

## Informe

### Caracterización de aislamientos de *Enterobacteriales* MBL-NDM positivo asociados a un brote en pacientes del Hospital San Juan de Dios

Fecha: 17 de mayo de 2021

#### Resumen

*Enterobacteriales* son bacterias de gran importancia en salud pública debido a su capacidad de causar múltiples infecciones asociadas a la atención de la salud y a la comunidad. Además, *Enterobacteriales* portadores de carbapenemasas son un serio problema de manejo clínico, debido a que son resistentes a  $\beta$ -lactámicos en general y a otros grupos de antibióticos, presentando fenotipos de multirresistencia (MDR) o extrema resistencia (XDR), quedando pocas posibilidades de tratamiento.

El presente trabajo colaborativo entre dos laboratorios de referencia del Inciensa y el H. San Juan de Dios permitió la caracterización de *Enterobacteriales* portadores de carbapenemasa tipo MBL-NDM asociados a un brote en pacientes de servicios diferentes de dicho hospital, logrando un análisis que incluye información epidemiológica, fenotípica y genotípica de las bacterias, mostrando la capacidad de trabajo en conjunto y las posibilidades de uso de una herramienta como la secuenciación completa del genoma en apoyo al estudio de brotes causados por organismos MDR y XDR.

**Cita sugerida:** Jiménez Antonieta\*, Duarte Francisco\*\*, Gutiérrez Rodolfo, Baltodano Priscilla, Cordero Estela, Godínez Adriana, Calderón Melany. "Caracterización de aislamientos de *Enterobacteriales* MBL-NDM positivos asociados a un brote en pacientes del Hospital San Juan de Dios, mayo 2021". Tres Ríos, Costa Rica: INCIENSA, 2021. Disponible en: <http://www.inciensa.sa.cr>

\* [ajimenez@inciensa.sa.cr](mailto:ajimenez@inciensa.sa.cr); \*\* [fduarte@inciensa.sa.cr](mailto:fduarte@inciensa.sa.cr)

## Informe

### Caracterización de aislamientos de *Enterobacterales* MBL-NDM positivo asociados a un brote en pacientes del Hospital San Juan de Dios

#### Antecedentes

El mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos más común en *Enterobacterales* es la hidrólisis del antibiótico por medio de  $\beta$ -lactamasas. Dentro de las  $\beta$ -lactamasas de importancia clínica que se recomienda detectar de rutina en el laboratorio clínico debido a su impacto en las decisiones de tratamiento y las medidas de contención, se encuentran las enzimas con capacidad de hidrólisis de cefalosporinas de amplio espectro como son  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) y las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC, ambas detectadas en *Enterobacterales* referidos por los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología (RNLB) a través de la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) en el Centro Nacional de Referencia de Bacteriología (CNRB) (Tijerino, 2016 y datos no publicados). Además, de estas dos enzimas es necesario la confirmación de las carbapenemasas que en su mayoría presentan la capacidad hidrolítica sobre la mayoría de  $\beta$ -lactámicos incluyendo los carbapenemes. Enzimas que deben ser diferenciadas entre los diferentes grupos de carbapenemasas: clase A (por ej. KPC), clase B las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) como NDM, VIM o IMP y clase D (enzimas del tipo OXA) (Ambler, 1980; Queenan 2007). A través de la vigilancia de la RAM en el CNRB, se ha determinado que las carbapenemasas tipo MBL son las más frecuentes en bacilos Gram negativos de importancia clínica referidos por los miembros de la RNLB. Las MBL más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa* son las del tipo IMP y VIM (Jiménez, 2018), mientras que en *Acinetobacter* y *Enterobacterales* son las del tipo NDM, en *Enterobacterales* con frecuencia acompañadas de la presencia de BLEE tipo CTX-M (datos no publicados). Además de las carbapenemasas, los bacilos Gram negativos que presentan este tipo de enzimas, por lo general son resistentes a diferentes grupos de antibióticos siendo aislamientos multi-resistentes (MDR) o con resistencia extrema (XDR), dejando pocas posibilidades de tratamiento.

