

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
Departamento de Microbiología y Parasitología



**TESIS DOCTORAL**

**Colonización por enterobacterias productoras de  
carbapenamasas durante el proyecto europeo R-GNOSIS:  
epidemiología, estructura poblacional y caracterización  
molecular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marta Hernández García**

Directores

**Rafael Cantón Moreno**  
**Patricia Ruiz Carbajosa**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Microbiología y Parasitología



**TESIS DOCTORAL**

**Colonización por Enterobacterias Productoras de  
Carbapenemasas durante el Proyecto Europeo R-GNOSIS:  
Epidemiología, Estructura Poblacional y Caracterización  
Molecular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marta Hernández García**

Directores

**Rafael Cantón Moreno**  
**Patricia Ruiz Garbajosa**



El Dr. Rafael Cantón Moreno, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid

La Dra. Patricia Ruiz Garbajosa, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid

CERTIFICAN QUE:

MARTA HERNÁNDEZ GARCÍA ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

**“Colonización por Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas durante el Proyecto Europeo R-GNOSIS: Epidemiología, Estructura Poblacional y Caracterización Molecular”**

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid, a 13 de Julio de 2018

Fdo.:

Fdo.:

Dr. Rafael Cantón Moreno

Dra. Patricia Ruiz Garbajosa





## AGRADECIMIENTOS

---

Lo único que se interpone entre tu sueño y tú, es la voluntad de intentarlo y la creencia de que en realidad es posible....Son muchos los retos a los que me he enfrentado durante esta gran aventura y aunque no siempre ha sido fácil, sin duda todo el esfuerzo ha merecido la pena. Sin embargo, nunca lo habría logrado si durante el camino no me hubiesen acompañado mis familiares, compañeros y amigos...

A mis directores de tesis, el Dr. Cantón y la Dra. Ruiz-Garbajosa, gracias por darme la oportunidad de desarrollarme profesional y personalmente durante estos años y por confiar en mi trabajo y mis capacidades para defender un proyecto tan ambicioso como el estudio R-GNOSIS. Vuestra dedicación, profesionalidad y entusiasmo han sido un ejemplo a seguir para mí y me han impulsado a intentar mejorar cada día. Gracias por acompañarme en los días más felices y por vuestro apoyo y comprensión en los momentos más difíciles.

Gracias a toda la gente que ha participado en el estudio R-GNOSIS y que de una manera u otra han logrado que este proyecto salga adelante. Quiero agradecer especialmente al personal del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Ramón y Cajal, y en particular a Cristina y Nieves, su labor durante el desarrollo del proyecto. Sin vuestra profesionalidad y constancia no habríamos conseguido llegar hasta aquí. Y por supuesto, quiero darles las gracias a los compañeros de Microbiología que también han colaborado en este gran estudio. Carmen Turrientes, gracias por tus buenos consejos y por tu magnífico sentido del humor. Ricardo, ha sido un placer trabajar contigo y aprender tanto sobre bioinformática. Gracias también a mis compañeras y amigas, Irene, Blanca y Marta Cobo, sin vuestro trabajo y apoyo esta tesis no habría sido la misma. Gracias por todos los buenos momentos vividos, tanto fuera como dentro del laboratorio, y por estar a mi lado siempre que os he necesitado. Sois las mejores. Y por último, a Ana Moreno y a Esther, sin vuestra gran capacidad de trabajo y gestión no habría sido posible el desarrollo de este estudio. Esther, gracias también por mostrarte siempre dispuesta a ayudar, por tu compañía y por tu encantadora manera de escuchar siempre que lo he necesitado.

Al laboratorio del Dr. Dan Andersson, el departamento de Bioquímica y Microbiología Médica (IMBIM) de la Universidad de Uppsala, Suecia. Gracias por darme la oportunidad de vivir una experiencia formidable y conocer como es el mundo más allá de nuestras fronteras. Quiero agradecerles especialmente a Linus Sandegren y Karin Hjort el tiempo que dedicaron a formarme en el campo de la evolución bacteriana

y la bioinformática. Y por supuesto, a Tíscar, mi familia en Uppsala. Gracias por tu compañía y apoyo durante el frío y nevado invierno sueco.

Al equipo ABAC Therapeutics, gracias por darme la oportunidad de ver la ciencia desde otro punto de vista y por mostrarme que también se puede ser muy feliz fuera de casa. A Domingo y Albert, gracias por haberme tratado desde el principio como a un miembro más del equipo y por todas las facilidades que me habéis ofrecido. A Soraya y Catalina, gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntas y por vuestra paciencia y apoyo, especialmente en la recta final de esta tesis.

Al Dr. Álvaro San Millán y su equipo PBE Lab, gracias por mostrarme el lado más molecular de la Microbiología. En particular a Jero, gracias por tu pasión contagiosa por la ciencia, por estar siempre dispuesto a ayudar y por enseñarme que lo más bonito de nuestro trabajo es hacerse preguntas.

A la Dra. Rosa Del Campo, gracias por descubrirme, por creer en mí y por estar siempre dispuesta a ayudar. Gracias por enseñarme que el secreto del éxito es disfrutar del camino y que en la ciencia y en la vida hay que ponerle amor a todo. Por supuesto, a los "chicos del campo", Ana Rizos, Juande, Bea Romero, Merche, Gabriela y Marta Cobo, gracias por enseñarme a dar los primeros pasos, por ser un ejemplo de compañerismo y trabajo duro, y por tantos momentos de alegría y complicidad.

A Irene Rodríguez y Ana Sofía. Gracias por vuestra amistad, por ser un ejemplo para mí en todos los aspectos, no sólo en la ciencia. Gracias por guiar mis pasos y transmitirme todo lo que sabéis. Sin vuestra ayuda nunca lo habría logrado. A Conchi, gracias por ponerle sentido de humor a cada instante y sacarle lo mejor a cada momento que hemos pasado juntas.

Al resto de compañeros y amigos que forman o han formado parte de este magnífico grupo de investigación: Sergio, Desirée, María Díez, Marisa Morosini, Val, Arancha, Aida y especialmente a Laurita y María García...gracias!! no sólo hemos compartido infinitas horas de laboratorio, congresos y cursos formativos, también muchísimas risas, celebraciones de todo tipo y viajes increíbles. Gracias también a todos los "resis" y al Servicio de Microbiología al completo. Todos habéis formado parte de mi día a día durante estos años y habéis contribuido a esta tesis.

A todos mis amigos, especialmente a Laury, Bea A, María, Merce, Bea M e Irene. Vuestro apoyo y confianza siempre me han ayudado a seguir adelante. Gracias por estar siempre a mi lado y hacer que todo sea más fácil y divertido.

A mis hermanas Lucía e Irene. Lucía, gracias por tu generosidad, serenidad y apoyo incondicional. Gracias por haber ejercido de hermana mayor y haber cuidado de todos mientras yo hacía realidad este sueño. Irene, gracias por tu alegría y espontaneidad. Tu interés y tu confianza en mí me han ayudado a no rendirme nunca. Os quiero mucho.

A mis padres, a los tres. Sin vuestro esfuerzo y apoyo no habría logrado llegar hasta aquí. A mi padre, gracias por transmitirme tu entusiasmo por la ciencia y la investigación. A mi madre y a Fernando, gracias por enseñarme a no tener miedo nunca, a creer en mí y a luchar por mis sueños hasta el final. Gracias por inculcarme vuestros valores y haber hecho de mí la persona que soy ahora. Os quiero mucho.

A Miguel, mi compañero de viaje y de vida. Gracias por estar a mi lado, por tu cariño y por haber compartido conmigo los mejores años de mi vida. Cerca o lejos, tu apoyo y tu amor siempre van conmigo. Te quiero mucho.



<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
1. La resistencia a los antimicrobianos .....	21
2. El orden <i>Enterobacterales</i> .....	24
3. Los antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	26
3.1. Clasificación .....	26
3.2. Mecanismos de acción .....	28
3.3. Mecanismos de resistencia .....	29
3.3.1. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	33
3.3.2. $\beta$ -lactamasas AmpC .....	34
4. Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) .....	35
4.1. Clasificación de carbapenemasas .....	35
4.2. Epidemiología y diseminación .....	38
4.3. Factores de riesgo de la colonización e infección por EPC .....	45
4.4. Métodos de detección y confirmación de portadores de EPC .....	46
4.5. Prevención y control .....	48
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
1. Proyecto R-GNOSIS .....	57
2. Recogida de muestras .....	59
3. Cultivos de vigilancia .....	60
4. Identificación bacteriana .....	61
4.1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) .....	61
4.2. Amplificación y secuenciación del ARNr 16S .....	61
4.2.1. Extracción de ADN .....	61
4.2.2. PCR y secuenciación .....	62
4.2.3. Análisis de la secuencia del ADNr 16S .....	63
5. Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas y BLEE .....	63
5.1. Test de doble difusión en disco (DDST) .....	63
5.2. Test de Hodge modificado (MHT) .....	64
5.3. Identificación fenotípica del tipo de carbapenemasa .....	64
6. Sensibilidad antimicrobiana .....	65
6.1. Microdilución .....	65
6.2. Tiras en gradiente .....	65

7. Caracterización de genes de resistencia.....	65
7.1. Pruebas de detección rápida.....	65
7.2. PCR y secuenciación.....	69
7.3. Análisis bioinformático.....	69
8. Estudio de la estructura poblacional.....	69
8.1. Electroforesis en campo pulsado (PFGE) .....	69
8.2. Multilocus sequence typing (MLST).....	71
8.3. Índice de diversidad.....	73
9. Transferencia horizontal de genes.....	74
9.1. Conjugación en filtro.....	74
9.2. Transformación química.....	74
9.3. Electroporación.....	75
10. Localización de los genes de resistencia .....	76
10.1. Digestión y separación del ADN .....	76
10.2. Transferencia y fijación del ADN a una membrana.....	77
10.3. Marcaje de sondas .....	78
10.4. Hibridación y revelado.....	79
11. Caracterización de plásmidos portadores de carbapenemasas y BLEE .....	80
11.1. Tipificación de plásmidos por PCR .....	80
11.2. Análisis del perfil plasmídico (RFLP).....	82
12. Clonaje de genes de resistencia.....	83
12.1. Clonación de genes en vectores de expresión.....	83
12.2. Mutagénesis dirigida.....	85
13. Estudio del efecto de la resistencia sobre coste biológico .....	86
13.1. Estudio de la estabilidad de los plásmidos .....	87
13.2. Cinética de crecimiento bacteriano.....	88
14. Secuenciación del genoma completo.....	88
14.1. Extracción de ADN genómico.....	88
14.2. Secuenciación masiva.....	89
14.3. Análisis bioinformático.....	89
15. Análisis estadístico.....	89
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 1. Estudio R-GNOSIS: Epidemiología y estudio microbiológico</b>	
<b>de enterobacterias productoras de carbapenemasas.....</b>	<b>93</b>
1. Epidemiología de las EPC y E-BLEE durante el proyecto R-GNOSIS.....	95
1.1. Incidencia de pacientes colonizados por EPC y E-BLEE.....	95
1.2. Incidencia de EPC y E-BLEE con y sin precauciones de contacto .....	99
1.3. Diversidad y distribución de especies bacterianas.....	103
2. Caracterización molecular de las EPC.....	108
2.1. Caracterización de los genes de resistencia.....	109
2.2. Sensibilidad a antibióticos .....	114
2.3. Estructural poblacional .....	115
2.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	115

2.3.2. <i>Escherichia coli</i> .....	118
2.3.3. Otras enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	119
2.4. Análisis de diversidad clonal.....	124
2.5. Clones epidémicos productores de OXA-48.....	127
<b>Capítulo 2: Cocolonización por enterobacterias productoras de OXA-48, VIM-1 y KPC-3.....</b>	<b>131</b>
1. Características de los pacientes cocolonizados.....	133
2. Eventos y dinámica de cocolonización.....	134
3. Estructura poblacional.....	138
4. Transferabilidad de genes de resistencia y caracterización de plásmidos.....	141
<b>Capítulo 3: Primera descripción de aislados de <i>Kluyvera</i> spp. productores de OXA-48 y CTX-M-213.....</b>	<b>145</b>
1. Identificación de los aislados bacterianos y datos clínicos.....	147
1. Caracterización genotípica y fenotípica de la resistencia.....	149
2. Tipado de plásmidos.....	149
3. Fenotipo de resistencia de <i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub> .....	150
4. Secuenciación genómica y análisis bioinformático.....	151
<b>Capítulo 4: Brote por <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1.....</b>	<b>159</b>
1. Descripción epidemiológica del brote y medidas de control.....	161
1.1. Evolución del brote y características de los pacientes.....	161
1.2. Medidas de control.....	165
2. Caracterización de las EPC detectadas durante el brote.....	166
3. Tipado de plásmidos.....	168
4. Estudio del efecto de la resistencia sobre el coste biológico.....	170
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>173</b>
1. Estudio R-GNOSIS: Epidemiología y estudio microbiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	175
2. Cocolonización por enterobacterias productoras de OXA-48, VIM-1 y KPC-3.....	184
3. Primera descripción de aislados de <i>Kluyvera</i> spp. productores de OXA-48 y CTX-M-213.....	187
4. Brote hospitalario por <i>K. pneumoniae</i> productora de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1.....	192
5. Discusión final.....	196
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>205</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>223</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

**AC** Aislamiento de contacto  
**ADN** Ácido desoxirribonucleico  
**ADP** Ácido dipicolínico  
**AFB** Ácido fenil-borónico  
**Ahy** *Aeromonas hydrophila*  
**AMC** Amoxicilina-ácido clavulánico  
**AMK** Amikacina  
**ARN** Ácido ribonucleico  
**AVI** Avibactam  
**AZT** Aztreonam  
**BAS** Broncoaspirado  
**BGN** Bacilos gramnegativos  
**BLEE**  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido  
**BO** Ácido borónico  
**C3G** Cefalosporinas de tercera generación  
**C4G** Cefalosporinas de cuarta generación  
**C5G** Cefalosporinas de quinta generación  
**CAZ** Ceftazidima  
**CBP** Carbapenemasa  
**CC** Complejo clonal  
**Cf** *Citrobacter freundii*  
**CF** Cefalotina  
**CIM** Método de inactivación de carbapenems  
**CIP** Ciprofloxacino  
**Ck** *Citrobacter koseri*  
**CLAV** Ácido clavulánico  
**CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
**CM** Comunidad de Madrid  
**CMB** Concentración mínima bactericida  
**CMI** Concentración mínima inhibitoria  
**COL** Colistina  
**CTX** Cefotaxima  
**CXM** Cefuroxima  
**CZ** Cefazolina  
**DDST** Test de doble difusión en disco  
**dNTP** Deoxinucleótido Trifosfato  
**DO** Densidad óptica  
**E-BLEE** Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido  
**Ec** *Escherichia coli*  
**Ecl** *Enterobacter cloacae* complex  
**EDTA** Ácido etilendiaminotetracético  
**EPC** Enterobacterias productoras de carbapenemasas  
**EPOC** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica  
**ERT** Ertapenem  
**EUCAST** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*  
**FEP** Cefepime

**FOS** Fosfomicina  
**G** Gastroenterología  
**GEN** Gentamicina  
**IMP** Imipenem  
**IS** Secuencia de inserción  
**ITU** Infección del tracto urinario  
**Ka** *Kluyvera* spp.  
**Kaer** *Klebsiella aerogenes*  
**Kox** *Klebsiella oxytoca*  
**Kp** *Klebsiella pneumoniae*  
**LAMP** *Loop-mediated isothermal amplification*  
**LB** Luria Bertuni  
**LCR** Líquido cefalorraquídeo  
**LEV** Levofloxacino  
**LIN** Linezolid  
**LOS** *Length of stay* (duración de la estancia)  
**MALDI-TOF MS** *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectrometer*  
**MBL** Metalo- $\beta$ -lactamasa  
**MDR** Microorganismo multirresistente  
**MER** Meropenem  
**MET** Metronidazol  
**MHA** Muelle-Hinton agar  
**MHT** Test de Hogde  
**MLST** *Multi locus sequence typing*  
**N** Neurocirugía  
**NAG** N-acetil-glucosamina  
**NAM** N-acetilmurámico  
**NCBI** *National Center for Biotechnology Information*  
**OMS** Organización Mundial de la Salud  
**ORF** *Open Reading frame*  
**P** Neumología  
**P1** Periodo 1  
**P2** Periodo 2  
**PBP** Proteína ligada a penicilina (*Penicillin Binding Protein*)  
**PBRT** *PCR-based replicon typing*  
**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDR** Microorganismo panresistente  
**PE** Precauciones estándar  
**PFGE** Electroforesis en campo pulsado  
**PG** Peptidoglicano  
**PIP/TZ** Piperacilina-tazobactam  
**PRAN** Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos  
**RAM** Resistencia a antimicrobianos  
**R-GNOSIS** *Resistance of Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies*  
**Ro** *Raoultella ornithinolytica*  
**Rp** *Raoultella planticola*  
**S1** Semestre 1  
**S2** Semestre 2  
**S3** Semestre 3

**S4** Semestre 4  
**SDI** Índice de dominancia de Simpson  
**SEIMC** Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica  
**SM** Servicios médicos  
**SNP** *Single nucleotide polymorphisms*  
**SQ** Servicios quirúrgicos  
**ST** Secuencia tipo  
**SXT** Trimetoprim-sulfametoxazol  
**TC** Transconjugante  
**TCE** Traumatismo craneoencefálico  
**TGI** Tracto gastrointestinal  
**TIG** Tigeciclina  
**TM** Transformante  
**TOB** Tobramicina  
**TZB** Tazobactam  
**U** Urología  
**UE** Unión Europea  
**UPGMA** *Unweighted pair group method using arithmetic averages*  
**VAN** Vancomicina  
**WGS** *Whole Genome Sequencing*  
**XDR** Microorganismo extremadamente resistente



## LISTADO DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Factores que promueven la aparición y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos.

**Figura 2.** Estructura química de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

**Figura 3.** a) Formación del peptidoglicano de la pared celular en bacterias gramnegativas; y b) mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

**Figura 4.** Principales mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en enterobacterias.

**Figura 5.** Tasa de colonización con E-BLEE en distintas regiones geográficas del mundo entre los años 2001 y 2011.

**Figura 6.** Prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en Europa en 2013.

**Figura 7.** Prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en Europa entre 2014 y 2015.

**Figura 8.** Representación de la estructura del transposón Tn4401.

**Figura 9.** Representación de la estructura de un integrón de clase 1.

**Figura 10.** Representación de los transposones Tn1999 y Tn1999.2.

**Figura 11.** Representación del plásmido pOXA-48a-IncL/M.

**Figura 12.** Diagrama de actuación para la confirmación de mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenems en enterobacterias.

**Figura 13.** Diagrama de flujo a seguir al ingreso hospitalario de un paciente.

**Figura 14.** Diseño del estudio R-GNOSIS.

**Figura 15.** a) Torundas rectales utilizadas en el cribado; b) placa Chromo ID-ESBL con colonias rojas y verdes; y c) placa Chromo ID-CARB/OXA-48, con colonias verdes en el medio para identificación de OXA-48 y colonias rojas en el medio para identificación de carbapenemasas.

**Figura 16.** a) Test de doble difusión en disco con aztreonam (AZT) y cefepime (FEP) colocados centro a centro del disco de amoxicilina-clavulánico (AMC) y disco de cefoxitina (FOX) y b) Test de Hodge Modificado (MHT).

**Figura 17.** Fórmulas para el cálculo del índice de Simpson ( $D_{SI}$ ) y el índice de dominancia (SDI).

**Figura 18.** a) Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1000,18 Kb) utilizado como marcador de peso molecular en la digestión con la enzima S1; b) *Southern Blot* para transferencia de ADN a una membrana de nylon.

**Figura 19.** Mapa genético del vector de expresión pCR-BluntII-TOPO.

**Figura 20.** Curva de crecimiento bacteriano (A=fase de latencia, B=fase exponencial; C=fase estacionaria y D=fase de muerte).

**Figura 21.** a) EPC causantes de infección entre los pacientes colonizados del estudio R-GNOSIS; b) Infecciones producidas por *K. pneumoniae* productora de carbapenamasa.

**Figura 22.** Incidencia semestral de EPC durante el estudio R-GNOSIS. a) Incidencia de EPC por semestres; b) incidencia de EPC por tipo de servicio; y c) incidencia de EPC en cada servicio.

**Figura 23.** Incidencia de EPC y E-BLEE durante el estudio R-GNOSIS. a) Incidencia total y prevalencia por periodos; b) incidencia por tipo de servicio hospitalario; y c) incidencia por servicios hospitalarios.

**Figura 24.** Abundancia relativa de especies de EPC por semestres (a) y diversidad de especies de EPC por semestres (b).

**Figura 25.** Abundancia relativa de especies de E-BLEE por semestres (a) y diversidad de especies de E-BLEE por semestres (b).

**Figura 26.** Abundancia relativa de especies portadoras de EPC o E-BLEE en cada servicio por semestres durante el estudio R-GNOSIS.

**Figura 27.** Distribución de las EPC a lo largo del tiempo de estudio en función del tipo de carbapenemasa.

**Figura 28.** Distribución de especies productoras de OXA-48 y VIM-1 durante ambos periodos.

**Figura 29.** Distribución de los genes *bla*<sub>carbapenemasa</sub> entre las especies bacterianas de los distintos servicios hospitalarios y semestres de estudio.

