



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO ACADEMICO PARA OPTAR POR
EL TITULO DE ESPECIALISTA EN
MICROBIOLOGIA CLINICA

CARBAPENEMASA NUEVA DELHI TIPO 1 (NDM): DESCRIPCIÓN
FENOTÍPICA Y EPIDEMIOLÓGICA

AUTOR:

LIZET IMELDA CAMARA LOPEZ

LIMA – PERU

2020

ASESOR (ES): MG. MARÍA DEL CARMEN QUISPE MANCO

DR. PAUL RUBEN ALFARO FERNANDEZ

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza para seguir avanzado en este camino de la vida y a mis padres Imelda y Miguel quienes con su esfuerzo y amor lograron forjar en mí la persona que soy.

AGRADECIMIENTO

A la universidad Cayetano Heredia por brindarme la oportunidad de poder ampliar mis conocimientos y desarrollarme como profesional, a mis maestros de esta especialidad que con sus enseñanzas lograron despertar en mí el deseo de crecer día a día

FINANCIAMIENTO

El financiamiento del presente trabajo fue asumido de manera integral por la autora, sin ocasionar ningún tipo de costo a la universidad ni a ninguna otra institución, no habiendo recibido ningún tipo de subvención económico ni de materiales, ni donación de ningún tipo, siendo un trabajo autofinanciado

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Antecedentes	3
Las β -Lactamasas	3
Carbapenemasas	4
Origen de las Carbapenemasas Nueva Delhi Tipo 1 (NDM).....	5
Características fenotípicas.....	8
Diagnóstico de laboratorio	10
Características epidemiológicas	15
CONCLUSIONES	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
ANEXOS	23

RESUMEN

La resistencia bacteriana en el mundo es un problema de salud pública, las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM) es hoy por hoy una nueva amenaza que ocasiona fracasos terapéuticos con los antimicrobianos actualmente disponibles, derivando en una alta morbi-mortalidad de los afectados.

El objetivo de la presente monografía fue describir las características fenotípicas, epidemiológicas y el diagnóstico laboratorial de las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM) de acuerdo a la revisión bibliográfica en los últimos 5 años.

Desde su aparición en el 2008 en la India y su diseminación mundial, se sabe que las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan los anillos β -lactámicos, son producidas por bacterias que han logrado bloquear a estos antibióticos, al modificar genéticamente la producción de peptoglicanos; una variedad de beta-lactamasas es la Metallo- β -lactamasa, cuyo comportamiento tiene relación con una molécula de Zinc en su sitio activo. Actualmente se están mejorando las pruebas para la identificación específica de estas Carbapenemasas, por ejemplo: la cristalografía en serie de femtosegundos, con nuevas combinaciones de β -lactámicos e inhibidores metalo- β -lactamasa

Conclusión las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM) son enzimas con capacidad de inhibir la acción de fármacos de última generación, su aparición demanda mejores métodos para su identificación y nuevos fármacos para su tratamiento, así como, de exigentes medidas de prevención y control.

Palabras clave

Resistencia bacteriana, β -lactamasas, Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1

INTRODUCCIÓN

La aparición de entero-bacterias productoras de Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1, usualmente conocida como NDM, complica aún más el problema de la resistencia bacteriana en el mundo, y hoy por hoy, es una amenaza a la salud pública, al ocasionar fracasos terapéuticos con los antimicrobianos actualmente disponibles. Toma el nombre de Nueva Delhi porque el primer caso reportado fue un paciente de Suecia que retornaba de la India. El mecanismo de resistencia de estas entero-bacterias radica en que la enzima producida contiene zinc en su estructura molecular, lo que le permite hidrolizar a los β -lactámicos a excepción de los mono-bactámicos (1).

La aparición de esta nueva resistencia bacteriana data del año 2008 cuando se reportó la presencia de entero-bacterias resistentes a diversos antibióticos en centros hospitalarios en Pakistán e India e incluso en países del primer mundo, como Inglaterra, difundiéndose luego a Italia, Japón, Canadá y Estados Unidos. Entero-bacterias como *E. coli* y *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter*, entre otras, son productoras de NDM, resistentes a los carbapenémicos, al ser microorganismos capaces de invadir diferentes órganos y tejidos como pulmones, heridas, peritoneo o en infecciones vinculadas al uso de dispositivos médicos (2) (3).

El primer reporte en Latinoamérica fue en el año 2011 en dos pacientes pediátricos de Guatemala sin antecedentes de haber salido del país, seguidamente se presentó un brote en neonatos de Colombia, Uruguay y Paraguay. Debido su dispersión a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitieron alertas epidemiológicas,

recomendando a los países miembros, la adopción de medidas preventivas, ante el avance de estas bacterias resistentes, especialmente en entornos hospitalarios (4).

En el año 2016, el primer reporte en el Perú fue el resultado de un estudio realizado en un hospital nacional de Lima con nueve pacientes que dieron positivo a *Klebsiella pneumoniae* con Carbapenemasas tipo Delhi 1 (NDM) (5).

El presente trabajo académico busca realizar una revisión bibliográfica de un problema que aún no ha sido suficientemente investigado, debido a la escasez de medios que permitan una adecuada identificación bacteriana, y contribuirá con la actualización de conocimientos relacionados a la presencia de Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM) en nuestro país y en países de la región, favoreciendo en particular, a la capacitación de profesionales tecnólogos médicos relacionados al diagnóstico laboratorial, metodologías y procedimientos para su respectiva identificación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Describir las características fenotípicas y epidemiológicas de la Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM) de acuerdo a la revisión bibliográfica en los últimos 5 años.

Objetivos Específicos

1. Describir el origen y clasificación de las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1.
2. Describir las características moleculares y fenotípicas de las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1.
3. Describir el diagnóstico laboratorial de las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1.

