $\beta$ -lactámico inactivándolo.

El esquema de clasificación de las  $\beta$ -lactamasas, de Bush, Jacoby y Madeiros, también consta de cuatro grupos y diversos subgrupos, y se basa en las características funcionales, teniendo en cuenta distintos criterios como las propiedades bioquímicas (peso molecular, secuencia de nucleótidos), propiedades físicas (punto isoeléctrico), el espectro de hidrólisis, el espectro de inhibición, la codificación (plásmidica o cromosómica). Esta clasificación es mucho más importante en el diagnóstico microbiológico de laboratorio ya que considera los substratos y los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas clínicamente relevantes (Paterson y Bonomo, 2005).

Debido a que el mecanismo de resistencia más prevalente en las bacterias Gram negativas a los antibióticos es la producción de  $\beta$ -lactamasas, es importante mencionar las más prevalentes  $\beta$ -lactamasas involucradas en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos:

**$\beta$ -lactamasas tipo AmpC:** estas enzimas generalmente llamadas cefalosporinasas, pertenecientes a la clase C de la clasificación Ambler, y al grupo 1 de la clasificación Bush, Jacoby y Madeiros, 1995, se han encontrado codificadas en gran variedad de bacterias Gram Negativas como *Aeromonas spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, y *Serratia spp.* También se ha encontrado AmpC mediada por plásmidos en *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.*, especies que no tienen naturalmente expresión de AmpC cromosómico (Jacoby y Muñoz, 2005; Philippon *et al.*, 2002).

Las bacterias con AmpC cromosómico, bajo condiciones normales producen esta enzima en bajas cantidades sin alterar significativamente la sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo algunas bacterias como *Escherichia coli*, pueden incrementar de forma constitutiva la síntesis de AmpC, y según su grado de expresión, median la resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación (incluido ceftioxitán), algunas cefalosporinas de tercera generación como ceftazidime, aztreonam e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (Livermore 1995; Hanson y Sanders, 1999).

Las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenémicos; sin embargo, las bacterias que porten genes *ampC* en plásmidos producen la enzima de forma constitutiva y en gran cantidad (Philippon *et al.*, 2002). En estas bacterias, la producción excesiva de enzima,

asociada a defectos de permeabilidad (pérdida de porinas), o la expresión exagerada de bombas de eflujo, conllevan a que el antibiótico se halle en baja cantidad en el espacio periplasmático, lo cual permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se desarrolle resistencia a los carbapenémicos (Livermore y Woodford, 2006; Rahal, 2008; Jacoby, 2009.). ACT-1, CMY-4 y ACC-1 son algunas de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC presentes en plásmidos que se han identificado en Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (Bradford *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2000; Bidet *et al.*, 2005.).

La expresión de  $\beta$ -lactamasa cromosómica en otras Enterobacterias como *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella spp.*, y *Pseudomonas aeruginosa*, es de carácter inducible (Lindquist *et al.*, 1989.). En este proceso de inducción, sólo se sintetiza la enzima cuando la bacteria está en presencia del antibiótico inductor, y es un fenómeno reversible, que desaparece cuando el antibiótico no está presente (Bennett y Chopra, 1993). Pero también en este grupo de bacterias, se puede producir el fenómeno de desrepresión, que de igual forma, incrementa la cantidad de  $\beta$ -lactamasa, pero a diferencia de la inducción, la desrepresión no es irreversible, no desaparece cuando la bacteria no está en presencia del antibiótico, sino que se seleccionan mutantes establemente desreprimidos, que sobreexpresan la enzima. Desde el punto de vista clínico, el fenómeno de desrepresión, puede suponer el fracaso terapéutico, que puede desarrollarse durante el tratamiento con  $\beta$ -lactámicos (Livermore, 1995.).

La expresión de AmpC es un mecanismo complejo. La interrupción de la biosíntesis de mureína por un agente  $\beta$ -lactámico, conduce a la acumulación de péptidos y oligopéptidos derivados de *N*-acetilglucosamina y el ácido *N*-acetilmurámico, estos productos de degradación de la pared bacteriana activan a la proteína AmpR, y esta induce la producción de AmpC. Para evitar la sobreproducción de la  $\beta$ -lactamasa, la célula tiene una amidasa en el citoplasma, llamada AmpD, la cual se encarga de eliminar los productos de degradación, para reducir su acumulación en el citoplasma, y así prevenir la generación constitutiva de AmpC.

La causa más común de la sobreexpresión de AmpC, en aislamientos clínicos, es la mutación en el gen *ampD*. Las mutaciones en las proteínas AmpR, y AmpG, son menos comunes, pero también conducen a la sobreexpresión de la  $\beta$ -lactamasa. AmpG, es una permeasa de la membrana interna, involucrada en el transporte de oligopéptidos, reciclaje de la pared celular, la síntesis de peptidoglucano a partir de los productos de degradación, y la regulación AmpC en el citosol (Jacoby, 2009; Suarez *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 1997).

**$\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE):** las BLEE han sido reportadas en gran variedad de especies de bacterias Gram negativas; los microorganismos frecuentemente implicados son *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli*, sin embargo, se han descrito en otros géneros de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*, las BLEE se han incluido en la clase A de la clasificación Ambler y el grupo 2be de la clasificación Bush, Jacoby y Madeiros, 1995, se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación, pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam, lo que las diferencia de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC. La mayoría de BLEE identificadas hasta el momento, han sido del tipo SHV y TEM, que han evolucionado a partir de las  $\beta$ -lactamasas plásmidicas clásicas como TEM-1, TEM-2 y SHV- (Bradford, 2001; Pitout et al., 2005.). Debido a mutaciones en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. Usualmente las BLEE tipo TEM y SHV hidrolizan a ceftazidime con mayor eficiencia que a ceftriazona o cefotaxime (Paterson et al., 2003; Paterson y Bonomo, 2005).

**TEM:** La expresión de  $\beta$ -lactamasa TEM-1 es el mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos más común en bacterias Gram negativas. La resistencia a ampicilina en *Escherichia coli*, es en un 90% debido a esta  $\beta$ -lactamasa plásmidica (Du Bois et al, 1995; Paterson y Bonomo, 2005). El gen responsable se localiza en un transposón cuya transposición hace que este gen se haya descrito en otras especies bacterianas como *Vibrio spp.*, y *Neisseria gonorrhoeae*.

TEM-2 es la primera enzima derivada de TEM-1, presenta una sustitución de glutamina en la posición 39 a lisina respecto a la secuencia de TEM-1, esto genera un cambio del punto isoelectrico de 5.4 en TEM-1 a 5.6 en TEM-2, pero no modifica el perfil del sustrato. Estas son mutaciones en puntos alejados del centro activo (Jacoby y Madeiros, 1991; Barthélémy et al., 1985.).

Las sustituciones en los aminoácidos que ocurren en la secuencia de la enzima TEM se producen en un número limitado de posiciones. La combinación de estos cambios de aminoácidos produce la aparición de los fenotipos BLEE, tales como la capacidad de hidrolizar ceftazidime y cefotaxime. La presión ejercida por el uso de cefalosporinas hace que se vayan seleccionando nuevas enzimas, como consecuencia de segundas, terceras y cuartas mutaciones en la secuencia de aminoácidos, para ir creando enzimas cada vez más eficaces en la hidrólisis de cefalosporinas (Jacoby y Madeiros, 1991).

TEM-3, originalmente descrita en el año 1988, fue la primera  $\beta$ -lactamasa tipo TEM que mostro fenotipo propio de una BLEE (Sougakoff *et al.*, 1988).

**SHV:** La SHV-1  $\beta$ -lactamasa, se haya comúnmente en *Klebsiella pneumoniae*, y es responsable del 20% de la resistencia a ampicilina, mediada por plásmidos en esta especie (Bradford, 2001; Tzouveleakis y Bonomo, 1999), no obstante, en muchas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, el gen  $bla_{SHV}$ , se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano (Livermore, 1995.). Las BLEE del tipo SHV, se encuentran con más frecuencia en aislamientos clínicos, que otros tipos de BLEE. SHV (*variable sulfhydryl*), es denominada así, debido a que se pensaba que la inhibición de la actividad de SHV por el *p*-cloromercuriobenzoato (*p*CMB), se relacionaba con el sustrato, y era variable de acuerdo a este. El *p*CMB logra inhibir la hidrólisis de la cefaloridina, pero no de la bencilpenicilina (Paterson y Bonomo, 2005; Szabo *et al.*, 1999.).

En el año 1983, fue aislada en Alemania una *Klebsiella ozaenae* la cual expresaba una  $\beta$ -lactamasa que hidrolizaba eficientemente cefotaxime (Knothe, 1983.), esta  $\beta$ -lactamasa difiere de SHV-1 porque en la secuencia de aminoácidos, hay un reemplazo de glicina por serina en la posición 238. Esta sola mutación la convierte en BLEE, y fue denominada SHV-2 (Paterson *et al.*, 2003.).

**CTX-M:** En el año 1989, se describió un nuevo tipo de BLEE, en una cepa de *Escherichia coli* en Alemania, y una cepa de *Salmonella* en Argentina, la cual se denominó CTX-M, debido a la potente actividad hidrolítica contra cefotaxime (Bauernfeind *et al.*, 1990.). Las CTX-M, usualmente hidrolizan cefotaxime y ceftriazona más rápidamente que ceftazidime. Los microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M, comúnmente registran alta resistencia a cefotaxime, con concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) >64 ug/ml, mientras que con ceftazidime son aparentemente susceptibles con CIMs en un rango de 2 a 8ug/ml. Sin embargo algunas BLEE tipo CTX-M actualmente pueden hidrolizar ceftazidime y conferir resistencia a esta cefalosporina (CIMs 256 ug/ml) (Paterson *et al.*, 2003; Paterson y Bonomo, 2005).

Estas BLEE de naturaleza plásmidica al igual que las TEM o SHV, derivan de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*.

**OXA:** Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA, son clasificadas dentro de la clase molecular D en el esquema de Ambler, y en el grupo 2d de la clasificación Bush, Jacoby y Madeiros, 1995. Cuando las OXA  $\beta$ -lactamasas fueron ubicadas, en una clase molecular independiente de las otras serina  $\beta$ -lactamasas (Heritier *et al.*, 2004.), habían sido identificadas principalmente en

*Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Naas y Nordmann, 1999.). Estas  $\beta$ -lactamasas se caracterizan por hidrolizar cloxacilina y oxacilina, mucho más rápido que a las penicilinas clásica. Son pobremente inhibidas por el ácido clavulánico y EDTA, y se sabe que tienen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos (Bush, *et al.*, 1995.). La  $\beta$ -lactamasa tipo OXA más común, es OXA-1, la cual ha sido encontrada en el 10% de aislamientos de *Escherichia coli* (Livermore, 1995.).

Muchas de las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido, en un grado significativo como para considerarse BLEE. Sin embargo OXA-10, hidroliza (débilmente), cefotaxime, ceftriazona y aztreonam, dando a la mayoría de organismos una susceptibilidad reducida a estos antibióticos. Otras BLEE tipo OXA incluyen OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, and -45; estos confieren resistencia franca a cefotaxime, y algunas veces a ceftazidime y aztreonam (Toleman, *et al.*, 2003.).

Las BLEE tipo OXA fueron originalmente descubiertas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, en un hospital de Ankara, Turquía (Philippon, *et al.*, 1997.).

**Otras BLEE:** Otras familias de BLEE son PER, VEB-1 y BES-1, las cuales son menos prevalentes en el mundo que las previamente descritas (Naas, 2008.).

**$\beta$ -lactamasas tipo Carbapenemasas:** son enzimas capaces de hidrolizar todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y los carbapenémicos. Representan un grupo heterogéneo de  $\beta$ -lactamasas pertenecientes a diferentes clases moleculares A, B y D (Ambler, 1980).

Las carbapenemasas de la clase molecular A, pertenecen al grupo 2f de la clasificación Bush, Jacoby y Madeiros, 1995, incluye  $\beta$ -lactamasas que poseen serina en su sitio activo, en este grupo destacan las BLEE: NMC-A, SME-1 a -2, IMI-1 a -2, KPC-1 a -3 y GES-2 a -4; las cuales se han descrito en *Enterobacteriaceae* (Nordmann y Poirel, 2002.).

**NMC-A** (*not metalloenzyme carbapenemase*), fue la primera carbapenemasa de clase A identificada en *Enterobacter cloacae* en el año 1990 en Francia. El gen *nmcA* está en el cromosoma, precedido de un gen regulador del tipo LysR (similar al gen regulador de las enzimas del tipo AmpC), siendo la expresión de NMC-A inducible. NMC-A hidroliza aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalotina, imipenem y aztreonam, pero es completamente sensible a las oximino-cefalosporinas (cefotaxime y ceftazidime), y su actividad es parcialmente inhibida por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Nordmann *et al.*, 1993.).

**SME-1**(*Serratia marcescens*enzyme), fue la primera enzima de este grupo identificada en un aislamiento de *Serratia Marcescens*. Este microorganismo fue recuperado en Londres en el año 1983, previo a la comercialización de los carbapenémicos (Yang *et al*, 1990.). El gen codificante de SME-1 está localizado en el cromosoma y su expresión depende de un regulador tipo LysR. Si bien SME-1 comparte solo un 68% de identidad en aminoácidos con NMC-A, presentan similar perfil de hidrólisis de sustratos y de inhibición. Es posible que aquellas *Serratia Marcescens* portadoras del gen *sme* constituyan una subespecie que posea naturalmente este marcador de resistencia (Queenan *et al.*, 2000.).

**IMI-1**(*imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase*)en el año 1984, antes de la aprobación de cualquier carbapenémico, para uso clínico en los Estados Unidos, fue identificada en un hospital en California esta carbapenemasa, a partir de dos cepas de *Enterobacter cloacae* resistentes a imipenem, y susceptibles a cefotaxime. (Nordmann *et al.*, 1993; Pechère, 1991.).IMI-1 comparte 95 % de identidad en aminoácidos con NMC-A y presenta un perfil similar de hidrólisis; al igual que esta enzima, el gen codificante está en el cromosoma y su expresión depende de un regulador tipo LysR (Rasmussen *et al.*, 1996.).