En este informe se presenta el análisis de 7 aislamientos de *Enterobacterales* NDM positivo, incluyendo aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus mirabilis* referidos por el laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios (HSJD) para su confirmación. De los siete aislamientos, cuatro provienen de pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) Covid Críticos, un aislamiento de un paciente en el servicio de la Unidad de Emergencias Quirúrgicas (UEQ) y un aislamiento de un paciente en ortopedia.

## Metodología

- Los aislamientos bacterianos fueron referidos al CNRB por el Laboratorio Clínico del HSJD. Cada uno de los aislamientos venía acompañado con la boleta Inciensa-R86 Solicitud de Confirmación Diagnóstica, que incluye información demográfica y clínica de los pacientes, así como los resultados de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (PSA) y de la presencia de carbapenemasa NDM confirmada.
- La Unidad de Vigilancia Epidemiológica (UVE) del HSJD compartió con el CNRB el “Informe de campo brote cepas NDM UCI COVID crítico y otros servicios”, documento del que se toma el número de caso y se mantiene para este informe.
- En el CNRB se llevó a cabo la confirmación de la identificación de cada uno de los aislamientos y del perfil de resistencia referido por el Laboratorio Clínico por medio de Vitek®2 Compact. La PSA a meropenem, aztreonam, tigeciclina y fosfomicina se realizó mediante la metodología de referencia de difusión de disco. Además para meropenem se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por medio de E-test. Para la interpretación de la PSA se utilizó la CLSI M100 S31, 2021. Tigeciclina y fosfomicina se interpretó según punto de corte establecido por el Laboratorio Regional de Referencia como se indica en el consenso Latinoamericano de la publicación (Jiménez, 2019). La PSA a colistina se realizó por medio de la determinación de la CIM utilizando el método recomendado por CLSI y EUCAST, la microdilución en caldo y se interpretó con el punto de corte de EUCAST 2021.
- La confirmación de los genes codificadores de MBL tipo NDM y de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido tipo CTX-M se llevó a cabo por medio de PCR punto final con los protocolos descritos por Nordmann, 2011 y Pagani, 2013.
- En el laboratorio de genómica y biología molecular del Inciensa se realizó la secuenciación del genoma completo (WGS, whole genome sequencing) de cuatro aislamientos de *K. pneumoniae* y uno de *E. cloacae* utilizando tecnología Illumina y los protocolos estandarizados de la red de subtipificación molecular PulseNet LA&C (OPS/OMS). Los estudios genómicos comparativos se realizaron gen por gen, bajo el esquema de wgMLST (whole genome MLST), basado en la identificación de variaciones alélicas a lo largo de todo el genoma bacteriano. Con el software Bionumeric 7.6.3 se identificaron los alelos utilizando el motor de cálculo de Appliedmaths, el cual cuenta con 19 729 loci para *K. pneumoniae* (<https://www.applied-maths.com/applications/wgmlst>). La comparación de los alelos reconocidos se hizo con el coeficiente de correlación variables categóricas y como método de construcción del dendograma de comparación UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages).

## Resultados

La información de paciente y los números de casos que se incluyen en este informe se tomaron de la Boleta de confirmación diagnóstica referida con cada uno de los aislamientos bacterianos, así como del Informe de campo “*brote cepas NDM UCI COVID crítico y otros servicios*” elaborado por la UVE de HSJD. Por lo anterior y en un intento de mantener la estandarización con el informe del HSJD, los números de caso utilizados en este documento corresponden al mismo número indicado en el informe antes mencionado, el que incluye ocho casos al 27 de marzo 2021. Los casos 1, 2, 3, 4, 5 y 8 corresponden a pacientes de UCI COVID crítico, mientras que el caso 6 es de un paciente de UEQ y el caso 7 de ortopedia. Todos fueron reportados entre el 13 de enero al 23 de febrero. En el CNRB se recibieron siete aislamientos correspondientes a seis de los casos (caso 2, caso 3, caso 4, caso 6, caso 7 y caso 8).