4. Describir la distribución epidemiológica de las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1.

Antecedentes

❖ Las β -Lactamasas

El mecanismo más eficiente de la resistencia microbiana ante los β -lactámicos es la producción genética de β -lactamasas, cuya codificación se encuentra en el cromosoma o en los plásmidos de estas bacterias; se cree que dicha producción enzimática sería resultado de la evolución de las proteínas de unión a Penicilina al lograr un alto grado de similitud entre ellas (2).

Clasificación de las β -lactamasas

Según la clasificación de Ambler, las β -lactamasas se dividen en cuatro grupos según su estructura molecular: los grupos A, C y D son serin- β -lactamasas debido a que contiene una Serina en el sitio activo, y el grupo B son Metallo- β -lactamasas por la presencia de zinc en su sitio activo. En la década de los 80, Bush, Jacoby y Medeiros revisan y definen una nueva clasificación, basada en el tipo de sustrato, capacidad inhibitoria y estructura molecular de las enzimas. En el año 2010, Bush y Jacoby actualizan la clasificación de Bush-Jacoby y de Ambler. Actualmente se utiliza la siguiente clasificación asociada:

- Grupo 2f: aquí se encuentran las β -lactamasas grupo A de Ambler, las que presentan restos de Serina en los sitios activos, son sensibles a la acción de Serino- β -lactamasas, solo se han logrado aislar en entero-bacterias.
- Grupo 3: estas enzimas son Metallo- β -lactamasas, grupo B de Ambler y son inhibidas por agentes quelantes, pero no por el ácido Clavulánico o

Tazobactam, tienen la capacidad de hidrolizar varios sustratos, la mayoría son de origen cromosómica (6).

❖ Carbapenemasas

Las enzimas Carbapenemasas desde la aparición del Imipenem en la década de los 80, fueron encontradas en *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus* y *Stenotrophomona maltophilia*. En la década de los 90 en el Japón se identifica en bacterias del campo clínico, por lo que hubo un mayor interés en el estudio de su estructura y función, debido a sus implicancias en la salud humana. Gracias al descubrimiento de las Carbapenemasas MP-1, KPC-1 y ARI-1, codificadas en plásmidos y al cambio del patrón de diseminación enzimática, hay una reestructuración en su clasificación. Hasta los años 90 eran escritas de acuerdo a su especie, codificación cromosómica y características enzimáticas, dejando de considerarla como expansión clonal de las especies, sino como una dispersión entre las especies. Las Carbapenemasas se han encontrado en *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, más diseminada principalmente, en la parte sur de Europa y en la zona de Asia (7).

Metallo- β -lactamasas (Clase B)

Este tipo de Carbapenemasas presenta mayor diversidad molecular y mayor impacto clínico. Las primeras bacterias que presentaron este tipo de enzimas en su cromosoma fueron ambientales y oportunistas. Las Metallo- β -lactamasas cromosómicas están relacionadas directamente con la prevalencia de la especie que la va a producir y en los últimos años, las Metallo- β -lactamasas adquiridas y

transferidas se han incrementado y expandido, existiendo al menos 9 tipos; tan amplia es su distribución que, en el caso de la familia VIM cuenta con casi 25 tipos, esto debido a que los genes que codifican a las Metallo- β -lactamasas se encuentran en los plásmidos y en los cromosomas, formando parte de genes en integrones de clase 1 o movilizados a través de elementos de inserción ISCR. Hace poco se ha descubierto que los genes bla_{VIM} se encuentran en transposones. Estas enzimas poseen Zinc en su sitio activo en vez de serina presente en las enzimas del grupo A y D, por lo que el ataque al núcleo del anillo β -lactámicos resulta esencial. Las Metallo- β -lactamasas tienen la capacidad de hidrolizar a todos los β -lactámicos menos al Aztreonam debido a que los Metallo- β -lactamasas se unen con muy baja afinidad a los Monobactámicos. Las investigaciones apuntan a que el acoplamiento en el sitio activo de este fármaco no favorece la hidrolización, además, el ácido Clavulánico y el Tazobactam no las inhibe como si sucede con el EDTA (14); algunas bacterias son capaces de producir otras β -lactamasas, por esta razón es común identificar bacterias productoras de BLEE que si logran hidrolizar al Aztreonam (8) (9)

Origen de las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM)

Los casos de resistencia antimicrobiana (RAM) más difundidos y los más graves en términos de morbilidad y mortalidad se relacionan con las bacterias; diversos mecanismos genéticos, bioquímicos y fisiológicos pueden ser responsables de RAM, pero el que genera mayor preocupación por su asociación a resistencia extrema o pan-resistencia, es la producción de enzimas β -lactamasas, en especial

las carbapenemasas de los tipos *Klebsiella pneumoniae* (KPC), oxacilinas (OXA) y metaloenzimas (Nueva Delhi metaloenzima, NDM) (10). Anexo (1)

El mecanismo más común de resistencia de agentes bacterianos Gram negativos de gran importancia clínica es la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos por medio de enzimas (11) .

