

Artículo Original/ Original Article

<http://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.03.35>

Primer reporte de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas en hospitales de Paraguay. Año 2021

Nancy Melgarejo Touchet ^{ID}¹, Sofía Busignani ^{ID}¹, Pamela Dunjo¹ ^{ID}, Mariel Brítez ^{ID}¹, Aníbal Kawabata ^{ID}², Marlene Silvagni ^{ID}³, Carolina Rojas ^{ID}⁴, Eva Mereles ^{ID}⁵, Evelyn López ^{ID}⁶, Juana Salinas ^{ID}⁷, Natalia Scavone ^{ID}⁸, Karina Abreu ^{ID}⁹, Jessy Colman ^{ID}¹⁰, Betania Medina ^{ID}¹¹, Juan Irala ^{ID}¹², Stefan Goertzen ^{ID}¹³, Vanesa López ^{ID}¹⁴, Rosana Ortiz ^{ID}¹⁵, Graciela Lird ^{ID}¹⁶, Mario Martínez Mora ^{ID}¹

¹Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Laboratorio Central de Salud Pública. Av. Venezuela y Teniente Escurra, Asunción, Paraguay.

²Hospital del Trauma "Dr. Manuel Giani". Av. General Santos y Teodoro Mongelós, Asunción, Paraguay.

³Instituto de Previsión Social "Hospital Central", Av. Sacramento y Capitán Lombardo, Asunción, Paraguay.

⁴Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Instituto de Medicina Tropical. Av. Venezuela y Florida, Asunción, Paraguay.

⁵Universidad Nacional del Este, Facultad de Ciencias de la Salud, Laboratorio Epidemiológico Regional de Alto Paraná. Calle Andreu Moleon. Minga Guazu, Paraguay.

⁶Hospital Universitario San Lorenzo. Ruta Mariscal Estigarribia. Km 15. San Lorenzo, Paraguay

⁷Sanatorio AMSA. Teniente Fariña y Capitán Figari, Asunción, Paraguay.

⁸Laboratorio Díaz Gill. Eligio Ayala 1384. Asunción, Paraguay.

⁹Meyer Lab. Coronel Irazábal y Mariscal Estigarribia, Asunción, Paraguay.

¹⁰Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Hospital General Pediátrico "Niños de Acosta Ñu". Av. Arnaldo Bacigalupo, San Lorenzo, Paraguay.

¹¹Hospital Policial Rigoberto Caballero. Mariscal López y J. Kubitschek. Asunción, Paraguay

¹²Laboratorio Analiza. Parapiti 1155. Asunción, Paraguay.

¹³Hospital Loma Plata. Loma Plata. Chaco Paraguayo, Paraguay.

¹⁴Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Hospital Regional de Ciudad del Este. Ciudad del Este, Paraguay.

¹⁵Hospital General de Luque. Dora Gómez Bueno de Acuña. Luque, Paraguay.

¹⁶Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Médicas, Hospital de Clínicas. Avenida Mariscal López y Coronel Casal, San Lorenzo, Paraguay.

**Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:**

Melgarejo Touchet N, Busignani S, Dunjo P, Brítez M, Kawabata A, Silvagni M, et al. Primer reporte de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas en hospitales de Paraguay. Año 2021. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2021; 19(3): 35-43

RESUMEN

Las carbapenemasas se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro país, tanto en bacilos gramnegativos fermentadores como no fermentadores. Durante 2021, se ha reportado incremento de cepas con estas enzimas. Con el objetivo de evaluar la doble producción de carbapenemasas en *Enterobacterales* y comunicar su circulación, fue puesta a punto una PCR convencional múltiple. Estudio retrospectivo en 128 aislamientos provenientes de 20 centros colaboradores de la Red Nacional de Vigilancia de la RAM (Capital, Central e interior del país), remitidos al LCSP entre febrero y setiembre de 2021, para confirmación y genotipificación de carbapenemasas. Se realizaron pruebas fenotípicas y colorimétricas con sustratos específicos, y pruebas genotípicas (PCR convencional múltiple) para la detección simultánea de varios genes de resistencia (*bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}).