**Figura 30.** Porcentajes de resistencia de las EPC a los distintos grupos de antimicrobianos.

**Figura 31.** Dendrograma de los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa.

**Figura 32.** Distribución por meses de los clones de *K. pneumoniae* A/ST11/OXA-48 (a) y B/ST54/VIM-1 (b) respecto al total de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

**Figura 33.** Distribución por meses de los aislados de *E. coli* pertenecientes al complejo clonal 10 (CC10).

**Figura 34.** Dendrograma de los aislados *E. coli* productores de carbapenemasa.

**Figura 35.** Dendrograma de los aislados *K. aerogenes* productores de carbapenemasa.

**Figura 36.** Dendrograma de los aislados *K. oxytoca* productores de carbapenemasa.

**Figura 37.** Dendrograma de los aislados *E. cloacae* complex productores de carbapenemasa.

**Figura 38.** Dendrograma de los aislados *Citrobacter* spp. productores de carbapenemasa.

**Figura 39.** Dendrograma de los aislados de *Raoultella* spp. productores de carbapenemasa.

**Figura 40.** Dendrograma de los aislados de *Kluyvera* spp. productores de carbapenemasa.

**Figura 41.** Índices de diversidad clonal de la población de *K. pneumoniae* y *E. coli* durante los cuatro semestres de estudio.

**Figura 42.** Distribución por servicios y periodos de los clones epidémicos *K. pneumoniae*- A/ST11 (a) y *E. coli*-A/ST10 (b) e índices de diversidad clonal (SDI) de las poblaciones *K. pneumoniae* y *E. coli* en los cuatro servicios durante ambos periodos de estudio.

**Figura 43.** Índices de diversidad clonal semestrales de la población *K. pneumoniae* y *E. coli* productora de OXA-48.

**Figura 44.** Distribución por servicios y periodos de los clones epidémicos *K. pneumoniae* -A/ST11/OXA-48 (a) y *E. coli*-A/ST10/OXA-48 (b) e índices de diversidad clonal (SDI) de las poblaciones *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de OXA-48 en los cuatro servicios durante ambos periodos de estudio (c).

**Figura 45.** a) Incidencia de cocolonización y colonización por *K. pneumoniae* y *E. coli*; y b) Incidencia de cocolonización y colonización por EPC-OXA-48 y otras EPC.

**Figura 46.** Dinámica de cocolonización durante el estudio R-GNOSIS. La escala numérica indica el día de colonización y cocolonización desde el ingreso.

**Figura 47.** Digestión con la endonucleasa S1 de los aislados salvajes y sus respectivos transconjugantes.

**Figura 48.** Digestión con *HpaI* (izquierda) y *DraI* (derecha) del ADN plasmídico purificado a partir de los transconjugantes y transformantes.

**Figura 49.** Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de los genes *bla<sub>CTX-M-13</sub>* y *bla<sub>CTX-M-213</sub>* de todos los aislados de *Kluyvera* spp.

**Figura 50.** a) Imagen de la hibridación-S1 del gen OXA-48 en todos los aislados de *Kluyvera* spp. y sus respectivos transformantes; y b) digestión con *DraI* del ADN plasmídico purificado a partir de los seis transformantes.

**Figura 51.** Árbol filogenético del *core genome* de KA2 y las cepas de referencia de la base de datos GenBank.

**Figura 52.** Mapa lineal del contexto genético de *bla<sub>CTX-M-213</sub>* respecto a otras regiones relacionadas encontradas en las bases de datos del genoma.

**Figura 53.** Características principales del plásmido pOXA-48 detectado en la cepa KA2.

**Figura 54.** Características principales de los plásmidos pKA2\_2 y pKA2\_3 detectados en la cepa KA2.

**Figura 55.** Distribución de casos durante el brote por *K. pneumoniae*-NDM-1+CTX-M-15+DHA-1 en el Servicio de Neurocirugía entre septiembre de 2015 y febrero de 2016.

**Figura 56.** Tasa de crecimiento relativa de los aislados Kp-clon C/ST101 portadores del gen *bla<sub>NDM-1</sub>* y sus respectivos transconjugantes.



## LISTADO DE TABLAS

---

- Tabla 1.** Clasificación molecular y funcional de las  $\beta$ -lactamasas.
- Tabla 2.** Clasificación general de las carbapenemasas.
- Tabla 3.** Estrategias de intervención del estudio R-GNOSIS.
- Tabla 4.** Objetivos del protocolo 5 del estudio R-GNOSIS.
- Tabla 5.** Número de torundas rectales y pacientes que participaron en el cribado.
- Tabla 6.** Interpretación de “KPC/MBL/OXA-48 Confirmation Kit”.
- Tabla 7.** Interpretación de “ESBL-and AmpC *Screen Kit*”.
- Tabla 8.** Cebadores para la identificación de genes de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE).
- Tabla 9.** Cebadores para la identificación de genes de carbapenemasa.
- Tabla 10.** Cebadores y condiciones de amplificación de los genes de MLST de *K. pneumoniae* y *E. coli*.
- Tabla 11.** Soluciones empleadas en la hibridación y revelado de membranas.
- Tabla 12.** Cebadores y condiciones de amplificación de los 18 replicones descritos para plásmidos de enterobacterias según el esquema PBRT.
- Tabla 13.** Cebadores y condiciones de amplificación de genes conservados de la estructura de plásmidos IncL/M.
- Tabla 14.** Cebadores y condiciones de amplificación de los grupos IncL e IncM.
- Tabla 15.** Distribución semestral de los casos de colonización con EPC y E-BLEE durante el estudio R-GNOSIS.
- Tabla 16.** Distribución de casos de colonización con EPC y E-BLEE durante el estudio R-GNOSIS por servicios y periodos.
- Tabla 17.** Distribución y diversidad (SDI) semestral y por periodos de especies bacterianas portadoras de carbapenemasa (EPC) durante el estudio R-GNOSIS.
- Tabla 18.** Distribución y diversidad (SDI) semestral y por periodos de especies bacterianas portadoras de BLEE durante el estudio R-GNOSIS.
- Tabla 19.** Distribución de genes *bla*<sub>carbapenemasa</sub> y *bla*<sub>BLEE</sub> según la especie bacteriana.
- Tabla 20.** Índice de diversidad de especies de las poblaciones productoras de OXA-48 y VIM-1 distribuido por servicios y periodos de estudio.
- Tabla 21.** Perfiles de resistencia de los aislados de EPC a los distintos antimicrobianos.
- Tabla 22.** Índices de diversidad clonal de las especies *K. pneumoniae* y *E. coli* distribuido por servicios y periodos de estudio.
- Tabla 23.** Índices de diversidad clonal (SDI) de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48 distribuido por servicios y periodos de estudio.
- Tabla 24.** Datos recogidos sobre los pacientes del estudio R-GNOSIS.
- Tabla 25.** Datos de los pacientes cocolonizados por EPC durante el estudio R-GNOSIS.
- Tabla 26.** Características principales de las EPC detectadas en pacientes cocolonizados y los plásmidos portadores de carbapenemasa identificados.
- Tabla 27.** Resistencia a antibióticos de las EPC recogidas de pacientes cocolonizados y los transconjugantes y transformantes obtenidos a partir de estos aislados.
- Tabla 28.** Grados de identidad en la identificación por MALDI-TOF MS de los aislados de *Kluyvera* spp.
- Tabla 29.** Datos recogidos de los pacientes colonizados por *Kluyvera* spp. productora de OXA-48, características fenotípicas y genotípicas de los aislados y caracterización plasmídica de los transformantes con OXA-48 obtenidos.
- Tabla 30.** Valores de CMI de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en transformantes *E. coli* productores de CTX-M-213 y CTX-M-13.

**Tabla 31.** Datos de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* productora de NDM-1.

**Tabla 32.** Datos recogidos de los pacientes del estudio R-GNOSIS en función de la carbapenemasa producida. NDM-1.

**Tabla 33.** Caracterización de las EPC procedentes de los pacientes del brote por *K. pneumoniae* productora de NDM-1.

**Tabla 34.** Caracterización de los plásmidos portadores de NDM-1, OXA-48 y VIM-1 de los pacientes implicados en el brote.

La aparición y diseminación incontrolada de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) es uno de los principales problemas de Salud Pública en todo el mundo. Los genes responsables de la producción de carbapenemasas suelen estar asociados a elementos genéticos móviles que facilitan su transferencia entre distintas especies de enterobacterias. Estas enzimas son capaces de hidrolizar casi todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y, por lo general, se asocian a altas tasas de resistencia a otras familias de antimicrobianos.

En España, la incidencia de EPC está alcanzando niveles endémicos en el ámbito nosocomial. En nuestro entorno, las EPC más frecuentes son *Klebsiella pneumoniae* productora de OXA-48 y VIM. La prevalencia de enterobacterias productoras de KPC y en particular de NDM es menor, aunque está aumentando en algunas regiones. La epidemiología de OXA-48 se ha asociado en gran medida a la expansión global de clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* bien adaptados al medio hospitalario y a la diseminación de plásmidos relacionados con IncL/M-pOXA-48a. Sin embargo, actualmente la diseminación de estos plásmidos portadores de OXA-48 en otras especies de bacterias gramnegativas, y particularmente en *E. coli*, está contribuyendo también a la endemidad de esta carbapenemasa en el ámbito hospitalario y representa una grave amenaza para la Salud Pública. Como consecuencia, se han implementado sistemas de vigilancia activa para reducir esta diseminación y actualmente la declaración de casos infectados y/o colonizados por EPC a las autoridades de Salud Pública es obligatoria en diferentes Comunidades Autónomas.

El objetivo de esta tesis fue estudiar la epidemiología, la estructura poblacional, los genes de carbapenemasa y los plásmidos portados por estas EPC aisladas en nuestro hospital durante el Proyecto Europeo R-GNOSIS, estudio controlado y aleatorizado para evaluar estrategias de aislamiento en pacientes portadores de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (E-BLEE).

En el **primer Capítulo**, el objetivo fue estudiar la incidencia de portadores de E-BLEE y EPC, la diversidad de especies y la caracterización de las enzimas correspondientes durante el Proyecto R-GNOSIS. Desde marzo de 2014 hasta marzo de 2016, se recogieron 15.556 torundas rectales de 8.209 pacientes ingresados en dos

servicios médicos (Gastroenterología y Neumología) y dos servicios quirúrgicos (Neurocirugía y Urología) de nuestro hospital. Durante el estudio, la incidencia de portadores de E-BLEE fue del 8,4% y no se pudo demostrar la eficacia de la estrategia de aislamiento de contacto (AC) en la reducción de la transmisión de E-BLEE. Entre los productores de BLEE, la diversidad de especies fue invariable en el tiempo y *E. coli* fue la especie predominante (78,5%). La incidencia de EPC (2%) también se mantuvo sin cambios a lo largo del tiempo y se observó una disminución en la diversidad de especies. Además, coincidiendo con la implementación de medidas de AC dirigidas a reducir la transmisión de E-BLEE se observaron cambios significativos, sugiriendo que el aislamiento preventivo de los pacientes colonizados/infectados con E-BLEE podría haber tenido un efecto indirecto en la prevalencia de EPC. Posteriormente, se analizó la prevalencia, las características microbiológicas y los cambios en la diversidad clonal a lo largo del tiempo de la población de EPC. Se caracterizaron un total de 198 EPC procedentes de 162 pacientes. En el 56,6% de los pacientes, la adquisición de EPC fue de origen nosocomial, mientras que en el 22,8% se relacionó con ingresos previos en nuestra institución y en el 3,7% con asistencia sanitaria en otros centros de nuestra región. *K. pneumoniae* (53,5%), *E. coli* (19,2%) y *Enterobacter cloacae* complex (11,1%) fueron las especies más frecuentemente asociadas a la producción de carbapenemasa. Por otra parte, OXA-48 fue la enzima identificada en más de la mitad de los casos (64,1%), seguida de VIM-1 (26,8%), NDM-1 (5,3%) y KPC-3 (3,5%). Además, el 55,5% fueron coproductores de BLEE, siendo OXA-48 y CTX-M-15 en *K. pneumoniae* la asociación más frecuente (29,3%). En general, la amikacina (9,6%), tigeciclina (9,6%) y colistina (0,5%) fueron los antibióticos que mostraron mayor sensibilidad. Desde el punto de vista de la estructura poblacional, se identificaron dos clones epidémicos de *K. pneumoniae* [OXA-48-CTX-M-15-ST11 (26,5%) y VIM-1-SHV-12-ST54 (10,5%)] y una alta diversidad genética entre el resto de aislados de EPC. Además, se observó la diversificación de OXA-48 a lo largo del tiempo entre la población de *K. pneumoniae*, coincidiendo con la emergencia de clones *E. coli*-OXA-48-CC10.

El objetivo del **segundo Capítulo** fue describir las características microbiológicas, la estructura poblacional y los plásmidos de las EPC recogidas en pacientes cocolonizados por diversas especies de enterobacterias productoras de OXA-48, VIM-1 y KPC-3 (23/162). En general, la cocolonización con EPC-OXA-48 fue el

evento más frecuente (20/23, 87%) ( $p < 0,05$ ), siendo *K. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ) y *E. coli* ( $p < 0,01$ ) las especies predominantes (20/23, 87%). En 15 pacientes, se detectó *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48 en la misma muestra, pero con frecuencia después de una colonización previa con OXA-48-*K. pneumoniae*. Entre los aislados de *K. pneumoniae*, se detectaron clones de alto riesgo (ST11-OXA-48, ST15-OXA-48, ST307-OXA-48), pero en la población de *E. coli* se encontró una mayor diversidad clonal. Asimismo, se describe una alta transmisión *in vivo* entre distintas especies, debido principalmente a la transferencia horizontal de un plásmido IncL-pOXA-48 dominante (relacionado con IncL/M-pOXA-48a), pero también de forma esporádica por plásmidos pVIM-1 relacionados y pKPC-3 no relacionados.

En el **tercer Capítulo** se estudió la que consideramos que es la primera descripción de *Kluyvera* spp. productora de OXA-48, portadora también de la nueva variante CTX-M-213. Durante el proyecto R-GNOSIS, se detectaron 6 pacientes sin aparente nexo epidemiológico colonizados por un único clon de OXA-48-*Kluyvera* spp. De uno de estos aislamientos se realizó la secuenciación del genoma completo (WGS, Illumina HiSeq-2500) y el análisis bioinformático de los plásmidos (PLACNET, Plasmid SPAdes). El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se localizó en un plásmido IncL de ~60 kb relacionado con IncL/M-pOXA-48a y el gen *bla*<sub>CTX-M-213</sub> en una región cromosómica conservada del género *Kluyvera*. El análisis del genoma también permitió identificar un plásmido IncF de ~177 kb (clase I, integron *sul1* y *aadA2*) y otro IncQ de ~9 kb (*IS4-bla*<sub>FOX-8</sub>).

Finalmente, en el **cuarto Capítulo** se describió un brote por *K. pneumoniae* productora de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1 en el servicio de Neurocirugía entre septiembre de 2015 y febrero de 2016. El brote afectó a nueve pacientes, uno de ellos procedente de Pakistán (caso índice), considerado una región endémica. Se identificaron dos clones (NDM-1-ST437 y NDM-1-ST101) con diferentes plásmidos portadores de NDM-1. Las EPC-NDM-1 mostraron una alta corresponsencia a otros antimicrobianos, siendo colistina y amikacina (clon C/ST101) o colistina, tigeciclina y cotrimoxazol (clon H/ST437) las únicas opciones terapéuticas. Además, en dos pacientes también se detectó la colonización con otras EPC (*K. pneumoniae*-OXA-48-ST11, *K. pneumoniae*-VIM-1-ST54, *K. pneumoniae*-VIM-1-ST908 y *E. coli*-VIM-1-ST43).

En conclusión, el efecto indirecto positivo del aislamiento de portadores de E-BLEE durante el proyecto R-GNOSIS mostró que el refuerzo de las medidas epidemiológicas podría beneficiar la disminución de las EPC. Sin embargo, a pesar de las medidas de control, durante este estudio describimos una población de EPC policlonal y variable a lo largo del tiempo. La coexistencia de clones mundialmente diseminados, como *K. pneumoniae*-ST11-OXA-48, con clones no relacionados y emergentes como *K. pneumoniae*-ST101-NDM-1, *K. pneumoniae*-ST54-VIM-1 y *E. coli*-OXA-48-CC10, muestra una compleja epidemiología en nuestra institución. La persistencia de clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*-OXA-48 podría explicar la exitosa y bien descrita transferencia interespecie de un plásmido IncL-pOXA-48 dominante desde *K. pneumoniae* a otras especies de enterobacterias, principalmente *E. coli*. Este complejo escenario epidemiológico podría facilitar la diseminación de diferentes carbapenemasas en el entorno comunitario a través de clones epidémicos y no epidémicos multirresistentes. La implementación adecuada de medidas de control de la infección y de programas de vigilancia activa ininterrumpida para detectar colonización es imprescindible para prevenir la diseminación global de las EPC.

## ABSTRACT

---

The emergence and uncontrolled dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) has caused great concern to public healthcare systems worldwide. Genes associated with carbapenemase production are often contained on mobile genetic elements that facilitate transfer among different *Enterobacteriaceae* species. These enzymes are able to hydrolyze nearly all  $\beta$ -lactam antibiotics and are usually associated with co-resistance to other antimicrobials.

In Spain, the incidence of CPE is reaching endemic levels in the nosocomial environment. The most predominant CPE are OXA-48 and VIM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Prevalence of KPC and particularly NDM-producing *Enterobacteriaceae* is lower but is increasing in certain areas. The epidemiology of OXA-48 has been largely associated with both global expansion of hospital-adapted *K. pneumoniae* clones and the dissemination of plasmids related to IncL/M-pOXA-48a. Nevertheless, the current spread of OXA-48-encoding plasmids into other Gram-negative bacteria species, particularly *E. coli*, is also contributing in the endemicity of this carbapenemase in hospital setting and depicts a great public health threat. As a consequence, regional guidelines have been implemented to curtail this dissemination and declaration of CPE to Public Health authorities is now mandatory in different Autonomous Communities.

The objective of this thesis was to study the epidemiology, population structure, characterization of carbapenemase and plasmids of CPE in our hospital during a cluster-randomized study evaluating isolation strategies for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* (E-ESBL)-carriers (R-GNOSIS European Project).

In the **first chapter** the aim was to assess the incidence of E-ESBL and CPE carriers, species diversity and characterization of the corresponding enzymes during the R-GNOSIS Project. From March-2014 to March-2016, 15556 rectal swabs from 8209 patients admitted in two medical (Gastroenterology and Pneumology) and two surgical (Neurosurgery and Urology) wards were collected. During the study, incidence of E-ESBL-carriers was 8.4% and the efficacy of the contact isolation (CI) strategy in reducing ESBL transmission could not be demonstrated. Among ESBL producers, species diversity was invariable over time and *E. coli* was predominant (78.5%). Incidence of CPE carriage remained also unchanged over time (2%) and a decreased in

the species diversity was observed. Furthermore, significant differences were observed coinciding with the implementation of CI measures targeted to reduce E-ESBL transmission, suggesting that preventive isolation of colonized/infected patients with E-ESBL could have had an indirect effect on the CPE prevalence. Subsequently, we studied the occurrence, microbiological features and changes in clonal diversity over time of CPE population. A total of 198 CPE isolates from 162 patients were characterized; 56.6% of cases were considered to be acquired during the study period, while others were related to a previous admission in our institution (22.8%) or in other healthcare center in our region (3.7%). *K. pneumoniae* (53.5%), *E. coli* (19.2%) and *Enterobacter cloacae* complex (11.1%) were the most frequent species. Moreover, the most frequent carbapenemase was OXA-48 (64.1%), followed by VIM-1 (26.8%), NDM-1 (5.3%) and KPC-3 (3.5%), and they were co-produced with ESBLs in 55.5%. Interestingly, OXA-48+CTX-M-15-*K. pneumoniae* was the most frequent association (29.3%). Overall, amikacin (9.6%), tigecycline (9.6%) and colistin (0.5%) showed low non-susceptibility. Two major *K. pneumoniae* clones were identified [OXA-48-CTX-M-15-ST11 (26.5%) and VIM-1-SHV-12-ST54 (10.5%)] with a high genetic diversity among the remaining CPE isolates. Additionally, the diversification of OXA-48 was observed over time among *K. pneumoniae* population, coinciding with the emergence of *E. coli*-OXA-48-CC10 clones.

The aim of the **second chapter** was to define the microbiological features, population structure and plasmid characteristics of CPE recovered from patients colonized with OXA-48, VIM-1 and KPC-3 producers (23/162). Overall, OXA-48-co-colonization was the most frequent event (20/23, 87%) ( $p < 0.05$ ), and *K. pneumoniae* ( $p < 0.05$ ) and *E. coli* ( $p < 0.01$ ) were the predominant species (20/23, 87%). OXA-48-producing *K. pneumoniae* and *E. coli* were recovered from the same sample in 15 patients, but frequently after a prior colonization with a single OXA-48-*K. pneumoniae*. Among *K. pneumoniae* isolates, high-risk clones (ST11/OXA-48, ST15/OXA-48, ST307/OXA-48) were mainly detected, but a higher clonal diversity was found among the *E. coli* population. A high in-vivo cross-species transmission was identified, presumptively due to horizontal transfer of a dominant IncL-pOXA-48 plasmid (related to IncL/M-pOXA-48a), but also sporadically caused by related or unrelated VIM-1 and KPC-3 encoding plasmids.