Los Carbapenémicos son antibióticos de gran importancia en el tratamiento de muchas patologías clínicas, estos medicamentos son de tipo β -lactámicos, poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, tienen una gran potencia con microorganismos Gram negativos y se usan como tratamiento de última línea cuando hay sospecha de una infección resistente a antibióticos de menor amplitud. Lamentablemente, muchas de las bacterias Gram negativas no fermentadoras como la *Pseudomona spp*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas spp* y algunas bacterias miembros de las *Enterobacteriaceae* como la *Klebsiella spp*, *E. coli* y *Enterobater spp*, son o se han convertido en resistentes a la mayoría de medicamentos Carbapenémicos disponibles. Dentro de los mecanismos de resistencia bacteriana contra los Carbapenémicos se tiene: la producción de β -lactamasas, mutaciones que producen alteración en la función de expresión de las porinas, bombas de expulsión y la presencia de proteínas ligadoras de Penicilina. Cuando estos mecanismos se presentan en conjunto en algunas especies bacterianas como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, ocurren altos niveles de resistencia a los Carbapenémicos. En el caso de las bacterias coco Gram positivo, la resistencia a Carbapenémicos se da por sustitución en las secuencias de los aminoácidos de las proteínas ligadoras de penicilina La forma de resistencia a medicamentos

Carbapenémicos más frecuente pareciera ser la presencia de enzimas que son capaces de hidrolizar estos antibióticos, denominadas Carbapenemasas, estas enzimas presentan cuatro clases moleculares: clase A: que incluye tres grupos, que presentan una codificación cromosómica y son inhibidos por el ácido Clavulánico (IMI, NMS-A y SME), se encuentran en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*, que codifican plásmidos denominados KPC, en bacterias que pertenecen a las *Enterobacteriaceae* y en aquellas bacterias que pertenecen a las enzimas tipo GES, identificadas en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las enzimas clínicamente más importantes son las de tipo B denominadas Metallo-beta-lactamasa, la mayoría de estas pertenecen a la serie IMP y VIM, inicialmente estas enzimas fueron reportadas en el mundo debido a su capacidad para hidrolizar a todos los beta-lactámicos a excepción del Aztreonam (12).

Las últimas Carbapenemasas reconocidas son las enzimas Metallo-beta-lactamasa del tipo Nueva Delhi, reportadas en diferentes partes del mundo desde su aparición en el 2008, en pacientes que habían tenido contacto o permanecido en la India (13). Los estudios moleculares realizados por el doctor Yong y su equipo en el primer caso confirmado de presencia de estas enzimas, demostró que esta Carbapenemasa clase B poseía una secuencia de aminoácidos diferentes que se encontraban cerca al sitio activo de la enzima, por lo que sugirió el descubrimiento de una nueva especie, diferente a las ya descritas (3).

Características fenotípicas

La mayoría de las entero-bacterias que posee Carbapenemasas tipo NDM son multi-resistentes a los beta-lactámicos y en ocasiones a otros no beta-lactámicos debido a que poseen en su ADN una gran cantidad de genes que permiten resistir la acción de estos medicamentos, a diferencia de otras Carbapenemasas como las de tipo KPC o VIM (14).

La enzima NDM-1 es un subtipo de Carbapenemasas tipo NDM que muestra mucha afinidad por las cefalosporinas en especial por la cefuroxime, cefotaxima y cefalotina; además de una relativa afinidad por las Penicilinas, lo cual resulta inusual en las Metallo-beta-lactamasas. Es importante señalar que la enzima NDM-1 no presenta unión tan fuerte a los Carbapenémicos como si lo hace los tipos IMP-1 y VIM-2 (2). Cuando la enzima NDM-1 fue analizada clínicamente presentó susceptibilidad únicamente a Tigeciclina, Colistina o Fosfomicina, sin embargo, en el caso de *Klebsiella pneumoniae* con enzima NDM-1 presentaba resistencia intermedia a Fosfomicina y Tigeciclina, en los casos de *E. coli*, los aislamientos clínicos fueron susceptibles a Cloranfenicol, Nitrofurantoína, Tetraciclinas y Cotrimoxazol, sin embargo, esta susceptibilidad no muestra confiabilidad en los casos que presentan las enzimas NDM. Aunque el Aztreonam es hidrolizado por la enzima NDM-1, en los ensayos clínicos esta enzima demostró resistencia a Monobactámicos, información que permite concluir que hay producción de otras enzimas beta-lactamasas en conjunto, en su mayoría, de tipo CTX-M y las cefalosporinas tipo AmpC (15).

En la investigación realizada en el hospital nacional de Lima se encontró un patrón fenotípico de BLEE que inhibe a las beta-lactamasas, Nitrofurantoína,

Cotrimoxazol y Quinolonas, además de encontrar susceptibilidad en todos los cultivos a Amikacina, además de dar positivo a NDM (5).

Para poder analizar el perfil fenotípico de una entero-bacteria de tipo NDM-1, en el reporte de tamizaje antibiótico se debe encontrar las características que lleven a sospechar de la presencia de estas enzimas, las cuales son: resistencia a Cefalosporinas (menos las de cuarta generación), sensibilidad a Monobactámicos y resistencia a Carbapenémicos; en el caso de los demás antibióticos, estos no podrían estar afectados, esa situación dependerá de la presencia de genes de resistencia que actúen conjuntamente con la enzima NDM-1. Las enzimas NDM-1 presentan sensibilidad a Tetraciclina, Cotrimoxazol, Cloranfenicol y Nitrofurantoína. Pranita en el 2019 refiere que la resistencia al carbapenem es consecuencia de varios mecanismos heterogéneos: las enzimas carbapenemasas, que hidrolizan el anillo de beta-lactamasa de los antibióticos carbapenem, son comunes a *Enterobacteriaceae* y *A baumannii*, en USA, el 50% de cepas de CRE son productores de carbapenemasas, el 95% de las carbapenemasas son carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), y el resto pertenece al grupo de carbapenemasas de metalo-beta-lactamasas (NDM) de Nueva Delhi o de tipo oxacilinasas 48 (tipo OXA-48). Agrega que las carbapenemasas de tipo KPC y OXA-48 son carbapenemasas de serina, y NDM, junto con las metalo-beta-lactamasas (VIM) y las imipenemasas (IMP) codificadas por Verona, son carbapenemasas de metalo-beta-lactamasa (MBL) comunes, denominadas como tales porque requieren la presencia de zinc en su sitio activo para funcionar. El resto de la resistencia a carbapenem en *Enterobacteriaceae* generalmente es causada por la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y / o

beta-lactamasas de AmpC (AmpCs), en combinación con una expresión reducida de porina (por ejemplo, mutación Ompk35, mutación Ompk36, etc; o sobreexpresión de las bombas de eflujo, por ejemplo: la bomba de eflujo AcrAB-TolC). Agrega que antibióticos beta-lactámicos contra microorganismos resistentes a carbapenem han completado estudios de fase III y recientemente fueron aprobados en USA, pero reconoce que muchos de dichos medicamentos ya son poco efectivos debido a la capacidad de desarrollo de resistencia microbiana (16).