Fecha de recepción: octubre 2021. Fecha de aceptación: noviembre 2021

*Autor correspondiente: **Dra Nancy Lorena Melgarejo Touchet.** Laboratorio Central de Salud Pública. Av. Venezuela y Teniente Escurra, Asunción, Paraguay

Correo personal: nmtouchet@gmail.com Correo institucional: antimicrobiano.lcsp@mspbs.gov.py

Teléfono personal: +595 981 173450 - Teléfono institucional: +595 21 292653



De los 128 aislamientos estudiados, 107 correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*, 14 a *Enterobacter cloacae complex*, entre otros; aislados en mayor frecuencia de muestras de orina (30%), respiratorias (30%), sangre y catéter (24%). Los genes de resistencia a los carbapenemes detectados fueron: bla_{NDM} (77,3%), bla_{KPC} (17,2%); siendo confirmada la doble producción de carbapenemasas en 7 aislamientos (5,5%) provenientes de 4 centros diferentes de la capital de país y uno de Central; 6 de ellas (*K. pneumoniae*) con $bla_{NDM}+bla_{KPC}$ y 1 (*E. cloacae complex*) con $bla_{NDM}+bla_{OXA-48}$ -like; confirmando circulación de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas en el país (KPC+NDM y OXA+NDM); hallazgos que obligan a proveer de capacidades de detección, de manera a que se puedan tomar medidas oportunas y eficaces de contención y control.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana; carbapenemasa doble producción; bla_{NDM} ; bla_{KPC} ; bla_{OXA-48} -like; *Enterobacterales*; Paraguay.

First report of double carbapenemases-producing *Enterobacterales* in hospitals of Paraguay. Year 2021.

ABSTRACT

Carbapenemases are widely distributed in our country, both in fermenting and non-fermenting gram-negative bacilli. During 2021, an increase in strains with these enzymes has been reported. In order to evaluate the double production of carbapenemases in *Enterobacterales* and communicate their circulation, a multiple conventional PCR was set up. Retrospective study carried out in 128 isolates from 20 collaborating centers of the National AMR Surveillance Network (Capital, Central and interior of the country), sent to the LCSP between February and September 2021, for confirmation and genotyping of carbapenemases. Phenotypic and colorimetric tests were performed with specific substrates, as well as genotypic tests (multiple conventional PCR) for the simultaneous detection of several resistance genes (bla_{NDM} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} -like, bla_{IMP} and bla_{VIM}). Of the 128 isolates studied, 107 corresponded to *Klebsiella pneumoniae*, 14 to *Enterobacter cloacae complex*, among others; isolated in higher frequency from urine (30%), respiratory (30%), blood and catheter (24%) samples. The genes for resistance to carbapenems detected were: bla_{NDM} (77.3%), bla_{KPC} (17.2%); the double production of carbapenemases was confirmed in 7 isolates (5.5%) from 4 different centers in the capital of the country and one in Central; 6 of them (*K. pneumoniae*) with $bla_{NDM} + bla_{KPC}$ and 1 (*E. cloacae complex*) with $bla_{NDM} + bla_{OXA-48}$ -like; confirming circulation of double *Enterobacterales* producers of carbapenemases in the country (KPC + NDM and OXA + NDM); findings that require the provision of detection capabilities, so that timely and effective containment and control measures can be taken.

Keywords: Antimicrobial resistance, carbapenemase, double production, bla_{NDM} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} -like, *Enterobacterales*, Paraguay.

INTRODUCCIÓN

La emergencia de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas constituye un enorme desafío para la salud pública, por el incremento en la morbi-mortalidad y los altos costos que generan el manejo y control de sus infecciones⁽¹⁾.

Las principales carbapenemasas en este grupo bacteriano son: KPC (clase A), NDM, IMP, VIM (clase B) y OXA-48 (clase D)⁽²⁾; todas ellas de amplia distribución a nivel mundial, y endémicas en varios países de la región y el mundo.