**KPC-1**(*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)en el año 2001 en Estados Unidos, esta carbapenemasa de clase A, fue identificada en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*; KPC-1 confería resistencia a oximino-cafalosporinas, carbapenémicos y aztreonam. Comparado con las anteriores carbapenemasas de la clase A codificadas cromosomalmente, KPC-1 es mejor inhibida por el ácido clavulánico y tazobactam, y no es de carácter inducible. El gen *bla<sub>kpc-1</sub>* fue localizado en un plásmido, lo cual constituye una ventaja en la evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos. KPC-1 solo comparte un 44% de identidad en aminoácidos con NMC-A, 45% con SME-1 y 43% con IMI-1. Esta carbapenemasa hidroliza penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, aztreonam y carbapenémicos (meropenem, así como imipenem)(Yigit *et al.*, 2001.). Las enzimas tipo KPC se han descrito clásicamente en *Klebsiella pneumoniae* y en algunas *Enterobacteriaceae* alrededor del mundo. En Colombia la primera *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KPC-2) se encontró en el año 2005(Yigit *et al.*, 2003; Villegas *et al.*, 2006.). Sin embargo, el grupo de resistencia bacteriana en Gram negativos, en Colombia, identificó por primera vez en el mundo, esta enzima por fuera de la familia de *Enterobacteriaceae* en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el año 2007 (Villegas *et al.*, 2007.).

**GES-2** (*Guiana extended spectrum*) en el año 2001 fue descrita una variante puntual de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido GES-1, con actividad de carbapenemasa en *Pseudomonas aeruginosa*, en Sudáfrica. GES-2 de codificación también plásmidica, presenta una sustitución de glicina en la posición 170 a asparagina, respecto a la secuencia de GES-1, además presenta una eficiencia de hidrólisis de imipenem 100 veces superior a la de GES-1. Sin embargo su actividad es 1000 veces inferior a la de otras carbapenemasas de clase A, como SME-1 y NMC-A (Poirel *et al.*, 2001.). Al menos nueve variantes de GES han sido descritas, GES-9 fue identificada recientemente en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en Francia (Poirel *et al.*, 2005.).

Las carbapenemasas de la clase molecular D pertenecen al grupo 2d de la clasificación Bush, Jacoby y Madeiros, 1995, incluye  $\beta$ -lactamasas que poseen serina en su sitio activo, en este grupo destaca la enzima tipo OXA.

**OXA** (*oxacillin-hydrolyzing*) la primera  $\beta$ -lactamasa tipo OXA, con actividad de carbapenemasa fue descrita por Paton *et al.*, en el año 1993. Esta enzima fue purificada de una cepa de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, la cual fue aislada en el año 1985 de un paciente en Edimburgo (Escocia) (Paton *et al.*, 1993.). La hidrólisis de imipenem fue detectada en placa de ensayo microbiológico; y la enzima fue denominada ARI-1 (*Acinetobacter resistance imipenem*), y después se demostró que reside en un largo plásmido (Scaife *et al.*, 1995.). La secuenciación de la enzima ARI-1, reveló que esta pertenecía a la familia de  $\beta$ -lactamasas tipo OXA, y entonces, la enzima fue rebautizada posteriormente como OXA-23 (Donald *et al.*, 2000.).

La gran mayoría de carbapenemasas tipo OXA, han sido descubiertas en el patógeno oportunista Gram negativo, *Acinetobacter baumannii*. Pero desde el año 1988, en *Acinetobacter spp.*, se han identificado carbapenemasas tipo OXA, la mayoría de las cuales son adquiridas por transposones o plásmidos e identificadas en aislamientos de diferentes partes del mundo (Afzal-Shah y Livermore, 1998.). Por ejemplo OXA-23, se ha identificado en brotes de *Acinetobacter*, resistente a carbapenémicos, en Brazil y Reino Unido. (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2005.). En Colombia se reportó la primera OXA-23 en *Acinetobacter baumannii* en el año 2007 (Villegas *et al.*, 2007.).

Además, la actividad de carbapenemasa se incrementa, si otros mecanismos de resistencia están presentes, como la sobreexpresión de bombas de eflujo y el cierre de porinas (Nordmann y Poirel, 2002.).

Las carbapenemasas de la clase molecular B, pertenecen al grupo 3 de la clasificación Bush, Jacoby y Madeiros, 1995, incluye  $\beta$ -lactamasas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática, éstas son las denominadas metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) (Walsh *et al.*, 2005.); en este grupo destacan las enzimas:IMP, VIM; las cuales se encuentran en una gran variedad de genes cassettes, localizados principalmente en integrones, cuando estos integrones, se asocian con plásmidos o transposones, la transferencia entre bacterias se facilita (Queenan y Bush, 2007.). Esta clase de  $\beta$ -lactamasas, se caracterizan por su capacidad para hidrolizar carbapenémicos, además de no ser inhibidas por el ácido clavulánico, ni tazobactam, pero sí presentan susceptibilidad a la inhibición por quelantes de iones metálicos, como el EDTA, el cual es un quelante de  $Zn^{2+}$  y otros cationes bivalentes. El espectro de sustrato de la metalo- $\beta$ -lactamasas es muy amplio, ya que además de los carbapenémicos, hidroliza penicilinas y cefalosporinas, pero carece de capacidad para hidrolizar aztreonam (Walsh *et al.*, 2005.).

**IMP** (*active on imipenem*), la resistencia a imipenem fue detectada por primera vez en Japón, inicialmente en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, en 1990 (Watanabe *et al.*, 1991.), seguido de un segundo reporte, de una carbapenemasa transferible en *Bacteroides fragilis*. (Bandoh, *et al.*, 1992.). La IMP-1, localizada en un plásmido de conjugación en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* (Watanabe *et al.*, 1991.), fue encontrada en un integron, en *Serratia marcescens* y otras *Enterobacteriaceae* en Japón (Ito *et al.*, 1995.). Esta enzima hidroliza imipenem, penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido, pero no aztreonam. Su actividad hidrolítica es inhibida por EDTA, y se restablece al adicionar  $Zn^{2+}$ . El primer miembro de la familia IMP (IMP-2), fue encontrado en Europa, en la ciudad de Italia, en un aislamiento de *Acinetobacter baumannii*; la enzima IMP-2, fue localizada en un gen cassette, localizado en un integron de clase 1; y además se demostró, que solo comparte un 85% de homología en aminoácidos con IMP-1 (Riccio *et al.*, 2000.). Desde entonces la familia de metalo- $\beta$ -lactamasas IMP, se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial (Walsh *et al.*, 2005.). En el año 2006, se presentó el primer reporte en América Latina de una *Klebsiella pneumoniae* productora de IMP-1 (Lincopan *et al.*, 2005.).

**VIM** (*Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*) otra familia de MBL, asociada a integrones, está compuesta por las enzimas tipo VIM. VIM-1, fue aislada de una *Pseudomonas aeruginosa* por primera vez, en Verona (Italia), en el año 1997 (Lauretto *et al.*, 1999.). Una segunda variante de VIM, VIM-2, fue descrita en un solo aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en Francia, en el año 1996, esta cepa, era resistente a  $\beta$ -lactámicos, cefepime, ceftazidime,

imipenem y meropenem; pero se mantuvo susceptible con aztreonam. VIM-2 tuvo el 90% de homología en aminoácidos con VIM-1 (Poirel *et al.*, 2000.). En Colombia, se han detectado la VIM-2 y la VIM-8, en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*(Villegas *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2004.).

**Otras MBL:** las SIM(*Seoul imipenemase*), SPM(*Sao Paulo metallo-β-lactamase*) y GIM(*German imipenemase*), son otras de las familias de metalo-β-lactamasas, y desde su descubrimiento, no se han diseminado más allá de sus países de origen. Sin embargo IMP y VIM, siguen siendo detectadas alrededor del mundo en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, y diferentes miembros de *Enterobacteriaceae* (Queenan y Bush, 2007.).

Las BLEE son un problema de salud pública con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica, que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil (Winokur *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 1999.). La producción de BLEE en estos países mostró importantes variaciones de un país a otro, con rangos entre 5% y 73%(Mendes *et al.*, 1999.). En Colombia, la prevalencia de BLEE, según Villegas *et al.*, se encuentra por encima del 40% (Villegas *et al.*, 2004.).

En estudio realizado por el Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY se encontró que los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* con un fenotipo BLEE fueron más prevalentes en América Latina (45.4%), seguidos por la región Pacífica (24.6%), Estados Unidos (7,6%), Europa (22.6%) y Canadá (4.9%) (Winokur *et al.*, 2001.); en otros estudios realizados también se observa la alta prevalencia de BLEE en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* entre 40% y 43%,seguido de *Escherichia coli*, con una prevalencia entre 20% y 27% (Mendes *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2003; Villanueva *et al.*, 2003.).

En el año 2008, en el estudio Evaluación Multicéntrica de la actividad antimicrobiana *in vitro* de Tigeciclina, en 13 instituciones de tercer nivel de Colombia realizado por el Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana(GREBO), se observó que de 144 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* recibidos en el laboratorio, 10 aislamientos (14.4%) eran portadores de KPC. Estos aislamientos provenían de hospitales de 3 ciudades diferentes: Bogotá (3 hospitales), Barranquilla (1 hospital) y Medellín (1 hospital) (Leal *et al.*, 2008).

## 2. Bombas de Expulsión

A finales de la década de 1980 se descubrieron los primeros sistemas de expulsión activa multidroga en procariotas (el análisis genómico ha confirmado el amplio espectro de distribución de estos sistemas, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas), estos sistemas, contribuyen significativamente a la resistencia intrínseca y adquirida de los agentes antimicrobianos (Nikaido, 1996; Moreira *et al.*, 2004; Paulsen *et al.*, 2001.); por consiguiente, son uno de los más importantes problemas en la medicina (Lewis, 1994; Paulsen *et al.*, 1996.).

Es una de las estrategias más frecuentemente empleadas por los sistemas biológicos, para la captación de nutrientes esenciales y iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente (Zhi y Nikaido, 2004.).

Las bombas de eflujo han sido definidas como translocasas de membrana con una capacidad sorprendente para expulsar una gran variedad de drogas (Lewis, 1994.). Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un fármaco (generalmente codificadas por un plásmido y por lo tanto, transmisibles.), o inespecíficas (generalmente expresadas en el cromosoma bacteriano.). Si se aumenta la expresión de una bomba de eflujo inespecífica, puede generarse resistencia cruzada, a múltiples clases de fármacos, empleándose un solo mecanismo (Depardieu *et al.*, 2007.).

La resistencia adquirida, puede ocurrir por tres mecanismos:

- Mutación y amplificación de los genes que codifican las bombas de eflujo, los cuales alteran su nivel de expresión (Ng *et al.*, 1994.), o su nivel de actividad (Knol *et al.*, 1996).
- Mutación en genes específicos, o en genes reguladores, dando como resultado un incremento de la expresión de bombas de eflujo, por ejemplo, la mutación en el gen *mexR* de *Pseudomonas aeruginosa* OCR1 (Poole *et al.*, 1996.).
- Transferencia intracelular de genes de resistencia, como el gen *qacE*, por medio de plásmidos o transposones, en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (Kazama *et al.*, 1998.).

Los sistemas de bombas de eflujo están agrupados en familias de proteínas transportadoras basadas en la homología de las secuencias de aminoácidos, las similitudes en la estructura secundaria, y en tamaño (Bolhuis *et al.*, 1996; Purewal, 1991.).

Las seis familias en las que se clasifican estos transportadores son: la familia ABC (*ATP binding cassette*), MF (*major facilitator*), MATE (*multidrug and toxic efflux*), RND (*resistancenodulation*

*división*), SMR (*small multidrug resistance*) y DMT (*drug/metabolite transporter superfamily*) (Jack *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2007.).

Los sistemas de eflujo, son característicamente dependientes de energía, y pueden ser clasificados en transporte activo primario, y transporte activo secundario (Levy, 1992.).

Los transportadores activos primarios, como los transportadores de la superfamilia ABC, utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para expulsar los distintos compuestos (Vila *et al.*, 2007.); y los transportadores activos secundarios, como los transportadores de la familia MATE, utilizan un gradiente electroquímico otorgado por Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup> (Su *et al.*, 2005.). Por otro lado, las bombas multidroga pertenecientes a la superfamilia MFS y a las familias RND y SMR utilizan la fuerza protón-motriz para ejercer su función (Paulsen *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 2000.).

Comúnmente, los sistema de eflujo, de las superfamilias MFS y MATE, consisten en un monocomponente de proteínas, con aproximadamente 12 segmentos transmembrana (Van Bambeke *et al.*, 2000.). Sin embargo, la mayoría de bombas de expulsión multidroga de bacilos Gram negativos, pertenecen a la familia RND (Sánchez, 2003.). El sistema es más complejo, debido a la estructura de su membrana; por esta razón ellos requieren de un sistema de expulsión tripartita, compuesto por: una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplasmático (proteína de fusión de membrana MFP) y una tercera en la membrana externa (factor de membrana externa) OMF (Lewis, 1994; Nikaido, 1996.). Los genes que codifican a los distintos componentes de estas bombas de expulsión se encuentran en el cromosoma bacteriano, generalmente en forma de operones (Piddok, *et al.*, 2006.).

En *Pseudomonas aeruginosa*, el sistema de transporte, denominado MexAB-OprM, es una bomba de eflujo multidroga que extrae de la célula una amplia variedad de antibióticos como, quinolonas, penicilinas, cefalosporinas, β-lactámicos, meropenem, doripenem, pero no imipenem; y su expresión exagerada conduce a un aumento de la CIM de estos antibióticos (Nikaido, 1996; Okamoto *et al.*, 2002; Livermore, 2002.). Este sistema MexAB-OprM, está compuesto por la proteína de membrana externa MexB y la proteína ligadora en el espacioperiplasmático MexA. Se cree que MexA, aproxima las membranas externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero MexB, bombeando así una amplia variedad de sustancias, presumiblemente a través del canal de salida OprM de la membrana externa (Nikaido, 1996; Symmons *et al.*, 2009.).

La MexXY-OprM es otra bomba muy importante, ya que es responsable de la expulsión de múltiples antibióticos, en especial los aminoglucósidos; recientemente se ha asociado con resistencia al cefepime; sin embargo, no tiene acción contra cefalosporinas de tercera generación, como ceftazidime (Hocquet *et al.*, 2006.).

En *Enterobacteriaceae* no se ha reportado la participación de bombas de eflujo en el desarrollo de resistencia a los carbapenémicos (Suarez *et al.*, 2006.).