En el año 2019, otro estudio sostiene que ha mejorado la comprensión de la bioquímica de la descomposición de beta-lactamasa y el incremento mundial de las enzimas hidrolizantes de carbapenem como KPC (clase A) NDM (clase B) y OXA-48 (clase D), que tiene que ver con las interacciones entre beta-lactamasa con carbapenems; agrega que, en el campo terapéutico, las combinaciones de beta-lactámicos con diazabiciclooctanona e inhibidores cíclicos de la serina beta-lactamasa de boronato son clínicamente útiles (17) .

Diagnóstico de laboratorio

Luego de la alerta epidemiológica lanzada por la OPS sobre la aparición de carbapenemasas NDM-1 en Latinoamérica, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” de Argentina, emitió un comunicado acerca de los procedimientos para la detección de estas Carbapenemasas, refiriendo que estas cepas fueron aisladas, utilizando los mismos métodos usados en la actualidad en los diferentes laboratorios de referencia de la región, señalando además, las cepas que fueron detectadas utilizando el método

de Hodge, por lo que, recomienda seguir usando los métodos señalados para poder detectar estas cepas sin mayores contratiempos. De acuerdo a los algoritmos de cada método para la detección de Carbapenemasas, todos fueron capaces de detectarlas (Anexo 2), independientemente de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) (Anexo 3) (18).

Para la confirmación fenotípica se realizan pruebas de inhibidores:

- Sinergia positiva entre discos de Carbapenem y EDTA/SMA (Laboratorio Britania)
- Incremento significativo (≥ 5 mm) con el disco de Meropenem + Dipicolínico respecto del Meropenem solo (KPC+MBL Confirm ID, Rosco, Medica-Tec)
- Incremento significativo (≥ 5 mm) con el disco de Meropenem + EDTA (Producidos en el LNR) respecto del Meropenem.
- Incremento significativo de las zonas de inhibición de Carbapenem en medio de cultivo suplementado con EDTA (0.4 mM concentración final)
- Adicionalmente, el aislado no presentó sinergia entre Carbapenem y ácido borónico (19).

En el 2017, los protocolos para *E. Coli* productora de Nueva Delhi metalo-beta-lactamasa en Colombia consideran pruebas fenotípicas con el test de Hodge modificado (THM), ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) y ácido fenilborónico (APB) para confirmar la presencia de una *E. coli* NDM (20).

Una prueba rápida para detectar Carbapenemasas es el Rapic carba NP (Biomerieux) que confirma en menos de 2 horas, la presencia de bacterias productoras de Carbapenemasas, en cultivos de agar con hidrólisis de sustrato de Imipenem, detectando cepas de las clases A, B y D, pero sin lograr la distinción

de las mismas; para la identificación fenotípica *Pseudomona aeruginosa*, en el Perú se usó disco de aproximación con sustratos, y para la genética se usó RCP simplex, encontrando que el 15,7% fueron metalo-beta-lactamasas (21) .

El Instituto Nacional de Salud del Perú realizó las confirmaciones moleculares de resistencia a carbapenemasas de cepas remitidas de 12 hospitales entre el 2013 y 2017. Para el estudio microbiológico, las cepas fueron sembradas en agar Tripticasa de soya y para su aislamiento se usó agar Mac Conkey. La identificación se realizó con una metodología del Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, la susceptibilidad a imipenem y meropenem se determinó por el método de disco difusión, la detección de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se hizo por medio de la tira de gradiente (E-Test Biomerieux) y para a interpretación se siguió las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Para el estudio fenotípico de los mecanismos de resistencia se utilizó el Test de Hodge modificado en el 2014, la detección bioquímica de la producción de carbapenemasa se hizo con el método de blue carba, usado a partir del año 2015, las pruebas fenotípicas para detección del mecanismo de resistencia se hicieron por el método de aproximación de discos (test de sinergia) entre Imipenem 10 ug y meropenem 10 ug con discos de ácido fenilborónico y ácido etilen-diamino-tetraacético, siguiendo las recomendaciones del Instituto Carlos Malbran, La detección de la resistencia a las carbapenémicos (genes bla_{KPC} y metalo-beta-lactamasas (bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}) se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional.

Las reacciones de PCR fueron preparadas empleando cebadores (sintetizados por Invitrogen) con una concentración de 100 nM, los controles positivos usados para

los genes bla_{KPC} y de metalo betalactamasas procedían del Instituto Carlos Malbran y la cepa *E. coli* ATCC 25922 fue usada como control negativo(22).