En nuestro país, desde la confirmación de la carbapenemasa KPC en el año 2009^(3,4) y la metalobetalactamasa NDM en el 2012⁽⁵⁾, varios centros asistenciales del país han reportado su circulación; sin embargo, hasta la fecha no ha sido reportada la doble producción de carbapenemasas en *Enterobacterales*⁽⁶⁻⁸⁾.

A fin de conocer acerca de la circulación de los gérmenes resistentes a los antimicrobianos y el genotipo de las enzimas involucradas, es fundamental el trabajo

multidisciplinario que llevan a cabo los equipos de salud en la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM).

El Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), a través del Departamento de Bacteriología y Micología, coordina la Red Nacional de Vigilancia laboratorial de la Resistencia a los Antimicrobianos (RNVRAM) desde hace más de 20 años, trabajando de manera conjunta con los laboratorios públicos y privados de todo el país, en la caracterización molecular de las carbapenemasas circulantes.

Este año, los centros que conforman la RNVRAM han reportado incremento en el número de aislamiento de cepas de *Enterobacterales* resistentes a los carbapenemes, lo que motivó la puesta a punto de la técnica de PCR convencional múltiple para la detección simultánea de varios genes de carbapenemasas en este grupo bacteriano; los resultados de la implementación de la técnica confirmaron la circulación de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas en hospitales del país; constituyendo la comunicación de estos hallazgos el principal objetivo de la presente publicación.

MATERIALES Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de corte transversal realizado con aislamientos de *Enterobacterales* provenientes de 20 centros colaboradores de la RNVRAM de Capital, Central e interior del país; remitidos al LCSP entre febrero y setiembre de 2021, para la confirmación de portación de carbapenemasas, y su genotipificación.

Los criterios de derivación de las cepas fueron:

- Halo de inhibición de imipenem ≤ 22 mm, o
- Concentración inhibitoria mínima (CIM) en equipo automatizado (Vitek2 C[®]) de imipenem ≥ 2 ug/mL⁽⁹⁾.

Fueron estudiados un total de 128 aislamientos remitidos, los cuales fueron sometidos a pruebas bioquímicas manuales para confirmación de especies bacterianas; tamizaje fenotípico de producción de carbapenemasas y estudios genotípicos para la detección de genes de resistencia a los carbapenemes.

Tamizaje fenotípico para detección de producción de carbapenemasas: Fue realizada por la prueba colorimétrica rápida *blue carba*⁽¹⁰⁾ y las pruebas de sinergias entre los discos de carbapenemes con los de ácido fenilborónico (APB) y ácido etilendiaminotetraacético/ácido mercaptoacético de sodio (EDTA/SMA). Además, de las pruebas de sinergia entre los discos de ceftazidima-avibactam (CZA, 14 ug) y EDTA (15 mm de distancia de centro a centro); y, entre los de aztreonam (AZT, 30 ug) y APB (10 mm de distancia de centro a centro).

Estudio genotípico para la detección de genes de resistencia: Realizado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de punto final, utilizando cebadores específicos para la detección simultánea de los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48-like}⁽¹¹⁾.

Para la obtención del ADN, se utilizó el método de lisis bacteriana por ebullición durante 10 minutos de una suspensión bacteriana de aproximadamente 0,5 Mac Farland en 300 uL de agua libre de RNAsa y centrifugada posteriormente a 10.000 rpm por 10 minutos. Las reacciones de amplificación de los genes se realizaron en un termociclador TC-PRO (BOECO Germany) y los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE buffer (PanReac AppliChem – ITW Reagents). Las imágenes de los patrones electroforéticos fueron obtenidas con el equipo fotodocumentador Gel Doc[™] EZ Imager (BIO-RAD) y analizadas con el programa Image Lab 6.0 (BIO-RAD).

RESULTADOS

De los 128 aislamientos de *Enterobacterales*, 107 correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*, 14 a *Enterobacter cloacae complex*, 2 a *Escherichia coli*, 2 a *Citrobacter freundii*, y 1 a *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes* y *Providencia stuartii*. Los mismos fueron recuperados en mayor frecuencia de muestras de orina (30%), respiratorias (30%), sangre y catéter (24%), secreciones (13%), entre otras; de pacientes mayoritariamente hospitalizados (96%).