In the **third chapter** we study what we believe to be the first description of OXA-48-producing *Kluyvera* spp. isolates, expressing also the novel variant CTX-M-213. During the R-GNOSIS project, a single clone of OXA-48- *Kluyvera* spp. was detected colonizing 6 unrelated patients. Whole genome sequencing (WGS, Illumina HiSeq-2500) and further bioinformatics analysis of plasmids (PLACNET, PlasmidSPAdes) were additionally performed. The *bla*<sub>OXA-48</sub> gene was located on a ~60kb IncL plasmid related to IncL/M-pOXA-48a and the novel *bla*<sub>CTX-M-213</sub> in a conserved chromosomal region of *Kluyvera* genus. Genomic analysis also revealed a ~177 kb IncF plasmid (class I integron *sul1* and *aadA2*) and an ~9 kb IncQ (*IS4-bla*<sub>FOX-8</sub>).

Finally, in the **fourth chapter** we described an outbreak due to NDM-1+ CTX-M-15+DHA-1-producing *K. pneumoniae* in the Neurosurgery ward from September-2015 to February-2016. Nine patients were involved in the outbreak, one of them connected with a foreign origin (Pakistan). Two clones (NDM-1-ST437 and NDM-1-ST101) with different NDM-1-containing plasmids were identified. A high co-resistance was found among NDM-1-positive isolates, leaving only colistin and amikacin (C/ST101 clone) or colistin, tigecycline and sulfamethoxazole/trimethoprim (H/ST437 clone) as therapeutic options. Colonization with other EPC (OXA-48-*K. pneumoniae*-ST11, VIM-1-*K. pneumoniae*-ST54, VIM-1-*K. pneumoniae*-ST908 and VIM-1-*E. coli*-ST43) was also detected in two patients.

In conclusion, the positive collateral effect of isolation of E-ESBL-carriers during the R-GNOSIS project revealed that reinforcement of epidemiological measures could have benefit the decrease of CPE. Nevertheless, despite control interventions, we describe a polyclonal and changeable CPE population over time. Coexistence of worldwide disseminated clones, as OXA-48-*K. pneumoniae*-ST11, with unrelated and emerging clones such as NDM-1-*K. pneumoniae*-ST101, VIM-1-*K. pneumoniae*-ST54 and OXA-48-*E. coli*-CC10, depicts a disturbing CPE epidemiology in our institution. The persistence of high risk clones of OXA-48-*K. pneumoniae* could explain the successful cross-species transfer of a dominant IncL-pOXA-48 plasmid from *K. pneumoniae* into other *Enterobacteriaceae* species, predominantly *E. coli*. This complex scenario could facilitate the dissemination of different carbapenemases into the community through epidemic and non-epidemic multi-drug resistant clones. Proper implementation of infection control measures and uninterrupted active surveillance

programs for detecting colonization are needed to prevent the global dissemination of CPE.

---

## INTRODUCCIÓN

---

*“En la vida no existe nada que temer, solo cosas que comprender”*

Marie Curie



### **1. La resistencia a los antimicrobianos**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) constituye actualmente una de las principales amenazas para la Salud Pública mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo biosanitario. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la RAM se produce cuando microorganismos como bacterias, hongos, virus o parásitos sufren cambios debido a la exposición a los distintos medicamentos antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos o antiparasitarios) y son capaces de resistir al efecto inhibitorio o letal de los mismos.

Por su alta prevalencia y las repercusiones clínicas y epidemiológicas que conllevan, la resistencia a los antibióticos es actualmente la más relevante. La resistencia a los antibióticos se ha definido como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras bacterias sensibles pertenecientes a la misma especie [1]. La resistencia se puede producir de manera natural (resistencia intrínseca) o por adquisición de mecanismos de resistencia (resistencia adquirida). La primera (natural o intrínseca) se produce cuando el microorganismo posee mecanismos propios codificados a nivel cromosómico que le hacen insensible a la acción de un determinado antimicrobiano. La resistencia adquirida a antibióticos es un fenómeno natural que surge como consecuencia de modificaciones en el cromosoma bacteriano (mutaciones puntuales ocurridas al azar y posterior selección de cepas resistentes tras la exposición a los fármacos) o por transferencia genética (por recombinación de ADN exógeno con el cromosoma bacteriano o por transferencia horizontal de genes mediante elementos genéticos móviles) [2,3].

Las resistencias transmisibles mediante elementos genéticos móviles son las más relevantes desde el punto de vista clínico y epidemiológico, ya que pueden albergar más de un mecanismo de resistencia y pueden transmitirse de bacteria a bacteria (incluso entre bacterias pertenecientes a distintos géneros y especies), contribuyendo a la emergencia y propagación de microorganismos multirresistentes. Una bacteria es considerada multirresistente (MDR) cuando presenta resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos de uso clínico habitual, y dicha resistencia tiene relevancia clínica (conlleva dificultad en el tratamiento de las infecciones producidas por dichas bacterias)

y epidemiológica (es causante de brotes epidémicos, de la transmisión de diferentes mecanismos de resistencia, etc.) [4,5]. En los últimos años se han definido otros términos como “extremadamente resistentes” (XDR), cuando los microorganismos son únicamente sensibles a una o dos categorías de antimicrobianos, y panresistentes (PDR), cuando los aislados bacterianos son resistentes a todas las clases de antibióticos disponibles [6].



**Figura 1.** Factores que promueven la aparición y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos (modificado de [http://www.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/Spanish\\_WHO\\_HWC\\_infographics\\_howitspreads\\_low-res.pdf](http://www.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/Spanish_WHO_HWC_infographics_howitspreads_low-res.pdf)).

Existen múltiples factores que promueven la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos (Figura 1). En el área de salud humana, la presión selectiva surge principalmente de la combinación del uso abusivo e incorrecto de los antibióticos, el inapropiado control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación inadecuada de los alimentos. Las diversas políticas sobre el uso de antimicrobianos en los distintos países, las infraestructuras sanitarias deficientes en los

países subdesarrollados, el comercio y la globalización, han contribuido también a la rápida difusión de la resistencia en todo el mundo [7–9]. Asimismo, el inadecuado y excesivo consumo de antimicrobianos en salud animal y la diseminación de los residuos de estos medicamentos a través del suelo, los cultivos y el agua, contribuyen a la emergencia y circulación de estos microorganismos resistentes [10].

Las infecciones por microorganismos multirresistentes se han asociado a un aumento de la mortalidad debido a las limitadas opciones terapéuticas existentes. En la Unión Europea (UE) cada año mueren alrededor de 25.000 pacientes a causa de infecciones producidas por estas bacterias. Se estima que en el año 2050 la resistencia a antimicrobianos podrá causar hasta 10 millones de muertes al año en todo el mundo. Estas infecciones son un desafío no solo para la ciencia y los sistemas sanitarios, sino también una carga económica importante para las instituciones sanitarias. En la UE el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes supone una pérdida de la productividad y un incremento en los costes de la atención sanitaria de al menos 1.500 millones de euros [11–13].

Para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos es necesario aplicar el concepto “*One Health*”, es decir, deben implementarse estrategias y medidas de manera coordinada entre la Salud Pública, la sanidad animal y el medio ambiente. El plan de acción mundial elaborado por la Asamblea Mundial de la Salud en 2015 establece cinco objetivos estratégicos para combatir la resistencia: 1) mejorar la concienciación y la comprensión de la población con respecto a la RAM; 2) reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación; 3) reducir la incidencia de las infecciones; 4) utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos en salud humana y animal; y 5) aumentar la inversión en nuevos medicamentos, métodos de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones, así como llevar a cabo una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países [14].

Actualmente, el incremento global experimentado por las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) constituye una amenaza creciente para la seguridad del paciente y las instituciones sanitarias de todo el mundo [15]. Los principales factores que han contribuido a la exitosa propagación de estas EPC han sido la diseminación de clones ampliamente distribuidos, el establecimiento de reservorios en hospitales y otros centros sanitarios, la asociación con otros genes de resistencia que

favorecen la coselección, y la presencia de estos genes en diferentes estructuras genéticas de transferencia horizontal que facilitan su dispersión [16].

En España, en los últimos años se ha producido un aumento importante de la incidencia de brotes nosocomiales por EPC, con un incremento de las diferentes clases moleculares y de su dispersión geográfica. Además, en paralelo, está aumentando la aparición de casos extrahospitalarios, elevando el riesgo de diseminación de estas enterobacterias multirresistentes en la comunidad [17,18]. Actualmente, nuestro país dispone de un Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos (PRAN), que incluye un plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de las resistencias a los antibióticos, tanto en medicina humana como veterinaria [19].

## **2. El orden *Enterobacterales***

El orden *Enterobacterales* (dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria) es un amplio y diverso grupo de bacterias gramnegativas recientemente clasificado, que incluye 7 familias: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* and *Budviciaceae* [20]. Se trata de bacterias con un tamaño intermedio (0,3-1µm x 0,6-6µm), con morfología de bacilo o cocobacilo, inmóviles o móviles por flagelos peritricos y no esporuladas. Son anaerobias facultativas, catalasa positivas, oxidasa negativas, reductoras de nitrato a nitrito y fermentadoras de glucosa y otros azúcares. Los principales factores de virulencia de estas bacterias son el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular, la producción de fimbrias o pili que permiten la unión a otras bacterias y a las células del huésped, y la formación por parte de algunas especies de una cápsula polisacáridica o proteica con función protectora [21].

El hábitat principal de los miembros del orden *Enterobacterales* en los seres humanos y animales mamíferos es el tracto gastrointestinal (TGI), de ahí que reciban el nombre común de enterobacterias (del griego “*enteron*”, intestino). De manera circunstancial se pueden encontrar colonizando otras partes del cuerpo como la zona perineal, la vagina, la cavidad oral o la región nasofaríngea. Algunas bacterias de este orden se encuentran también ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose encontrar asociadas a diversos nichos ecológicos, tanto terrestres como acuáticos, e incluso con otros organismos vivos como plantas o insectos [20,21].

Las enterobacterias representan menos del 0,1% ( $<10^8$  ufc/g) de la microbiota intestinal, pero mantienen una relación mutualista con nuestro sistema y llevan a cabo importantes funciones metabólicas [22–24]. Algunas especies como *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella granulomatis* y algunas cepas de *Escherichia coli*, son patógenos entéricos primarios y se asocian siempre a enfermedad. Sin embargo, especies como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* y *Morganella morganii*, entre otras, son comensales y solamente causan infección como patógenos oportunistas [25–28].

*E. coli* es el coliforme aerobio más frecuente del TGI ( $10^5$ - $10^8$  células por gramo de contenido intestinal). La mayor parte de los aislados de *E. coli* que se encuentran colonizando el TGI mantienen una relación simbiótica con las células intestinales y persisten en el hospedador durante meses o años, causando infecciones únicamente como patógenos oportunistas [29]. Sin embargo, el genoma de *E. coli* es altamente flexible, por lo que la adquisición de determinados factores de virulencia y de resistencia por parte de cepas comensales puede dar lugar a patógenos altamente adaptados causantes tanto de infecciones intestinales como extraintestinales graves. Aunque es el principal agente responsable de infecciones comunitarias (primera causa de infecciones del tracto urinario y bacteriemia), también es el principal causante de infecciones nosocomiales [25–27].

*K. pneumoniae* tiene como hábitat principal las superficies mucosas de humanos y otros mamíferos, principalmente el TGI y el nasofaríngeo. A diferencia de *E. coli*, esta enterobacteria también tiene como hábitat natural distintos nichos ambientales como el agua, el suelo o las plantas. Es inmóvil y posee una cápsula polisacárida que le confiere virulencia y aspecto mucoso [30]. Aunque puede producir infecciones de origen comunitario, *K. pneumoniae* es considerado un importante patógeno nosocomial y se asocia con frecuencia a brotes hospitalarios y a altas tasas de mortalidad [31,32]. Las manos del personal sanitario son consideradas la principal vía de transmisión de esta enterobacteria, especialmente de determinados clones epidémicos (clones de alto riesgo) que están bien adaptados al medio sanitario y que han adquirido factores de virulencia o genes de resistencia a antibióticos mediante elementos genéticos móviles. Las enfermedades subyacentes y las alteraciones del sistema inmunológico de los

pacientes, así como la antibioterapia previa (especialmente con fluoroquinolonas y penicilinas antipseudomónicas) y las largas estancias hospitalarias, son considerados importantes factores de riesgo para la colonización y posterior infección por cepas epidémicas de *K. pneumoniae* [30,33–35].

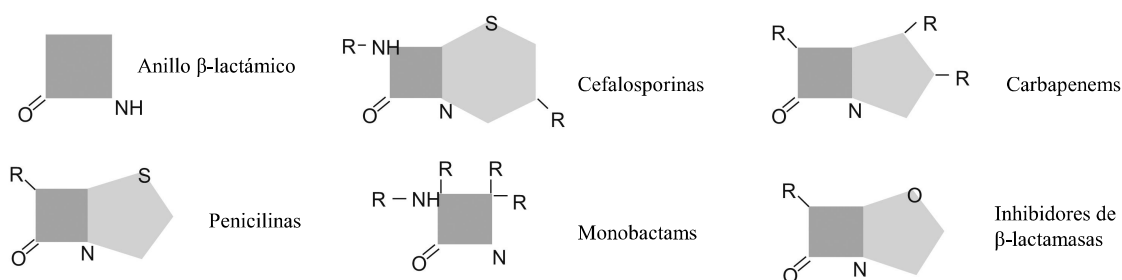
Otras enterobacterias, como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp. o *K. oxytoca*, también pueden producir infección en el ámbito hospitalario, aunque en menor proporción [25].

### 3. Los antibióticos $\beta$ -lactámicos

En los años 40 del siglo pasado, la FDA (del inglés, “*Food and Drug Administration*”) aprobó la utilización de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en la práctica clínica para el tratamiento y profilaxis de infecciones causadas por bacterias patógenas humanas y animales. Actualmente, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias gramnegativas, grampositivas y espiroquetas.

#### 3.1. Clasificación

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se caracterizan por la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico formado por tres átomos de carbono y uno de nitrógeno. Los miembros de esta gran familia de antibióticos se clasifican en 5 grupos definidos en función del anillo adyacente al  $\beta$ -lactámico y las cadenas laterales complementarias (Figura 2) [36]:



**Figura 2.** Estructura química de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (modificado de [37]).

1) Penicilinas: se clasifican en penicilinas naturales (bencilpenicilina o penicilina G), semisintéticas (ampicilina y amoxicilina) y penicilinas resistentes a penicilinasas (metecilina, cloxacilina y piperacilina).

2) Cefalosporinas: se trata del grupo más amplio en cuanto a moléculas desarrolladas y comercializadas. Se agrupan en 5 grupos o generaciones cuya evolución se ha orientado a incrementar el espectro frente a bacterias gramnegativas a expensas de una reducción progresiva de la actividad frente a grampositivos. Las cefalosporinas de tercera generación (C3G) son las más ampliamente utilizadas para tratar infecciones nosocomiales causadas por enterobacterias, y entre ellas se encuentran la cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima. Las cefalosporinas de 4ª generación (C4G), como la cefepima, con una estructura altamente hidrófila que facilita su penetración a través de la pared celular de gramnegativos, presentan una mayor actividad frente a las bacterias productoras de AmpC cromosómica. Las de 5ª generación (C5G) se caracterizan por no verse afectadas, al contrario que las anteriores, por la resistencia a la meticilina.

3) Carbapenems: este grupo incluye los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con mayor espectro bacteriano, actividad y resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Derivan del antibiótico tienamicina, un producto natural obtenido a partir de la bacteria grampositiva *Streptomyces cattleya* [38]. Se dividen en dos grupos en función de su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. El primer grupo incluye tres carbapenems (imipenem, meropenem y doripenem) con marcada actividad antipseudomónica, que son empleados en el tratamiento de infecciones graves polimicrobianas o causadas por bacilos gramnegativos resistentes a cefalosporinas y aminoglucósidos. El meropenem es el más indicado para tratar infecciones graves mixtas adquiridas en el hospital o relacionadas con la asistencia sanitaria. El segundo grupo de carbapenems incluye antibióticos con actividad muy limitada frente a *P. aeruginosa*. El único miembro de este grupo actualmente comercializado es el ertapenem, y está indicado en el tratamiento empírico de infecciones intraabdominales, de partes blandas y neumonías aspirativas producidas por enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), incluyendo infecciones graves de origen comunitario.

4) Monobactams: son antibióticos  $\beta$ -lactámicos con un único anillo en su estructura. El aztreonam es el único disponible para uso clínico y presenta actividad solamente frente a bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Es resistente a la hidrólisis por metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), pero es inactivado por BLEE, carbapenemasas de clase A, C y D, y se afecta por la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC.

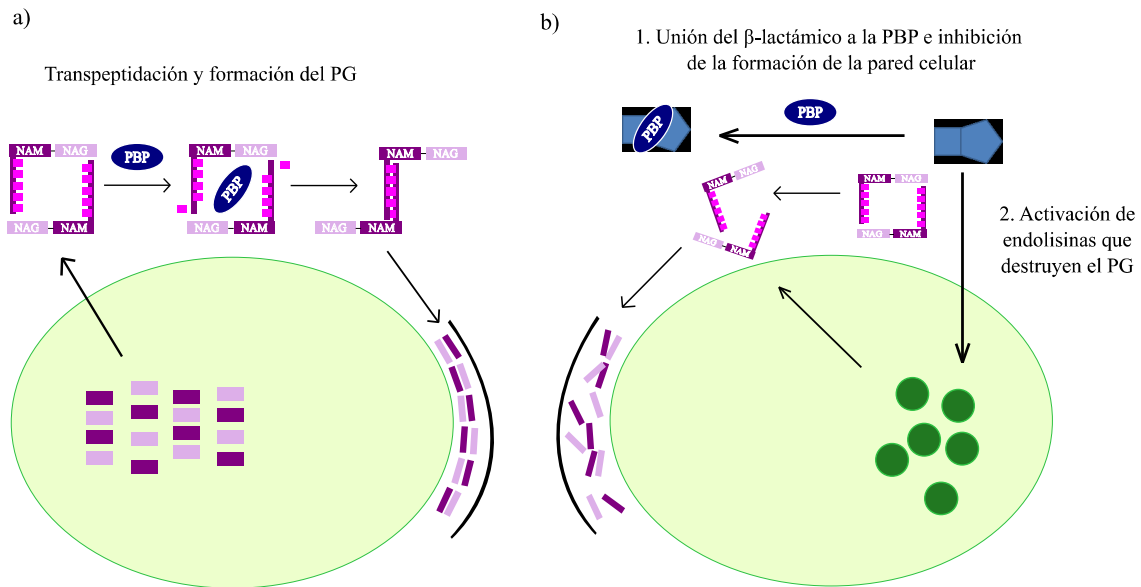
5) Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas: son moléculas cuya estructura química permite la unión irreversible a las enzimas  $\beta$ -lactamasas. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas más empleados en la práctica clínica son los denominados inhibidores suicidas: el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Se administran en combinación con otros antimicrobianos, principalmente del grupo de las penicilinas, para la recuperación de su actividad antibacteriana (amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam). En su perfil de inhibición no se incluye las carbapenemasas. Recientemente se ha comercializado el avibactam y el vaborbactam, asociados respectivamente a ceftazidima y meropenem. Son inhibidores de  $\beta$ -lactamasas con estructura no  $\beta$ -lactámica. Su perfil inhibitor incluye las carbapenemasas de clase A, y en el caso del avibactam, también a algunas de las carbapenemasas de clase D, entre ellas OXA-48. Ninguno de los dos tiene actividad inhibidora sobre las MBL (carbapenemasas de clase B) [39].

### **3.2. Mecanismos de acción**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto a través de dos mecanismos, la inhibición de la síntesis de la pared celular y la inducción de autólisis bacteriana.

La pared bacteriana de las bacterias gramnegativas es una estructura compleja que consta de una fina capa interna de peptidoglicano (PG) y de una membrana externa formada por lípidos y proteínas. El PG es un copolímero formado por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetil-glucosamina (NAG) unidas mediante enlaces covalentes  $\beta$ -1,4. En la última fase de ensamblaje, unas enzimas transpeptidasas, también conocidas como PBP (del inglés "*penicillin binding protein*", proteína ligada a penicilina), se unen a las subunidades peptídicas precursoras de la barrera peptidoglicana y eliminan sus aminoácidos terminales D-alanil-D-alanina, dando lugar a unos tetrapéptidos que se fijan al ácido murámico y se unen entre sí formando una malla (Figura 3a). El anillo  $\beta$ -lactámico guarda una similitud estructural con el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas, por lo que es capaz de unirse a ellas covalentemente e impedir la transpeptidación (Figura 3b) [40,41]. El segundo mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es la activación de una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Figura 3b) [42,43].

El mecanismo de acción es responsable de la escasa toxicidad de este grupo de antimicrobianos, ya que se unen a una estructura celular que no está presente en células eucariotas. De igual manera, va a determinar su principal mecanismo de resistencia, la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico.