De los aislamientos correspondientes a los cuatro casos de pacientes en UCI COVID crítico, el caso 2 proviene de una paciente femenina de la que se obtuvo un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* recuperado de esputo, mientras que los otros tres provienen de pacientes masculinos recuperados de esputo (caso 3, *K. pneumoniae*), sangre (caso 4, *Enterobacter cloacae*) y orina (caso 8, *K. pneumoniae*). Para el caso 6 se recibieron dos aislamientos uno de *K. pneumoniae* y uno de *Proteus mirabilis* obtenidos de un hematoma de una paciente femenina. El caso 7 corresponde a *K. pneumoniae* de un paciente masculino y recuperado de orina (Cuadro 1). Todas las cepas fueron referidas por el laboratorio clínico del HSJD como positivas para la MBL NDM, lo que fue confirmado por PCR en el CNRB. Además, todos los aislamientos, excepto el de *P. mirabilis*, resultaron BLEE tipo CTX-M positivo, también por PCR.

Las MBL presentan la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y cabapenemes, sin capacidad de hidrólisis a aztreonam, además de ser resistentes a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas usados en el ámbito clínico (Queenan, 2007). En el caso de las cepas bajo estudio, son portadoras de BLEE CTX-M, enzima con capacidad hidrolítica a cefalosporinas en general y monobactames como el aztreonam. Uno de los aspectos de importancia clínica en este tipo de aislamientos es que cepas productoras de carbapenemasas suelen tener un perfil de multi-resistencia o extrema resistencia incluyendo diferentes mecanismos de resistencia a diferentes grupos de antibióticos como los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetoprima sulfametoxazole entre otros. En el cuadro 1 se incluyen los resultados a diferentes tipos de antibióticos evidenciando que todas las cepas analizadas presentan resistencia a diferentes grupos. Al respecto, de acuerdo al consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes (MDR), con resistencia extendida (XDR) o panresistentes (PDR) (Jiménez, 2019), de los cinco aislamientos de *K. pneumoniae* analizados uno se cataloga como MDR con sensibilidad a fosfomicina, tigeciclina y colistina. Los otros cuatro aislamientos se clasifican como XDR, tres de ellos con sensibilidad a fosfomicina y colistina y uno con sensibilidad únicamente a colistina. Estos resultados están en coincidencia a lo que se describe en la

literatura sobre *Enterobacterales* NDM positivo, en general sensibles únicamente a colistina y tigeciclina (Kumarasamy, 2010). Para los aislamientos de *E. cloacae* y *P. mirabilis* ReLAVRA aún no cuenta con definiciones para estos perfiles de resistencia, pero en el mismo cuadro se muestra como ambos presentan resistencia a diferentes grupos de antibióticos que los identificarían como al menos MDR.

Cuadro 1. Resumen de los 7 aislamientos referidos al CNRB relacionados a un brote en UCI COVID crítico y otros servicios, Hospital San Juan de Dios