Los genes de resistencia a los carbapenemes detectados fueron:

- *bla*_{NDM} en 99 aislamientos (77,3%), siendo predominante la especie bacteriana *K. pneumoniae* (88%), seguida por *E. cloacae complex* (6%);
- *bla*_{KPC} en 22 aislamientos (17,2%), prevalente en *K. pneumoniae* (64%), seguida por *E. cloacae complex* (32%);
- *bla*_{NDM} + *bla*_{KPC} en 6 aislamientos, todos ellos de *K. pneumoniae*; y,
- *bla*_{NDM} + *bla*_{OXA-48-like} en 1 aislamiento de *E. cloacae complex*.

De los 7 aislamientos dobles productores de carbapenemasas (5,5%); 6 fueron provenientes de cuatro centros diferentes de la capital de país y uno de Central. Todas las cepas coproductoras de KPC+NDM correspondieron a *K. pneumoniae*, sin embargo, la coproducción de NDM + OXA-48-like fue confirmada en un aislamiento de *E. cloacae complex*. La Tabla 1 resume los resultados de caracterización molecular de las cepas estudiadas.

Tabla 1. Genotipificación de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas por PCR convencional múltiple. Febrero a setiembre de 2021. Paraguay. N: 128.

Genes detectados	Número de aislamientos	Cepa bacteriana
<i>bla</i> _{NDM}	99	<i>K. pneumoniae</i> (87) <i>E. cloacae complex</i> (6) <i>E. coli</i> (2) <i>C. freundii</i> (2) <i>K. aerogenes</i> (1) <i>P. stuartii</i> (1)
<i>bla</i> _{KPC}	22	<i>K. pneumoniae</i> (14) <i>E. cloacae complex</i> (7) <i>K. oxytoca</i> (1)
<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{KPC}	6	<i>K. pneumoniae</i> (6)
<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{OXA-48-like}	1	<i>E. cloacae complex</i> (1)

Fuente: Dpto. Bacteriología y Micología, Laboratorio Central de Salud Pública. MSPyBS. Paraguay.

En cuanto a las características de los aislamientos con doble producción de carbapenemasas y sus orígenes; en el 100 % fueron recuperados de muestras clínicas tomadas de pacientes hospitalizados con más de 25 días de internación. La Tabla 2 resume las características más importantes proveídas por los centros remitentes.

Tabla 2. Características de los aislamientos dobles productores de carbapenemasas. Paraguay. Año 2021.

Paciente	Centro de internación	Edad (años) sexo	Patología de base	Muestra clínica	Aislamiento bacteriano	Desenlace
1	Centro A	78 F	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión arterial • Cardiopatía isquémica • Diabetes • Hipotiroidismo • Trastorno depresivo 	re	kpn NDM+KPC	Óbito
2	Centro B	61 F	<ul style="list-style-type: none"> • Complicaciones post-covid 	se	kpn NDM+KPC	Óbito
3	Centro C	59 M	<ul style="list-style-type: none"> • Neumonía asociada a SARS-CoV-2 	es	kpn NDM+KPC	Alta médica

4	Centro D	35 M	<ul style="list-style-type: none"> Traumatismo por accidente de tránsito Sin patología de base 	ao	kpn NDM+KPC	Alta medica
5	Centro E	57 M	<ul style="list-style-type: none"> Tumor rectal 	ca	ecl NDM+OXA-48-like	Óbito
6	Centro D	47 M	<ul style="list-style-type: none"> Traumatismo por accidente de tránsito Sin patología de base 	sa ca	Kpn NDM+KPC	Sigue en internación
7	Centro D	24 M	<ul style="list-style-type: none"> Traumatismo por accidente de tránsito Sin patología de base 	ca	kpn NDM+KPC	Sigue en internación