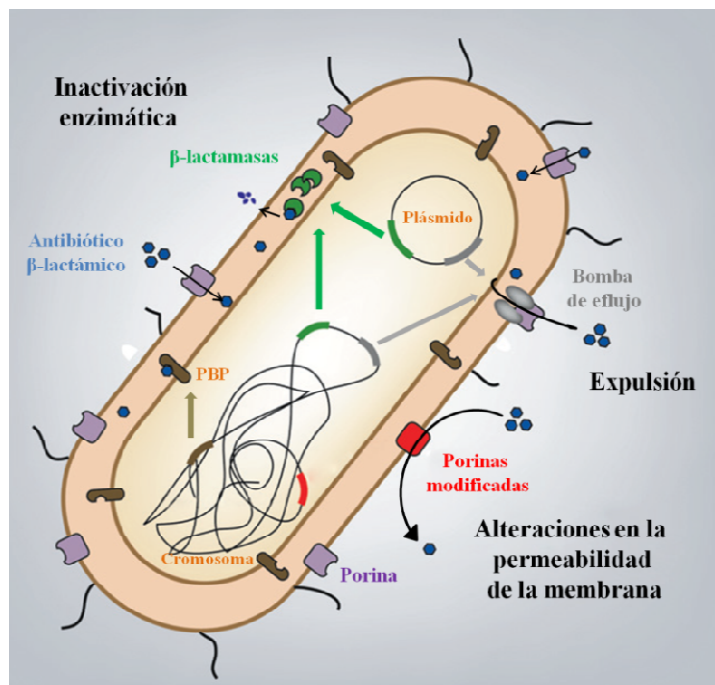
**Figura 3.** a) Formación del peptidoglicano de la pared celular en bacterias gramnegativas; y b) mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

### 3.3. Mecanismos de resistencia

Las poblaciones bacterianas han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 4), entre ellos: a) la alteración de la permeabilidad de la membrana externa (pérdida o modificación de porinas), b) la producción de bombas de expulsión, c) la modificación de la diana (PBP), y el más importante, d) la producción de enzimas entre las que se encuentran las  $\beta$ -lactamasas [44–46].

Las enzimas  $\beta$ -lactamasas guardan una alta homología con las PBP de la pared celular y actúan hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico e impidiendo su unión a dichas proteínas. Es el mecanismo más frecuente y eficaz de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacterias gramnegativas. Los genes que codifican estas enzimas (*bla*) se pueden localizar en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones, y su producción puede ser constitutiva o inducible. Las  $\beta$ -lactamasas pueden ser transferibles si su producción está mediada por plásmidos, y en tal caso, suelen ser inactivadas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas de

origen cromosómico, como las AmpC, son a menudo inducibles por la exposición a  $\beta$ -lactámicos, especialmente cefalosporinas, y no suelen ser sustrato de los inhibidores [47].



**Figura 4.** Principales mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en enterobacterias (modificado de [48]).

A día de hoy se han comunicado más de 1500 enzimas con actividad  $\beta$ -lactamasa ([www.lahey.org/studies.webt.htm](http://www.lahey.org/studies.webt.htm)), que se han clasificado en función de su estructura molecular (clasificación de Ambler) y sus características enzimáticas (clasificación de Bush-Jacoby). La clasificación molecular de Ambler divide a las  $\beta$ -lactamasas en 4 clases (A, B, C y D) de acuerdo a los mecanismos de interacción enzima-sustrato y a la secuencia de aminoácidos de la proteína [49]. Las enzimas de los grupos A, B y D son serin- $\beta$ -lactamasas que contienen una serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo- $\beta$ -lactamasas que utilizan  $Zn^{+2}$  como cofactor y se inhiben por agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetracético) pero no por el ácido clavulánico o el tazobactam. La clasificación funcional propuesta por Bush-Jacoby establece distintos grupos en función de la afinidad del enzima por el sustrato y su sensibilidad a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas [50]. La Tabla 1 recoge la correspondencia entre ambas clasificaciones.

**Tabla 1.** Clasificación molecular y funcional de las  $\beta$ -lactamasas (modificado de [50]).

Bush-Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Sustrato preferente	Actividad de CLAV o TZB	Inhibición por EDTA	Características	$\beta$ -lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
1	C	Cefalosporinas	-	NO	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamicinas	AmpC, P99, AACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
1e	C	Cefalosporinas	-	NO	Hidrólisis elevada de ceftazidima y de otros oxiiimino- $\beta$ -lactámicos	GC1, CMY-37	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias
2a	A	Penicilinas	SI	NO	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PC1	Cromosómica/plasmídica	<i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i>
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> generación	SI	NO	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>H. influenzae</i>
2be	A	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación, monobactam	SI	NO	Hidrólisis elevada de oxiiimino- $\beta$ -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima) y aztreonam	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2br	A	Penicilinas	-	NO	Resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10	Plasmídicas	<i>E. coli</i>
2ber	A	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación, monobactams	-	NO	Hidrólisis elevada de oxiiimino- $\beta$ -lactámicos y resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50	Plasmídicas	Enterobacterias
2c	A	Carbenicilina	SI	NO	Hidrólisis elevada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3	Cromosómica/plasmídica	<i>Moraxella catarrhalis</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i>
2ce	A	Carbenicilina, cefepima	SI	NO	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima y ceftiproma	RTG-4	Plasmídicas	<i>A.baumannii</i>

CLAV= ácido clavulánico; TZB= tazobactam; EDTA= ácido etilendiaminotetracético; NI= No incluido.

**Tabla 1.** Continuación

Bush-Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Sustrato preferente	Actividad de CLAV o TZB	Inhibición por EDTA	Características	$\beta$ -lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
2d	D	Cloxacilina	Variable	NO	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2d	D	Cloxacilina	Variable	NO	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2de	D	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación	Variable	NO	Hidrólisis elevada de oximino- $\beta$ -lactámicos, cloxacilina y oxacilina	OXA-11, OXA-15	Plasmídicas	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2df	D	Carbapenems	Variable	NO	Hidrólisis de carbapenems, cloxacilina y oxacilina	OXA-23, OXA-48	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>A. baumannii</i>
2e	A	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación	SI	NO	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por CLAV pero no aztreonam	CepA	Cromosómica/plasmídica	<i>Bacteroides</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Carbapenems	Variable	NO	Hidrólisis elevada de carbapenems, oximino- $\beta$ -lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1	Cromosómica/plasmídica	<i>E. cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> <i>K. pneumoniae</i>
3a	B (B1 y B3)	Carbapenems	NO	SI	Hidrólisis de amplio espectro, incluidos los carbapenems, pero no los monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1	Cromosómica/plasmídica	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
3b	B (B2)	Carbapenems	NO	SI	Hidrólisis de carbapenems	CphA, Sfh-1	Cromosómica	<i>Aeromonas</i> spp.
4	NI	Penicilinas	NO	-	-	Penicilinas	Cromosómica	<i>Burkholderia cepacia</i>

CLAV= ácido clavulánico; TZB= tazobactam; EDTA= ácido etilendiaminotetracético; NI= No incluido.

El uso indiscriminado e incorrecto de los antimicrobianos durante las últimas décadas ha favorecido la evolución de las  $\beta$ -lactamasas hacia una nueva generación de enzimas: BLEE,  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas y carbapenemasas [46].

### 3.3.1. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

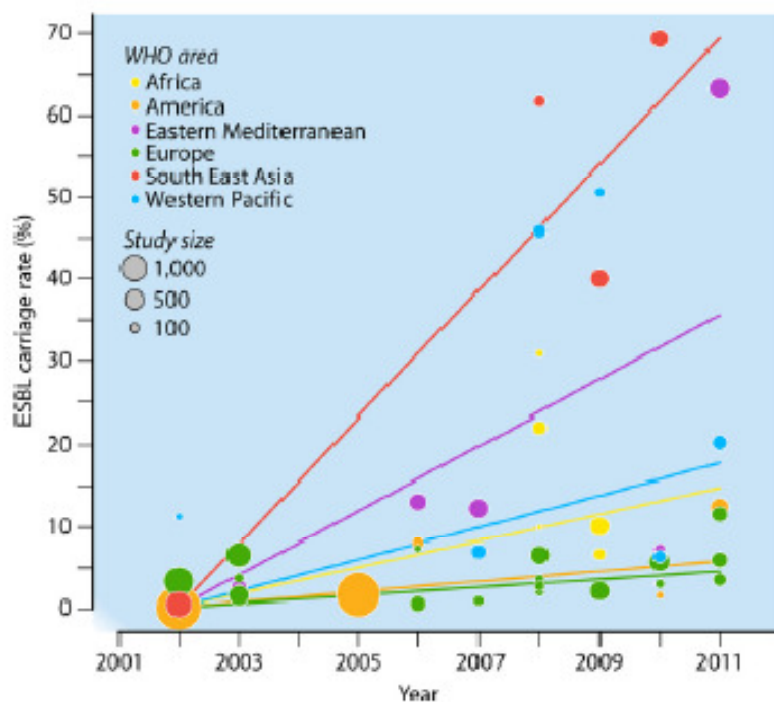
Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clases A y D de Ambler (grupos funcionales 2be y 2de, respectivamente) (Tabla 1) [51]. Las familias mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Otras BLEE aisladas con menor frecuencia son SFO, TLA, GES, IBC y BEL (Tabla 1). Estas enzimas son capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas y el aztreonam, pero no las cefamicinas ni los carbapenems. Además, son inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico y el sulbactam.

Actualmente las enzimas tipo CTX-M son las BLEE más prevalentes a nivel mundial, tanto en el ambiente comunitario como en el nosocomial [52], y se han asociado principalmente a aislados de *E. coli* causantes de infecciones comunitarias y a clones hospitalarios de *K. pneumoniae* [53–56]. Las enzimas CTX-M se caracterizan por tener una mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima [57]. Actualmente hay descritas más de 200 variantes y en función de su secuencia de aminoácidos se dividen en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 [52,58]. Todas ellas derivan de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica procedente de distintas especies del género *Kluyvera* [59–61]. La movilización de los genes  $bla_{CTX-M}$  desde el cromosoma de *Kluyvera* spp. a diferentes plásmidos y la implicación de elementos genéticos como *ISEcp1-like*, *ISRC1* o *IS26* en su transferencia a otras especies de enterobacterias ha sido bien caracterizada [62–66]. A menudo, estos elementos genéticos integran genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas [53,67].

La diseminación de CTX-M mediante plásmidos epidémicos multirresistentes altamente transmisibles ha sido uno de los factores responsables de la compleja epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE (E-BLEE) y de su rápida expansión mundial, primero en el ámbito hospitalario y después en la comunidad [52,53,68–71]. La amplia difusión de estas enzimas a través de clones exitosos de *E. coli* como el clon de alto riesgo ST131, asociados a la producción de variantes como

CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-27, ha sido también determinante para propagación y establecimiento de las E-BLEE en todo el mundo [72–75].

Los últimos datos indican que en voluntarios sanos, la prevalencia de colonización por E-BLEE en Europa oscila entre el 6% y el 10% (Figura 5) y que este porcentaje va a continuar aumentando, especialmente en la comunidad [71,76].



**Figura 5.** Tasa de colonización con E-BLEE en distintas regiones geográficas del mundo entre los años 2001 y 2011 (tomado de [71]).

### 3.3.2. $\beta$ -lactamasas AmpC

Las  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC pertenecen a la clase molecular C de Ambler y al grupo funcional 1 (Tabla 1). Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas, y en menor medida las de tercera generación. Generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación y los carbapenémicos, y se inhiben con cloxacilina, aztreonam y el ácido borónico y sus derivados. Estas cefalosporinas pueden tener localización cromosómica o plasmídica, y su producción puede ser constitutiva o inducible, dependiendo del grado de expresión del gen *bla*<sub>AmpC</sub> [47,62].

Desde el punto de vista epidemiológico, la relevancia de las  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC) radica en su capacidad para movilizarse y transferirse tanto en el ambiente nosocomial como en la comunidad. Los genes *bla*<sub>AmpC</sub> plasmídicos proceden del cromosoma bacteriano y suelen asociarse a integrones o transposones localizados en plásmidos conjugativos. Estas pAmpC se clasifican en 9 familias: MOX, CMY, LAT, BIL, DHA, ACC, MIR, ACT y FOX. Se han descrito principalmente en algunas especies de enterobacterias con relevancia clínica y epidemiológica como *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis*, entre otros [77]. Aunque la distribución de estas enzimas es mundial, su prevalencia se mantiene relativamente baja, y en general, asociada a otros mecanismos de resistencia como BLEE o carbapenemasas [78–80].

#### **4. Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC)**

En los últimos años, se ha producido una gran alarma y preocupación por la gran dispersión de las EPC. Se ha descrito que la producción de BLEE o AmpC asociada a la pérdida de porinas disminuye la sensibilidad a estos antibióticos [81,82]. Sin embargo, el mecanismo más frecuente de resistencia a carbapenems en enterobacterias es la producción de carbapenemasas.

##### **4.1. Clasificación de carbapenemasas**

Según la clasificación molecular de Ambler, las carbapenemasas se agrupan en las clases moleculares A (penicilinasas), B (metalo- $\beta$ -lactamasas o MBL) y D (oxacilinasas), que se corresponden con los grupos funcionales 2f, 3 y 2df, respectivamente. En la Tabla 2 se recogen las carbapenemasas más relevantes, los microorganismos en los que se encuentran habitualmente y sus principales características.

##### **4.1.1. Carbapenemasas de clase A**

Las carbapenemasas de clase A tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de  $\beta$ -lactámicos, entre los que se incluyen las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenems y el aztreonam. Son parcialmente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam [83].

**Tabla 2.** Clasificación general de las carbapenemasas (modificado de [84]).

Grupo de carbapenemasas (clase molecular <sup>1</sup> y grupo funcional <sup>2</sup> )	Enzimas	Inhibición por			AZT	Microorganismos	Localización
		CLAV	EDTA	AVI			
Penicilinasas (A, 2f)	SME IMI, NMC	±	-	+	R	<i>S. marcescens</i> <i>E. cloacae</i>	Cromosómica
	KPC	+	-	+	R	Enterobacterias	Plasmídica
	GES	+	-	+	R	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica
Metallo-β-lactamasas (B,3)	L1 CcrA Cpha BcII	-	+	-	S/R	<i>S. maltophilia</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Cromosómica
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	-	S	Enterobacterias, <i>Pseudomonas</i> spp. Otros BGN no fermentadores	Plasmídica (ocasionalmente cromosómica)
Oxacilinasas (D, 2df)	OXA (OXA-48)	±	-	±	S	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , Enterobacterias	Cromosómica/ plasmídica

<sup>1</sup>Clasificación molecular de Ambler, <sup>2</sup>Clasificación funcional de Bush&Jacoby  
CLAV= ácido clavulánico; EDTA= ácido etilendiaminotetracético; AVI= Avibactam;  
AZT= Aztreonam; BGN= Bacilos gramnegativos.

La primera carbapenemasa de clase A, SME-1 (del inglés “*Serratia marcescens* *enzyme*”) fue descrita en 1982 en una cepa de *S. marcescens* [85]. En 1984 se aisló una enzima inhibidora de imipenem (IMI-1, del inglés “*Imipenem-hydrolysing β-lactamase*”) en un aislado de *E. cloacae* procedente de un paciente hospitalizado en EE.UU. [86]. En 1993, se aisló un tercer tipo de enzima carbapenemasa, NmcA (del inglés “*not-metallo-enzyme-carbapenemase A*”) a partir de una cepa de *E. cloacae* [87]. Todas estas carbapenemasas son de localización cromosómica, aunque algunas variantes de IMI, como IMI-2, se han identificado en plásmidos [83]. Las enzimas GES (del inglés “*Guiana extended spectrum*”) fueron identificadas inicialmente como BLEE, pero con el tiempo se describió que hidrolizaban parcialmente el imipenem [88,89]. A diferencia de los anteriores, los genes que codifican las enzimas GES son de localización plasmídica.

Dentro de este grupo de serincarbapenemasas, las que tienen mayor trascendencia clínica e importancia epidemiológica son las denominadas KPC (del inglés, “*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*”) [90]. Estas enzimas son inhibidas por el ácido borónico,

compuesto que se emplea para su reconocimiento mediante métodos fenotípicos. Las KPC se distinguen del resto de carbapenemasas de clase A en que se encuentran siempre en plásmidos transferibles y en que su espectro de hidrólisis incluye el anillo aminotiazol de las cefalosporinas [83]. La primera enzima KPC (KPC-1) se identificó en un hospital de EE.UU. en 1996 en un aislado de *K. pneumoniae* [91]. Desde entonces, se han detectado en distintas especies de enterobacterias hasta 24 variantes, siendo KPC-2 y KPC-3 las más frecuentes [92].

### 4.1.2. Carbapenemasas de clase B

Las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) son el grupo de carbapenemasas más diverso y diseminado a nivel mundial. Poseen un amplio perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aunque presentan muy baja afinidad por los monobactams como el aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. A diferencia de las clases A y D, el sitio activo de las MBL contiene un ión (o iones) de  $Zn^{+2}$ , que es esencial para la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico. Esta característica estructural hace que puedan ser inhibidos por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, compuestos tiólicos como el ácido 2-mercaptopropiónico o el ácido dipicolínico [50,93]. Algunos de ellos se utilizan en el reconocimiento fenotípico de esta familia de carbapenemasas.

Las enzimas MBL más importantes desde el punto de vista epidemiológico, por su prevalencia y por su elevada capacidad de diseminación, son las de tipo IMP, VIM y NDM. La enzima IMP-1 (del inglés “*Imipenem-resistant Pseudomonas*”) fue la primera carbapenemasa transferible descrita en bacilos gramnegativos, en concreto en *P. aeruginosa* [94]. Estas enzimas se empezaron a detectar posteriormente asociadas a otras especies del género *Pseudomonas* y en enterobacterias como *S. marcescens* y *K. pneumoniae* [95,96]. A día de hoy se han descrito más de 50 variantes en todo el mundo, siendo especialmente prevalentes en Asia.

Las enzimas VIM (del inglés, “*Verona integron encode metallo- $\beta$ -lactamase*”) se describieron por primera vez en Verona (Italia) en 1997 en un aislado de *P. aeruginosa* [97]. Poco después se comunicó en Francia una segunda variante, VIM-2, localizada en un plásmido transferible de *P. aeruginosa* [98]. Desde entonces, se han descrito más de 40 variantes asociadas tanto a *P. aeruginosa* como a enterobacterias, siendo VIM-2 la más difundida a nivel mundial [99]. VIM-1 y VIM-2 comparten el 90% de su secuencia

de aminoácidos, aunque VIM-1 posee un mayor perfil hidrolítico frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, especialmente frente a las cefalosporinas [100].

Las enzimas NDM (del inglés, “*New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*”) son las carbapenemasas con amplia distribución geográfica más recientemente identificadas. La primera descripción (NDM-1) se realizó en 2009, asociada a dos aislados (*K. pneumoniae* y *E. coli*) procedentes de un paciente sueco que había recibido asistencia sanitaria en un hospital de Nueva Delhi (India) [101]. Desde 2010 se han descrito 16 variantes y todas ellas muestran un perfil hidrolítico similar al de otras MBL.

#### 4.1.3. Carbapenemasas de clase D

La clase D comprende más de 200 enzimas OXA (del inglés “*Oxacillin-hydrolysing carbapenemase*”), cuya producción se ha asociado mayoritariamente con la especie *Acinetobacter baumannii*. Se denominan oxacilinasas por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la penicilina. No hidrolizan, o apenas hidrolizan, las cefalosporinas de espectro extendido (excepto la variante OXA-163) y en general tienen una actividad carbapenemasa muy débil. No se inhiben por el ácido clavulánico, el ácido borónico, ni por agentes quelantes como el EDTA, aunque sí por el NaCl [102,103]. Una característica única de este grupo de enzimas que las diferencia de las serincarbapenemasas de las clases A y C es que presentan una elevada resistencia a temocilina [104].

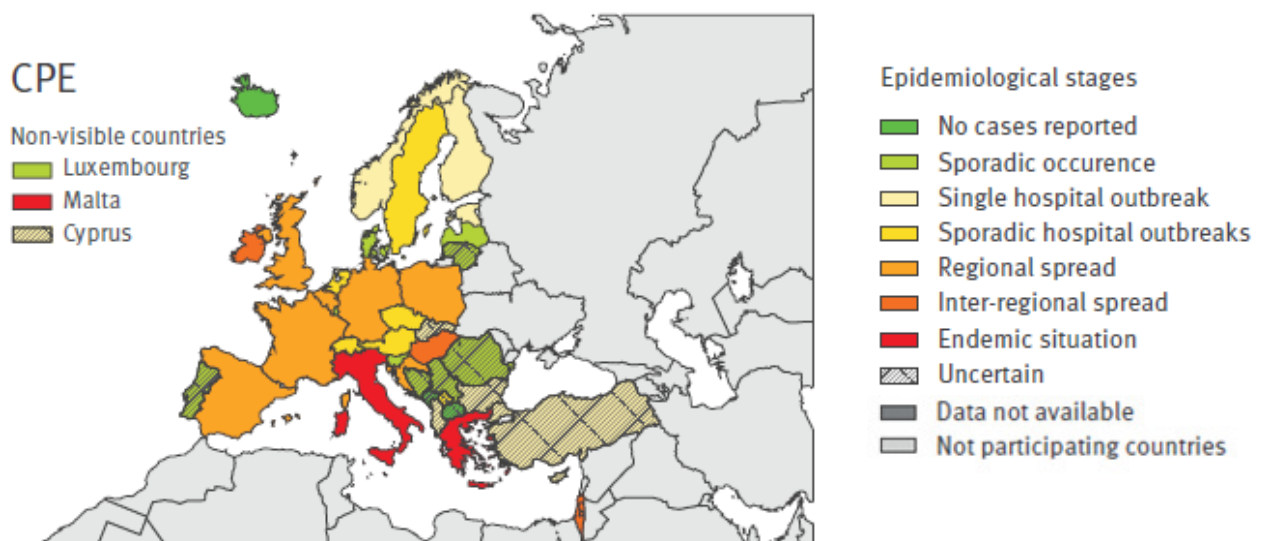
Dentro de la clase D, solo unas pocas variantes poseen actividad carbapenemasa, siendo una de las principales representantes de este grupo la enzima OXA-48. Desde su primera descripción en Turquía en 2001 en una cepa de *K. pneumoniae* [105], la diseminación de OXA-48 ha sido mundial y principalmente asociada a enterobacterias productoras de BLEE, en concreto la CTX-M-15. En 2011 se describió en India una variante de esta enzima, OXA-181, con un perfil hidrolítico idéntico a OXA-48 [106]. Los niveles de resistencia a carbapenems de estas enzimas son muy bajos, siendo sólo detectables en muchos casos cuando van asociados a otros mecanismos de resistencia como BLEE o pérdida de permeabilidad de la membrana [48].