### 3. Pérdida de Porinas

Las bacterias Gram negativas, posee unos canales embebidos en la membrana externa, llamados porinas, los cuales trabajan como filtros en una membrana permeable y pueden ser específicas o inespecíficas dependiendo de su selectividad para las moléculas que dejan pasar. Además de otras funciones vitales, estas moléculas tienen la capacidad de retardar el acceso de los antibióticos al interior de la bacteria. Las porinas pueden ser específicas o inespecíficas dependiendo de su selectividad para las moléculas que dejan pasar (Tafur *et al.*, 2008.) Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como los carbapenémicos, llegan al espacio periplasmático pasando a través de estos canales; los genes que codifican las porinas, pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales, o pueden disminuir su expresión (Hancock, 1997.). Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenémicos. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenémicos en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente la pérdida de porinas, solo aumenta los valores la CIM para el antibiótico, sin superar los puntos de corte que determinan resistencia; sin embargo, esto puede llegar a ocurrir cuando la pérdida de porinas se combina con otro mecanismo de resistencia (Hancock, 1997; Martínez-Martínez, 2008.).

En *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, las BLEE, principalmente del tipo SHV, son el mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido, que más predomina en estas bacterias. Sin embargo, han sido reportados mecanismos no enzimáticos, que confieren resistencia a todas las cefalosporinas, incluyendo cefamicinas. Estos mecanismos incluyen la pérdida de porinas, que resultan en la disminución de la permeabilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En *Escherichia coli*, se han descrito dos importantes porinas, OmpF y OmpC; y en *Klebsiella pneumoniae*, se presentan OmpK35 y OmpK36, pero muchas de las bacterias, que producen BLEE, no expresan la porina OmpK35. La pérdida de las dos porinas OmpK35 y OmpK36, en *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, causa resistencia a cefoxitín,

cefalosporinas de espectro extendido, y disminución de la susceptibilidad a carbapenémicos, particularmente ertapenem (Nikaido, 1989; Martinez-Martinez, 2008; Palasubramaniam *et al.*, 2009.).

En *Pseudomonas aeruginosa*, los carbapenémicos como imipenem y meropenem, utilizan una porina específica llamada OprD. La OprD puede cerrarse durante la terapia con carbapenémicos, lo que lleva a una resistencia (Kohler, *et al.*, 1999.). El meropenem es menos dependiente que el imipenem al paso por esta porina; algunos aislamientos resistentes a imipenem, pueden permanecer entonces, sensibles al meropenem. Por otro lado, meropenem y doripenem pueden ser sacados al exterior de la bacteria por bombas de expulsión, lo cual no es el caso de imipenem. Simplificando, la resistencia a imipenem es más dependiente de la pérdida de porinas y la resistencia a meropenem y doripenem es más dependiente de bombas de expulsión (Tafur *et al.*, 2008.).

#### **4. Modificación del Sitio Blanco**

Desde hace tiempo se ha reconocido, que la modificación de las proteínas unidoras de penicilina (PBPs), para reducir su afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es un mecanismo importante por el cual bacterias Gram positivas, adquieren resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo en los bacilos Gram negativos, este mecanismo es considerado inusual, y está restringido solo a especies mutantes creadas en el laboratorio y que son clínicamente irrelevantes. No obstante, a través de investigaciones genéticas detalladas, se ha demostrado, que tanto *in vitro* como *in vivo*, uno de los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*, se debe a una mutación en el gen *dacB*, el cual codifica para PBP4 (Moya, *et al.*, 2009.).

La función y estructura de PBP4, ha sido caracterizada principalmente en *Escherichia coli*; se cree que esta proteína no es esencial, de bajo peso molecular, con actividad de carboxipeptidasa y endopeptidasa, desempeña un papel auxiliar tanto en el mantenimiento de la morfología, como en la maduración y reciclaje del peptidoglicano (Korat *et al.*, 1991). Por lo tanto, la inhibición de esta PBP, trae como consecuencia la modificación cualitativa y cuantitativa de los muropeptidos, los cuales son las moléculas efectoras de la  $\beta$ -lactamasa AmpC (Jacobs *et al.*, 1997.), luego, una sobreexpresión de esta  $\beta$ -lactamasa, debido a antibióticos inductores como cefoxitín e imipenem (Livermore, 1995.), junto con la inhibición de la PBP4, median la resistencia a estos antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Moya, *et al.*, 2009.).

También en *Acinetobacter baumannii* se describió que la ausencia de dos proteínas unidoras de penicilina, una de 73,2 kd (PBP 2a) y otra de 70,1 kd (PBP 2b), se relaciona con resistencia de bajo grado a imipenem y meropenem (Fernández-Cuenca *et al.*, 2003.).

Debemos considerar la importancia que tienen en la práctica diaria los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antimicrobianos disponibles, y tenerlos en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento antibacteriano (Holmberg, 1987.).

### **Epidemiología de la resistencia bacteriana**

La resistencia bacteriana, en el género *Enterobacteriaceae*, continúa en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones complicadas, adquiridas en la comunidad e intrahospitalarias. Se calcula que entre el 50% y el 60% de más de dos millones de infecciones hospitalarias en los Estados Unidos son causadas por bacterias resistentes, y que son responsables de cerca de 77.000 muertes por año (Jones, 2001.).

En informe de resistencia bacteriana del GREBO para el año 2008 y el primer semestre del año 2009 en UCI y no UCI (otros servicios de hospitalización excepto urgencias), se observó una mayor frecuencia de aislamientos de *Escherichia coli*(24%), seguido de *Staphylococcus aureus*(10%); mientras que en el primer semestre del año 2009, se observó un aumento en la frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* (23%), seguido de *Klebsiella Pneumoniae* (10%). La frecuencia de aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en 2008, fue del 5% y tuvo un ligero aumento en el primer semestre de 2009(GREBO, 2009.).

El perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* tanto en UCI como no UCI, para el año 2008 y primer semestre de 2009, mostro tasas de susceptibilidad, que van del 99.5% a 99.9% para imipenem y 99.5% a 100% para meropenem (GREBO, 2009.).

El perfil de susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* tanto en UCI como no UCI, para el año 2008 y primer semestre de 2009, mostro tasas de susceptibilidad, que van del 95.3% a 96.9% para imipenem y 94.2% a 95.6% para meropenem, con una tendencia a la resistencia a lo largo del tiempo, sobretodo en la UCI. También, se observa un aumento en el porcentaje de resistencia a ceftazidime tanto para *Escherichia coli* como para *Klebsiella pneumoniae*(GREBO, 2009.).

El perfil de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* tanto en UCI como no UCI, para el año 2008 y primer semestre de 2009, mostro tasas de susceptibilidad, que van del 74.8% a 84.7%

para imipenem y 72.1% a 76.9% para meropenem, con una tendencia a la resistencia a lo largo del tiempo, sobretodo en la UCI, al igual que *Klebsiella pneumoniae*.

Además, *Pseudomonas aeruginosa* presenta también un aumento en el porcentaje de resistencia a ertapenem (GREBO, 2009).

### **Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana en el Laboratorio**

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Dentro de los beneficios que presenta se encuentran: dirigir la terapéutica una vez que el microorganismo es conocido, generar una base de datos que permita seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico (aquel en que no conocemos el agente causal), desarrollar políticas de uso de antimicrobianos, vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia, detectar precozmente la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario. Los métodos para el estudio de la sensibilidad bacteriana, se clasifican en cuantitativos y cualitativos (Taroco *et al.*, 2006.).

**Métodos cuantitativos:** son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). Se define como CBM la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana estandarizada. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o *E-test* (marca comercial) (Taroco *et al.*, 2006; Yepes *et al.*, 2008.).

**Métodos cualitativos:** (disco difusión) son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria (Taroco *et al.*, 2006.).

El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), estandarizó los métodos, para que de esta manera los resultados sean reproducibles y comparables. La realización de estos procedimientos requiere la utilización de cepas de control de calidad con resultados conocidos, para así verificar que la metodología se realiza en forma correcta. Dentro de los parámetros a estandarizar se encuentran (Taroco *et al.*, 2006; CLSI, 2008.):

- El tipo de bacterias a estudiar, ya que no es lo mismo un microorganismo de crecimiento rápido que lento, exigente o no exigente, aerobio o anaerobio.
- Los medios de cultivo para realizar las pruebas. De los medios disponibles se considera que tanto el agar como el caldo Müller Hinton (MH) son los más apropiados para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad.
- El tiempo de incubación: la mayoría de los resultados deben leerse entre 18 y 20 horas.
- La temperatura de incubación, lo cual altera la velocidad de crecimiento bacteriano y su viabilidad.
- El estado de los antibióticos, su fecha de vencimiento si se trata de discos, o su potencia si se trata de antibiótico como droga.

Si bien estos parámetros pueden ser controlados físicamente, es decir el clínico puede controlar temperaturas, tiempos, estados de los medios, etc., los controles de calidad se realizan utilizando cepas conocidas. A continuación se destacaran algunos de los métodos antes mencionados (Taroco *et al.*, 2006.).

**Método de dilución en placa o en caldo:** es el *Gold Standard* de los test *in vitro*. En este un inóculo bacteriano (usualmente  $10^5$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) determinado se expone a diluciones seriadas del antimicrobiano de 18 a 24 horas; para luego observar el crecimiento de los microorganismos y así definir la CIM, la cual se expresa en microgramos por mililitro (ug/mL) (Taroco *et al.*, 2006.).

**Test de dilución en agar:** sigue los mismos principios excepto que los microorganismos son inoculados en platos. La CIM es definida como la menor concentración a la cual no se observan colonias, tiene como desventaja el mayor costo y el no brindar una información cualitativa (Taroco *et al.*, 2006.).

**Método de difusión de disco:** método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le

deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa). El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby *et al.*, en 1966, es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos (Celiz, 2000; Taroco *et al.*, 2006.).

Para la detección de BLEE, se utilizan métodos de aproximación de discos como la sinergia de doble disco o la combinación de discos (Paterson y Bonomo, 2005; Harada *et al.*, 2008.).

Y para la detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas, actualmente, se utiliza el test modificado de Hodge, el cual es la única prueba avalada por el CLSI. Esta prueba confirmatoria, ha demostrado una sensibilidad y especificidad por encima del 90% en la detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasa (GREBO, 2009.).

**Método de Gradiente Antibiótico (*E-test*):** método cuantitativo. El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método *E-test* podemos, mediante lectura directa, determinar la CIM. Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de *E-test* sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CIM será el valor donde la elipse corta la tira. Se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM (Baker *et al.*, 1991; Taroco *et al.*, 2006.).

Además, para la detección de BLEE, las tiras *E-test*, contienen en una parte de ellas concentraciones decrecientes de cefalosporina (ceftazidime, cefotaxime o cefepime) y en la otra parte las mismas concentraciones del antibiótico con una concentración fija de ácido clavulánico. Para confirmar la presencia de BLEE debe existir una reducción de al menos tres diluciones en presencia del inhibidor (Paterson y Bonomo, 2005; Harada *et al.*, 2008).

**Métodos automatizados:** durante la última década se han desarrollado equipos automatizados y semiautomatizados tanto de identificación bacteriana, como de susceptibilidad antimicrobiana, en un periodo que oscila entre 2 y 7 horas, comparado a las 15 y 24 horas, que habitualmente

demoran los métodos tradicionales. Existen diferentes tipos de equipos. La diferencia de estos radica en diferentes factores: la rapidez y confiabilidad en los resultados de identificación y sensibilidad antimicrobiana, el espectro de microorganismos abarcado, los costos de mantenimiento y control de calidad, y la presencia de un *software* anexo con capacidad de controlar los mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia antimicrobiana. La sensibilidad antimicrobiana se basa en la inoculación de una suspensión de los microorganismos, en tarjetas con determinadas diluciones estandarizadas de distintos antimicrobianos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por el CLSI (Berke y Tierno, 1996; CLSI, 2008.).

### **Interpretación y Manejo de la Resistencia a Antibióticos $\beta$ -lactámicos**

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se clasifican siempre de acuerdo con interpretaciones fenotípicas de laboratorio: el microorganismo se informa como susceptible o resistente a un antibiótico determinado. El clínico generalmente toma decisiones terapéuticas con base en esta información sin tener en cuenta que estos datos son el fiel reflejo de procesos moleculares. Courvalin introdujo el concepto de lectura interpretativa de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Courvalin, 1992.). La lógica de este enfoque se basa en:

- La caracterización del fenotipo de resistencia con la evaluación apropiada de los antibióticos pertenecientes a una misma clase.
- Deducción del mecanismo bioquímico y molecular de resistencia de acuerdo con el fenotipo observado.
- Elección del antimicrobiano apropiado con base en estos parámetros.

Para aprovechar este proceso es necesario que los aislamientos clínicos sean identificados según la especie en forma altamente confiable y que se utilicen varios antibióticos en las pruebas de susceptibilidad. En el mismo orden de ideas, es absolutamente fundamental que el clínico aprenda a identificar patrones de resistencia poco comunes o que no han sido informados anteriormente (Arias *et al.*, 2003.).