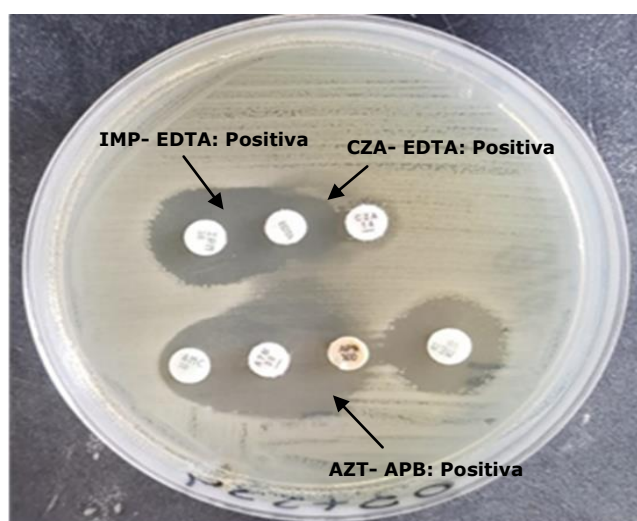
F: femenino; M: masculino; re: hisopado rectal; se: secreción de herida; es: esputo; ao: secreción abdominal; sa: sangre; ca: catéter; kpn: *K. pneumoniae*; ecl: *Enterobacter cloacae complex*.

Fuente: Dpto. Bacteriología y Micología, Laboratorio Central de Salud Pública. MSPyBS. Paraguay.

Los resultados de los estudios fenotípicos de las cepas dobles productoras de carbapenemasas fueron:

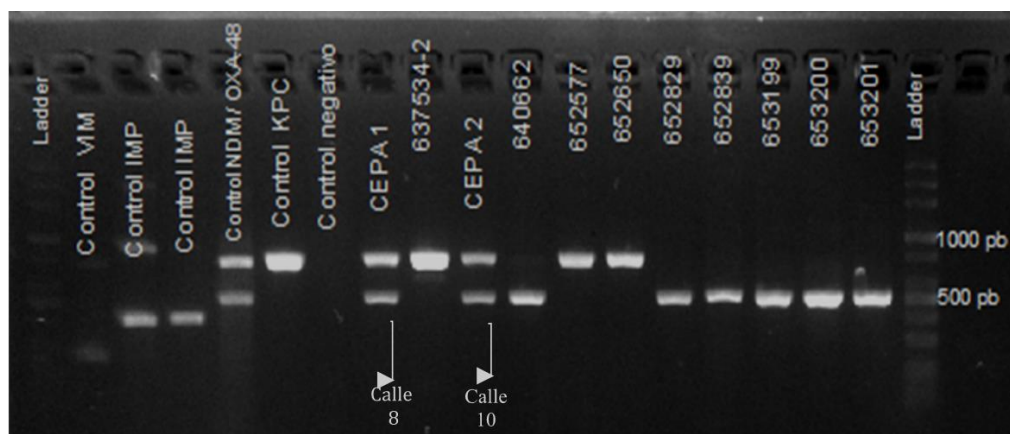
- *K. pneumoniae* (6):
 - *Blue carba test*: Positivo
 - Sinergia entre disco de CZA (14 ug) y disco de EDTA: Positivo.
 - Sinergia entre discos de AZT (30 ug) – discos de APB: Positivo.
- *E. cloacae complex* (1):
 - *Blue carba test*: Positivo
 - Sinergia entre disco de CZA (14 ug) y disco de EDTA: Positivo.
 - Sinergia entre disco de AZT (30 ug) y disco de APB: Negativo.

La Figura 1 muestra los resultados de sinergias de las cepas de *K. pneumoniae* dobles productoras de carbapenemasas; y la Figura 2 muestra los resultados de caracterización molecular llevadas a cabo por PCR convencional múltiple de las cepas estudiadas con los respectivos controles de calidad.



CZA: ceftazidima/avibactam; IMP: imipenem; AZT: aztreonam; MEM; meropenem; APB: ácido fenilborónico.

Figura 1. Pruebas de sinergia realizadas en aislamientos de *K. pneumoniae* (NDM+KPC).