#### 4.2. Epidemiología y diseminación

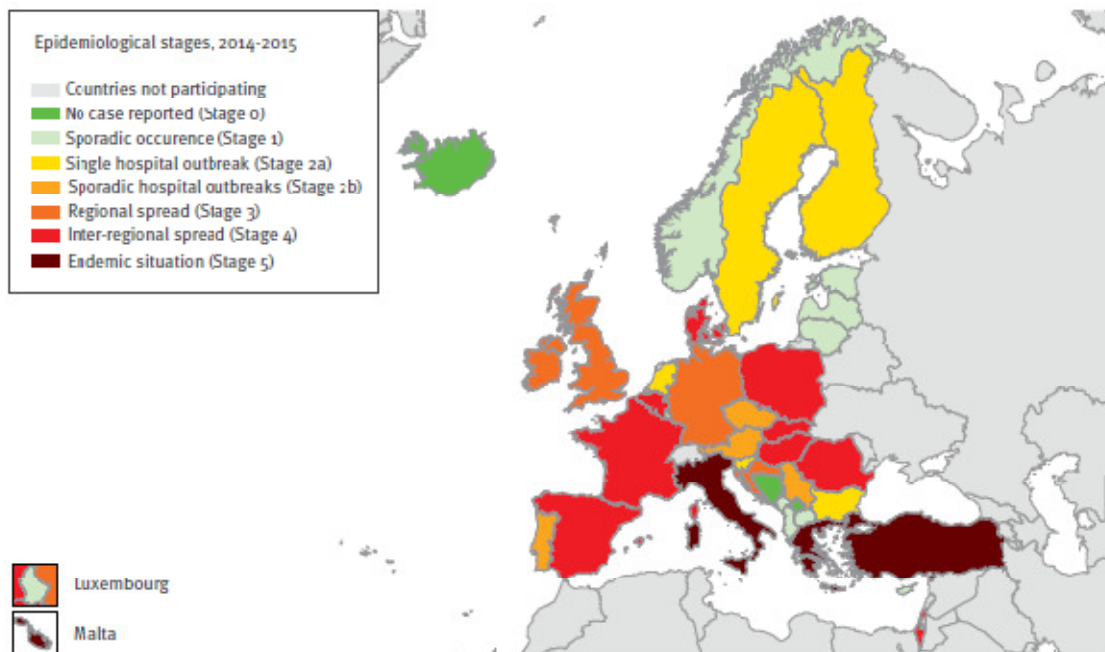
La aparición y diseminación de las EPC está aumentando en todo el mundo y se está convirtiendo en un problema global de Salud Pública.

En 2010, se estableció una escala epidemiológica para evaluar la diseminación de las EPC en Europa. En España, durante este primer estudio, la incidencia de EPC se limitaba a brotes esporádicos en hospitales, no relacionados entre sí (sin transmisión autóctona) y asociados a las carbapenemasas de tipo KPC, VIM e IMP (estado 2b) [107]. En 2013, la incidencia de casos en nuestro país aumentó, debido principalmente a la emergencia de clones productores de OXA-48. Estos brotes hospitalarios se asociaron a una transmisión interinstitucional de nivel regional (estado 3) (Figura 6) [108]. Entre los años 2014 y 2015, España ascendió al estado 4 de la escala, debido a la detección en diferentes centros sanitarios de múltiples brotes epidémicos causados mayoritariamente por productores de OXA-48 y VIM, pero con potencial riesgo de diseminación interregional (Figura 7) [17].

Según los últimos datos, los productores de OXA-48 y VIM continúan siendo los más frecuentes en los brotes nosocomiales y el riesgo de que estas enzimas de hagan endémicas en nuestra región es cada vez mayor. Con una menor prevalencia, otras carbapenemasas como las KPC y las NMD también están aumentando, generando importantes brotes intra e interhospitalarios [17].



**Figura 6.** Prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en Europa en 2013 (tomado de [108]).



**Figura 7.** Prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en Europa entre 2014 y 2015 (tomado de [17]).

#### 4.2.1. Carbapenemasas KPC

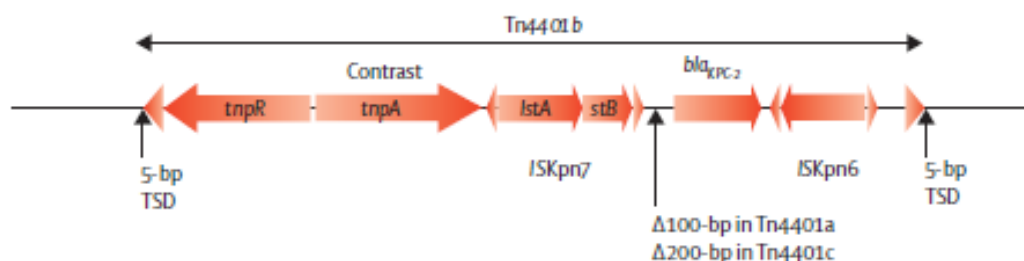
Las enzimas KPC se describieron por primera vez en 2001 en la costa este de EE.UU, para posteriormente diseminarse por toda la región americana hasta considerarse endémicas. Pocos años después se empezaron a describir importantes brotes en otros países de Latinoamérica, Asia y Europa, normalmente asociados a pacientes que habían recibido atención sanitaria en EE.UU. [109,110]. Actualmente, las enterobacterias productoras de KPC, mayoritariamente *K. pneumoniae*, se consideran un problema endémico en países como EE.UU, Grecia, Italia, Israel y China [111].

La diseminación mundial de KPC ha estado influenciada por la expansión de determinados clones de *K. pneumoniae* y la transferabilidad interespecie de los genes *bla<sub>KPC</sub>* a través de elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones. La diseminación, primero en EE.UU y luego a nivel mundial, de las variantes más frecuentes (KPC-2 y KPC-3) se ha relacionado principalmente con la expansión del complejo clonal (CC) 258 (ST258 y ST512) de *K. pneumoniae* [90,112]. El clon ST258 asociado KPC es endémico en varios países, se asocia a transmisión nosocomial, es causante de infecciones graves y recurrentes, y tiene la habilidad de colonizar y persistir

en el hospedador durante periodos extensos, por lo que es considerado un clon de alto riesgo [113].

La transferabilidad de los genes *bla*<sub>KPC</sub> ha sido ampliamente relacionada con el transposón Tn4401 (un elemento de 10 kb derivado de Tn3) y con las secuencias de inserción IS*Kpn6* y IS*Kpn7* [83,90,114]. El transposón Tn4401 (Figura 8) se localiza normalmente en plásmidos grandes, conjugativos o no conjugativos, que frecuentemente portan otras β-lactamasas, como CTX-M-15, o genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos o quinolonas [90].

En España, la emergencia de enterobacterias productoras de KPC se describió por primera vez en 2010, asociado a los clones ST384 y ST388 de *K. pneumoniae* productores de KPC-3 y al transposón Tn4410a [115]. Desde entonces, la prevalencia de EPC-KPC en nuestra región se ha mantenido baja, detectándose únicamente brotes esporádicos en hospitales [116,117]. Entre 2015 y 2017, en Andalucía se registró un incremento de casos debidos a *K. pneumoniae* ST512 productores de KPC-3 ([http://pirasoa.iavante.es/pluginfile.php/16286/mod\\_resource/content/14/Memoria%20cient%20ADfca%20del%20laboratorio%20de%20referencia%202017.pdf](http://pirasoa.iavante.es/pluginfile.php/16286/mod_resource/content/14/Memoria%20cient%20ADfca%20del%20laboratorio%20de%20referencia%202017.pdf)).



**Figura 8.** Representación de la estructura del transposón Tn4401. Tn4401a y Tn4401c presentan una deleción de 100pb y 200pb, respectivamente, respecto a Tn4401b (tomado de [90]).

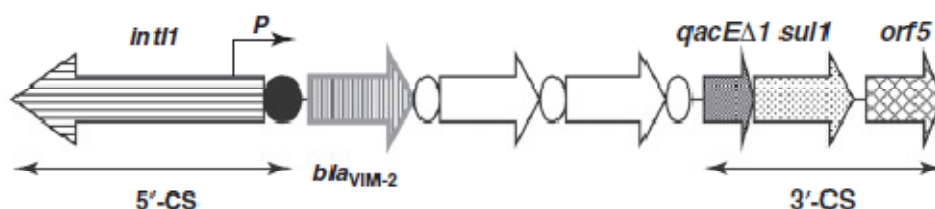
#### 4.2.1. Carbapenemasas VIM

Aunque la diseminación de las MBL de tipo VIM se ha relacionado mayoritariamente con BGN no fermentadores como *P. aeruginosa*, estas enzimas se encuentran ampliamente representadas entre miembros del orden *Enterobacterales* [118]. Desde su aparición en 1999, se han descrito casos de enterobacterias productoras de VIM en numerosos países de Europa, Asia y América [93]. La variante VIM-2 es la más

extendida en todo el mundo, y es considerada endémica en el sur de Europa y en el sudeste asiático [119]. A diferencia de otras carbapenemasas, la diseminación de VIM no se ha asociado a clones concretos de enterobacterias, aunque se aísla principalmente en *K. pneumoniae* [17,111].

Todas las variantes de VIM, tanto las cromosómicas como las mediadas por plásmidos, son transportadas como *genes cassette* insertados en integrones de clase 1 (Figura 9) o son movilizados a través de elementos *ISCR*. Estos integrones se caracterizan por transportar genes de resistencia a aminoglucósidos y cotrimoxazol [66,100,120,121]. Los transposones Tn402 (derivados de Tn21) asociados a integrones de clase 1 se han relacionado también con la movilización de VIM-1 y otras  $\beta$ -lactamasas (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>) en aislados de nuestra región [70,120].

En España, la primera descripción de una variante VIM fue en 2005 en un aislado de *E. coli* causante de ITU y en un aislado de *K. pneumoniae* de origen fecal, ambos productores de VIM-1 [122]. En 2007, se produjo el primer brote asociado a enterobacterias productoras de VIM-1 [123], y desde entonces, nuestro país ha sufrido un aumento progresivo de casos detectados que se han asociado mayoritariamente al ámbito hospitalario [121,124].



**Figura 9.** Representación de la estructura de un integrón de clase 1. El extremo conservado 5' (5'CS) contiene la integrasa *IntI1*, la zona variable incluye los *genes cassette* (*bla<sub>VIM-2</sub>*), y el extremo conservado 3' (3'CS) contiene los genes de resistencia a amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y a sulfonamidas (*sul1*) (tomado de [48]).

#### 4.2.3. Carbapenemasas NDM

Las enzimas NDM se describieron por primera vez en el año 2009. Un estudio retrospectivo realizado en 2011 con muestras recogidas en 14 hospitales de la India, demostró que *bla<sub>NDM-1</sub>* ya circulaba en los hospitales de esta región en el año 2006

[125]. Desde entonces, se han identificado enterobacterias productoras de diferentes variantes de NDM en todos los continentes y la mayoría de los casos se han relacionado con viajes a zonas endémicas. Actualmente, el subcontinente indio, los Balcanes y países de Oriente Medio son considerados el principal reservorio de estas enzimas. En Reino Unido, se ha comunicado una elevada prevalencia de enterobacterias productoras de NDM, siendo la mayoría casos importados de países como Pakistán o Bangladesh [111,126–130].

La variante NDM-1 es la más extendida y su difusión se ha descrito en un gran número de enterobacterias. A diferencia de otros tipos de carbapenemasas, la diseminación de NDM-1 se ha asociado a transmisión hospitalaria pero también a patógenos relacionados con la comunidad, como *E. coli* [126,130,131]. En la India, también se ha descrito que fuentes ambientales como el suelo, el agua potable y las aguas residuales son reservorio de esta enzima [128].

La diseminación de *bla*<sub>NDM-1</sub> se ha asociado a múltiples y diversos plásmidos transferibles que suelen estar asociados a otras  $\beta$ -lactamasas (AmpC, BLEE o incluso otras carbapenemasas) y a otros genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos (metilasas de ARN 16S), macrólidos (esterasas), fluoroquinolonas, tetraciclinas (bombas de eflujo), rifampicina, nitrofurantoína y sulfonamidas, siendo en muchos casos únicamente sensibles a tigeciclina, colistina o fosfomicina [125,127,132–134].

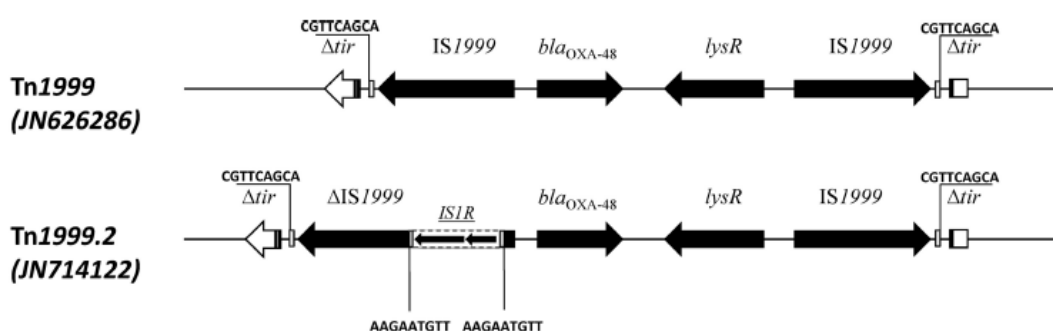
En España, la diseminación de enterobacterias productoras de NDM se ha limitado a brotes hospitalarios esporádicos y en la mayoría de los casos se ha establecido un vínculo con regiones endémicas [17].

#### **4.2.4. Carbapenemasas OXA-48**

Desde su emergencia en Turquía en el año 2003, la diseminación de enterobacterias productoras de OXA-48 ha sido explosiva [135]. Se han descrito brotes nosocomiales en Turquía y en países del sur de Europa y el norte de África [131]. Actualmente, la enzima OXA-48 es endémica en Turquía y Malta, aunque se encuentra ampliamente diseminada por toda Europa [17]. Aunque se ha detectado en una gran variedad de enterobacterias, la dispersión de OXA-48 ha sido generalmente asociada a la

adquisición hospitalaria de clones epidémicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* [131,136,137].

El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> está localizado en el transposón Tn1999, flanqueado por dos copias de las secuencias de inserción IS1999. Estas IS permiten la movilización del gen por transposición y regulan su expresión a través de un promotor. El transposón Tn1999.2, que difiere del anterior en la presencia de una secuencia de inserción ISIR dentro de Tn1999, también se ha asociado a la movilización de OXA-48 [138,139] (Figura 10).

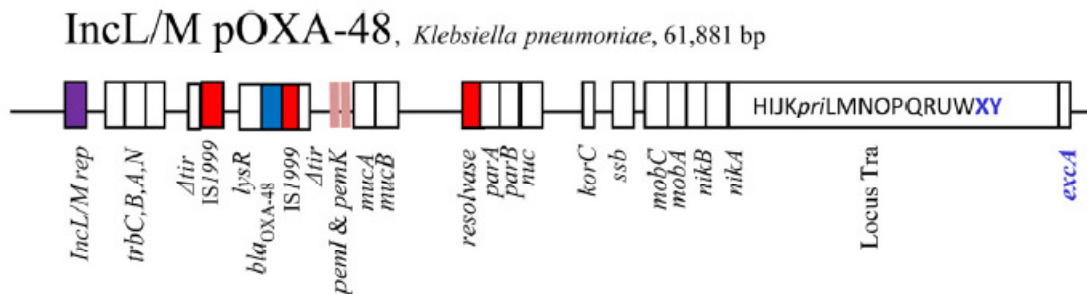


**Figura 10.** Representación de los transposones Tn1999 y Tn1999.2 (tomado de [140]).

Aunque se han comunicado casos en los que este transposón tiene localización cromosómica [137], el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se disemina mayoritariamente a través de un único plásmido conjugativo IncL/M de ~62 kb, denominado pOXA-48a, que no suele contener ningún otro gen de resistencia a antibióticos [141,142] (Figura 11). En estos plásmidos, el gen *tir* (codificador de una proteína inhibidora de la conjugación bacteriana) se encuentra truncado por el transposón Tn1999, lo que conduce a un incremento de la frecuencia de conjugación plasmídica y a una eficiente diseminación de *bla*<sub>OXA-48</sub> [136].

En España, el primer brote por enterobacterias productoras de OXA-48 se describió entre 2009 y 2010. Esos aislados fueron identificados y tipados como *K. pneumoniae* ST101 y eran coproductores de la enzima CTX-M-15. Desde entonces, se han descrito multitud de brotes asociados principalmente a la alta diseminación de clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* (ST405, ST15, ST437 y ST11) [124,143–146]. Estos clones de *K. pneumoniae* están bien adaptados al medio hospitalario y se han relacionado previamente con la dispersión de BLEE de tipo CTX-M [68,147,148] y de otras

carbapenemasas [16]. En menor proporción, OXA-48 se ha detectado en otros miembros del orden *Enterobacterales* [124,144], siendo cada vez mayor y más preocupante la prevalencia de aislados *E. coli* productores de OXA-48 [149,150].



**Figura 11.** Representación del plásmido pOXA-48a-IncL/M (tomado de [142]).

### 4.3. Factores de riesgo de la colonización e infección por EPC

La colonización del hospedador tiene un papel fundamental en la epidemiología de las infecciones producidas por EPC. Estas infecciones se asocian con una peor evolución del paciente y a una mayor mortalidad [32–34,146,151–153]. La proporción de pacientes colonizados con EPC que posteriormente desarrollan una infección está influenciada por las características clínicas del paciente y por las particularidades propias del tipo de EPC. *K. pneumoniae* es la enterobacteria productora de carbapenemasa más prevalente en todo el mundo y se ha definido como un factor de riesgo independiente de predicción de mortalidad [32].

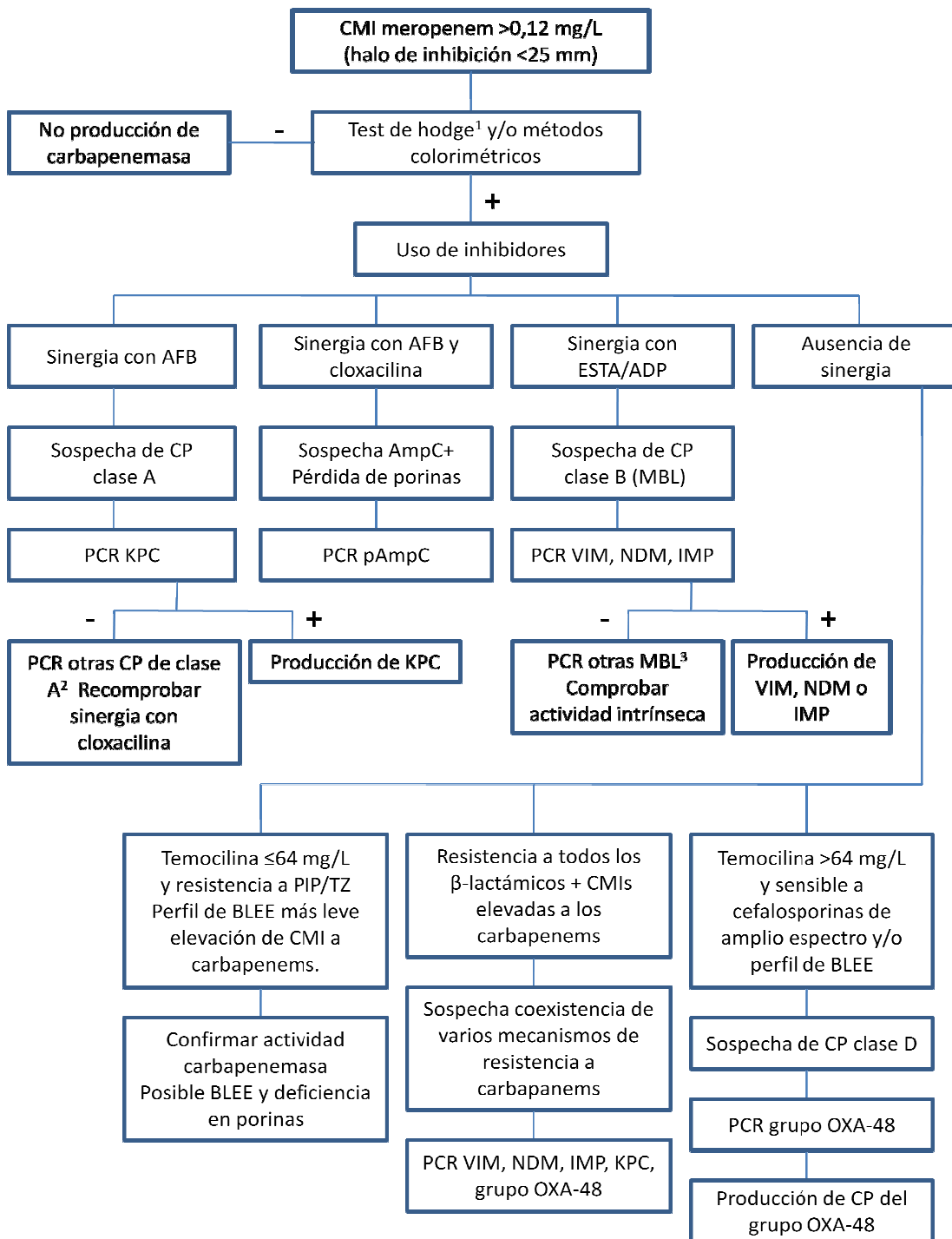
En general, los pacientes procedentes de la comunidad presentan una tasa de colonización con EPC muy baja [154,155]. La adquisición de EPC se asocia mayoritariamente con el ámbito hospitalario y con otros centros de cuidados sanitarios [154–159]. Los principales factores que predisponen a la colonización con EPC son las estancias hospitalarias prolongadas, la utilización de antibióticos, la colonización con otros patógenos resistentes, el uso de procedimientos diagnósticos o terapéuticos invasivos y las comorbilidades previas [33,152,160,161]. También se considera un factor de riesgo el contacto con regiones endémicas, especialmente el asociado al turismo sanitario [7,9,162]. Algunos estudios han determinado que en un contexto de alta endemicidad, el riesgo global de ser colonizado por una EPC es de aproximadamente el 5% [163,164]. Se estima que el tiempo medio de colonización con EPC es de 3 meses, aunque se han descrito colonizaciones que superan el año [33],

aumentado el riesgo de infección y de adquisición de otros microorganismos multirresistentes.