### ***Enterobacteriaceae***

Los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos varían de acuerdo con la especie; es así como la identificación exacta del microorganismo infectante es fundamental para la elección adecuada del antimicrobiano. Generalmente, la resistencia observada en *Enterobacteriaceae* es mediada

por  $\beta$ -lactamasas. Se han descrito en la literatura más de 300  $\beta$ -lactamasas y es importante tratar de inferir la clase de enzima involucrada con base en los datos del antibiograma y la identificación del microorganismo según la especie. Entre las situaciones clínicas más relevantes, se destaca la identificación de BLEE en *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. El mejor indicador de la presencia de BLEE en cualquiera de las especies mencionadas, es el informe de resistencia a ceftazidime (Livermore y Brown, 2001; Livermore, 1995.). En nuestro continente, la presencia de la enzima CTX-M ocasiona que, en algunas circunstancias, la cefotaxime sea mejor indicador que la ceftazidime (Bradford *et al.*, 1998; Nordmann, 1998.). Adicionalmente este hallazgo puede sustentarse investigando el patrón de susceptibilidad a cefoxitín, el cual no es sustrato de las BLEE: la resistencia a ceftazidime o (cefotaxime para CTX-M) con susceptibilidad a cefoxitín sugiere con alta probabilidad la presencia de BLEE en el microorganismo correspondiente (Livermore *et al.*, 2001.). De la misma manera, las BLEE (derivadas de las enzimas tipo TEM y SHV) tienden a ser inhibidas por clavulanato, sulbactam y tazobactam, lo que ayuda a su caracterización. La presencia de dichas enzimas debe ser confirmada por el laboratorio clínico y la terapia debe hacerse teniendo en cuenta este hallazgo. En estos casos las opciones terapéuticas dependen de varios factores y uno de los más importantes es la cantidad de enzima que se produce. La presencia de BLEE hace altamente probable que el uso de todas las cefalosporinas (incluida cefepime) sea inefectivo. Algunas combinaciones de  $\beta$ -lactámicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas han mostrado eficacia (p.ej, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato, cefoperazona-sulbactam, ampicilina-sulbactam), pero dependen de la cantidad de enzima producida y solo se recomiendan si se tienen datos confiables de susceptibilidad. Los carbapenémicos (imipenem, meropenem y doripenem) presentan la mejor actividad contra estas enzimas y son la mejor opción para el tratamiento de infecciones por estos microorganismos (Arias *et al.*, 2003.), sin embargo, algunas cepas han desarrollado muchas formas efectivas para lidiar con los carbapenémicos, incluyendo la producción de carbapenemasas. Cuando las *Enterobacteriaceae* son resistentes a uno ó más cefalosporinas de tercera generación (por ejemplo cefoperazona, cefotaxime, ceftazidime, ceftizoxime y ceftriaxona), y muestran CIMs elevadas o reducción en el diámetro de la zona de inhibición a carbapenémicos, pueden ser bacterias productoras de carbapenemasas a pesar de que la CIM o el halo de inhibición esté dentro del rango de sensible, para confirmar su presencia se debe realizar el test modificado de Hodge (GREBO, 2009.), inoculando la superficie de una placa de agar con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 sensible a carbapenémicos, luego se coloca un disco de ertapenem o meropenem (10ug) en el centro y se inoculan radialmente las cepas

que se van a ensayar. Tras incubación se comprueba la existencia de una distorsión en intersección entre la zona de inhibición de la cepa control alrededor del disco de ertapenem o meropenem y la cepa problema (Pasteran *et al.*, 2009).

Por otro lado, la resistencia a ceftioxitín en la mayoría de *Enterobacteriaceae* es indicativa de la producción de enzimas AmpC (Moritz y Carson, 1986.). Las especies más implicadas son: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, y *Serratia spp.*

Si la enzima se produce de manera inducible (directamente relacionada con la presencia del antibiótico), muestra susceptibilidad a cefalosporinas como ceftriaxona, ceftazidime, cefotaxime y cefuroxime, con resistencia a ceftioxitín (Bennett y Chopra, 1993; Arias *et al.*, 2003.). Si la enzima se produce de forma constitutiva (por desrepresión), es susceptible a cefalosporinas de cuarta generación (cefepime y cefpirome) y los carbapenémicos, previa confirmación de susceptibilidades; y resistente a aminopenicilinas, y cefalosporinas de segunda y tercera generación; este fenómeno se observa en 30% de los casos en *Enterobacter spp.* (Cosgrove *et al.*, 2002; Philippon *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2003.).

Además, las enzimas AmpC son resistentes a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (la única excepción es la enzima producida por *Morganella morganii* que es susceptible a la inhibición por tazobactam); por tanto su uso en la terapéutica es limitado (Arias *et al.*, 2003; Paterson y Bonomo, 2005.).

### **No fermentadores**

Los microorganismos de este grupo más comúnmente aislados en el área clínica son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, y *Stenotrophomonas maltophilia* (Arias *et al.*, 2003.).

Debe darse consideración especial a las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, debido a sus mecanismos de resistencia, como lo son las bombas de eflujo y la pérdida o alteración de porinas. Este microorganismo muestra resistencia a varios grupos de antimicrobianos y además en muchos casos coexisten con la producción de  $\beta$ -lactamasas. Los carbapenémicos se ven afectados de forma diferente: la hiperproducción de bombas de eflujo (MexAB-OprM) producen resistencia a meropenem, y la pérdida de la porina OprD aumenta ligeramente la CIM para este antibiótico. Por otro lado, en la mayoría de los casos, la resistencia a imipenem se origina solamente por la pérdida de la porina OprD (Nikaido, 1996; Okamoto *et al.*, 2002; Livermore, 2002; Tafur *et al.*, 2008.).

Si el microorganismo presenta pérdida de porinas, junto con hiperproducción de bombas de eflujo, ningún  $\beta$ -lactámico es efectivo como terapia; se sugiere el uso de polimixina B o la colistina (Livermore, 2001.).

Las enzimas que degradan los carbapenémicos han sido también reportadas en *Pseudomonas aeruginosa* y el clínico debe estar alerta ante esta posibilidad, pues los altos niveles de resistencia a imipenem o meropenem son indicativos de la presencia de esta enzima (carbapenemasa) (Arias *et al.*, 2003.).

## OBJETIVOS DEL PROYECTO

### Objetivo General

Evaluar la actividad *in vitro* de doripenem frente a bacterias Gram negativas productoras de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en muestras clínicas de pacientes con infección nosocomial en el Hospital Universitario San Ignacio.

### Objetivos Específicos

- Comparar el comportamiento *in vitro* de doripenem frente a otros carbapenémicos como meropenem frente a bacterias Gram negativas productoras de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) por método de difusión de disco y el método de difusión por *E-test*
- Evaluar la concordancia de la actividad *in vitro* de doripenem en muestras clínicas por método de difusión de disco y método de difusión por *E-test*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño de la Investigación:** Estudio observacional, descriptivo, de corte transversal, que pretende determinar el comportamiento de doripenem frente a bacterias Gram negativas, productoras de BLEE y KPC, aisladas de muestras de pacientes con procesos infecciosos intrahospitalarios, durante el periodo comprendido entre Octubre de 2009 y Enero de 2010, en el Hospital Universitario San Ignacio.

## PROCEDIMIENTO

**Recolección de muestras:** para la realización de este estudio, en el laboratorio de microbiología clínica del Hospital Universitario San Ignacio, durante el periodo comprendido entre Octubre de 2009 a Enero de 2010, se obtuvieron muestras a nivel respiratorio (esputo, secreción traqueal, lavado bronquial, líquido pleural), intrabdominal (líquido peritoneal, abscesos, tejidos y secreciones intrabdominales), urinario (orina), además de otras como, hemocultivos, heridas, abscesos, tejidos y secreciones de distintos sitios de infección de pacientes adultos de sexo masculino y femenino, mayores de 18 años, con infecciones intrahospitalarias, y que formaron parte del conjunto de muestras que diariamente se procesan en este laboratorio, procedentes de los servicios unidad de cuidado intensivo (UCI), medicina interna, cirugía y urgencias del Hospital Universitario San Ignacio.

Para el manejo de la información clínica de cada uno de los pacientes de quienes se obtuvieron las muestras, se creó una base de datos utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007 (Ver Anexo 1), y los tipos de infección nosocomial se definieron según los parámetros de la clasificación internacional establecida por los CDC de Atlanta, Estados Unidos (Horan *et al.*, 2008.).

**Aislamiento bacteriano:** el aislamiento de los microorganismos de las muestras obtenidas, se realizó en placas de agar sangre (BBL, Becton Dickinson) y agar MacConkey (BBL, Becton Dickinson), y se incubaron en condiciones de aerobiosis durante 24 horas a 37° C; a continuación, se realizó un extendido y coloración de Gram a las colonias aisladas para observar su morfología microscópica, e igualmente, se observaron y analizaron las características macroscópicas de estas colonias (forma, tamaño, utilización de lactosa en agar MacConkey), para así realizar una diferenciación presuntiva entre bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores; a estos últimos se les realizó la prueba de oxidasa. Luego se realizó un estudio bioquímico para ubicar los aislamientos en géneros y especies.

**Identificación bioquímica y perfiles de sensibilidad:** la identificación de género y especie de cada aislamiento se determinó mediante el método automatizado MicroScan® (Equipo Walkaway 96, West Sacramento, Calif.), a través de inóculos estandarizados al 0.5 de MacFarland para cada aislamiento en un sistema de paneles de microdilución, siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego de un periodo de incubación de 20 horas a 37 °C, fue analizado por el software experto, que de forma automática, detectó el tipo de panel, asignó la identificación más

probable como consecuencia del crecimiento y los cambios de color en los pocillos destinados a la identificación (comparando cada perfil de identificación con los perfiles de su base de datos); además, se establecieron los perfiles de susceptibilidad y resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido, también mediante paneles, que contienen concentraciones dobles seriadas de ceftazidime [0,5-128  $\mu\text{g/ml}$ ], cefotaxime [0,5-128  $\mu\text{g/ml}$ ], cefotaxime/clavulanato (0,12/4-16/4  $\mu\text{g/ml}$ ), ceftazidime/ clavulanato (0,12/4-16/4  $\mu\text{g/ml}$ ), aztreonam (0,5-64  $\mu\text{g/ml}$ ), cefepime (1-32  $\mu\text{g/ml}$ ), imipenem (0,5-16  $\mu\text{g/ml}$ ), meropenem (0,5-16  $\mu\text{g/ml}$ ). El sistema MicroScan®, emitió un informe con la identificación de la especie bacteriana, la CIM emitida *in vitro*, la categoría clínica correspondiente a dicha CIM, la categoría clínica modificada, en su caso, y el fenotipo o fenotipos de resistencia inferidos (aplicando las reglas indicadas por CLSI, 2010.). La presencia de BLEE es sugerida por el fabricante cuando el antibiograma es interpretado como ceftazidime y/o cefotaxime resistente, aztreonam resistente, cefepime resistente, ceftazidime/clavulanato sensible, cefotaxime/clavulanato sensible, imipenem y meropenem sensible; y la presencia de KPC es sugerida cuando el antibiograma es interpretado como resistente a todas las cefalosporinas, aztreonam y carbapénemicos.

Se tuvieron en cuenta todas aquellas identificaciones de *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE y KPC; cualquier otro resultado fue rechazado.

**Método confirmatorio para la presencia de BLEE en enterobacterias:** de acuerdo a lo reportado por el sistema MicroScan®, a los aislamientos productores de BLEE, se les realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de Mac Farland, la cual se inoculó en la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (BBL, Becton Dickinson), luego se dejó absorber este inóculo un mínimo de 3 a 5 minutos hasta que la superficie estuvo completamente seca, y sobre esta se colocaron discos de papel absorbente impregnados con concentraciones estándar del inóculo, cefotaxime (30  $\mu\text{g}$ ) y ceftazidime (30  $\mu\text{g}$ ) solos, y en combinación con ácido clavulánico (10  $\mu\text{g}$ ). Posterior incubación por 24 horas a 37°C, se confirma la presencia de BLEE, al observar un aumento de 5 mm en el halo de inhibición alrededor del disco con la combinación cefalosporina y el inhibidor enzimático (ácido clavulánico), en relación al halo de inhibición alrededor del disco con solo la cefalosporina (CLSI, 2010).

**Método confirmatorio para la presencia de carbapenemasas en enterobacterias:** de acuerdo a lo reportado por el sistema MicroScan®, a los aislamientos productores de carbapenemasas, se les realizó el test modificado de Hodge: se inoculó la superficie de una

placa de agar Müller-Hinton (BBL, Becton Dickinson) con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, ajustada a 0.5 Mac Farland, luego se dejó absorber este inóculo de 3 a 5 minutos hasta que la superficie estuvo completamente seca, y sobre esta se colocó en el centro un disco de ertapenem (10 ug) y se inocularon radialmente las cepas a ensayar. Tras una incubación de 20 horas a 37°C, se examinó la existencia de una distorsión en intersección entre la zona de inhibición de la cepa control alrededor del disco de ertapenem y la cepa problema. Para la confirmación específica del tipo de carbapenemasa, las cepas son enviadas al Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana (GREBO), para la identificación molecular por medio de la técnica electroforesis de campo pulsado (CLSI, 2010).

### **Pruebas de susceptibilidad a doripenem y meropenem**

- **Prueba de difusión de disco:** La susceptibilidad antibiótica de los aislamientos clínicos se realizó, por el método de difusión de disco en placas de agar Müller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de 0.5 Mac Farland, luego se dejó absorber este inóculo un mínimo de 3 a 5 minutos hasta que la superficie estuvo completamente seca, y sobre esta se colocaron discos de papel absorbente impregnados con concentraciones estándar del inóculo, 10 ug de doripenem y 10 ug de meropenem (AB BioMérieux, Solna, Suiza), luego de incubar 18 horas a 37°C, se interpretó el diámetro de los halos de inhibición, indicando el grado de sensibilidad del microorganismo al antibiótico. Estos halos se midieron utilizando regla Kaliper (CLSI, 2010.).
- **Prueba de gradiente de difusión E-test®:** Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), tanto de doripenem como de meropenem, se utilizaron tiras reactivas E-test® (AB BioMérieux, Solna, Suiza.), las cuales se basan en el mismo fundamento de la difusión en disco, pero, en este caso, se utilizaron tiras de plástico no poroso de doripenem y meropenem, cada una de las cuales contienen 16 concentraciones del antibiótico respectivo. Tras aplicar la tira a una placa previamente inoculada e incubada por 24 horas a 37°C, la intersección de la elipse de crecimiento del microorganismo con la tira permitió una determinación directa de la CIM (CLSI, 2010.).

Las cepas control fueron las cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753, que se incluyeron en cada experimento realizado. Tanto los sensibilizadores como las tiras reactivas fueron aportadas por el laboratorio farmacéutico Janssen-Cilag S.A.

En el análisis de los resultados se utilizaron los criterios y los puntos de corte que recomienda el CLSI 2010, excepto para doripenem ya que aún no están disponibles, por lo tanto se utilizaron los que acepta la Food and Drug Administration (FDA) y el fabricante (AB BioMérieux, Solna, Suiza.).

Puntos de corte de Doripenem (FDA)

Patógeno	Difusión en Disco (Diámetro Zona de Inhibición en mm)			Concentración Inhibitoria Mínima (ug/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Enterobacteriaceae</i>	≥18	15-17	≤14	≤0.5	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥19	17-18	≤16	≤2	-	-

Puntos de corte de Meropenem (CLSI 2010)

Patógeno	Difusión en Disco (Diámetro Zona de Inhibición en mm)			Concentración Inhibitoria Mínima (ug/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Enterobacteriaceae</i>	≥16	14-15	≤13	≤4	8	≥16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥16	14-15	≤13	≤4	8	≥16

Puntos de corte de Doripenem y Meropenem EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Patógeno	Doripenem Concentración Inhibitoria Mínima (ug/mL)			Meropenem Concentración Inhibitoria Mínima (ug/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 1	2-4	> 4	≤ 2	4-8	> 8

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤ 1	2-4	> 4	≤ 2	4-8	> 8
-------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

**Análisis de Concordancia:** La evaluación estadística de los resultados se realizó mediante un análisis del índice de concordancia kappa para variables categóricas, y el coeficiente de correlación de Pearson para variables numéricas, incluidas en el paquete computarizado de programas estadísticos PASW Statistics 18® para Windows.