Las cepas 1 y 2 (calles 8 y 10); corresponden a *K. pneumoniae* con doble producción de genes de carbapenemasas (bla_{KPC} y bla_{NDM}).

Figura 2. PCR convencional múltiple para detección simultánea de genes de resistencia a carbapenemes. Paraguay. N: 128. Año 2021.

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Este es el primer reporte en el país de detección en *Enterobacterales* con doble producción de carbapenemasas, con portación de genes bla_{NDM} + bla_{KPC} en aislamientos de *K. pneumoniae*; y de genes bla_{NDM} + bla_{OXA-48} -like en *E. cloacae* complex. Hasta la fecha, solo hemos confirmado las producciones de carbapenemasas KPC y NDM en *Enterobacterales*, siendo éste el primer hallazgo de OXA-48; una enzima ya descrita en países de la región (Argentina, Brasil y Colombia)¹²⁻¹⁴, y una de las más frecuentes en países de Europa^(15, 16).

Los primeros hallazgos de coproducción de carbapenemasas en *Enterobacterales* fueron confirmados en cepas provenientes de la India: Karthikeyan K y colaboradores informaron en el año 2010 el primer reporte de coexistencia de OXA-48 y NDM-1⁽¹⁷⁾, y en el año 2012, Kumarasamy y colaboradores publicaron la coproducción de NDM-1 y KPC-2 en aislamiento de *K. pneumoniae* recuperado de una muestra de orina en julio de 2010⁽¹⁸⁾. A partir de entonces, varios países del mundo han confirmado hallazgos similares de coproducción de diferentes genotipos⁽¹⁹⁻²¹⁾.

En países de la región, los primeros en reportar coproducción de carbapenemasas fueron investigadores de Brasil: Nava RG y colaboradores en el 2019⁽²²⁾; y, Oliveira EM y colaboradores en el 2020⁽²³⁾, describiendo la portación de genes bla_{NDM} + bla_{KPC} en aislamientos de *K. pneumoniae*.

En abril del 2021 el Laboratorio de Referencia Regional "Dr. Carlos Malbrán". INEI. ANLIS, emitió una Alerta Epidemiológica: Emergencia de dobles productores de carbapenemasa KPC+MBL", en la que se describe la confirmación en la primera ola de la pandemia por COVID-19 la emergencia y diseminación de colonización/infección de *Enterobacterales* productores de combinaciones de carbapenemasas en la Argentina, de los genotipos KPC+NDM, NDM+OXA-163 y NDM+IMP⁽²⁴⁾.

A raíz de los reportes regionales, el Laboratorio de Referencia Nacional llevó a cabo la estandarización de metodologías (fenotípicas y genotípicas) y estudios retrospectivos en los aislamientos productores de carbapenemasas, y los resultados de los hallazgos fueron socializados en un comunicado en setiembre del presente año, con las recomendaciones para los laboratorios de microbiología⁽²⁵⁾. La alerta epidemiológica regional por producción de dobles carbapenemasas fue emitida por la Organización Panamericana de la Salud el 22 de octubre⁽²⁶⁾ y la alerta epidemiológica nacional por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social el 2 de noviembre de 2021⁽²⁷⁾.

Esta emergencia y diseminación de bacterias coproductoras de carbapenemasas, requiere una respuesta firme, coordinada y protocolizada por parte de todo el equipo

sanitario multidisciplinario y autoridades de salud humana, veterinaria y ambiental, que permitan el control precoz y minimice su impacto negativo.

Nuestros hallazgos además obligan a proveer capacidades de detección a los laboratorios de bacteriología de todo el país, de manera a que se puedan tomar medidas oportunas y eficaces de contención y control.

CONFLICTO DE INTERES: No declarado.

FINANCIAMIENTO: Ninguno.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Melgarejo Touchet Nancy: Autor principal. Idea, Elaboración del Protocolo, recolección y análisis de los datos, presentación de resultados, redacción del manuscrito.

Martínez Mario: Asesoría, revisión crítica del manuscrito.