#### **4.4. Métodos de detección y confirmación de portadores de EPC**

Para la detección específica de EPC en portadores (o incluso en muestras clínicas) se han utilizado tradicionalmente medios selectivos (agar MacConkey) suplementados con concentraciones bajas de imipenem (1 mg/L) o discos de imipenem o ertapenem (10µg). En los últimos años se han desarrollado diferentes medios cromogénicos que han demostrado una alta sensibilidad para todos los tipos de carbapenemasas. Entre ellos se encuentran los medios chromID (bioMérieux, Francia), el medio CRE Brilliance (Thermo Fisher Scientific, UK) y el medio CHROMagar mSuperCARBA. En algunos casos, como el chromID, se ha desarrollado un formato de biplaca con dos medios, uno para el aislamiento selectivo de bacterias productoras de OXA-48 y otro para bacterias productoras de KPC o MBL [165].

Las pruebas fenotípicas para la confirmación de la producción de carbapenemasas incluyen el test de Hodge modificado, la medición de hidrólisis de los carbapenems por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), métodos colorimétricos basados en cambios de pH (*CarbaNP* y *BlueCarba*), inmunocromatografía y el método de inactivación de carbapenems (CIM). Ese último ha sufrido diferentes modificaciones y ha sido adoptado, por el momento, como método de referencia por el CLSI en detrimento del test de Hodge modificado. Con posterioridad a la detección de la posible producción de carbapenemasa, se recomienda realizar otras pruebas fenotípicas que confirmen el mecanismo de resistencia y la clase de carbapenemasa producida. En la Figura 12, se incluye el esquema recomendado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en sus procedimientos microbiológicos (<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>). Las recomendaciones del grupo EUCAST, orientadas al estudio de aislados que presenten resistencia o sensibilidad disminuida a los carbapenémicos recomienda la detección de carbapenemasa en los aislados de enterobacterias que tengan valores de CMI a meropenem superiores a 0,12 mg/L ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf)) (Figura 12).

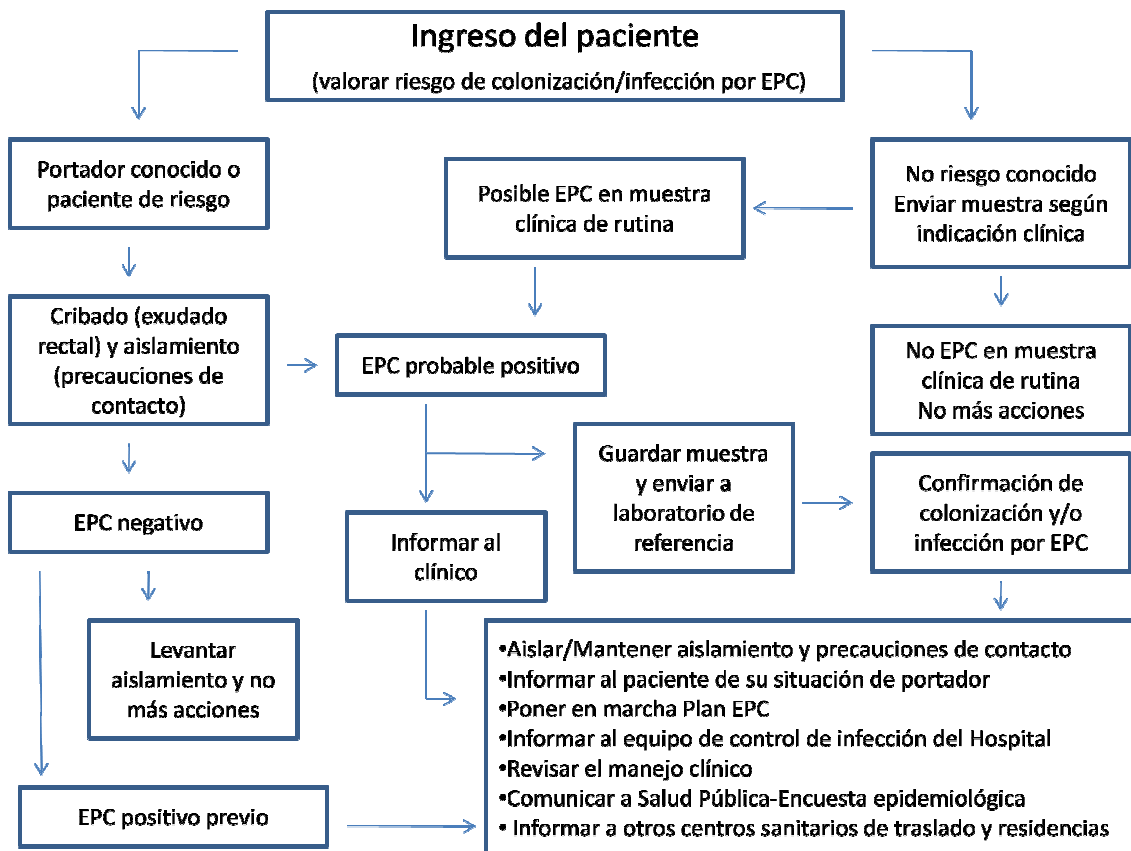


**Figura 12.** Diagrama de actuación para la confirmación de mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenems en enterobacterias (modificado de [166]). AFB=ácido fenilborónico; ADP=ácido dipicolínico; EDTA=ácido etildiaminotetraacético; MBL=metalo-β-lactamasas; CP=carbapenemasa; BLEE=β-lactamasa de espectro extendido; pAmpC=AmpC plasmídica; PIP/TZ=Piperacilina/tazobactam. <sup>1</sup> Interpretar junto con las pruebas que emplean inhibidores de β-lactamasas. <sup>2</sup> GES, SME, IMI, NCM. <sup>3</sup> SIM, GIM, AIM, SPM entre otras.

Aunque el cultivo microbiológico empleando medios cromogénicos sigue siendo el método más habitual en la detección de los individuos portadores de EPC, existen también alternativas moleculares como microarrays, PCR de diferente índole, LAMP (“*Loop-mediated isothermal amplification*”), etc, que incluso ofrecen información sobre el tipo de carbapenemasa. Estas mismas técnicas se pueden emplear directamente sobre aislados, sobre todo en aquellos casos en los que la presencia de otros mecanismos de resistencia como BLEE, AmpC o pérdida de porinas, dificulta la confirmación fenotípica (Figura 12).

#### 4.5. Prevención y control

Las EPC se están propagando entre los miembros del orden *Enterobacterales*, de la misma manera que lo hicieron dos décadas antes las BLEE, particularmente las enzimas CTX-M. La detección precoz de pacientes colonizados por EPC y la implementación de medidas de control y de aislamiento, son imprescindibles para reducir la infección por estas bacterias.



**Figura 13.** Diagrama de flujo a seguir al ingreso hospitalario de un paciente (modificado de [167]).

En 2013, la Comunidad de Madrid (CM) implementó un Plan de Actuación en el que se contemplan las medidas a tomar en los centros sanitarios de la región para la prevención y el control de la infección por EPC [167]. El Plan de Actuación incluye un diagrama de flujo que indica los pasos que se han de seguir tras el ingreso de un paciente en un hospital (Figura 13).



---

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

*“El trabajo te da significado y propósito, y la vida está vacía sin ambos”*

Stephen Hawking



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

En los últimos años, la incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) está aumentando en todo el mundo y de forma particular en España. El perfil de multirresistencia de las EPC y su gran facilidad de dispersión clonal e interespecie, contribuyen a aumentar el riesgo de endemicidad de estos microorganismos, suponiendo una grave amenaza para nuestros sistemas de salud. Actualmente, la adquisición de EPC se asocia mayoritariamente al ámbito hospitalario, aunque el riesgo de introducción y diseminación de estas EPC en el entorno comunitario está aumentando, por lo que podría repetirse el modelo que siguieron las CTX-M,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ampliamente diseminadas. La colonización del hospedador por EPC es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de infección por estos microorganismos multirresistentes. Por tanto, la detección precoz de portadores fecales de EPC mediante sistemas de vigilancia activos, y el conocimiento de los microorganismos, su estructura poblacional y las enzimas implicadas, son fundamentales para conocer la dimensión del problema y poder establecer medidas que permitan frenar su propagación.

Con este propósito, el **objetivo principal** de esta tesis fue estudiar la incidencia de pacientes colonizados por EPC en nuestro hospital durante el desarrollo del Proyecto Europeo R-GNOSIS (marzo 2014-marzo 2016). Durante un periodo de dos años estudiamos la epidemiología y la diversidad de especies de EPC, así como su posible afectación por las medidas de aislamiento de contacto implementadas para reducir la transmisión de portadores fecales por enterobacterias productoras de BLEE (E-BLEE). Además, se caracterizaron los genes responsables de las carbapenemasas y se estudió la diversidad genética de las distintas especies de EPC, así como la distribución espacial y temporal de los principales clones epidémicos.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la epidemiología de las EPC y entender los mecanismos genéticos implicados en la adquisición y diseminación de los genes de carbapenemasa, se establecieron los siguientes **objetivos secundarios**:

- Analizar en un subgrupo de pacientes cocolonizados por diferentes EPC, la transferencia *in vivo* de los genes *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-3</sub> entre distintas

especies de enterobacterias y caracterizar los elementos genéticos móviles implicados.

- Describir por primera vez la diseminación clonal de *Kluyvera* spp. productora de OXA-48 portadora también de la nueva variante cromosómica CTX-M-213, y analizar la secuencia del genoma completo de uno de estos aislamientos.

- Describir y analizar las características microbiológicas, epidemiológicas y clínicas de un brote de *K. pneumoniae* productora de las enzimas NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1 detectado en el servicio de Neurocirugía entre septiembre de 2015 y febrero de 2016.

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

*“Para hacer las cosas bien es necesario: primero, el amor; segundo, la técnica”*

Antoni Gaudí



### 1. Proyecto R-GNOSIS

El estudio R-GNOSIS (*“Resistance of Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies”*) es un proyecto financiado por la Unión Europea englobado dentro del 7º programa marco (FP7) (R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512). Es un estudio controlado, de dos brazos, aleatorizado por grupos de dos estrategias de control de infecciones con diseño de ramas cruzadas (<http://www.r-gnosis.eu/>). Este proyecto se diseñó con el objetivo general de determinar la eficacia de las medidas de control empleadas para reducir la adquisición, infección y diseminación de bacterias gramnegativas multirresistentes. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Ref. 251/13).

**Tabla 3.** Estrategias de intervención del estudio R-GNOSIS

Estrategias de intervención	
PE	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Higiene de manos.</li> <li>✓ Uso de bata y otras barreras durante el cuidado de los pacientes.</li> </ul>
AC+PE	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Precauciones estándar.</li> <li>✓ Uso de bata y guantes por parte de los visitantes de los pacientes colonizados y/o infectados.</li> <li>✓ Aislamiento del paciente en habitaciones individuales o compartidas con otros pacientes colonizados por el mismo microorganismo).</li> </ul>

PE=Precauciones estándar; AC=Aislamiento de contacto

Dentro del proyecto R-GNOSIS, una de las aproximaciones que se llevaron a cabo (Protocolo 5) fue el estudio de las estrategias de aislamiento de pacientes portadores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en servicios médicos y quirúrgicos (*“Patient isolation strategies for ESBL carriers in medical and surgical hospital wards”*). Las medidas correspondientes a cada estrategia de intervención se engloban en la Tabla 3. En este protocolo colaboraron 4 hospitales con distintas localizaciones europeas: Madrid (España), Berlín (Alemania), Utrecht (Holanda) y Ginebra (Suiza). Su objetivo principal fue evaluar el efecto adicional del aislamiento de contacto (AC) frente a las estrategias de precaución estándar (PE) sobre la densidad de incidencia de adquisición nosocomial de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (E-BLEE). Los objetivos secundarios del protocolo 5 se recogen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Objetivos del protocolo 5 del estudio R-GNOSIS.

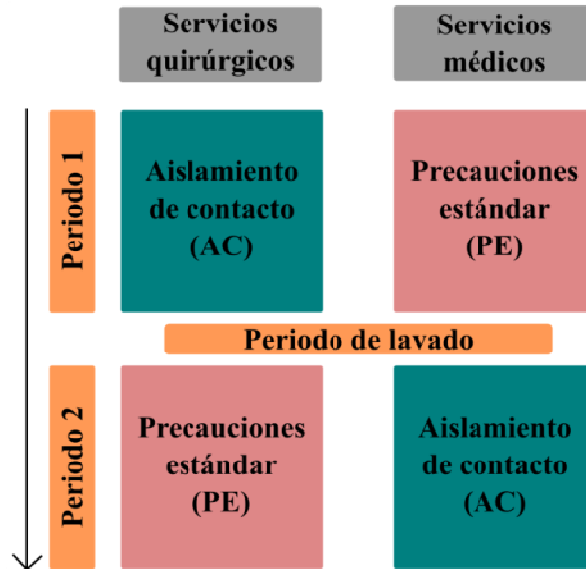
Objetivo principal:
✓ Evaluar el efecto adicional de las medidas de aislamiento frente a las estrategias de precaución estándar sobre la densidad de incidencia de E-BLEE.
Objetivos secundarios:
✓ Determinar la prevalencia de E-BLEE al ingreso y al alta.
✓ Determinar la incidencia de infecciones nosocomiales por E-BLEE.
✓ Evaluar la adherencia de la higiene de manos.
✓ Evaluar el cumplimiento de las medidas de aislamiento.
✓ Comparar la incidencia de E-BLEE detectadas con y sin cribado de vigilancia universal (periodos de intervención vs. periodo basal pre-intervención y periodo post-intervención).

El estudio se llevó a cabo con pacientes hospitalizados en dos servicios quirúrgicos (Neurocirugía y Urología) y dos servicios médicos (Gastroenterología y Neumología) de nuestro hospital. Durante un primer período de 12 meses (1 de marzo de 2014 – 28 de febrero de 2015), se implantó la estrategia de aislamiento de contacto en los servicios quirúrgicos (SQ), mientras que en los servicios médicos (SM) se llevaron a cabo sólo las medidas de precaución estándar. El mes de marzo de 2015 fue un “periodo de lavado” en el que no se realizó aislamiento de contacto en ninguna unidad en los pacientes colonizados por E-BLEE. Durante un segundo periodo que abarcó los 12 meses posteriores (1 de abril de 2015-31 de marzo de 2016), las medidas de aislamiento de contacto se implantaron en los servicios médicos, y en las unidades quirúrgicas se realizaron únicamente las medidas de precaución estándar habituales (Figura 14).

Otra de las aproximaciones del proyecto R-GNOSIS que se recoge en esta tesis se incluye en el Protocolo 7 (“*Functional microbiology & within-host transmission dynamics of genes, plasmids and clones of MDR-GNB*”), cuyo objetivo fue estudiar la dinámica de aparición, la persistencia, los mecanismos de resistencia y las relaciones clonales de las BGN multirresistentes detectados durante el protocolo 5.

En los últimos años, en nuestro hospital se ha registrado un aumento de la aparición de pacientes colonizados y/o infectados por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC). Por este motivo, en nuestro centro, a todos los pacientes que participaron en el proyecto R-GNOSIS se les realizó en paralelo un cribado para detectar posibles portadores de EPC. Ante la detección de cada nuevo caso de colonización se implementaron inmediatamente las medidas de control y prevención de la infección por EPC recomendadas en la CM [167], que incluyen tanto las estrategias

de aislamiento de contacto y precaución estándar como la recogida de cultivos rectales de vigilancia epidemiológica. Las EPC que se identificaron en este grupo de pacientes fueron incluidas en esta tesis doctoral.



**Figura 14.** Diseño del estudio R-GNOSIS.

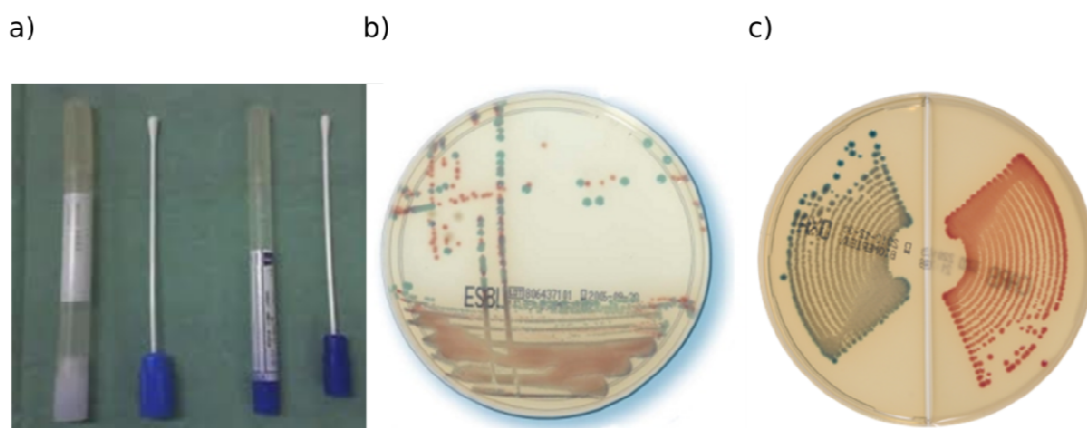
## 2. Recogida de muestras

Se recogieron un total de 15.556 torundas rectales de 8.209 pacientes durante todo el estudio. En el primer periodo se recogieron 6.508 muestras rectales pertenecientes a 4.432 pacientes, mientras que en el segundo periodo, se recogieron 7.852 muestras de 5.055 pacientes. Durante el mes considerado como “periodo de lavado” (marzo 2015) se recogieron 730 torundas. En la Tabla 5 se engloba el número de muestras y de pacientes de cada servicio y en cada periodo que participaron en el estudio.

Las muestras rectales se obtenían al ingreso en cada unidad, semanalmente para aquellos pacientes que permanecieron ingresados más de 7 días, y al alta en aquellos que estuvieron hospitalizados al menos 3 días. Se revisaron las historias clínicas de todos aquellos pacientes colonizados con EPC y se recogió la edad, el sexo y la ubicación del paciente.

**Tabla 5.** Número de torundas rectales y pacientes que participaron en el cribado.

Servicios		Nº torundas rectales	Nº pacientes
Gastroenterología	Periodo 1	1936	1238
	Lavado	190	82
	Periodo 2	2180	1289
	<b>Total</b>	<b>4116</b>	<b>2527</b>
Neumología	Periodo 1	1732	1197
	Lavado	217	88
	Periodo 2	2173	1289
	<b>Total</b>	<b>3905</b>	<b>2486</b>
Neurocirugía	Periodo 1	720	436
	Lavado	81	35
	Periodo 2	952	477
	<b>Total</b>	<b>1672</b>	<b>913</b>
Urología	Periodo 1	2120	1561
	Lavado	216	105
	Periodo 2	2547	2000
	<b>Total</b>	<b>4667</b>	<b>3561</b>
<b>TOTAL</b>		<b>14360</b>	<b>9487</b>



**Figura 15.** a) Torundas rectales utilizadas en el cribado; b) placa Chromo ID-ESBL con colonias rojas y verdes; y c) placa Chromo ID-CARB/OXA-48, con colonias verdes en el medio para identificación de OXA-48 y colonias rojas en el medio para identificación de carbapenemasas.