Análisis	caso 2 (F)	caso 3 (M)	caso 4 (M)	caso 6 (F)		caso 7 (M)	caso 8 (M)
	<i>Kpn</i> 654221 UCI	<i>Kpn</i> 653146 UCI	<i>Ecl</i> 653273 UCI	<i>Kpn</i> 649958 UEQ	<i>Pmir</i> 649959 UEQ	<i>Kpn</i> 654332 ortopedia	<i>Kpn</i> 655909 UCI
Cefotaxima*	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	32	≥ 64	≥ 64
Ceftazidima*	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Cefepima*	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	4	≥ 64	≥ 64
Aztreonam**	11	12	6	15	31	7	9
Meropenem●	8	8	16	4	1	4	≥ 32
Meropenem*	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16
Imipenem*	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16
Amikacina*	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Gentamicina*	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16
Ciprofloxacina**	12	12	15	19	38	24	11
Ácido nalidídico**	10	11	15	16	21	18	10
Levofloxacina**	16	16	21	21		23	15
Trimetoprim sulfametoxazole*	≥ 320	≥ 320	≥ 320	≥ 320	≤ 20	≤ 20	≥ 320
Tigeciclina**	16	15	23	20	17	21	17
Fosfomicina**	21	20	21	26	36	25	16
Colistina†	0,5	1	0,5	0,5	RN	1	0,5
PCR NDM/CTX-M	NDM+/CTXM+	NDM+/CTXM+	NDM+/CTXM+	NDM+/CTXM+	NDM+/CTXM-	NDM+/CTXM+	NDM+/CTXM+
Perfil de resistencia	XDR	XDR	SDE	XDR	SDE	MDR	XDR

Prueba de sensibilidad por \*Vitek (µg/mL), \*\* difusión de disco (mm), ●E-test (µg/mL), †microdulción en caldo (µg/mL). **F:** femenino. **M:** masculino. **Kpn:** *Klebsiella pneumoniae*. **Ecl:** complejo *Enterobacter cloacae*. **Pmir:** *Proteus mirabilis*. **UCI:** UCI COVID crítico. **UEQ:** Unidad de Emergencias Quirúrgicas. **RN:** resistencia natural. **MDR:** multi resistencia **XDR:** extrema resistencia **SDE:** sin definición estandarizada en la región.

Fuente: Centro Nacional de Referencia de Bacteriología, Incienssa

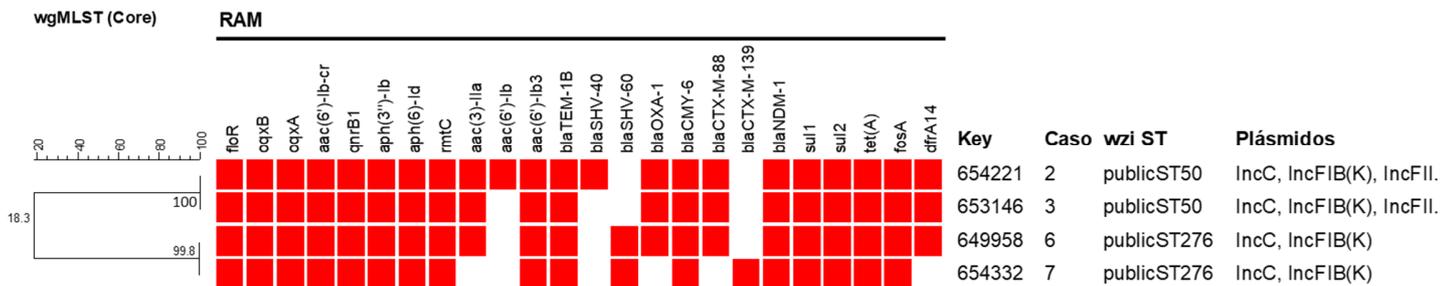
El aislamiento de *P. mirabilis* fue sensible a aztreonam y meropenem por punto de corte dando la posibilidad de tratamiento para estos antibióticos, además presentó sensibilidad para ciprofloxacina, trimetoprim sulfametoxazole y sensibilidad dosis dependiente para cefepima. En cuanto a la CIM de meropenem por Vitek para este aislamiento y los otros aislamientos