## RESULTADOS

**Aislamiento bacteriano:** se pudo obtener crecimiento apropiado en los agares especialmente en agar MacConkey a temperaturas de 37°C; mediante la coloración de Gram se pudieron evidenciar las formas de bacilos Gram negativos en su mayoría dispuestos en pares o aislados, y en cuanto al aspecto morfológico de las colonias, se evidenciaron en agar MacConkey colonias grandes, lactosa positivo (color rojo), halo turbio (características presuntivas del microorganismo *Escherichia coli*), colonias grandes, lactosa positivo (color rosa), mucosas (características presuntivas del microorganismo *Klebsiella pneumoniae*), y colonias pequeñas, de un ligero color amarillo en agar sangre, lactosa negativo (colonias incoloras) en agar MacConkey, con prueba de oxidasa positiva (características presuntivas del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*).

**Identificación bioquímica y perfiles de sensibilidad:** de acuerdo al informe emitido por el sistema MicroScan®, se obtuvieron 50 cepas de bacilos Gram negativos aerobios (27 *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE y KPC, 16 *Escherichia coli* productoras de BLEE y 7 *Pseudomonas aeruginosa*).

**Método confirmatorio para la presencia de BLEE en enterobacterias:** a partir de los resultados anteriores se confirmaron como productoras de BLEE, 14 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y 16 de *Escherichia coli*, debido a que mostraron un aumento de 5 mm en el halo de inhibición alrededor del disco con la combinación cefalosporina y el inhibidor enzimático (ácido clavulánico), en relación al halo de inhibición alrededor del disco con solo la cefalosporina.

**Método confirmatorio para la presencia de carbapenemasas en enterobacterias:** se evidenció la existencia de una distorsión en intersección entre la zona de inhibición de la cepa

control alrededor del disco de ertapenem y 13 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, las cuales se confirmaron como productoras de carbapenemasa. La identificación molecular indicó una carbapenemasa tipo KPC.

**Pruebas de susceptibilidad a doripenem y meropenem:** la actividad *in vitro* de doripenem y meropenem, evaluados comparativamente frente a bacterias Gram negativas aerobias, es detallada en la tabla 2; y está expresada en términos de porcentaje de susceptibilidad y resistencia.

- **Prueba de difusión de disco:**

El 100% los aislamientos de *Escherichia coli* (n= 16), fueron reportados como susceptibles tanto a doripenem como a meropenem, por método de difusión de disco.

De los 27 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, 16 (59%), fueron reportados como susceptibles y 11 (41%), fueron resistentes a doripenem y meropenem.

Con respecto a la susceptibilidad observada en *Pseudomonas aeruginosa* (n=7), 3 aislamientos (43%), fueron susceptibles y 4 (57%) resistentes, tanto a doripenem como a meropenem

- **Prueba de gradiente de difusión E-test:**

El 100% los aislamientos de *Escherichia coli* (n= 16), fueron reportados como susceptibles tanto a doripenem como a meropenem, por método de gradiente de concentración E-test®.

De los 27 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, se observó una gran diferencia entre la susceptibilidad reportada a doripenem y meropenem por este método, en el cual 21 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* (78%), mostraron susceptibilidad, y 6 (22%) mostraron resistencia a meropenem, en contraste con la susceptibilidad reportada a doripenem, en la cual 14 aislamientos (52%) fueron susceptibles y 13 (58%) fueron resistentes a este antimicrobiano (estas últimas fueron las cepas productoras de KPC).

Con respecto a la susceptibilidad observada en *Pseudomonas aeruginosa* (n=7), el 100% de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron susceptibilidad a meropenem, mientras que 6 aislamientos (86%) mostraron susceptibilidad, y 1 (14%) fue resistente a doripenem.

**Tabla 1. Comparación de la sensibilidad a doripenem frente a meropenem por método de difusión de disco y método de gradiente de difusión *E-test***

ATB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE y KPC (n=27)				<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE (n=16)				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=7)			
	%S		%R		%S		%R		%S		%R	
	<i>E-test</i>	DD	<i>E-test</i>	DD	<i>E-test</i>	DD	<i>E-test</i>	DD	<i>E-test</i>	DD	<i>E-test</i>	DD
<b>DRPM</b>	52	59	48	41	100	100	0	0	86	43	14	57
<b>MEPM</b>	78	59	22	41	100	100	0	0	100	43	0	57

%S= susceptibilidad en porcentaje de cepas; % R= resistencia en porcentaje de cepas; ATB = antibiótico; DRPM= doripenem; MEPM= meropenem; DD= difusión de disco.

La correlación entre el método de difusión de disco y método de gradiente de difusión, para doripenem se detalla en la tabla 2, apreciándose la buena correlación entre los métodos, tanto para la categoría de susceptibilidad ( $k = 0.757$ ) como para la relación entre el diámetro de los halos de inhibición y los valores de la CIM, dados por las tiras de *E-test*® ( $r = -0.780$ ).

**Tabla 2. Concordancia de la actividad in vitro de doripenem por método de difusión de disco y método de gradiente de difusión *E-test*®, en 50 cepas aisladas de procesos intrahospitalarias y complicados.**

	<b>Valor</b>	<b>Interpretación</b>
<b>Índice de concordancia kappa (κ)</b>	0.757	Grado de acuerdo sustancial
<b>Coefficiente de correlación de pearson (r)</b>	-0.780	Correlación negativa alta

En la tabla 3, se detallan los resultados de la susceptibilidad *in vitro* frente a doripenem y meropenem de las 50 cepas obtenidas, con el método de difusión de disco y el método de gradiente de difusión *E-test*®

**Tabla 3. Resultados de susceptibilidad a doripenem y meropenem por el método de difusión de disco y método de gradiente de difusión *E-test*®; e interpretación en 50 cepas aisladas de procesos intrahospitalarias.**

Bacteria	No. Aislamiento Bacteriano	<b>MEROPENEM</b>			<b>DORIPENEM</b>				
		<i>E-test</i> CIM (ug/ml)	INTER.	DD (mm)	INTER.	<i>E-test</i> CIM (ug/ml)	INTER.	DD (mm)	INTER.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=27)	1	0.5	S	21	S	0.5	S	21	S
	2*	6	I	15	I	4	R	15	I
	3*	2	S	12	R	2	R	15	I
	4	0.064	S	30	S	0.032	S	30	S
	5*	-	R	-	R	-	R	-	R

	6	0.064	S	30	S	0.032	S	30	S
	7	0.094	S	30	S	0.094	S	30	S
	8*	3	S	15	S	2	R	15	I
	9	0.047	S	31	S	0.032	S	31	S
	10*	6	I	12	R	6	R	13	R
	11*	4	S	10	R	2	R	15	I
	12*	1.5	S	18	S	1.5	R	20	S
	13	0.047	S	32	S	0.023	S	32	S
	14	0.19	S	30	S	0.19	S	30	S
	15*	2	S	15	I	2	R	15	I
	16*	2	S	15	I	1	R	15	I
	17*	-	R	-	R	-	R	-	R
	18*	-	R	-	R	-	R	-	R
	19*	-	R	-	R	-	R	-	R
	20	0.75	S	18	S	0.50	S	18	S
	21	0.5	S	30	S	0.38	S	30	S
	22*	4	S	15	I	4	R	18	S
	23	0.064	S	32	S	0.064	S	32	S
	24	1	S	21	S	0.075	S	23	S
	25	0.125	S	30	S	0.125	S	30	S
	26	0.032	S	32	S	0.032	S	35	S
	26	0.047	S	32	S	0.032	S	35	S
<i>Escherichia coli</i> (n=16)	28	0.064	S	30	S	0.047	S	30	S
	29	0.5	S	21	S	0.5	S	25	S
	30	0.064	S	31	S	0.032	S	31	S
	31	0.047	S	30	S	0.023	S	30	S
	32	0.064	S	32	S	0.032	S	32	S
	33	0.064	S	30	S	0.047	S	30	S
	34	0.125	S	30	S	0.19	S	30	S
	35	0.064	S	30	S	0.047	S	30	S
	36	0.047	S	30	S	0.023	S	30	S
	37	0.064	S	30	S	0.032	S	30	S
	38	0.094	S	35	S	0.094	S	35	S
	39	0.064	S	31	S	0.047	S	31	S
	40	0.064	S	32	S	0.032	S	32	S
	41	0.5	S	20	S	0.5	S	25	S
	42	0.125	S	32	S	0.064	S	32	S
	43	0.047	S	32	S	0.032	S	35	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=7)	44	4	S	15	I	2	S	15	R
	45	3	S	15	I	2	S	15	R
	46	4	S	15	I	3	R	15	R
	47	0.5	S	30	S	0.38	S	30	S
	48	0.25	S	30	S	0.19	S	30	S
	49	0.5	S	30	S	0.38	S	30	S
	50	2	S	15	I	2	S	15	R

INTER= interpretación; S= susceptible; I= intermedio; R= resistente; DD= difusión de disco; \*= cepa productora de carbapenemasa KPC; - = inactivo

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las *Enterobacteriaceae* (frecuentemente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) productoras de BLEE, y bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran entre las causas más importantes de las infecciones intrahospitalarias, y la resistencia cada vez más frecuente a los antimicrobianos en estas especies, se ha convertido en un grave problema para las entidades de salud (Pitout *et al.*, 2005). Este estudio *in vitro*, mostro que doripenem, al igual que meropenem tiene una buena actividad frente a bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, y *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual se correlaciona con estudios realizados por Ge *et al.*, Jones *et al.*, en el año 2004, Keam y Pillar *et al.*, en el 2008; su buena actividad, se debe a la afinidad por una gran número de PBPs, inhibiendo así el entrecruzamiento de los peptidoglicanos causando la muerte celular bacteriana. (Goffin y Ghuysen, 1998; Massova y Mobashery, 1998).

Cabe destacar, que la producción de BLEE por *Escherichia coli*, no afecto la actividad *in vitro* de doripenem, ni meropenem, por ninguno de los dos métodos de susceptibilidad utilizados, mientras que producción de KPC por *Klebsiella pneumoniae* si lo hizo. Doripenem mostró una mejor actividad (>70%) contra los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE (CIMs 0.023-0.5 ug/mL), mientras que fue menos activo (<10%) contra los aislamientos productores de KPC de *Klebsiella pneumoniae* (CIMs 1.5->64 ug/mL), esto pone de manifiesto la pobre o nula actividad de doripenem frente a carbapenemasas, como lo demuestran otros estudios (Anderson *et al.*, 2007; Pillar *et al.*, 2008; Endimiani *et al.*, 2009.). Con respecto a *Pseudomonas aeruginosa*, solo uno de los aislamientos fue resistente a doripenem, este fenotipo de resistencia tal vez, estaría relacionado a la disminución o ausencia de la expresión de la porina OprD, que se encuentra en la membrana externa de esta bacteria, la cual es utilizada específicamente por las carbapenémicos para ingresar a la célula bacteriana, junto con otro mecanismo de resistencia, como lo es, la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM, capaz de eliminar el antimicrobiano del interior de *Pseudomonas aeruginosa* (Kohler, *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2009.).

Doripenem exhibió una disminución en la concentración mínima inhibitoria para algunos aislamientos de las dos *Enterobacteriaceae* estudiadas productoras de BLEE, y para *Pseudomonas aeruginosa*, con respecto a meropenem, lo que demuestra su gran estabilidad enzimática, y una ventaja sobre este último carbapenémico, ya que la erradicación de los microorganismos es más difícil de alcanzar, si las CIMs de los antimicrobianos son más altas. Asimismo, es importante recordar que las condiciones *in vivo* son distintas a las utilizadas para

esta prueba que se realiza *in vitro*. *In vivo*, la bacteria generalmente se encuentra un medio más ácido y anaerobio. Además, es mayor tamaño del inóculo bacteriano y probablemente no está en fase rápida de crecimiento; lo cual disminuye el valor predictivo de la CIM; por esta razón, que los valores más altos de la CIM de doripenem, apenas alcanzaran 0.5 ug/mL tiene un fuerte impacto clínico en las cepas estudiadas, ya que muchas de ellas se aislaron de secreciones, infecciones sistémicas, abdominales, de tracto respiratorio y urinario, por lo que podría ser una excelente alternativa de uso en pacientes gravemente enfermos (Drusano, 2004; Jones *et al.*, 2005; Keam, 2008; Lo *et al.*, 2009).

Al igual que en otros estudios (Mendes *et al.*, 2009; Jean *et al.*, 2010), con respecto a los resultados de la CIM de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, fue reportada una menor tasa de susceptibilidad a doripenem (52% y 86% respectivamente), en comparación con la tasa de susceptibilidad reportada a meropenem (78% y 100% respectivamente), probablemente, esto tenga que ver con las limitaciones de los actuales puntos de corte para meropenem, que impiden la detección de cepas productoras de carbapenemasas u otros mecanismos de resistencia. Los puntos de corte de doripenem utilizados en este estudio para *Enterobacteriaceae*, y *Pseudomonas aeruginosa* son los aceptados por la FDA ( $\leq 0.5$  mg/mL y  $\leq 2$  mg/mL respectivamente), mientras, el actual punto de corte recomendado por el CLSI para meropenem, es de  $\leq 4$  mg/mL para estos mismos microorganismos. El bajo valor de los puntos de corte para doripenem, consecuentemente aumenta el número de aislamientos resistentes (reconociendo la presencia de carbapenemasa para el caso de *Klebsiella pneumoniae*, y la probable disminución o ausencia de la expresión de la porina OprD y la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM, para el caso de *Pseudomonas aeruginosa*); y el valor de los puntos de corte para meropenem, hace que algunas de estas cepas cursen con aparente susceptibilidad (Endimiani *et al.*, 2009; Paterson y DePestel, 2009). De acuerdo a estos hechos, algunos autores opinan (Anderson *et al.*, 2007; Paterson y DePestel, 2009), que utilizando los puntos de corte de EUCAST ( $\leq 1$  mg/mL para *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*), la sensibilidad de detección de resistencia mediada por KPC, podría incrementar para los carbapenémicos. Sin embargo, el CLSI publicará próximamente los puntos de cortes actualizados para carbapenémicos en un nuevo suplemento del M100-S20. No obstante, sería prudente esperar a esta actualización para hacer un análisis detallado de los cambios propuestos, su impacto en la eficacia clínica y la compatibilidad con nuestra epidemiología y modalidad de trabajo (Corso y Pasteran, 2010.).