### **3. Cultivos de vigilancia**

Las torundas rectales se sembraron en medios cromogénicos y selectivos Chromo ID-ESBL y -CARB/OXA-48 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) para detección de BLEE y carbapenemasas, respectivamente (Figura 15). Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días, y se hizo una lectura a las 24 h y otra a las 48 h. La identificación

presuntiva de las colonias se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. De esta forma, las colonias de color rosa se correspondían con crecimiento por *E. coli*, y las colonias verdes azuladas con *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., y *Citrobacter* spp. De cada medio de agar cromogénico se seleccionó una colonia única por color y morfología y se sembró en placas de agar sangre para realizar los posteriores estudios microbiológicos.

#### **4. Identificación bacteriana**

##### **4.1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)**

Las colonias que crecieron en las placas de agar sangre se identificaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, “*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*”). La identificación se realizó a partir de una única colonia que se colocó sobre una placa de titanio punteada y se cubrió con 0,7 µl de matriz (ácido-ciano-4-hidroxicinamínico). Se empleó el equipo MALDI-Biotyper Realtime (Bruker Daltonics, Alemania) y el espectro resultante de cada cepa se analizó con el software FlexControl 3.0 comparándolo con la base de datos. Los resultados se expresan como puntuaciones de 0 a 3. Los valores  $\leq 1,7$  se consideraron una identificación no fiable; los valores entre 1,7-2 se correspondieron con una identificación de género; y finalmente los valores  $\geq 2$  una identificación fiable a nivel de especie.

##### **4.2. Amplificación y secuenciación del ARNr 16S**

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. La amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y posterior secuenciación del ADNr 16S, es un método rápido y eficaz de identificación bacteriana.

###### **4.2.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN bacteriano de los aislados se realizó mediante el método de hervido (“*boiling*”). Para obtener el lisado bacteriano se resuspendió una colonia tomada de un cultivo en placa de agar sangre de 24 h en 350 µl de TE y se hirvió en un termobloque durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min

y se recogió el sobrenadante que se utilizó para las posteriores reacciones de amplificación.

#### 4.2.2. PCR y secuenciación

Para amplificar el gen ADNr 16S se emplearon cebadores específicos (16S-F5'-AGGATTAGATACCCTGGTAG-3' y 16S-R5'-AGGCCCGGGAACGTATTCAC-3') y las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.

Las reacciones de amplificación se prepararon en volúmenes finales de 20 µl que contenían los siguientes componentes: tampón de reacción (1x), MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), dNTPs (2,5 mM), cebadores directo (F) y reverso (R) (0,1 µM cada uno), 2,5 U de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y ADN molde (3 µl). La enzima AmpliTaq Gold, es una *Taq* ADN polimerasa de alta fidelidad y especificidad que se activa solamente a temperaturas elevadas, disminuyendo la formación de productos inespecíficos y aumentando el rendimiento de la amplificación. Las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc., Minnesota, EE.UU.).

Los productos obtenidos tras la amplificación se separaron mediante electroforesis de corriente continua en cubetas horizontales (100V, 30-60 min), utilizando geles de agarosa D-1 Low EEO (Pronadisa) al 1,5% en tampón TBE 0,5x (44,5 mM Trisbase, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH=8,0). Como marcador de peso molecular se utilizó 100 bp DNA ladder (100-1500 pb) (TaKaRaBio Inc.). La visualización de los productos amplificados se realizó mediante tinción de los geles de agarosa con GelRed a una concentración final 3X y su posterior exposición a luz ultravioleta en el equipo transiluminador ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Imaging System (Bio-Rad, Hércules, CA., EE.UU.).

Los productos de PCR fueron purificados con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EE.UU.), añadiendo 1 µl de reactivo y 1 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril por cada 5 µl de producto de PCR, e incubando en el termociclador durante de 15 min a 37°C y 15 min a 80°C. El producto de PCR purificado fue posteriormente secuenciado en Macrogen Europe (Macrogen Inc., Amsterdam, The Netherlands) en secuenciadores Applied Biosystems 3730XL de alto rendimiento y última generación.

### 4.2.3. Análisis de la secuencia del ADNr 16S

La identificación bacteriana se confirmó con la comparación, mediante el programa BLAST, de la secuencia del ADNr 16S obtenida con las depositadas en la base de datos del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 5. Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas y BLEE

La producción de BLEE y carbapenemasas se confirmó fenotípicamente empleando diferentes pruebas de difusión en agar. A partir de una colonia crecida en una placa de agar sangre de 18-24h, se preparó un inóculo de 2 ml de NaCl 0,9% ajustado a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala MacFarland. La suspensión se agitó durante 15-20 segundos y con un hisopo de algodón estéril se sembró la superficie de una placa de Mueller-Hinton agar (MHA).

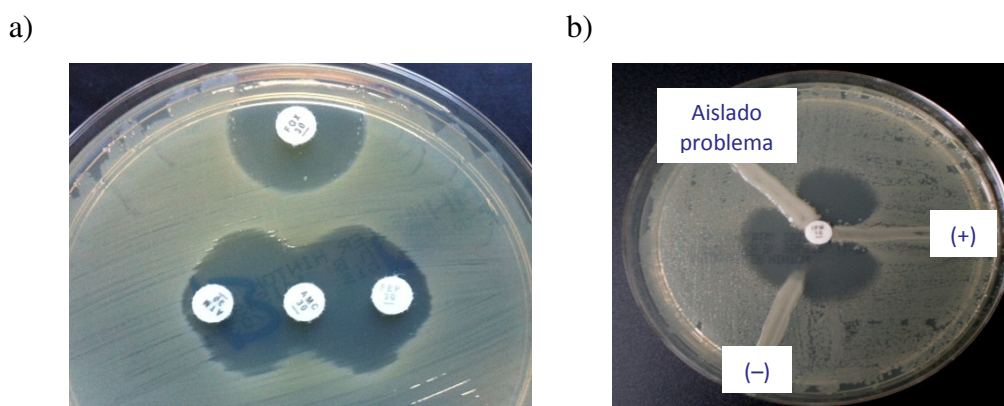
### 5.1. Test de doble difusión en disco (DDST)

El test de doble difusión en disco consiste en un antibiograma que permite detectar la producción de BLEE mediante la observación de sinergia (ampliación de la zona de inhibición) entre dos discos de antibióticos. Acorde al diseño del estudio R-GNOSIS y en función de la identificación bacteriana, se emplearon diferentes discos de antibiótico (Oxoid, Ltd. Hampshire, Reino Unido). Para las colonias identificadas como *E. coli* se utilizaron los discos convencionales de cefotaxima (30 µg) (CTX) y ceftazidima (30 µg) (CAZ) con un disco de amoxicilina-clavulánico (20/10 µg) (AMC) colocado en el centro de la placa a una distancia de 20-30 mm de los anteriores. Para el resto de especies, se emplearon discos de aztreonam (30 µg) (AZT) y cefepime (30 µg) (FEP) colocados centro a centro del disco de AMC (Figura 16a). Además, se utilizó un disco de cefoxitina (30 µg) (FOX) para la detectar la posible producción de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC (Figura 16a). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-18h.

Mediante esta prueba, la producción de BLEE se confirma cuando se observa sinergia entre cualquiera de los discos de cefalosporina de espectro ampliado (CAZ, CTX, AZT o FEP) y el disco de AMC. Esta forma característica de “halo de herradura” se produce por el efecto inhibitorio del ácido clavulánico sobre la BLEE, dando lugar a que el resto de antibióticos aumenten su actividad inhibitoria en la zona de intersección.

## 5.2. Test de Hodge modificado (MHT)

El test de Hodge es un método de difusión en agar que se emplea para detectar la producción de carbapenemasas. Se inoculó una placa de MHA con una suspensión bacteriana preparada a partir de una colonia de la cepa *E. coli* ATCC 25922 sensible a los carbapenémicos. En el centro de la placa se colocó un disco de meropenem (10 µg) (MER), y con un asa se estrió una colonia del microorganismo a estudiar desde el borde del disco hacia el exterior de la placa. Este proceso se repitió con un control positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA1705, productora de KPC) y con un control negativo (*K. pneumoniae* ATCC 1706). Se interpreta un resultado positivo cuando se observa formación de una “punta de flecha” debido al crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en la intersección entre el halo de inhibición (generado por la difusión del antibiótico) y la estría de la cepa productora de carbapenemasa (Figura 16c).



**Figura 16.** a) Test de doble difusión en disco con aztreonam (AZT) y cefepime (FEP) colocados centro a centro del disco de amoxicilina-clavulánico (AMC) y disco de cefoxitina (FOX) y b) Test de Hodge Modificado (MHT).

## 5.3. Identificación fenotípica del tipo de carbapenemasa

Con el fin de discriminar el tipo carbapenemasa producida [KPC, metalo-β-lactamasa (MBL) u OXA-48] se empleó el test comercial “KPC/MBL/OXA-48 Confirmation Kit” (RoscoDiagnostica, Taastrup, Denmark). Esta prueba contiene discos en formato tableta de temocilina (inhibidor de OXA-48), de meropenem, y de meropenem suplementados con otros inhibidores de diferentes β-lactamasas (ácido borónico, inhibidor de KPC y AmpC; cloxacilina, inhibidor de AmpC; y ácido dipicolínico, inhibidor de MBL). La interpretación se realiza midiendo diferencias entre los halos de inhibición de los distintos discos siguiendo las recomendaciones del fabricante (Tabla 6).

El test “ESBL and AmpC *Screen Kit*” (Rosco Diagnóstica) fue también utilizado para detectar la producción de BLEE y/o AmpC. En esta prueba se emplean discos con cefotaxima y con cefotaxima combinada con clavulanato y/o cloxacilina. La interpretación de los resultados se puede observar en la Tabla 7

**Tabla 6.** Interpretación de “KPC/MBL/OXA-48 Confirmation Kit”.

Actividad AmpC	Diferencia $\geq 5$ mm entre MRP10- MRPCX
Actividad MBL	Diferencia $\geq 5$ mm entre MRP10 - MRPDP
Actividad KPC	Diferencia $\geq 4$ mm entre MRP10 -MRPBO y $<4$ mm entre MRP10 - MRPCX
Actividad OXA-48	No se observa halo de inhibición en TEM

Meropenem 10  $\mu$ g, (MRP10); meropenem 10  $\mu$ g + ácido borónico (MRPBO); meropenem 10  $\mu$ g + cloxacilina (MRPCX); meropenem 10  $\mu$ g + ácido dipicolínico (MRPDP); y temocilina 30 ug (TEM).

**Tabla 7.** Interpretación de “ESBL-and AmpC *ScreenKit*”.

Actividad BLEE	Diferencia $\geq 5$ mm entre CTX30-CTX+C y CTXC-C - CTXCX
Actividad AmpC	Diferencia $\geq 5$ mm entre CTXCC-CTX+C y CTXCX – CTX30
Actividad BLEE + AmpC	Diferencia $\geq 5$ mm entre CTXCC-CTXCX y $<5$ mm entre CTX+C – CTX30

Cefotaxime 30  $\mu$ g (CTX30), cefotaxime 30  $\mu$ g + clavulanato (inhibidor de BLEE) (CTX+C), cefotaxime 30  $\mu$ g + cloxacilina (inhibidor de AmpC) (CTXCX), y cefotaxime 30  $\mu$ g + clavulanato + cloxacilina (CTXCC).

## 6. Sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas de sensibilidad permiten inferir la actividad *in vitro* de los antibióticos y establecer valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y de concentración mínima bactericida (CMB). La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del microorganismo estudiado, y la CMB, como la menor concentración de antimicrobiano que causa la muerte del microorganismo. La categorización clínica de los valores de CMI obtenidos se realizó siguiendo los puntos de corte establecidos por EUCAST ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf)).

## **6.1. Microdilución**

La sensibilidad a antimicrobianos se determinó por microdilución utilizando el sistema automático MicroScan (Beckman Coulter, CA, EE.UU.).

## **6.2. Tiras en gradiente**

Se emplearon tiras comerciales en gradiente de celulosa (Liofilchem MIC-Test Strip, Rosetodegli Abruzzi, Italy) impregnadas con antibiótico a un rango de concentración creciente y variable según el agente antimicrobiano. Estas tiras, depositadas en una placa de MHA inoculada previamente con la suspensión bacteriana, ofrecieron información cuantitativa de la CMI (mg/L), que se corresponderá con el valor que aparece en el punto de intersección del halo de inhibición del crecimiento bacteriano con la tira.

## **7. Caracterización de genes de resistencia**

La caracterización de los genes de resistencia se realizó mediante PCR y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados. En algunos casos, también se empleó el sistema eazyplex® SuperBug CRE (Amplex-Biosystems, Alemania). En la colección de aislados se investigó la presencia de los principales genes de carbapenemasas (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, y *bla*<sub>OXA-OXA-48</sub>) y de las BLEE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>). En casos concretos, además se estudiaron otros tipos de β-lactamasas como las β-lactamasas plasmídicas de tipo AmpC.

### **7.1. Pruebas de detección rápida**

El sistema eazyplex® SuperBug CRE (Amplex-Biosystems, Alemania) es una prueba de detección rápida basada en la técnica LAMP (“*Loop-mediated isothermal amplification*”). Este método no requiere termociclador y se fundamenta en la amplificación de ADN por desplazamiento de cadena a una temperatura constante. El test permite detectar los diferentes tipos de carbapenemasa (KPC, NDM, OXA-48, OXA-181 y VIM) y BLEE (de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-9) directamente desde un cultivo crecido en placa y muestra un resultado a tiempo real en 15 minutos.

**Tabla 8.** Cebadores para la identificación de genes de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE).

Genes	Cebadores	(Secuencia 5'-3')	Amplicón	Condiciones	Referencia
PCR MÚLTIPLE TEM-SHV-CTX-M	SHV-F	ATGCGTTATATTTCGCCTGTG	747 bp	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Monstein y cols. [168]
	SHV-R	TGCTTTGTTATTTCGGGCCAA			
	TEM -F	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445 bp		
	TEM-R	ACGCTCACCCGGCTCCAGATTTAT			
	CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593 bp		
	CTX-M-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG			
PCR MÚLTIPLE CTX-M-1 grupo - CTX-M-9 grupo	CTX-M-1G-F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	415 bp	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 25 seg a 94°C, 40 seg a 52°C, 50 seg a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Woodford y cols. [169]
	CTX-M-1G-R	AGCTTATTCATCGCCACGTT			
	CTX-M-9G-F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	205 bp		
	CTX-M-9G-R	ATTGGAAGCGTTCA TCACC			
PCR <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	CTX-M-1-SEQ-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	1000 bp	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Carattoli y cols. [170]
	CTX-M-1-SEQ-F	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG			
PCR <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	CTX-M-9-SEQ-F	TGGTGACAAAGAGAGTGCAACG	874 bp	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 40 seg a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Paauw y cols. [171]
	CTX-M-9-SEQ-F	TCACAGCCCTTCGGCGAT			
PCR <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-SEQ-F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	800 bp	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Weill y cols. [172]
	SHV-SEQ-R	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG			
PCR <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-SEQ-F	GCGGAACCCCTATTTG	964 bp	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Olesen y cols. [173]
	TEM-SEQ-R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG			

**Tabla 9.** Cebadores para la identificación de genes de carbapenemasa.

Genes	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Condiciones	Referencia
PCR MULTIPLE VIM-NDM-KPC- OXA-48	VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	390 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 52°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Poirel y cols. [174]
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG			
	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438 pb		
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621 pb		
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
	KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798 pb		
	KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG			
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM-seq-F	TATTGGTCTATTTGACCGCGT	800 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Valverde y cols. (Comunicación personal)
	VIM-seq-R	TACTCRRCGACTGAGCGAT			
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48-seq-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	600 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 56°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Poirel y cols. [105]
	OXA-48-seq-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM-seq-F	AAGCTGAGCACCGCATT	713 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 52°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Gijón y cols. [121]
	NDM-seq-R	GCTCATCACGATCATGCT			
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC-seq-F	ATGTCACTGTATCGCCGTC	800 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Endimiani y cols. [175]
	KPC-seq-R	TTACTGCCCGTTGACGCC			

## 7.2. PCR y secuenciación

La extracción de ADN bacteriano de las cepas y de los controles se realizó como se describe en el apartado 4.2.1. La amplificación por PCR y la secuenciación de los distintos genes se llevó a cabo siguiendo los mismos procedimientos que en el apartado 4.2.2. Los cebadores específicos y las condiciones de reacción de los distintos genes de resistencia se describen en las Tablas 8 y 9. La determinación de los genes de carbapenemasa y BLEE se realizó primero mediante una PCR múltiple con distintos cebadores para los distintos grupos y posteriormente se confirmaron mediante una PCR simple con cebadores específicos de cada una de las familias. En cada una de las reacciones se utilizaron controles de reacción positivo, negativo y blanco.

## 7.3. Análisis bioinformático

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante los programas Chromas (versión 2.6.4 Technelysium Pty. Ltd, Tewantin, Australia) y Vector NTI (versión 10.3.0 Invitrogen Corporation, Carlsbad, EE.UU). Para la comparación y los alineamientos entre las distintas secuencias se utilizaron los programas BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y Clustal Omega ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), respectivamente. La determinación de las distintas variantes de cada uno de los genes se realizó utilizando los datos disponibles en la página [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies). La web ExpASy (SIB Bioinformatics Resource Portal) (<http://web.expasy.org/translate/>) se empleó para convertir las secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos y la herramienta NEBasechanger (versión 1.2.6, New England BioLabs, Inc) (<http://nebasechanger.neb.com/>) se utilizó para el diseño de cebadores específicos.

## 8. Estudio de la estructura poblacional

### 8.1. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La técnica de PFGE consiste en la macrorrestricción del ADN bacteriano mediante enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y su posterior separación mediante la aplicación de distintos pulsos eléctricos que permiten la reorientación y migración de los fragmentos según su peso molecular.

La digestión se realizó con enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y su secuencia, se encuentran en baja frecuencia a lo largo del ADN cromosómico de la

bacteria, de manera que se obtienen entre 10 y 30 fragmentos de ADN de alto peso molecular (20 kb- 1 Mb). Para separar estos fragmentos de gran tamaño, es necesario aplicar un gradiente de corriente alterna que obligue al ADN a cambiar su conformación y reorientarse para avanzar en la dirección de los distintos pulsos eléctricos. Esta técnica permite obtener patrones de restricción (pulsotipos) con los que se pueden establecer categorías de relación entre cepas bacterianas de un mismo estudio.

El análisis por PFGE se realizó en todos los aislados productores de carbapenemasa incluidos en el estudio, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Preparación de los bloques de agarosa: a partir de un cultivo en placa de agar Luria Bertuni (LB agar) de 24 h se preparó de cada aislado una suspensión bacteriana en 2 ml de tampón CSB (100 mM TrisHCl pH=8; 100mM EDTA, pH8) ajustada a una densidad óptica de 600 nm ( $DO_{600}$ ) igual a 1,45. Se tomaron 150  $\mu$ L de cada suspensión celular en un tubo eppendorf y se adicionaron 7  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/ml). Para obtener los bloques de agarosa, se agregó a cada tubo 150  $\mu$ L de agarosa D5 (Pronadisa, Madrid, España) preparada al 1% en tampón TBE 0,5x con SDS al 10%, y se repartió en moldes. Tras la solidificación de los bloques, se procedió a la lisis y desproteinización celular utilizando para cada bloque 2 ml de tampón de lisis (50 mM Tris: 50mM EDTA, pH8 + 1% Sarcosina) y 10  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/ml), y se incubó a 56°C durante 2h en baño con agitación (150-175 rpm). Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 15 min a 56°C con 2 ml de agua ultrapura estéril, y 4 lavados de 10 min a 56°C con 2 ml de tampón TE (10 mM Tris HCl pH=8,0; 0,1 mM EDTA pH=8,0). Una vez finalizados los lavados, los bloques de agarosa se conservaron en tampón TE a 4°C.

- Digestión y electroforesis: se cortó aproximadamente 1/3 de cada bloque y se preparó para cada porción un volumen final de solución de digestión de 100  $\mu$ L con 30-50 U de la enzima *Xba*I y una concentración 1x del tampón correspondiente (TaKaRaBio Inc., Shiga, Japón). A continuación, se incubaron a 37°C durante 3-4 h. Posteriormente se cargaron los bloques de agarosa digeridos en un gel de 150 ml de agarosa D5 (Pronadisa) preparada al 1,2% con TBE 0,5x y se llevó a cabo la separación de los fragmentos de ADN en el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad), empleando como tampón de electroforesis 2 l de TBE 0,5x con 20 mg de tiourea. Como marcador de peso molecular se empleó la cepa *Salmonella enterica* subs. *enterica* serotipo

Braenderup (H9812). Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: 14°C, 6 V/cm<sup>2</sup>, con pulsos de 2,2 a 54,2 seg durante 20h.

- Tinción y visualización: la visualización de los fragmentos de ADN separados se realizó por tinción con GelRed. Los geles teñidos se fotografiaron con el equipo ChemiDoc™ MP.

- Análisis de los perfiles de restricción: Los patrones de restricción obtenidos se interpretaron de acuerdo a los criterios de Tenover y cols. [176]. En función del número de diferencias (bandas) entre dos patrones se clasificó a los aislados como idénticos (mismo número de bandas y mismo tamaño), genéticamente relacionados (número de diferencias ≤ 3), posiblemente relacionados (número de diferencias entre 4 y 6) y no relacionados (número de diferencias > 6).

El análisis de los patrones de restricción y la elaboración de los dendrogramas de cada especie bacteriana se llevó a cabo mediante el software *Bionumerics* (versión 3.0 Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) utilizando el método de agrupamiento UPGMA (“*unweighted pair group method using arithmetic averages*”). Para calcular la similitud entre las cepas se aplicó el coeficiente de Dice expresado entre los valores 0 y 1, siendo 1 el valor de mayor homogeneidad genética entre dos aislados.