Periano y colaboradores en el 2018 analizaron 170 *Enterobacter* spp procedentes de dos sistemas de vigilancia de RAM, reportaron 142,226 *Enterobacteriaceae*, de ellas, 4.5% fueron identificadas como *Enterobacter* spp, 682 no eran susceptibles a 1 de los carbapenémicos, y 2.6% fueron positivos para KPC, OXA, NDM, VIM e IMP. Para el estudio del genoma completo utilizaron el kit de preparación de muestras de ADN Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) y secuenciaron muestras en un Illumina NextSeq500 durante 300 ciclos (151 pares de bases emparejados). Para el análisis genómico, obtuvieron borradores de genomas utilizando SPAdes versión 3.10.1, identificaron especies basadas en las secuencias del gen *hsp60*, y crearon árboles filogenéticos del genoma completo, incluidas las cepas de referencia para la identificación del complejo *E. cloacae*. Para definir la presencia de genes y sus alelos, accedieron a BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI), recursos de datos de beta-lactamasa. Para el análisis filogenético crearon un árbol filogenético basado en polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) libre de recombinación e identificaron SNP mapeando las lecturas o alineando los genomas contra la cepa LMG27195 del tipo *E. xiangfangensis* usando la tubería RedDogi, eliminaron los sitios de recombinación según Gubbins, eliminaron los profagos identificados por PHAST e incluyeron SNP centrales y sitios que estaban presentes en todos los genomas para crear un árbol de máxima verosimilitud utilizando RAxML con el modelo general de sustitución gamma más reversible en el tiempo. Visualizaron el árbol usando iTOL versión 3. Para identificar clados dentro de ciertos tipos de

secuencia (ST), utilizaron un enfoque genético de población libre de filogenia de los SNP centrales, realizando análisis de agrupamiento jerárquico con el programa Análisis Bayesiano de Estructura de Población; incluyeron 1,048 *Enterobacter spp.* disponibles, genomas en la base de datos de secuencia de referencia de NCBI. Mediante un análisis MLST in silico se identificó 282 ST de 950 genomas tipificables, se incluyeron un total de 201 genomas de ST 78, 90, 93, 105, 108, 114 y 171 para el análisis de agrupamiento. Para cada subespecie de *E. hormaechei* o *E. xiangfangensis*, el análisis jerárquico de agrupación de la estructura de la población se realizó con 3 niveles anidados con un límite superior a priori del número de grupos entre un cuarto y la mitad del número total de aislamientos Definieron clados usando el segundo nivel de agrupamiento. Finalmente, los datos de secuenciación se mantienen en una base de datos de ADN en Japón y en la base de datos NCBI (23).

Pranita en el 2019 refiere de que se disponen de pruebas fenotípicas y genotípicas para laboratorios de microbiología que permiten identificar la producción de carbapenemasas por organismos Gram-negativos y las carbapenemasas específicas producidas, pues los nuevos antibióticos beta-lactámicos tienen perfiles únicos para actuar contra algunas carbapenemasas y no otras (18).

Tooke también refiere que, en el 2019, ya se dispone de nuevas tecnologías, como la cristalografía en serie de femtosegundos, que conjuntamente con nuevas combinaciones de beta-lactámicos e inhibidores metalo-beta-lactamasa están generando nuevas oportunidades y futuros impactos en favor de la salud pública (19).

Características epidemiológicas

Desde su aparición en el año 2008, Carbapenamasas NDM se ha reportado en diferentes países del mundo y su presencia está vinculada tanto a la infección humana como a la colonización por entero-bacterias, lo que pone en evidencia la necesidad de contar con fármacos nuevos que ayuden a combatir estas bacterias y preservar la salud humana, así como disponer de medidas de control de propagación de esta resistencia microbiana y evitar su diseminación (21).

En el año 2011 se reportaron más de 100 casos de NDM-1 recuperados en el Reino Unido sin que hubiera alguna relación entre los hospitales en los que se logró este aislamiento, encontrándose como dato epidemiológico, vínculos de los pacientes infectados con estadías en países como India o Pakistán. Las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. En la India, país donde se presentó el primer caso de NDM-1 se encuentra una prevalencia de 5 a 8% considerando que la presencia de esta enzima puede encontrarse también en microorganismos ambientales (23). Las muestras con entero-bacterias que tenían el gen de la enzima NDM-1 provenían de pacientes con infecciones urinarias, digestivas, pulmonares y de tejidos blandos e infecciones que evolucionaron hasta septicemia asociadas a uso de dispositivos médicos, demostrándose la capacidad de estos gérmenes para infectar cualquier entorno. Se cree que la colonización puede estar presente antes de la infección, existiría una transmisión oro-fecal por contaminación en manos y manipulación de agua y alimentos.

En el 2019, la vigilancia epidemiológica española refería la infección por bacterias productoras de carbapenemasa VIM (CPB-VIM) en un hospital infantil,

reportando un 2.6 de incidencia de infección y 6.7 de colonización por cada mil pacientes hospitalizados en 2012, 1.8 y 10.0, respectivamente en 2014 y para el 2015, los valores fueron 0.3 y 5.0, respectivamente (24).

Las bacterias con el gen NDM-1 hasta el año 2010 sólo podían ser encontrados en ciertos continentes, sin que se logrará reportar casos en América Latina. Guatemala en el 2011 reportó el primer caso de *Klebsiella pneumoniae* con la enzima NDM-1 en un niño con diagnóstico de Neumonía nosocomial y shock séptico, tratado sin éxito con Vancomicina y Meropenem; el segundo caso fue un paciente adulto con herida de bala en cabeza y cuello, en la secreción oro-traqueal se aisló *Klebsiella pneumoniae*. Ambas muestras fueron enviadas al centro de referencia guatemalteco, se encontraron idénticos perfiles de sensibilidad, con resistencia a los betalactámicos, Sulfametoxazol, Trimetropim y Minociclina con susceptibilidad intermedia a Cloranfenicol, Ciprofloxacino y Gentamicina; siendo sensibles a Amikacina, Acido Nalidixico y Levofloxacino, además se lograron realizar estudios moleculares llegando a identificar al gen NDM-1, demostrando que las cepas aisladas pertenecían al mismo tipo clonal (26).