analizados, en el cuadro 1 se muestra que es  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ . Pero, por E-test los casos 2, 3, 6 y 7 muestran una CIM de 4 ó 8  $\mu\text{g/ml}$  y el caso 4 CIM de 16  $\mu\text{g/ml}$ . El valor de la CIM de meropenem es muy importante ya que podría indicar posibilidad de tratamiento en cepas productoras de carbapenemasa. De esta forma si la cepa portadora de carbapenemasa presenta valores de meropenem para CIM  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ , el carbapenem es apto para tratamiento combinado (requiere alta dosis e infusión prolongada). En caso de que la CIM sea  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ , el carbapenem no es apto para tratamiento combinado. Si la CIM es 16  $\mu\text{g/ml}$ , se toma como indeterminado, en este caso se requiere del análisis del contexto clínico del paciente en conjunto con la documentación microbiológica de disponibilidad de otras opciones terapéuticas. Por lo anterior es importante para el laboratorio clínico contar con una prueba alternativa para determinar la CIM de meropenem para este tipo de aislamientos. Lo anterior se justifica debido a que estudios publicados indican que la sobrevivencia de los pacientes infectados por *Enterobacterales* portadoras de carbapenemasas puede verse beneficiada si se utilizan tratamientos combinados en los que se pueden incluir carbapenemes, específicamente los que pueden ser aplicados en infusión prolongada como meropenem y doripenem (Qureshi, 2012; Roberts, 2009). En este sentido, de los aislamientos analizados en este informe, solo el caso 8 está dentro del valor en donde no se recomienda el antibiótico como posibilidad de tratamiento  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ .

Para los aislamientos de *K. pneumoniae* correspondientes a los casos 2, 3, 6 y 7 se corroboró la presencia de los genes NDM y CTX-M detectados por PCR utilizando secuenciación completa del genoma (SCG), como se muestra en la figura 1, se confirmaron en los 4 aislamientos la presencia del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> y en tres de ellas el gen *bla*<sub>CTX-M-88</sub>, mientras que en el otro aislamiento *bla*<sub>CTX-M-139</sub>. Además, los cuatro aislamientos presentan todos o algunos de los genes codificantes de otras  $\beta$ -lactamasas incluyendo *bla*<sub>CMY-6</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>SHV-60</sub> o *bla*<sub>SHV-40</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub>. Otros genes de resistencia detectados fueron *rmtC* que codifica para la 16S metiltransferasa que confiere resistencia de alto nivel a aminoglicósidos (ej. amikacina y gentamicina) encontrado con frecuencia en aislamientos de *Enterobacterales* NDM positivo, *aac(6')-Ib-cr* (variante génica que puede producir resistencia simultánea contra aminoglucósidos y fluoroquinolonas), *qnrB*, *oqxA* y *oqxB* (confieren resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos), y *fosA* (resistencia a fosomicina), entre otros.

Además, por medio de SCG se realizó la comparación por wgMLST determinándose que los aislamientos de los pacientes en la UCI (casos 2 y 3) están relacionados genéticamente, con una similitud del 100 %, ambos pertenecientes al secuenciotipo ST50, mientras que los aislamientos de los casos 6 y 7 relacionados a servicios diferentes a la UCI resultaron con una similitud de 99,8 %, ambos del secuenciotipo ST276. La similitud entre los dos clústeres fue de 18,3 %, mostrando que eran grupos diferentes (Figura 1). Este hallazgo es similar a lo reportado en otros trabajos en los que se ha determinado que NDM-1 se encuentra en aislamientos de la misma especie sin relación clonal (Kumarasamy, 2010).

Figura 1. Dendrograma de similitud genética para *K. pneumoniae* por wgMLST, utilizando como coeficiente de correlación variables categóricas y como método de construcción UPGMA.



**wgMLST**: whole genome multi locus sequence typing. **RAM**: resistencia a los antibióticos. **Cuadro rojo**: presencia del determinante de resistencia. Espacio **en blanco**: no se detectó el determinante de resistencia. **Key**: identificador de la muestra. **ST**: secuenciotipo.

Fuente: Laboratorio de Genómica y Biología molecular del Centro Nacional de Referencia de Inocuidad de Alimentos, Inciensa.