Aunado a lo anterior, algunos resultados de la CIM para meropenem, y de los halos de inhibición de doripenem, estuvieron dentro del rango de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC, también podría explicarse por la poca fiabilidad de los métodos *E-test*® y difusión de disco, para detectar la presencia de esta carbapenemasa, como lo indican otros estudios (Bratu *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2009; Goldfarb *et al.*, 2009). Aún los sistemas automatizados, tampoco son del todo confiables, Tenover *et al.*, probó 15 aislamientos clínicos, caracterizados por producir carbapenemasa del tipo KPC, resistentes a imipenem y meropenem, utilizando los métodos recomendados por el CLSI, microdilución en caldo, *E-test*®, MicroScan WalkAway, BD Phoenix Sensititre Autoreader, VITEK y VITEK2. Los sistemas automatizados reportaron tasas de susceptibilidad que van desde 6.7% hasta 87% dependiendo del sistema utilizado, también se observó una variación diaria, y además los resultados del método de gradiente de difusión *E-test*® fueron inconsistentes debido a colonias presentes dentro de la elipse de inhibición (Tenover *et al.*, 2006). Posiblemente, las limitantes de los métodos para el estudio de la sensibilidad bacteriana se deban a la influencia de factores como: actividad hidrolítica muy débil o baja expresión enzimática (debido a la alta variabilidad de KPC) (Wolter *et al.*, 2009), expresión simultánea de otros mecanismos de resistencia, tales como pérdida de porinas, o expresión de otras  $\beta$ -lactamasas, incluyendo BLEE y AmpC (Queenan y Bush, 2007). En estudio realizado por Bradford *et al.*, se reportó que la pérdida de una sola proteína de membrana externa en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, se correlacionan con la resistencia a imipenem, cuando también estas cepas expresan la  $\beta$ -lactamasa ACT-1, ya que esta enzima por sí sola, no es capaz de conferir resistencia al antimicrobiano (Bradford *et al.*, 1997.). Esto indica, que a pesar de la utilidad de estas pruebas, descritas como técnicas de uso rápido en el laboratorio, los resultados de este estudio apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad del uso de otras pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas (Test modificado de Hodge), y además de pruebas de identificación genética para la caracterización específica de la enzima (Nordmann y Poirel, 2002; Pasteran *et al.*, 2009).

Sin embargo, al analizar los resultados globales obtenidos por método de difusión de disco, se considera que esta metodología es adecuada para evaluar de manera cualitativa y rápida la actividad antimicrobiana de los carbapenémicos estudiados, contra enterobacterias productoras de BLEE, y *Pseudomonas aeruginosa*, además, estos resultados también sugieren que doripenem no desplaza a meropenem, ya que no hubo diferencias de comportamiento entre los resultados del diámetro de los halos de inhibición, entre estos dos antimicrobianos mostrando

un perfil similar de actividad, como lo indican otros estudios (Walsh, 2007; Keam, 2008; Pillar *et al.*, 2008).

Ahora bien, con respecto a la concordancia entre métodos para doripenem, en la actualidad no existen publicaciones que correlacionen las dos metodologías utilizadas. Los resultados de este estudio, indican que existe una buena correlación entre los métodos de difusión de disco y gradiente de difusión *E-test*® tanto para la categoría de susceptibilidad ( $k = 0.757$ ) como para la relación entre el diámetro de los halos de inhibición y los valores de la CIM ( $r = -0.780$ ); sin embargo, que la correlación no sea absoluta, muy seguramente tenga que ver con lo mencionado anteriormente, acerca de la dificultad en la identificación de carbapenemasas del tipo KPC. Pero en términos generales, se observa que los métodos utilizados en esta investigación para evaluar la actividad de doripenem, no demostraron diferencias significativas de desempeño para la detección de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE, y *Pseudomonas aeruginosa*, por esta razón se podría sugerir que los resultados intermedios o resistentes obtenidos por difusión de disco, sean comprobados por *E-test*®, y en caso de resistencia por ambos métodos debe estudiarse la cepa por el método de dilución en caldo (patrón de oro). Sin embargo hay que tener en cuenta, que a pesar de la fácil metodología de *E-test*®, esta técnica no es la más rentable para muchos laboratorios clínicos (Bradford, 2001.). Finalmente, los resultados de esta investigación son lo suficientemente estimulantes y abren las puertas para estudios futuros incluyendo un número mayor de aislamientos con el fin de ratificar los hallazgos del presente estudio.

## CONCLUSIONES

Doripenem, es un carbapenémico de amplio espectro, con actividad *in vitro*, con características similares a las de otros carbapenémicos como meropenem, pero un poco más potente y eficaz que este último, frente a bacilos Gram negativos entéricos y no fermentadores, debido a la modificación en la cadena lateral del anillo carbapenémico; esto aunado a el perfil de actividad presentado en este estudio y en otros, podría justificar que doripenem sea considerado como una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, frecuentemente involucradas en procesos intrahospitalarios y complicados. Pero a pesar de ello, hay que tener en cuenta que en algunos aislamientos de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*, la producción de carbapenemasas de clase A (KPC), clase B metalo- $\beta$ -lactamasas (IMP, VIM) de la clasificación de Ambler, o la sobreexpresión de sistemas de eflujo junto con la pérdida de la porina OprD en *Pseudomonas aeruginosa* puede conferir

resistencia a doripenem, y debido a que su uso es principalmente intrahospitalario, donde la resistencia a carbapenémicos, en algunos patógenos Gram negativos mediada por plásmidos ya ha sido documentada, es importante el continuo seguimiento de la actividad de este antimicrobiano de gran alcance antes y después de la introducción en el uso clínico.

## RECOMENDACIONES

El desarrollo de resistencia antimicrobiana de gran alcance como los carbapenémicos debe ser continuamente investigado; por ello, es importante que el laboratorio de microbiología cuente con un adecuado control de calidad en las pruebas de sensibilidad, mediante el ejercicio de la lectura interpretada del antibiograma, realizando un análisis fenotípico de los resultados de estas pruebas y fundamentado en el conocimiento de los mecanismos de resistencia y su expresión fenotípica, para así evitar el posible fracaso terapéutico derivado del uso antimicrobiano cuando se expresan estos mecanismos de resistencia en el microorganismo estudiado en el antibiograma; igualmente, hay que tener en cuenta que la utilización exclusiva de las categorías clínicas (sensible, intermedia o resistente) puede limitar la lectura interpretada del antibiograma, en particular si los puntos de corte clínicos no son adecuados. Esta circunstancia se agrava cuando se consideran mecanismos de resistencia de baja expresión que implican valores de CMI o halos de inhibición que apenas superan los puntos de corte de sensibilidad establecidos. El análisis interpretativo debe utilizar un amplio número de concentraciones y hacer especial énfasis en incluir concentraciones por debajo del punto de corte de sensibilidad con el objetivo de valorar cualquier desvío de los valores normales o habituales. Así el estudio cualitativo y su análisis eluden las discrepancias de criterios que puedan existir en la definición de las categorías clínicas entre los distintos comités. Teniendo en cuenta lo anterior, junto con datos de la experiencia clínica, y la epidemiología local, deben ser factores claves en la toma de decisiones para el uso clínico de los carbapenémicos. (Courvalin, 1992; Cantón, 2002).

## BIBLIOGRAFÍA

AFZAL-SHAH M, LIVERMORE DM. 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. 41:576-577.

ÁLVAREZ C, ROSENTHAL V, OLARTE N, *et al.* 2006. Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Columbian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. (27): 349-356.

AMBLER RP. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Biology*. 289:321-331.

AMBLER RP, COULSON AF, FRERE JM, GHUYSEN JM, JORIS B, FORSMAN M, LEVESQUE RC, TIRABY G, AND WALEY SG. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*. 276: 269-270.

ANDERSON KF, LONSWAY DR, RASHEED JK, *et al.* 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:2723–2725.

ARIAS C, PANESSO D, ZUÑIGA M. 2003. Guías para el uso racional de antibióticos  $\beta$ -lactámicos: mecanismos de resistencia y su interpretación clínica. *Biomédica*. 23(2):134-140

BAKER CN, STOCKER SA, CULVER DH, THORNSBERRY C. 1991. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(3):533–538.

BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists*. 36(3):49-52.

BAUERNFEIND A, GRIMM H, SCHWEIGHART S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 18:294-298.

BARTHÉLÉMY M, PEDRUZZI J, y LABIA R. 1985. Distinction entre les structures primaires des  $\beta$ -lactamases TEM-1 et TEM-2. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiology*. 136:311-321.

BENENSON AS. 1995. *Control of communicable diseases manual*, 16th edition. Washington, American Public Health Association.

BENNETT JV. 1982. Infecciones hospitalarias. La Habana: Ed. Científico-Técnica. 5-10.

BENNETT PM, CHOPRA I. 1993. Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37(2): 153–158.

BERKE J, TIerno PM. 1980. Comparison of efficacy and cost-effectiveness of BIOMIC VIDEO and Vitek antimicrobial susceptibility test systems for use in the clinical microbiology laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*. 34:1980–1984.

BIDET P, BURGHOFFER B, GAUTIER V, BRAHIMI N, MARIANI-KURKDJIAN P, EL-GHONEIMI A, BINGEN E, ARLETG. 2005. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:3562-3565.

- BOLHUIS H, VAN VEEN HW, MOLENAAR D, POOLMAN B, DRIESSEN AJM, KONINGS WN. 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiology Reviews*. 21:55-88.
- BUSH, K., JACOBY, G. A. & MEDEIROS, A. A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 1211-1233.
- BRADFORD PA. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Review* . 14: 933–951.
- BRADFORD PA, YANG Y, SAHM D, GROPE I, GARDOVSKA D, STORCH G. 1998. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42:1980-1984.
- BRADFORD PA, URBAN C, MARIANO N, PROJAN SJ, RAHAL JJ, BUSH K.1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC betalactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:563-569.
- BRATU S, MOOTY M, NICHANI S, LANDMAN D, GULLANS C, PETTINATO B, KARUMUDI U, TOLANEY P, QUALE J.2005. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:3018–3020.
- BRUIN-BUISSON C. 1994. Les infections dans les hopitaux. *La Recherche*. 266:706-707.
- CANTÓN R. 2002. Lectura Interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20: 176-185.
- CAO VT, ARLET G, ERICSSON BM, TAMMELIN A, COURVALIN P, LAMBERT T. 2000. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 46:895-900.
- CELIZ E. 2000. Determinación de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* comparando dos métodos: microskan versus dilucion en disco kirby Bauer. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 14(4).
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). 1991. Hospital Infections program. Atlanta
- COHEN ML. 1992. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science*. 1050-1055.
- COSGROVE SE, KAYE KS, ELIOPOULOUS GM, CARMELI Y. 2002. Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Archives of Internal Medicine*. 162:185–190.
- COURVALIN P. 1992. Interpretative reading of antimicrobial susceptibility test. *The American Society for Microbiology (ASM)*. 58:368-375.
- CORSO A, PASTERAN F. 2010. Novedades 2010 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Servicio Antimicrobiano. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”. 1-17.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. M100-S19. PA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20<sup>th</sup> informational supplement. M100-S20, PA.

CREDITO K. 2008. Comparative antianaerobic activities of doripenem determined by MIC and time-kill analysis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 52(1): 365-373.

CRESPO M P, WOODFORD N, SINCLAIR A, KAUFMANN ME, TURTON J, GLOVER J, VELEZ JD, CASTAÑEDA CR, RECALDE M, LIVERMORE DM. 2004. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal Clinical Microbiology*. 42:5094-5101.

CUNHA B. 2002. Ertapenem: a new carbapenem. *Drugs Today*. 38 (3):195-213.

DALLA-COSTA LM, COELHO JM, SOUZA HA, CASTRO MES, STIER CJ, BRAGAGNOLO JL, REA-NETO A, PENTEADO-FILHO SR, LIVERMORE DM, WOODFORD N. 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal Clinical of Microbiology*.41:3403-3406.

DEPARDIEU F, PODGLAJEN I, LECLERCQ R, COLLATZ E, COURVALIN P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Review*. 20:79-114.

DETTENKOFER M, EBNER W, HANS FJ, FORSTER D, BABIKIR R, ZENTNER J, PELZ K, DASCHNER FD. 1999. Nosocomial infections in a neurosurgery intensive care unit. *Acta Neurochirurgica (Wien)*.141:1303–1308

DING JG, SUN QF, LI KC, ZHENG MH, MIAO XH, NI W, HONG L, YANG JX, RUAN ZW, ZHOU RW, ZHOU HJ, HE WF. 2009. Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. *Biomed Central Infectious Diseases*. 9:115

DONALD HM, SCAIFE W, AMYES SG, YOUNG HK. 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA  $\beta$ -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*.44:196-199.

DUBOIS SK, MARRIOTT MS, AMYES SG. 1995. TEM- and SHV-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: relationship between selection, structure and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 35: 7-22

DURÁN PÉREZ J, RODRÍGUEZ LC, ALCALÁ-CERRA G. 2008. Mortalidad e infecciones nosocomiales en dos unidades de cuidados intensivos de la ciudad de Barranquilla (Colombia). *Salud Uninorte*. 24(1): 74-86.

DRUSANO GL. 2003. Prevention of resistance: A goal for dose selection for antimicrobial agents. *Clinical Infectious Diseases*. 36(1): 42-50.

DRUSANO GL. 2004. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nature Reviews Microbiology*.2: 289-300.