En nuestro país, el primer caso reportado se presentó en el año 2013, fue una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a Carbapenem y en el 2014 en una cepa de *Proteus mirabilis* del tipo NDM-1, en ambos casos se realizaron estudios moleculares en el Instituto Nacional de Salud (25).

En el año 2011 se realizó un estudio transversal en 6 hospitales de Lima, aislando 51 muestras con *Pseudomona aeruginosa* con resistencia a Cefotaxidima y reducida sensibilidad a Carbapenémicos (26).

En el 2016, se emitió en el Cusco una alerta epidemiológica en el Hospital Lorena de casos confirmados de *Pseudomona aeruginosa* positivos a metalo-beta-lactamasas (27) También en el Hospital Militar Central en el año 2016 se encontró que el gen más frecuente fue el gen bla_{IMP} que estuvo en el 95.8% de los casos aislados de *Pseudomona aeruginosa* positivos a metalo-beta-lactamasas (28) (Anexo 4).

Entre junio del 2016 y noviembre del 2017 en 5 hospitales de Lima e Iquitos se procesaron 1088 muestras positivas de las cuales 213 fueron de *E. coli* y 875 de Eskape (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), el agente patógeno más aislado en Lima fue *P. aeruginosa* con el 36% y en Iquitos fue *E. coli* con el 46%, 974 muestras aisladas eran Gram negativos y de estos 472 no fueron susceptible a Carbapenem, en el resultado de PCR, el 20% (155) fue positivo para al menos uno de los cuatro genes codificadores de Carbapenemasa, de estos el 5% de cepas albergaban genes que codifican Carbapenemasa susceptibles a los carbapenems, lo que indica la presencia de pseudogenes de resistencia a Carbapenem presente en los aislamientos, por lo que se debería realizar un análisis de las secuencias poblacionales de los gérmenes aislados en el Perú. De las 155 muestras positivas, 8 fueron susceptibles a NDM-1, de ellas, 5 fueron enterobacterias (1 *E. coli* y 4 *K pneumoniae*) y 1 *A. baumannii*, procedía de Iquitos. Se logró aislar 2 cepas de *A. baumannii* en los casos de infección por *A baumannii*, el caso de Lima se presentó en una muestra de hemocultivo y las otras dos procedían de Iquitos: una muestra era de punta de catéter y la otra, de una herida post

quirúrgica, siendo esta última considerada como extremadamente resistente (XDR) (29).

Kelly AM y otros, en el 2017 realizaron una revisión sistemática y advierten que varios informes refieren una probable propagación desde los centros hospitalarios a la comunidad, por lo que evaluaron la proporción de aislamientos de CRE que podrían tener procedencia comunitaria, en 33.3% de estudios no encontraron CRE asociada a la comunidad, e identificaron porcentajes entre 0.04% a 29.5% de los CRE asociados a la comunidad o de inicio comunitario, se revisaron estudios en los EE. UU (30).

Pranita en el 2019 afirma que las carbapenemasas son un mecanismo poco frecuente *P aeruginosa* resistente a carbapenem en USA, pero es más común en otras regiones del mundo como Europa, Asia y América Latina; refiere que carbapenemasas VIM son responsables en Europa del 11% de infecciones por *P aeruginosa* resistentes a carbapenem, el 12% en Asia y hasta el 19% de las infecciones resistentes a carbapenem que ocurren en América Latina (18).

Dada la difusión de estas cepas a nivel mundial, la OMS en el 2017 pone a disposición de los países miembros, guías para su prevención y control en centros hospitalarios que hagan posible una vigilancia epidemiológica efectiva y sistemática de este grave problema para la salud pública (31)

CONCLUSIONES

- Las Carbapenemasas Nueva Delhi tipo 1 (NDM) contienen Zinc en su sitio activo, característica común en el grupo de las enzimas Metallo-beta-lactamasas.
- Las características fenotípicas de las Metallo-beta-lactamasas Nueva Delhi tipo 1 son: resistencia a cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y a Carbapenémicos, siendo sensibles a los antibióticos monobactámicos.
- El mecanismo de acción de las beta-lactámicos se basa en la inhibición de la pared bacteriana y la activación de una autolisina endógena bacteriana.
- Las Metallo-beta-lactamasas Nueva Delhi tipo 1 se ha difundido a nivel mundial, manteniendo mayores prevalencias en países de medio y bajo desarrollo, especialmente en la India y Pakistan.
- Las Metallo-beta-lactamasas Nueva Delhi tipo 1 agrava los problemas derivados de la resistencia microbiana, situación que afecta a la salud pública, siendo necesario medidas preventivas y de control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berrazeg M, Dianne S, Mediahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, et al. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps. *Euro Surveill.* 2014; 19(20).
2. Kumarasamy K. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10(9: 597-602).
3. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future. *Ther Adv Infect Dis.* 2016 feb; 3(1:15-21).
4. OPS. Epidemiological Alert, Nosocomial transmission of NDM-type multiresistant bacteria (19 December 2012). [Online].; 2012 [cited 2019 nov. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50734>.
5. Resurreccion C, Montenegro J, Chiape A, Gonzales R, Vargas R, Cucho C, et al. Klebsiella pneumoniae Nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo. *Rev Per Med Exp Salud Pública.* 2017; 34(2: 261-7).
6. Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 54(3:969-76).
7. Canton R, Akovic M, Carmeli Y, Giske C, Glupczynski Y, Livermore D, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2012; 18(5: 413-31).
8. Tzouvelekis L, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios P, Daikos G. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25(4:682-707).
9. Khong W, Xia E, Maromuthu K, Xu W, Teo Y, Tan E, et al. Local transmission and global dissemination of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM): a whole genome analysis. *BMC Genomics.* 2016; 17(452).
10. Pasteran F, Meo A, Gómez S, Derdoy L, Albornoz E, Faccione D, et al. Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *JGAR.* 2014; 2(4: 344-5).

11. Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents Chemother.* 2010; 54(3: 969-976).
12. Papp W K, Endimiani A, Taracila M, Bonomo R. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 nov; 55(11:4943-4960).
13. Moquet O, Bouchia C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, et al. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. *EID Journal.* 2011 jan; 17(1).
14. Nordmann P, Poirel L, Walsh T, Livermore D. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011 Dec; 19(12:588-95).
15. Livermore D, Mushtaq S, Warner M, Zhang J, Maharjan S, Doumith M, et al. Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase - producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 jan; 55(1: 390-394).
16. Pranita D T, Hsu A. Defining the Role of Novel β -Lactam Agents That Target Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.* 2019 jul; 8(3: 251-260).
17. Tooke C, Hinchliffe P, Bragginton E, Colenso C, Hiryonen V, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019 aug; 431(18: 3472-3500).
18. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Carlos G. Malbran. Argentina. *Aleta Epidemiológica: Emergencia de Carbapenemasa tipo NDM.* [Online].; 2013 [cited 2019 ag. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/07/Alerta-epidemiologica-NDM-Arg-v11.pdf>.
19. Bushnell G, Mitrani F, Mundy L. Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance. *Int J Infect Dis.* 2013 May ; 17(5: 325-33).
20. Correa C, Castro E, Salamanca D, Dustacero L, Lemos E. Escherichia Coli productora de Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en Colombia: reporte de caso. *Infect.* 2017 ab.jun; 21(1).
21. Perry J, Naqvi S, Mirza I, Alizai S, Hussain A, Ghirardi S, et al. Prevalence of

faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Oct; 66(10:2288-94).

22. Sacsquispe R, Bailon H. Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2018 ab-jun; 35(2).
23. Peirano G, Matsumura Y, Adams M, Bradford P, Motyl M, Chen L, et al. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing Enterobacter spp., 2008–2014. *Emerg Infect Dis.* 2018 jun; 24(6:1010-1019).
24. Gonzales R, Parra D, San Juan I, Ruiz G, Gallegos S, Escosa C, et al. Evolución de la incidencia de pacientes colonizados e infectados por bacterias productoras de carbapenemasas VIM en un hospital pediátrico en España. *Rev Esp Quimioter.* 2019 feb; 32(1: 60-67).
25. MINSA. Dirección General de Epidemiología. Boletín. Alerta Epidemiológica. [Online].; 2014 [cited 2019 oct. Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2014/23.pdf>.
26. Gonzales E E, Vicente T W, Champi M R, Soto P J, Flores P W, Lovera G M, et al. Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de pseudomonas aeruginosa en Lima, Perú. *Rev. perú. med. exp. salud publica.* 2013 ab; 30(2).
27. Espinoza J. Presencia de casos Klebsiella pneumoniae y/o Staphylococcus aureus meticilino resistente en pacientes del servicio de medicina del Hospital Antonio Lorena Cusco. Alerta epidemiológica N°001. [Online].; 2016 [cited 2020 feb. Available from: <http://www.diresacusco.gob.pe/inteligencia/epidemiologia/alertas/alertas2016/ALERTA%20EPIDEMIOLOGICA%20001-2016.pdf>.
28. Salvador G, Garcia R, Gonzales E. Caracterización de metalo- β -lactamasas en aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa recuperados de pacientes hospitalizados en el Hospital Militar Central. *Rev. perú. med. exp. salud publica.* 2018 Oct-Dic; 35(4).
29. Rocha C, Bernal M, Canal E, Rios P, Meza R, López M, et al. First Report of New Delhi Metallo- β -Lactamase Carbapenemase–Producing Acinetobacter baumannii in Perú. *Am J Trop Med Hyg.* 2019; 100(3:529-531).
30. Kelly A, Mathema B, Larson E. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community. *Int J Agentes antimicrobianos.* 2017; 50(2:127-134).

31. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. Informe Técnico. Genova;; 2017. Report No.: ISBN 978-92-4-155017-8.

ANEXOS

Anexo 1

CLASIFICACIÓN DE BETA-LACTAMASAS SEGÚN CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y

Ambler, 1980	Bush-Jacoby - Medeiros 1995	Bush-Jacoby 2009	Inhibida por		Características funcionales
			AC	EDTA	
A	2a	2a	SI	NO	Mayor hidrólisis de penicilinas que cefalosporinas
A	2b	2b	SI	NO	Similar hidrólisis de penicilinas y cefalosporinas
A	2be	2be	SI	NO	Mayor hidrólisis de oxamino-β-lactámicos (CTX, CAZ, CRO, ATM)
A	2br	2br	NO	NO	Derivadas de TEM resistentes a los inhibidores (IRT)
A	NI	2ber	NO	NO	Mayor hidrólisis de oxamino-β-lactámicos combinados con inhibidores
A	2c	2c	SI	NO	Mayor hidrólisis de carbenicilina
A	NI	2ce	SI	NO	Mayor hidrólisis de carbenicilina, cefepime y ceftipime
A	2f	2f	SI	NO	Mayor hidrólisis de carbapenemes, oxamino-β-lactámicos, cefamicinas
B (B1)	3	3a	NO	SI	Amplio espectro de hidrólisis incluyendo carbapenemes pero no aztreonam
B (B2)					
B (B3)	3	3b	NO	SI	Hidrólisis preferentemente de carbapenemes
C	1	1	NO	NO	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de penicilinas; hidroliza cefamicinas
C	NI	1e	NO	NO	Incrementa hidrólisis de ceftazidima y otras oxamino-β-lactámicos
D	2d	2d	Variable	NO	Mayor hidrólisis de oxacilina o cloxacilina
D	NI	2de	Variable	NO	hidrólisis de Oxacilina, cloxacilina y oxamino-β-lactámicos
D	NI	2df	Variable	NO	hidrólisis de Oxacilina, cloxacilina y carbapenemes
D	2e	2e	SI	NO	Hidroliza cefalosporinas, inhibidas por ac. clavulánico pero no aztreonam
Desconocido	4	NI			