En la figura 1 también se muestra que los dos clústeres identificados (ST50 y ST276) presentaron plásmidos similares IncC y IncFIB(K), lo que podría sugerir que estos dos plásmidos son los portadores de los genes de resistencia, sugiriendo además transferencia horizontal de genes dentro de la misma especie entre grupos clonales diferentes.

También abre la hipótesis de transferencia de estos plásmidos a especies diferentes como *P. mirabilis* y *E. cloacae* también relacionados a este brote (cuadro 1), lo que se ha demostrado en diversos estudios (Hammerum, 2016; Borgia 2012). Esta hipótesis se refuerza con los resultados de la SCG de la cepa de *E. cloacae* incluida en este informe. Por medio de este análisis se detectó en este aislamiento de forma similar con *K. pneumoniae* los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CMY-6</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *rmtC*, *aac*(6')-Ib-cr, *qnrB* y *fosA*. También presentó el gen codificante de BLEE CTX-M, la variante *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, además del gen *qnrS*. Debido a las limitaciones de la plataforma Illumina utilizada para la secuenciación de genomas, es imposible poder hacer una caracterización detallada de los plásmidos presentes en los aislamientos secuenciados. Es por eso que solo se sugiere la posibilidad de transferencia horizontal de los genes de resistencia. Sería necesario el uso de una plataforma complementaria por ejemplo Oxford Nanopore o PacBio para dilucidar este punto. Así como para dilucidar más información sobre la estructura y bagaje genético del plásmido adicional IncFII que contienen los dos aislamientos del secuenciotipo ST50, relacionado a los casos de UCI.

## Conclusiones

*Enterobacterales* son organismos de importancia clínica causantes de infecciones tanto asociadas a la atención de la salud como a la comunidad, lo que se ha demostrado en Costa Rica a través de la Estrategia para la Vigilancia de RAM de microorganismos de importancia en salud pública, que incluye datos de cuatro de los hospitales de mayor complejidad dentro de los que se encuentra el HSJD. El Informe de esta Estrategia muestra que, especies de *Enterobacterales* como las analizadas en este documento, se encuentran dentro de los organismos causantes de infecciones graves, como lo muestra la figura 1 y 2 del informe de la Estrategia, en las que se incluyen aislamientos provenientes de líquido cefalorraquídeo y sangre. Además de ser frecuentes en infecciones urinarias, figura 7 del mismo informe (Jiménez y grupo de trabajo de la Estrategia RAM, 2020). Por lo que, estudios colaborativos como este es relevante para fortalecer la respuesta local con información en cuanto a la relación genética de cepas asociadas a un brote, en este caso provenientes de diferentes servicios del mismo establecimiento de salud, en un mismo tiempo, demostrando que aislamientos de la misma especie provenientes de pacientes en diferente servicios pertenecen a grupos clonales diferentes. Aunque no fue posible definir la transmisión horizontal de la resistencia a través de plásmidos conjugativos entre los clones de *K. pneumoniae* a otras especies involucradas en el estudio, las similitudes fenotípicas y la presencia de plásmidos de los mismos grupos de incompatibilidad abren esta posibilidad. Esta hipótesis podría ser corroborada mediante el uso de plataformas de secuenciación complementarias a la empleada en este estudio.

Otro aspecto a recalcar es que a través del análisis realizado se demuestra que, a pesar de que vivimos un momento en el que las herramientas genómicas parecen estar desplazando los análisis fenotípicos, por el contrario, se trata de análisis complementarios. Lo anterior se pudo ver con la determinación de la CIM a meropenem por E-test, obteniendo seis aislamientos de siete con valores de CIM que indican posibilidad de tratamiento con este carbapenem a pesar de la presencia de carbapenemasa tipo NDM. Un dato que no puede ser obtenido por un análisis genético.