- EDWARDS JR. 1995. Meropenem: a microbiological overview. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 36:1-17.
- ENDIMIANI A, HUJER AM, PEREZ F, BETHEL CR, *et al.* 2009. Characterization of bla<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63(3): 427–437.
- ESPOSITO S, NOVIELLO S, LEONE S. 2008. Le infezioni urinarie associate a catetere: epidemiologia e prevenzione  
Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology and prevention. *Le Infezioni in Medicina*. 3:130-143.
- FERNÁNDEZ-CUENCA F, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, CONEJO MC, AYALA JA, PEREA EJ, PASCUAL A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51:565-574.
- FERRO S, CURE N, SUSSMANN O, VÉLEZ JD, ROBLEDO C, ROBLEDO J, VÉLEZ L, PACHECOL G, ROJAS LM. 1998. Sensibilidad *in vitro* de cepas obtenidas de pacientes hospitalizados a Meropenem y otros antibióticos. *Revista Infectio*. 2(11):31-35.
- GARNER JS, JARVIS WR, EMARI TG, HORAN TC, HUGUES JM. 1988. CDC definitions for nosocomial infections. *American Journal of Infection Control*. 16:128-140.
- GE Y, WIKLER MA, SAHM DF, BLOSSER-MIDDLETON RS, KARLOWSKY JA. 2004. *In vitro* antimicrobial activity of doripenem, a new carbapenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(4):1384–1396.
- GOFFIN C, GHUYSEN JM. 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology Molecular Biology Review*. 62(4):1079-1093.
- GOLDFARB D, HARVEY SB, JESSAMINE K, JESSAMINE P, TOYE B, DESJARDINS M. 2009. Detection of plasmid mediated KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: Evidence of Intra-Hospital Transmission. *Journal of Clinical Microbiology*. Accepts published online ahead. 1:10
- Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana (GREBO). 2009. Resultados de la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana. Boletín Informativo GREBO. Número 2, Bogotá, ISSN no. 2027-0860.
- HANCOCK RE. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends of Microbiology*. 5:37-42.
- HANSON ND, SANDERS CC. 1999. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Current Pharmaceutical Design*. 5:881-894.
- HARADA S, ISHII Y, YAMAGUCHI K. 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 28:401-412.
- HASHIZUME T, ISHINO F, NAKAGAWA J, TAMAKI S, MATSUHASHI M. 1984. Studies on the mechanism of action of imipenem (n-formimidoylthienamycin) *in vitro*: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli*

and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E coli*. The Journal of Antibiotics. 37(4):394-400.

HERNÁNDEZ JA. Factores de Riesgo y Costo Económico de la Infección Nosocomial en un Hospital e Amito Comarcal. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona. 2001.

HERITIER C, POIREL L, NORDMANN P. 2004. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D  $\beta$ -lactamase from *Shewanella algae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.48:1670-1675.

HIGGINS MK, BOKMA E, KORONAKIS E, HUGHES C, KORONAKIS V. 2004. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. Proceeding of the National Academy of Sciences. 101(27): 9994-9999.

HOCQUET D, NORDMANN P, EL GF, CABANNE L, PLESIAT P. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50:1347-351.

HOLMBERG SD, SOLOMON SL, BLAKE PA. 1987. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. Reviews of Infectious Diseases. 9: 1065-1078.

HORAN TC, MPH, ANDRUS M, RN, BA, CIC, DUDECK MA, MPH. ATLANTA, GEORGIA. 2008. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. American Journal of Infection Control. 36(5):309-332.

ITO H, ARAKAWA Y, OHSUKA S, WACHAROTAYANKUN R, KATO N, OHTA M.1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.39:824-829.

JACK DL, YANG NM, SAIER MH, JR. 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. European Journal of Biochemistry. 268:3620-3639.

JACOBS C, FRERE JM, NORMARK S. 1997.Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gramnegative bacteria. Cell. 88:823-32.

JACOBY GA, MUÑOZ-PRICE LS. 2005. The New Beta-lactamases. The New England Journal of Medicine. 352:380-91.

JACOBY GA. 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews. 22(1): 161-182.

JACOBY GA, MADEIROS AA. 1991. More extended spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35:1697-1704.

JEAN SS, HSUEH PR, LEE WS, CHANG HT, CHOU MY, CHEN IS, WANG JH, LIN CF, SHYR JM, KO WC, WU JJ, LIU YC, HUANG WK, TENG LJ. 2010. In vitro activities of doripenem and other carbapenems against clinically important bacteria isolated in intensive care units: nationwide data from the SMART Programme. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 29:471-475.

- JEON BC, JEONG SH, BAE IK, KWON SB, LEE K, YOUNG D, LEE JH, SONG JS, LEE SH. 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23  $\beta$ -lactamase in Korea. *Journal Clinical of Microbiology*.43:2241-2245.
- JONES RN. 2001. Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Program. *Clinical Infectious Diseases*. 32:S8-1-S156.
- JONES RN, HUYNH HK, BIEDENBACH DJ. 2004. Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(8):3136–3140
- JONES RN, SADER HS, FRITSCHER TR. 2005. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various  $\beta$ -lactamase resistance mechanisms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 52(1): 71-74.
- KAHAN FM, KROPP H, SUNDELOF JG, BIRNBAUM J. 1983. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 12:1-35.
- KEAM SJ. 2008. Doripenem. A review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*. 68: 2022-2049
- KNOTHE H, SHAH P, KRUMHOLTZ V, ANTAL M, MITSUHASHI S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11:315–317.
- KOHLER T, MICHEA-HAMZEHPUR M, EPP SF, PECHERE JC. 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial Agents and Chemother*. 43:424-427.
- KORAT B, MOTTI M, KECH W. 1991. Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the *dacB* gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Molecular Microbiology*. 5:675–684.
- LASSO M. 2003. Rotación de antimicrobianos en la Unidad de Terapia Intensiva: ¿Es ésta una estrategia útil?. *Revista Chilena de Infectología*.20(1):74 -79.
- LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R, ROSSOLINI GM. 1999. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.43:1584–1590.
- LEAL AL, BUITRAGO G, CIRTES JA, OVALLE MV, ALVAREZ CA, CASTILLO JS, LARROTA J, GALO S. 2008. “*In vitro* activity of tigecycline and other broad spectrum antibiotics against micro-organisms from infected patients in Colombia. *Clinical Microbiology and Infection*. Abstr. S625. 15 (4). Helsinki, Finland.
- LEVY SB. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36:695-703.
- LEWIS K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends in Biochemical Sciences*. 19:19-123.

- LINCOPAN N, MCCULLOCH JA, REINERT C, CASSETTARI VC, GALES AC, MAMIZUKA EM. 2005. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:516-519.
- LINDQUIST S, LINDBERG F, & NORMARK S. 1989. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC*  $\beta$ -lactamase gene. *Journal of Bacteriology* 171:3746–3753.
- LIVERMORE DM. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*. 8:557-584.
- LIVERMORE DM. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47:247-250.
- LIVERMORE DM. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. 34:634-640.
- LIVERMORE DM, BROWN DF. 2001. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(1):59-64.
- LIVERMORE DM, WINSTANLEY TG, SHANNON KP. 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(1):87-102.
- LIVERMORE DM, WOODFORD N. 2006. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*. 14:413-420.
- LO TS, BORCHARDT SM, WELCH JM, ROHRICH MA, ALONTO AM, ALONTO AV. 2009. Doripenem in hospital infections: a focus on nosocomial pneumonia, complicated intra-abdominal infections, and complicated urinary tract infections. *Infection and Drug Resistance*. 2:41-49.
- LÓPEZ SASTRE JB, COTO COLLADO D, FERNÁNDEZ COLOMER B. 2002. Neonatal sepsis of nosocomial origin: an epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo”. *Journal of Perinatal Medicine*. 30:149-157.
- LUDSKY K, HOYEN C, SALVATOR A, RICE L, TOLTZIS P. 2002. Antibiotic-resistant gram-negative organisms in pediatric chronic-care facilities. *Clinical Infectious Diseases*. 34: 760-766.
- MARÍN M, GUDIOL F. 2003. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21(1):42-55.
- MARTÍNEZ P, MERCADO M, MÁTTAR S. 2003. Determinación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en gérmenes intrahospitalarias del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colombia Médica*. 34:130-9.
- MARTINEZ-MARTINEZ L. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection*. 14 (1):82-89.
- MASSOVA I, MOBASHERY S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 42(1):1-17. Review.

MENDES C, ROSSI A, PRADO V, ZURITA J, ROBLEDO J, GUZMAN M, *et al.* 1999. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The Resisnet Group. Summaries, IDSA 37 Annual Meeting, Philadelphia, PA; p. 57 Abstract 99.

MENDES RE, RHOMBERG PR, BELL JM, TURNIDGE JD, SADER HS. 2009. Doripenem activity tested against a global collection of *Enterobacteriaceae*, including isolates resistant to other extended-spectrum agents. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 63(4):415-25.

MINSAP. 1998. Programa Nacional de Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias. La Habana: Folleto 1-15.

MORALES R. 2003. Ertapenem: una nueva clase de carbapenem. *Revista Chilena de Infectología*. 20 (4): 270--276

MOREIRA MA, DE SOUZA E, DE MORAES C. 2004. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:19-28.

MORITZ VA, CARSON PB. 1986. Cefoxitin sensitivity as a marker for inducible  $\beta$ -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*. 21:203-207.

MOTYL M, MIXSON L, FRIEDLAND IR, WOODS GL. 2003. Ertapenem: A parenteral, long-acting carbapenem. *Clinical Microbiology Newsletter*. 25(12):89-95

MOYA B, DÖTSCH A, JUAN C, BLÁZQUEZ J, ZAMORANO L, HAUSSLER S, OLIVER A. 2009. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *Plos Pathogens*. 5(3):e1000353.

MUSHTAQ S, LIVERMORE DM. 2004. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugates of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter spp.* with characterized  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents y Chemotherapy*. 48(4): 1313-1319.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM REPORT (NNISS). 2003. *American Journal Infection Control*. 31:481-509.

NAAS T, POIREL L, NORDMANN P. 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Infectious*. 14(1):42-52.

NAAS T, NORDMANN P. 1999. OXA-type  $\beta$ -lactamases. *Current Pharmaceutical Design*. 5:865-879.

NIKAIDO H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33: 1831-1836.

NIKAIDO H. 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 178:5853-5859.

NORDMANN P. 1998. Trends in  $\beta$ -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clinical Infectious Diseases*. 27(1):100-106.

NORDMANN P, MARIOTTE S, NAAS T, LABIA R, NICOLAS M. 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 37: 939-946.

NORDMANN P, POIREL L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology Infectious*. 8:321-331.

NEU HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 1064-1073.

OKAMOTO K, GOTOH N, NISHINO T. 2002. Alterations of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by overproduction of multidrug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 8:371-373

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2005. Prevención de las infecciones intrahospitalarias, Guía Práctica.

PALASUBRAMANIAM S, MUNIANDY S, NAVARATNAM P. 2009. Resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Malaysia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 42(2):129:133.

PASTERAN F, MENDEZ T, GUERRIERO L, RAPOPORT M, CORSO A. 2009. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(6): 1631-1639.

PATEL JB, *et al.* 2009. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology and laboratory detection. *Clinical Microbiology News*. 31:55-62.

PATERSON DL, DePESTEL DD. 2009. Doripenem. *Clinical Infectious Diseases*. 15; 49(2):291-8. Review.

PATERSON DL. 2002. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: A 21<sup>st</sup> century approach. *Clinical Infectious Diseases*. 34:1564-1567.

PATERSON DL, BONOMO RA. 2005. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(4):657-686.

PATERSON DL, HUJER KM, HUJER AM, YEISER B, BONOMO MD, RICE LB, BONOMO RA. 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:3554-3560.

PATON R, MILES RS, HOOD J, AMYES SGB. 1993. ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal Antimicrobial Agents*. 2:81-87.

PAULSEN IT, BROWN MH, SKURRAY RA. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiology Review*. 60:575-608.

- PAULSENIT, CHENJ, NELSONKE, SAIERMH. 2001. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*.3:145–150
- PECHÈRE JC. 1991. Why are carbapenems active against *Enterobacter cloacae* resistant to third generation cephalosporins. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 78:17–21.
- PIDDOK L. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Review*. 19(2): 382-402.
- PILLAR CM, TORRES MK, BROWN NP, SHAH D, SAHM DF. 2008. *In vitro* activity of doripenem, a carbapenem for the treatment of challenging infections caused by gram-negative bacteria, against recent clinical isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(12):4388-4399.
- PITOUT JD, NORDMANN P, LAUPLAND KV, POIREL L. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(1):52-59.
- POIREL L, WELDHAGEN GF, NAAS T, DE CHAMPS C, DOVE MG, NORDMANN P. 2001. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.45:2598-2603.
- POIREL L, BRINAS L, FORTINEAU N, NORDMANN P.2005. Integron-encoded GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.49:3593-3597.
- POIREL L, NAAS T, NICOLAS D, COLLET L, BELLAIS S, CAVALLO JD, NORDMANN P. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(4):891-897.
- POOLE K, TETRO K, ZHAO Q, NESHAT S, HEINRICHS DE, BIANCO N. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 2021-2028.
- PUREWAL AS. 1991. Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 82:229-232.
- PUTMAN P, VAN VEEN H, KONINGS N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 64: 672-693.
- PHILIPPON L N, NAAS T, BOUTHORS AT, BARAKETT V, NORDMANN P.1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum betalactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:2188–2195.
- PHILIPPON A, ARLET G, JACOBY GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:1-11.

QUEENAN A, TORRES VIERA C, GOLD H, CARMELI Y, ELIOPOULOS G, MOELLERING R, QUINN JP, HINDLER J, MADEIROS AA, BUSH K. 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 3035-3039.

QUEENAN AM, BUSH K. 2007. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Review*.20(3): 440–458.

RAHAL JJ. 2008. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram-negative infections. *Critical Care*.12(4):S5.

RASMUSSENBA, BUSHK, KEENEYD, YANG Y, HARE R, O'GARA C, MADEIROS AA. 1996. Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a novel class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*40: 2080–2086.

RICHARDS MJ, EDWARDS JR, CULVER DH, GAYNES RP. 1999. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Critical Care Medicine*.27:887–892.

RODRIGUES PMA, CARMO NETO E, SANTOS LRC, KNIBEL MF. 2009. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. *Journal Brasil of Pneumology*.35(11):1084-1091 .

ROSENTHAL VD, MAKI DG, SALOMAO R, MORENO CA, MEHTA Y, HIGUERA F, CUELLAR LE, ARIKAN OA, ABOUQAL R, LEBLEBICIOGLU H. 2006. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Annals of Internal Medicine*.145:582–591.

SYMMONS MF, BOKMA E, KORONAKIS E, HUGHES C, KORONAKIS V. 2009. From the Cover: The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 106(17): 7173–7178.

SOUGAKOFF W, GOUSSARD S, COURVALIN P. 1988. The TEM-3  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiology Letters*. 56:343–348.

RICCIO ML, FRANCESCHINI N, BOSCHI L, CARAVELLI B, CORNAGLIA G, FONTANA R, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM. 2000. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.44:1229-1235.