Busignani Sofía: Estudios fenotípicos y genotípicos completos de los aislamientos bajo investigación.

Pamela Dunjo: Estudios fenotípicos y genotípicos completos de los aislamientos bajo investigación.

Mariel Brítez: Apoyo en estudios genotípicos de los aislamientos bajo investigación.

Aníbal Kawabata, Marlene Silvagni, Carolina Rojas, Eva Mereles, Evelyn López, Juana Salinas, Natalia Scavone, Karina Abreu, Jessy Colman, Betania Medina, Juan Irala, Stefan Goertzen, Vanesa López, Rosana Ortiz, Graciela Lird: Detección fenotípica de resistencias inusuales en las cepas de interés; y remisión de estas al Laboratorio de Referencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pujol M, Limón E. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia [General epidemiology of nosocomial infections. Surveillance systems and programs]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Feb; 31(2): 108-13. Doi: [10.1016/j.eimc.2013.01.001](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.001). PMID: 23357654.
2. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul; 20(3): 440-58, table of contents. Doi: [10.1128/cmr.00001-07](https://doi.org/10.1128/cmr.00001-07) PMID: 17630334; PMCID: PMC1932750.
3. Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Lird G, Laconich M, Aguilar G. Detección de carbapenemasa (KPC) en *Enterobacter* en un hospital de Asunción, Paraguay. VII Congreso paraguayo de Infectología. I Jornada de Microbiología Clínica. V Jornada de Enfermería. 6, 7, 8 de noviembre de 2009. Asunción, Paraguay.
4. Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Falcón M. Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Revista de Salud Pública del Paraguay*. 2013; 3(1): 30-5. Disponible en: <https://fi-admin.bvsalud.org/document/view/w9yhv>
5. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Alerta Epidemiológica. Primer hallazgo de Metalobetalactamasa. New Delhi (NDM) en Paraguay. 26 de noviembre de 2012. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/dependencias/imt/uploads/Documento/alerta6.pdf>.
6. Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Falcón M. Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Rev. Salud Pública Parag*. 2013 3(1): 30-5. Disponible en: <https://fi-admin.bvsalud.org/document/view/w9yhv>.
7. Rivas M, Ortiz H, Almada P, Arguello R, Melgarejo N, Martínez C. *Escherichia coli* metalobetalactamasa en un hospital de alta complejidad en Paraguay. *Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int* 2016; 3 (2):120-3. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2312-38932016000200011&lng=en%22lng=en.
8. Melgarejo-Touchet N, Brítez CM, Busignani S, Falcón M, López E, Laconich M, et al. (2021). Caracterización molecular de carbapenemasas en bacilos gramnegativos circulantes en hospitales de Paraguay. Primer cuatrimestre 2021. Memorias del Instituto de