Con lo anterior, se demostró la capacidad instalada a nivel local (HSJD) y de Referencia (Inciensa) para la caracterización de organismos de importancia clínica MDR y XDR incluyendo información epidemiológica, fenotipo y genotipo. Esto permite mantener una perspectiva a futuro cercano para utilizar este tipo de trabajos colaborativos en busca de una respuesta oportuna en la detección temprana de brotes, dando información valiosa para la toma de decisiones para la contención de la diseminación de organismos MDR y XDR, además de poner a disposición de la seguridad social metodologías de comparación apropiadas que contribuyen a establecer con mayor exactitud la posible relación epidemiológica entre distintas cepas en diferentes servicios de los establecimientos de salud. Esto, se traduce en información de apoyo al control de infecciones del establecimiento de salud.

## Referencias

Ambler, R. P. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 289:321–331.

Borgia S, Lastovetska O, Richardson D, Eshaghi A, Xiong J, Chung C, Baqi M, McGeer A, Ricci G, Sawicki R, Pantelidis R, Low DE, Patel SN and Melano RG. Outbreak of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Containing blaNDM-1, Ontario, Canada. *Clinical Infectious Diseases* 2012;55(11):e109–117

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; document M100, 31th ed. 2021.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 11.0, valid from 2021-01-01.

Hammerum AM, Hansen F, Nielsen HL, Jakobsen L, Stegger M, Andersen PS, Jensen P, Nielsen TK, Hansen LH, Hasman H and Fuglsang-Damgaard D. Use of WGS data for investigation of a long-term NDM-1-producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary in vivo spread of blaNDM-1 to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 3117–3124

Jiménez Antonieta, Rodríguez David, Baltodano Priscilla, Bolaños Hilda y Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología. Informe técnico: “Vigilancia de la resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa*, 2013 - 2017”. Tres Ríos, Costa Rica: Inciensa, 2018.

Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, Ramón-Pardo P, Melano RG. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica*. 2019;43:e65. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>

Jiménez Pearson Antonieta, Chaverri Murillo Jorge, Pérez Corrales Cristian, Ramírez Cardoce Manuel, Bolaños Acuña Hilda María y Grupo de trabajo de la Estrategia para la Vigilancia de Laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos en microorganismos de importancia en salud pública. “Informe técnico: Estrategia Vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de microorganismos de importancia en salud pública, 2018”. Tres Ríos, Costa Rica: Inciensa, abril 2020.

[https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia\\_epidemiologica/informes\\_vigilancia/2020/CNRB/Informe%20Estrategia%20Vigilancia%20RAM%20Inciensa-Costa%20Rica%202018.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2020/CNRB/Informe%20Estrategia%20Vigilancia%20RAM%20Inciensa-Costa%20Rica%202018.pdf)

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, *et al*. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases* 2010; 10: 597–602.

Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA and Walsh TR. How To Detect NDM-1 Producers. Journal of clinical microbiology. 2011. p. 718–721 Vol. 49, No. 2

Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E and Rossolini GM. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. Journal of clinical microbiology. 2013. p. 4264–4269 Vol. 41, No. 9

Queenan AM and Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews, July 2007, p. 440–458 Vol. 20, No. 3

Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, and Doia Y. Treatment Outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012 (2108 –2113).

Roberts JA, Kirkpatrick CMJ, Roberts MS, Robertson TA, Dalley AJ and Lipman J. Meropenem dosing in critically ill patients with sepsis and without renal dysfunction: intermittent bolus versus continuous administration? Monte Carlo dosing simulations and subcutaneous tissue distribution. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2009) 64, 142–150.

Tijerino Ayala A, Bolaños Acuña HM, Acuña Calvo MT, Vargas Morales JL, Campos Chacón E. Emergencia de  $\beta$ -lactamasa AmpC plasmídica del grupo CMY-2 en *Shigella sonnei* y *Salmonella* spp. en Costa Rica, 2003-2015. Rev Panam Salud Pública. 2016; 40(1):70–75.