SÁNCHEZ P. 2003. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*. 16 (2): 172-187.

SCAIFE W, YOUNG HK, PATON RH, AMYES SGB. 1995. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *Journal. Antimicrobial and Chemotherapy*.36:585-586.

SCHEETZ MH, ESTERLY JS, MALCZYNSKI M, POSTELNICK M, QI C. 2009. Impact of dissimilar susceptibility breakpoints for doripenem on susceptibility and carbapenem discordance for *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 64(4):465-7.

SHAH PM, ISAACS RD. 2003. Ertapenem, the first of a new carbapenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52:538-542.

SU X, CHEN J, MIZUSHIMA T, KURODA T, TSUCHIYA T. 2005. AdeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (10): 4362-4364.

SUAREZ CJ, KATTÁN JN, GÚZMAN AM, VILLEGAS MV, 2006. Mecanismos de Resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*. 10(2): 85-93.

SWARTZ MN.1994.Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 91(7):2420-2427

SZABO DZ, FILETOTH J, SZENTANDRASSY M, NEMEDI E, TOTH C, JENEY G, KISPAL, ROZGONYI F. 1999. Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum betalactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:4167–4169.

TAFUR JD, TORRES JA, VILLEGAS MV. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gran negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*. 12(3):217-226.

TAROCCO R, SEIJA V, VIGNOLI R. 2006. Métodos de Estudio de la Sensibilidad Antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2<sup>da</sup> Ed Pp 663-672.

TENOVER, FCR, KALSI K, WILLIAMS PP, CAREY RB, STOCKER S, LONSWAY D, RASHEED JK, BIDDLE JW, MCGOWAN JE, AND HANNA B.2006. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging Infectious Diseases Journal*.12:1209-1213.

TOLEMAN M A, ROLSTON K, JONES RN, WALSH TR.2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d\_ beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*. 47:2859–2863.

TOLTZIS P, BLUMER J. 2001. Nosocomial acquisition and transmission of antibiotic-resistant Gram-negative organisms in the pediatric intensive care unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 20(6): 612-618.

TZOUVELEKIS LS, BONOMO RA. 1999. SHV-typeβ-lactamases.*Current Pharmaceutical Design*. 5:847-864

VILA J, MARTI S, SANCHEZ-CESPEDES J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 59:1210-1215.

VILA J, MARCO F. 2002.Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y MicrobiologíaClínica*. 20:304-310.

VILLANUEVA A, MARTÍNEZ P, MÁTTAR S, URBINA D. 2007. Prevalencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital San Jerónimo de Montería y la Clínica General del Norte de Barranquilla. *Infectio*. 7:103.

VILLEGAS MV, LOLANS K, CORREA A, SUAREZ CJ, LOPEZ JA, VALLEJO M, QUINN JP. 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50:2880-2882.

VILLEGAS MV, LOLANS K, OLIVERA MR ET AL. 2006. First detection of metallo-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50:226-229.

VILLEGAS MV, LOLANS K, CORREA A, KATTAN JN, LOPEZ JA, QUINN JP. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:1553-1555.

VILLEGAS MV, KATTAN JN, CORREA A, LOLANS K, GUZMAN AM, WOODFORD N, *et al.* 2007. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

VON GRAEVENITZ A. 1985. Ecology, clinical significance, and antimicrobial susceptibility of infrequently encountered glucose-non fermenting gram-negative rods. En: Gilardi GL(Ed), *Non fermentative gram-negative rods. Laboratory identification and clinical aspects.* Marcel Dekker, Inc., New York p.181-232.

WALSH F. 2007. Doripenem: A new carbapenem antibiotic a review of comparative antimicrobial and bactericidal activities. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 3(5): 789-794.

WALSH T, TOLEMAN MA, POIREL L, NORDMANN P. 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Review*. 18:306-325.

WARREN D, FRASER V. 2001. Infection control measures to limit antimicrobial resistance. *Critical Care Medicine*. 29(4): 128-132.

WATANABE M, IYOBE S, INOUE M, MITSUHASHI S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35:147-151.

WEBB GF, D'AGATA EM, MAGAL P, RUAN S. 2005. A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 102:13343-13348;

WINOKUR PL, CANTON R, CASELLAS JM, LEGAKIS N. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamases phenotype of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Diseases*. 32:94-103.

WISEMAN LR, WAGSTAFF AJ, BROGDEN RN, BRYSON HM. 1995. Meropenem. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs*. 50(1):73-101.

WOLTER DJ, KURPIEL PM, WOODFORD N, PALEPOU MFI, GOERING RV, HANSON ND. 2009. Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis of the Novel KPC Variant KPC-5 and Its Evolutionary Variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(2): 557-562.

YANG Y, WU P, LIVERMORE D. 1990. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 223-232.

YEPES CA, RODRÍGUEZ A, RUIZ A, ARIZA B. 2008. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Médica Colombiana*. 33(1):11-14.

YIGITH, QUEENANAM, ANDERSONGJ, DOMENECH-SANCHEZ A, BIDDLE JW, STEWARD CD, ALBERTI S, BUSH K, TENOVER FC. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45:1151-1161

YIGIT H, QUEENAN AM, RASHEED JK, BIDDLE JW, DOMENECH-SANCHEZ A, ALBERTI S, BUSH K, TENOVER FC. 2003. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:3881-3889.

ZHANEL GG, WIEBE R, DILAY L, THOMSON K, RUBINSTEIN E, HOBAN DJ, NOREDDIN AM, KARLOWSKY JA. 2007. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 67(7):1027-1052.

ZHI X, NIKAIIDO H. 2004. Efflux mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 62 (2): 159-204.

Anexo 1. Plantilla de Registro de Resultados

Sexo	Edad	Dx	Serv.	Fecha de Ingreso	Fecha de Aislamiento Bacteriano	Tipo de Infección	Tipo de Muestra	Resultado del Cultivo	MEPM CIM (ug/mL)	DRPM CIM (ug/mL)	MEPM Difusión en Disco (mm)	DRPM Difusión en Disco (mm)
F	37	LES	MI	28/09/09	12/10/09	IVU	Orina	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.50	0.50	21	21
M	59	Politrauma Autopedestre	CIR	13/08/09	27/10/09	IVU	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	4	15	15
M	59	Politrauma Autopedestre	CIR	13/08/09	29/10/09	Bacteremia	Secreción Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	12	15
M	53	DM con pie diabetico	UCI	21/09/09	2/11/09	Bacteremia	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.064	0.032	30	30
M	70	DM y Edema Pulmonar	CIR	12/09/09	2/11/09	Neumonía	Secreción Esternal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
M	64	ERC	CIR	19/10/09	5/11/09	IVU	Punta de Cateter	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.064	0.032	30	30
F	71	ERC	MI	21/10/09	5/11/09	IVU	Orina	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.047	30	30
M	58	Choque Cardiogenico	UCI	3/11/09	7/11/09	Bacteremia	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.094	0.094	30	30
M	69	Apendicitis Aguda	URG	3/11/09	12/11/09	Infección Intrabdominal	LPE	<i>Escherichia coli</i>	0.50	0.50	21	25
M	26	HIV	MI	25/10/09	21/11/09	Infección de Tejidos Blandos	Secreción Ulcera Talar	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2	15	15
M	41	HIV	MI	11/11/09	25/11/09	Neumonía	Punta de Cateter	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.047	0.032	31	31
M	66	DM y Osteomielitis	CIR	23/11/09	25/11/09	Osteomielitis	Hueso de Talón Derecho	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	12	13
M	26	HIV	MI	25/10/09	25/11/09	Infección de Tejidos Blandos	Tejido Necrotico de Pie Derecho	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	2	10	15
M	29	Politraumatismo por HPAT	CIR	12/11/09	27/11/09	Traqueitis	Secreción Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.5	1.5	18	20

Sexo	Edad	Dx	Serv.	Fecha de Ingreso	Fecha Aislamiento Bacteriano	Tipo de Infección Nosocomial	Tipo de Muestra	Resultado del Cultivo	MEPM CIM (ug/mL)	DRPM CIM (ug/mL)	MEPM Difusión en Disco (mm)	DRPM Difusión en Disco (mm)
F	77	Disectomia, Artrodesis de Columna	UCI	30/09/09	6/12/09	Bacteremia	Sangre	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4	2	15	15
F	77	Disectomia, Artrodesis de Columna	UCI	30/09/09	08/12/09	Bacteremia	Orina	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	2	15	15
F	77	Disectomia, Artrodesis de Columna	UCI	30/09/09	08/12/09	Bacteremia	Aspirado Traqueal	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4	3	15	15
M	71	DM y Traqueitis	UCI	7/12/09	13/12/09	IVU	Orina	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.032	30	30
M	79	DM y Enfermedad coronaria	URG	13/12/09	15/12/09	IVU	Orina	<i>Escherichia coli</i>	0.047	0.023	30	30
M	32	HIV	MI	13/12/09	15/12/09	Bacteremia	Sangre	<i>Klebsiella pneumonia</i>	0.047	0.023	32	32
F	77	Disectomia, Artrodesis de Columna	UCI	30/09/09	16/12/09	Bacteremia	Sangre	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.50	0.38	30	30
M	32	HIV	UCI	4/12/09	17/12/09	Bacteremia	Sangre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.19	0.19	30	30
M	30	Colecistectomía, Necrosectomía Pancreatica	URG	20/10/09	21/12/09	Infección Intrabdominal	Secreción Herida Abdominal	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.032	32	32
F	43	Cancer gastrico	UCI	5/12/09	23/12/09	Infección Intrabdominal	Líquido Cavidad Abdominal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	15	15
F	43	Eventorrafia con Malla	MI	21/12/09	23/12/09	Infección Intrabdominal	Drenaje Colección Abdominal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.25	0.19	30	30
M	77	Celulitis Región Inguinal	UCI	24/12/09	30/12/09	Infección Intrabdominal	Tejido Epiplon	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.50	0.38	30	30
M	21	Epilepsia Multifocal Refractaria	UCI	14/12/09	02/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Cateter	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1	15	15
M	21	Epilepsia Multifocal Ractaria	UCI	14/12/09	02/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Secreción Uretral	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-

Sexo	Edad	Dx	Serv.	Fecha de Ingreso	Fecha de Aislamiento Bacteriano	Tipo de Infección Nosocomial	Tipo de Muestra	Resultado del Cultivo	MEPM CIM (ug/mL)	DRPM CIM (ug/mL)	MEPM Difusión en Disco (mm)	DRPM Difusión en Disco (mm)
M	44	Reemplazo Total de Cadera	CIR	28/12/09	03/01/10	Infección por Reemplazo Total de Cadera	Secreción Interfase Superficial	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.032	31	31
F	43	Cancer Gastrico	MI	5/12/09	05/01/10	Infección Intrabdominal	Liquido Peritoneal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
M	44	Reemplazo Total de Cadera	CIR	12/12/09	05/01/10	Infección por Reemplazo Total de Cadera	Secreción de Drenaje	<i>Escherichia coli</i>	0.125	0.19	30	30
M	21	Epilepsia Multifocal Refractaria	UCI	14/12/09	06/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Deshibr. Tejido Genital	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
F	62	Cáncer Renal, con Metástasis Oseas	MI	05/01/10	11/01/10	Bacteremia	Sangre	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.047	30	30
M	21	Epilepsia Multifocal Refractaria	UCI	14/12/09	11/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.75	0.50	18	18
M	21	Epilepsia Multifocal Refractaria	UCI	14/12/09	12/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0.50	18	20
F	62	Cáncer Renal, con Metástasis Oseas	UCI	05/01/10	13/01/10	Bacteremia	Orina	<i>Escherichia coli</i>	0.047	0.023	30	30
M	77	Adenocarcinoma y Metaplasia Intestinal	UCI	05/01/10	13/01/10	Neumonia Nosocomial	Secreción de Herida	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4	15	18
F	37	Trauma Raquimedular HPAF	UCI	13/01/10	16/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Hueso	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.032	30	30
F	52	Transplante de Riñon Nefrostomia	MI	15/01/10	17/01/10	IVU	Orina	<i>Escherichia coli</i>	0.094	0.094	35	35
M	67	Enfermedad Arterial Oclusiva	URG	10/01/10	18/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Secreción Injerto Infectado	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.064	0.064	32	32
M	55	Adenocarcinoma de Recto	UCI	27/12/09	19/01/10	Infección Intrabdominal	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.0	0.075	21	23
M	53	DM con pie diabetico	URG	01/01/10	20/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Sangre	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.047	31	31

Sexo	Edad	Dx	Serv.	Fecha de Ingreso	Fecha de Aislamiento Bacteriano	Tipo de Infección Nosocomial	Tipo de Muestra	Resultado del Cultivo	MEPM CIM (ug/mL)	DRPM CIM (ug/mL)	MEPM Difusión en Disco (mm)	DRPM Difusión en Disco (mm)
M	53	DM con pie diabetico	UCI	18/12/09	23/01/10	Infección de Tejidos Blandos	Tejido Necrotico Pie Derecho	<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.032	32	32
M	77	Adenocarcinoma y Metaplasia Intestinal	UCI	22/01/10	26/01/10	Bacteremia	Sangre	<i>Escherichia coli</i>	0.50	0.50	20	25
M	76	Eventorrafia abdominal	UCI	20/01/10	27/01/10	Infección intrabdominal	Drenaje	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.125	0.125	30	30
M	53	DM con pie diabetico	UCI	20/01/10	27/01/10	Neumonía Nosocomial	Lavado Bronquial	<i>Escherichia coli</i>	0.125	0.064	32	32
F	68	Síndrome de canal medular	MI	23/01/10	29/01/10	IVU	Orina	<i>Escherichia coli</i>	0.047	0.032	32	35
F	81	Fractura vertebras lumbares	URG	24/01/10	04/02/10	IVU	Orina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.032	0.032	32	35
M	41	HIV	UCI	24/01/10	05/02/10	Neumonía Nosocomial	Cateter	<i>Klebsiella pneumonia</i>	0.047	0.032	32	35
F	77	Gastromía	CIR	23/01/10	05/01/10	Infección Intrabdominal	Tejido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	15	15

F= femenino, M= masculino, DX= diagnostico, Serv= servicio, MEPM= meropenem, DRPM= doripenem, LES= lupus eritematoso sistémico, DM= diabetes mellitus, HPAF= herida por arma de fuego, ERC= enfermedad renal crónica, HIV= virus de inmunodeficiencia humana, - = inactivo.