- Investigaciones en Ciencias de la Salud, 2021; 19(2): 49–58. Doi: [10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.02.49](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.02.49).
9. Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Criterios para sospecha de carbapenemasas en Enterobacterias 2019. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/10/CRITERIOS-PARA-SOSPECHA-DE-CARBAPENEMASAS-EN-ENTEROBACTERIAS-2019.pdf>.
 10. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2013 Dec; 51(12): 4281-3. Doi: [10.1128/jcm.01634-13](https://doi.org/10.1128/jcm.01634-13) Epub 2013 Oct 9. PMID: 24108615; PMCID: PMC3838089.
 11. Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Protocolo de PCR multiplex para detección de carbapenemasas. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/01/Deteccion-CBP-Multiplex.pdf>
 12. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, Jiménez JN. A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 60(1): 332-42. Doi: [10.1128/aac.01775-15](https://doi.org/10.1128/aac.01775-15)
 13. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59 (8): 4453-6. Doi: [10.1128/AAC.04243-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04243-14)
 14. Andrés P, Rodríguez A, Albornoz E, Rapoport M, Saa G, Pasterán F, Corso A, Fernández A. Emergencia de OXA-370, una variante de la carbapenemasa OXA-48, en un aislamiento clínico del Complejo *Enterobacter cloacae* en Argentina. XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019). Poster 008. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/09/EMERGENCIA-DE-OXA370-UNA-VARIANTE-DE-LA-CARBAPENEMASA-OXA48.pdf>
 15. Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Virulence. 2017; 8(4): 460-9. doi: [10.1080/21505594.2016.1222343](https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343)
 16. Galan-Sánchez F, Ruiz del Castillo B, Marín-Casanova P, Rodríguez-Iglesias M. Caracterización de blaOXA-48 detectada en cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* aisladas en el sur de España [Characterization of blaOXA-48 in *Enterobacter cloacae* clinical strains in southern Spain]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012 Nov; 30(9): 584-5. Spanish. doi: [10.1016/j.eimc.2012.05.002](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.05.002). Epub 2012 Jun 21. PMID: 22727535.
 17. Karthikeyan K, Toleman M, Giske CG. First report of the co-existence of blaOXA-48 or blaOXA-48-like gene with blaNDM-1 in *Enterobacteriaceae* from India. Clin Microbiol Infect 2010; 16 Suppl 2: S187.
 18. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. J Antimicrob Chemother. 2012 Jan; 67(1):243-4. doi: [10.1093/jac/dkr431](https://doi.org/10.1093/jac/dkr431). Epub 2011 Oct 11. PMID: 21990048.
 19. Loqman S, Soraa N, Diene SM, Rolain JM. Dissemination of Carbapenemases (OXA-48, NDM and VIM) Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from the Mohamed VI University Hospital in Marrakech, Morocco. Antibiotics (Basel). 2021 Apr 26; 10(5): 492. doi: [10.3390/antibiotics10050492](https://doi.org/10.3390/antibiotics10050492). PMID: 33925772; PMCID: PMC8145435.
 20. Thomson GK, Snyder JW, McElheny CL, Thomson KS, Doi Y. Coproduction of KPC-18 and VIM-1 Carbapenemases by *Enterobacter cloacae*: Implications for Newer β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. J Clin Microbiol. 2016 Mar; 54(3):791-4. Doi: [10.1128/JCM.02739-15](https://doi.org/10.1128/JCM.02739-15). Epub 2015 Dec 30. PMID: 26719440; PMCID: PMC4767958.
 21. Poirel L, Ros A, Carricajo A, Berthelot P, Pozzetto B, Bernabeu S, Nordmann P. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan; 55(1):447-8. doi: [10.1128/AAC.01305-10](https://doi.org/10.1128/AAC.01305-10). Epub 2010 Oct 25. PMID: 20974865; PMCID: PMC3019622.
 22. Nava RG, Oliveira-Silva M, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Vespero EC. New sequence type in multidrug-

- resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the blaNDM-1-encoding gene in Brazil. Int J Infect Dis. 2019 Feb; 79: 101-3. doi: [10.1016/j.ijid.2018.11.012](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.012). Epub 2018 Nov 26. PMID: 30496852.
23. Oliveira ÉM, Beltrão EMB, Scavuzzi AML, Barros JF, Lopes ACS. High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with bla KPC and bla NDM from patients at a public hospital in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020; 53: e20200397. doi: [10.1590/0037-8682-0397-2020](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0397-2020).
 24. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Alerta Epidemiológica: Emergencia de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas. INEI. ANLIS. Malbrán. 2021. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2021/?cat=37>.
 25. Melgarejo N, Falcón M, Busignani S, Britez M, Dunjo P. Detección de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas en hospitales de Paraguay. Revista del Nacional 2021; 13 (1) suplemento. Disponible en <http://www.revistadelnacional.com.py/index.php/inicio/Suplemento>.
 26. Organización Panamericana de la Salud. Alerta epidemiológica. Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en *Enterobacterales* en Latinoamérica y el Caribe. 22 de octubre de 2021. Disponible en <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas>.
 27. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Alerta epidemiológica N° 2/2021. Detección de Enterobacterias multirresistentes y con doble portación de carbapenemasas. Disponible en http://dqvs.mspbs.gov.py/files/slider/BOLETIN_DETECCION%20DE%20ENTEROBACTERIAS.pdf.