Fuente: Detección y caracterización molecular de metalo-β-lactamasas en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa recuperados en el Instituto Nacional de Salud del Niño Lima-Perú. 2013

Anexo 2

METODOLOGÍAS APLICADAS EN TAMIZAJE FENOTÍPICO SEGÚN ALGORITMO

	Difusión ^a	Micro dilución ^b	Etest/MICE ^b	Phoenix ^b	Vitek 2C ^b
Señal de sospecha de Carbapenemasa según algoritmo	Imipenem ≤ 22	Imipenem ≥ 2.0	Imipenem ≥ 1.0	Ertapenem ≥ 1.0	Imipenem ≥ 2.0 + Meropenem ≥ 1.0
<i>Providencia rettgeri</i> NDM+	SI	SI	SI	SI	SI

Fuente: Alerta Epidemiológica: Emergencia de Carbapenemasa tipo NDM. Servicio Antimicrobiano, INEI-ANLIS Malbrán. Boletín 3, 2013

^a Zona de inhibición en mm

^b CIM en mg/L

Anexo 3

METODOLOGÍAS APLICADAS EN TAMIZAJE FENOTÍPICO SEGÚN VALORES ABSOLUTOS

	Difusión ^a	Micro dilución ^b	Etest ^b	MICE ^b	Automatizados	
					Phoenix ^b	Vitek 2C ^b
Imipenem	15	16	> 32	> 32	> 8	≥ 16
Meropenem	15	8	8	ND ^c	8	≥ 16
Ertapenem	19	2	4	ND ^c	> 1	ND ^c

Fuente: Alerta Epidemiológica: Emergencia de Carbapenemasa tipo NDM. Servicio Antimicrobiano, INEI-ANLIS Malbrán. Boletín 3, 2013

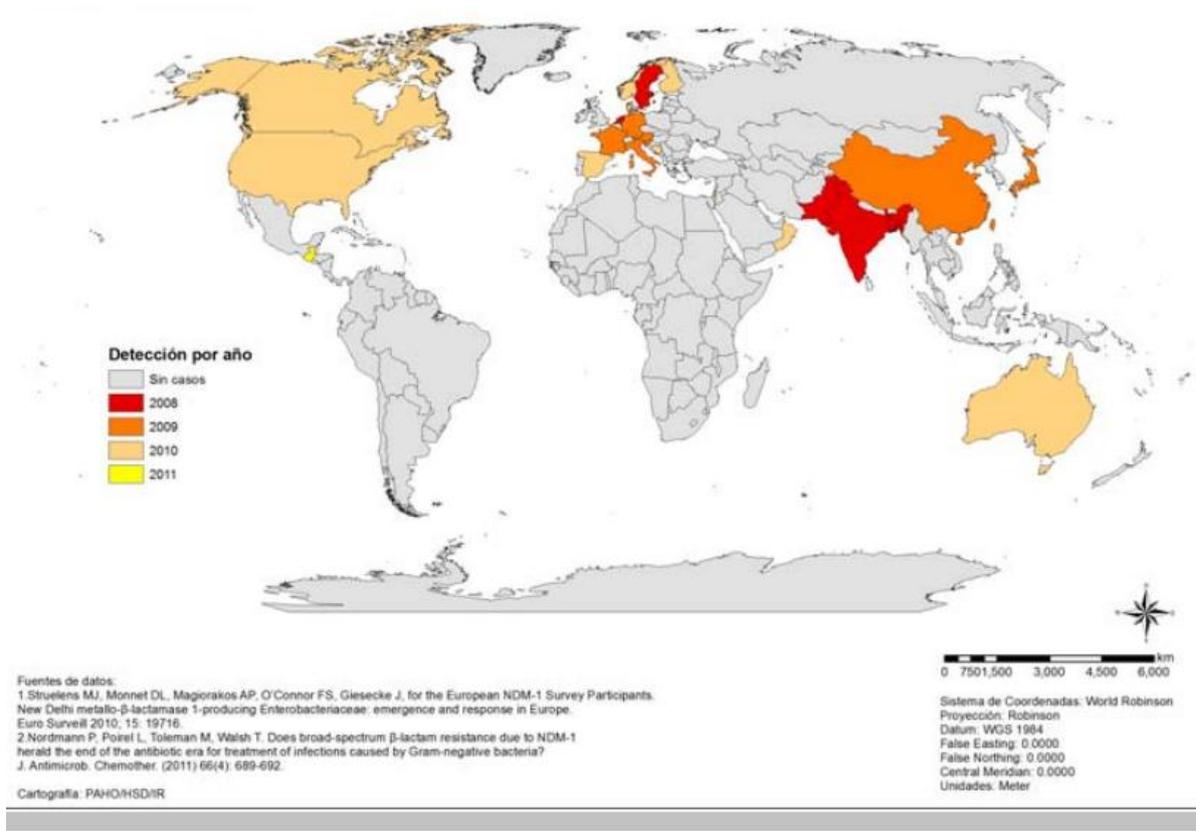
^a Zona de inhibición en mm

^b CIM en mg/L

^c No disponible

Anexo 4

MAPA DE DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE CARBAPENEMASA NUEVA DELHI 2008-2011



Fuente: Alerta epidemiológica: Organización Panamericana de la Salud, 2011