## 8.2. Multi locus sequence typing (MLST)

La técnica de MLST fue desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales entre las poblaciones bacterianas. El análisis consiste en amplificar y comparar las secuencias de fragmentos variables de siete genes de mantenimiento celular (“*housekeeping*”) del cromosoma bacteriano. Según las bases de datos correspondientes a los distintos microorganismos, a cada variación alélica de cada uno de los genes se le asigna un número, y a cada combinación de 7 alelos (perfil alélico) se le asigna una secuencia tipo (ST).

El MLST se realizó a los representantes de cada uno de los perfiles de restricción identificados por PFGE de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de carbapenemasa, de acuerdo a los esquemas seguidos por el Instituto Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/index.html>) y la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk>), respectivamente.

**Tabla 10.** Cebadores y condiciones de amplificación de los genes de MLST de *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Genes (pb)	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones	
<b><i>K. pneumoniae</i></b>				
<i>rpoB</i> (510 pb)	rpoB-F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
	rpoB-R	RGAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
<i>mdh</i> (477 pb)	mdh-F	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG		
	mdh-R	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG		
<i>pgi</i> (432 pb)	pgi-F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC		
	pgi-R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
<i>phoE</i> (420 pb)	phoE-F	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG		
	phoE-R	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
<i>infB</i> (318 pb)	infB-F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG		
	infB-R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
<i>gapA</i> (450 pb)	gapA-F	TGAAATATGACTCCACTCACGG		1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	gapA-R	C TTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		
<i>tonB</i> (414 pb)	tonB-F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 45°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
	tonB-R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		
<b><i>E. coli</i></b>				
<i>adk</i> (583 pb)	adk-F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
	adk-R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>icd</i> (878 pb)	icd-F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA		
	icd-R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>purA</i>	purA-F	TCGGTAACGGTGTTGTGCTG		
	purA-R	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>fumC</i> (806 pb)	fumC-F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC		
	fumC-R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>recA</i> (780 pb)	recA-F	ACCTTTGTAGCTGTACCACG		1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	recA-R	TCGTGCGAAATCTACGGACCGGA		
<i>gyrB</i> (911 pb)	gyrB-F	TCGGCGACACGGATGACGGC		1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	gyrB-R	ATCAGGCCTTACGCGCATC		
<i>mdh</i> (932 pb)	mdh-F	ATGAAAGTCGCAGTCTCGGGCGCTGCTGGCGG		
	mdh-R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTCTT		

El esquema descrito por Diancourt y cols. [177] para *K. pneumoniae* se basa en la amplificación de los siguientes genes: *rpoB* (subunidad beta ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucoasa isomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor iniciador de la traducción, IF-2) y *tonB* (transductor de energía periplásmico).

Siguiendo el esquema de Wirth y cols. [178], los genes *housekeeping* de *E. coli* para MLST son: *adk* (adenilato quinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (ADN girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa) y *recA* (motivo de unión de ATP/GTP).

Los procedimientos utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación de estos genes fueron los mismos que se emplearon en los apartados 4.2.1 y 4.2.2. Los cebadores utilizados y las condiciones específicas de amplificación de cada uno de los genes de MLST de *K. pneumoniae* y *E. coli* se encuentran en la Tabla 10.

### 8.3. Índice de diversidad

La diversidad de población de las EPC detectadas durante este estudio fue estimada mediante el índice de Simpson ( $D_{SI}$ ). El  $D_{SI}$  es un índice de diversidad de especies que representa la probabilidad de que dos microorganismos seleccionados al azar dentro de una población pertenezcan a la misma especie [179]. Durante este estudio, se analizó la diversidad de población empleando el índice de dominancia de Simpson ( $SDI=1-D_{SI}$ ) (Figura 17), el cual se expresa entre los valores 0 y 1, siendo el valor 0 la probabilidad más alta de dominancia de una especie o de un clon, y el valor 1 la máxima biodiversidad.

$$D_{SI}: \frac{\sum_i n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)} \qquad SDI: 1 - \frac{\sum_i n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}$$

**Figura 17.** Fórmulas para el cálculo del índice de Simpson ( $D_{SI}$ ) y el índice de dominancia (SDI). N= n° total de aislados de la población;  $n_i$ = n° de aislados pertenecientes a una misma especie (i) o perfil de restricción (i).

En este estudio, se estimó la diversidad de especies bacterianas dentro de la población de EPC comparando la prevalencia de las diferentes especies entre períodos y

entre las distintas localizaciones hospitalarias. Este índice también se aplicó para analizar la diversidad clonal de las especies más representativas (*K. pneumoniae* y *E. coli*), basándonos en los perfiles de restricción identificados mediante PFGE.

## **9. Transferencia horizontal de genes**

Los ensayos de transferencia de genes *in vitro* se llevaron cabo mediante conjugación en filtro, transformación química y electroporación.

### **9.1. Conjugación en filtro**

Se partió de 2 ml de Luria Bertoni caldo (LB caldo) de 18 h de cada una de las cepas donadoras y de la receptora (*E. coli* J53 Azide®). Se prepararon diluciones 1:100 de cada uno de los cultivos y se pusieron en contacto las cepas donadoras y receptoras en una proporción 1:2. Las mezclas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 15 min y los precipitados se resuspendieron en 100 µl de LB caldo. Posteriormente, con cada suspensión se inoculó un filtro (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) colocado sobre una placa de LB agar y se incubó durante 18 h a 37°C. Para la selección de los transconjugantes, el total de la masa bacteriana de cada filtro se sembró en placas de selección de agar MacConkey suplementadas con azida sódica (100 µg/ml) y ertapenem (0,5 µg/ml) o imipenem (0,5 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h. Los cultivos positivos se reestriaron de nuevo en placas de selección y se incubaron a 37°C durante 18 h. Los transconjugantes se confirmaron por PCR (procedimientos de los apartados 4.2.1 y 4.2.2) y se guardaron en glicerol al 40% a -40°C.

### **9.2. Transformación química**

Para la realización de los experimentos de transformación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Extracción de ADN plasmídico: se realizó empleando el Qiagen Plasmid Midi Kit 25 (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ADN purificado se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).
- Preparación de las células químicas competentes: se preparó un cultivo de 50 ml de LB caldo con la cepa *E. coli* DH5-α y se incubó a 37°C con agitación (225 rpm) durante aproximadamente 2 h hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> igual a 0,25-0,4. El cultivo se

mantuvo en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4°C. Se resuspendió el precipitado en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M a 4°C y se incubó en hielo durante un mínimo de 20 min. Se repitió la centrifugación y se resuspendió el precipitado en 0,7 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M a 4°C. La suspensión de células químicas competentes se guardó en la nevera durante toda la noche.

- Transformación por choque térmico: para cada reacción se tomaron 100 µl de células químicas competentes y se añadió 30-50 ng/ml de ADN plasmídico. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 30 min, y posteriormente se incubaron a 42°C durante 45 seg (choque térmico). Inmediatamente después se añadió a cada tubo 1 ml de LB caldo precalentado a 37°C y se incubaron con agitación (225 rpm) durante aproximadamente 1-2h a 37°C. A continuación, para la selección de los transformantes se plaquearon 200 µl de cada cultivo LB caldo en placas de LB agar suplementadas con ertapenem (0,5 µg/ml). Los transformantes se confirmaron por PCR (procedimientos de los apartados 4.2.1 y 4.2.2) y se guardaron a -40°C en glicerol al 40%.

### 9.3. Electroporación

La técnica de electroporación se realizó siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Extracción de ADN plasmídico: se utilizó el kit NucleoBond® Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany). La concentración de ADN purificado se midió utilizando el equipo NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V.3.6 (ThermoScientific).

- Preparación de células electrocompetentes: se inoculó un cultivo de 1 ml de LB caldo con la cepa *E. coli* DH5- $\alpha$  y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. A partir de este cultivo se preparó una dilución 1:100 en 50 ml de LB caldo que se incubó a 37°C con agitación hasta obtener una DO<sub>600nm</sub> de 0,3-0,4 (aproximadamente 2 h). Inmediatamente después, se incubó en hielo durante al menos 10 min, y posteriormente se repartió en dos volúmenes de 25 ml y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó cuidadosamente en 15 ml de glicerol 10% a 4°C y se centrifugó de nuevo (4500 rpm, 10 min, 4°C). Este lavado con glicerol se repitió dos veces más. Tras el último lavado, se resuspendió el precipitado en 300 µl de glicerol 10% a 4°C y se prepararon alícuotas de 40 µl.

- Electroporación: se realizó en el equipo Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (Bio-Rad, Hércules, CA., EE.UU), en cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) con 40 µl de células y 100 ng de ADN plasmídico purificado. Las condiciones del pulso eléctrico fueron las siguientes: 2,5 kV, 25 µF y 200 Ω. A continuación, las células se resuspendieron rápidamente en 1 ml de LB caldo precalentado a 37°C y se incubó 2 h a 37°C con agitación. Para la selección de los electrotransformantes se sembraron 200 µl en placas de selección suplementadas con ertapenem (0,5 µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, los electrotransformantes se confirmaron por PCR siguiendo los mismos procedimientos que en los apartados 4.2.1 y 4.2.2, pero empleando la ADN *Taq* polimerasa DreamTaq Hot Start (Thermo Fisher Scientific) y el equipo termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific). Los electrotransformantes se guardaron a -80°C en glicerol al 40%.

## **10. Localización de los genes de resistencia**

La localización de los genes resistencia transferidos mediante plásmidos se realizó mediante la técnica de hibridación del ADN con sondas específicas obtenidas por PCR. Esta técnica requiere los siguientes pasos:

### **10.1. Digestión y separación del ADN**

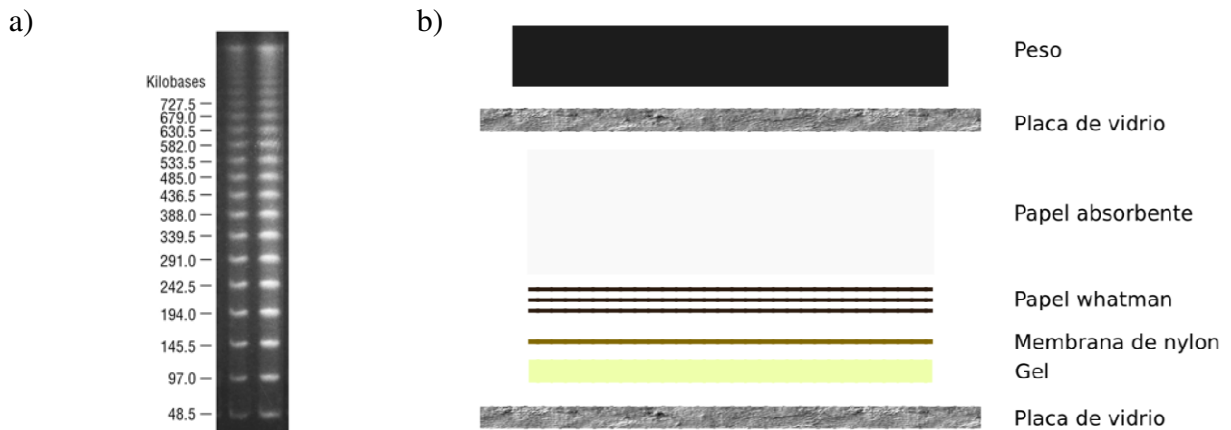
Para investigar la localización plásmidica de los genes de resistencia, se llevó a cabo una digestión con la enzima *S1* y la posterior separación de las bandas de ADN por electroforesis de corriente alterna (PFGE).

El primer paso fue digerir 1/3 de un bloque de agarosa (procedimiento del apartado 8.1) con la enzima *S1* (*S1* Nuclease, Thermo Fisher Scientific), una endonucleasa que degrada el ADN cromosómico de la bacteria y lineariza el ADN plasmídico. La digestión se realizó en un volumen final de 100 µl con 12 U de enzima *S1* y una concentración 2x del tampón *S1*, y se incubó a 37°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, para evitar la degradación del ADN plasmídico por exceso de digestión se adicionaron 10 µl de EDTA 0,5M pH8. El gel de agarosa y el tampón de electroforesis se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 8.1. Los plásmidos linearizados se separaron por PFGE en el sistema CHEF-DRIII con las siguientes condiciones: 14°C, 6 V/cm<sup>2</sup>, primera rampa de 5 h (pulsos de 5 a 25 seg) y segunda rampa de 15 h (pulsos de 30 a 45 seg). La visualización de bandas se realizó de nuevo

por tinción con GelRed y exposición a luz ultravioleta. El tamaño y el número de plásmidos de cada cepa se estableció por comparación de las bandas con los marcadores de peso molecular utilizados: Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1000,18 Kb) y Low Range PFG Marker (0,13-194 Kb) (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EE.UU.) (Figura 18a).

### 10.2. Transferencia y fijación del ADN a una membrana

Tras la tinción y visualización del gel, se procedió a fijar el ADN mediante exposición a luz ultravioleta durante 3 min. A continuación se realizó un lavado del gel con aproximadamente 200 ml de solución desnaturalizante (NaOH 0,5M: NaCl 1M) durante 30 min con agitación suave (150-175 pm). El tratamiento con NaOH rompe los puentes de hidrógeno entre las bases de manera que la sonda podrá hibridar con las regiones complementarias. Se eliminó la solución y se lavó el gel con 100 ml de agua destilada. Posteriormente se hicieron dos lavados de 15-20 min en agitación suave con 200 ml de solución neutralizante (NaCl 3M: Tris HCl 0,5; pH8).



**Figura 18.** a) Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1000,18 Kb) utilizado como marcador de peso molecular en la digestión con la enzima S1; b) *Southern Blot* para transferencia de ADN a una membrana de nylon.

Para hacer la transferencia a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) se utilizó el método *Southern Blot* (Figura 18b). Para ello se colocó el gel invertido (pocillos hacia abajo) sobre una placa de cristal. Se cortó la membrana de nylon acorde al tamaño del gel y se colocó sobre el gel

cuidadosamente para no hacer burbujas. Sobre la membrana se colocaron 3 filtros 3MM (papel *whatman*) del mismo tamaño y sobre éstos una pila de papel absorbente (6-8 cm). Por último, se colocó otra placa de vidrio y un peso (aproximadamente 500g). El *blot* se dejó toda la noche para que el ADN se transfiriera a la membrana por capilaridad. Pasado este tiempo, la membrana de nylon se dejó secar al aire y se fijó el ADN por exposición a luz ultravioleta durante 2 min.

### 10.3. Marcaje de sondas

Las sondas de ADN específicas de los genes de resistencia que se hibridaron con las membranas se obtuvieron por PCR utilizando el procedimiento habitual (apartados 4.2.1 y 4.2.2) pero empleando dNTPs marcados con digoxigenina (PCR DIG Labeling Mix, Roche, Mannheim, Germany).

También se prepararon sondas de hibridación para los marcadores de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker y LowRange PFG Marker) mediante marcaje con el DIG DNA Labeling Kit (Roche). La sonda se preparó a partir de ADN de fago  $\lambda$  (Roche) digerido con la enzima *PstI* (TaKaRaBio Inc.). Las condiciones de digestión para obtener una concentración final de ADN fago  $\lambda$  de 50 ng/ $\mu$ l fueron las siguientes: 50  $\mu$ g de ADN fago  $\lambda$  (167  $\mu$ l), 12  $\mu$ l de enzima *PstI*, 90  $\mu$ l de tampón de la enzima, y H<sub>2</sub>O ultrapura estéril hasta un volumen final de 1 ml. La solución se incubó a 37°C durante 18h. Para el marcaje de la sonda se preparó un volumen final de 15  $\mu$ l con ADN fago  $\lambda$  (5  $\mu$ l) y agua milliQ estéril (10  $\mu$ l), y se desnaturalizó hirviendo a 95°C durante 10 min. La mezcla se enfrió inmediatamente en hielo y a continuación se añadieron 2  $\mu$ l de mezcla de hexonucleótidos (Hexanucleotide Mix 10x conc.), 2  $\mu$ l de dNTPs marcados (DIG DNA LabelingMix 10x conc) y 1  $\mu$ l de enzima *klenow* (2 U/ $\mu$ l), y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente se añadieron 2  $\mu$ l de EDTA 0,2 M pH8 para parar la reacción. Se precipitó la mezcla con 2,5  $\mu$ l de LiCl 4M y 75  $\mu$ l de etanol absoluto y se conservó a -70°C durante 20 min. Se centrifugó 20 min a 10.000 rpm y se lavó el precipitado con 40  $\mu$ l de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar y se resuspendió el precipitado en 50  $\mu$ l de TE pH8 estéril.

#### 10.4. Hibridación y revelado

Los componentes de cada una de las soluciones empleadas durante la hibridación se recogen en la Tabla 11. La técnica de hibridación con digoxigenina incluye los siguientes pasos:

- Prehibridación: se introdujo la membrana de nylon con el ADN fijado en una botella del horno de hibridación. Se añadieron 25 ml de solución de hibridación previamente descongelada y atemperada a 60°C y se incubó en agitación durante 2 h a 60°C.

- Hervido de la sonda de ADN: se prepararon en un tubo eppendorf 15 µl de producto de PCR purificado, 2 µl de ADN fago  $\lambda$  y 50 µl de solución de hibridación, y se incubó en el termobloque a 95°C durante 10 min. Inmediatamente después la mezcla se incubó en hielo hasta su utilización.

- Hibridación: Se añadió la sonda marcada y hervida a la solución de hibridación de la botella con la membrana y se incubó a 60°C con agitación toda la noche.

- Lavados: se retiró la solución de hibridación y se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente y con agitación con 20 ml de solución de lavado 1. A continuación, se hicieron dos lavados de 15 min a 60°C y agitación con 20 ml de solución de lavado 2. A partir de este momento todos los lavados se hicieron a temperatura ambiente. Se aclaró la membrana con 20 ml de tampón I 1x durante 1 min. Seguidamente se añadieron 20 ml de tampón II y se incubó durante al menos 30 min. Para la detección inmunológica se añadieron 4 µl de anticuerpo conjugado (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) y se incubó 30 min. Se decantó el tampón II con anticuerpo y se hicieron 2 lavados de 15 min con 20 ml de tampón I 1x para quitar el anticuerpo no pegado. Por último, se lavó la membrana durante 3 min exactos con el tampón III.

- Revelado con CDP-star: Se preparó la solución de revelado en un tubo protegido de la luz con 5 ml de tampón III y 5 µl de agente revelador CDP-star (CDP-Star Chemiluminescence substrate, Roche). La membrana se secó cuidadosamente con papel absorbente y se colocó en una bolsa limpia. Se añadió la solución de revelado y se extendió rápida y uniformemente por toda la superficie de la membrana. La bolsa se selló y se conservó en total oscuridad durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se retiró de la membrana el exceso de solución y se procedió al revelado mediante exposición a

luz ultravioleta (20-40 min). El tiempo de exposición dependió de la intensidad de la señal y la cantidad de ADN fijado en la membrana.

**Tabla 11.** Soluciones empleadas en la hibridación y revelado de membranas.

<b>Soluciones:</b>	<b>Componentes:</b>
Solución de hibridación	50 ml de SSC 20x; 2 ml de laurylsarcosina al 10%; 400 µl de SDS 10%; 3 g de reactivo de bloqueo (Blocking Reagent, Roche) y hasta 200 ml de agua destilada estéril. Disolver en un baño a 70°C. Conservar congelado.
Solución de lavado 1	20 ml de SSC 20x, 2 ml de SDS 10% y hasta 200 ml con agua destilada estéril.
Solución de lavado 2	1 ml de SSC 20x, 2 ml de SDS 10% y hasta 200 ml con agua destilada estéril.
Tampón I 10x	121,14g de Tris HCl, 87,7g de NaCl, ajustar a pH7.5 con HCl y hasta 1 litro con agua destilada.
Tampón I 1x	100 ml de tampón I 10x y hasta 1 litro con agua destilada.
Tampón II	2 g de reactivo de bloqueo y hasta 200ml con tampón I 1x estéril. Disolver en un baño a 70°C. Conservar congelado.
Tampón III	4,84g de Tris HCl y 2,34g de NaCl y hasta 400ml con agua destilada estéril. Disolver en un baño a 70°C.
SSC 20x	175,25g de NaCl; 88,5 g de Tri-Na Citrato, y hasta 1 litro con agua destilada.

## **11. Caracterización de plásmidos portadores de carbapenemasas y BLEE**

Los plásmidos de las cepas que se consideraron más interesantes desde el punto de vista epidemiológico se tiparon mediante PCR y digestión con enzimas de restricción (RFLP).

### **11.1. Tipificación de plásmidos por PCR**

Los plásmidos portadores de los genes *bla*<sub>carbapenemasas</sub> se clasificaron en relación a su grupo de incompatibilidad (Inc) siguiendo el esquema establecido por Carattoli y cols. [180]. Este esquema denominado PBRT (“*PCR-based replicon typing*”) se basa en la identificación mediante PCR de los replicones de los principales grupos de incompatibilidad de los plásmidos más relacionados con enterobacterias: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Ig, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, y FIIA. Los cebadores y condiciones que se utilizaron para la amplificación de los 18 replicones se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Cebadores y condiciones de amplificación de los 18 replicones descritos para plásmidos de enterobacterias según el esquema PBRT [180].

PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Condiciones
PCR MÚLTIPLE HI1- HI2- I1	HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
	HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644 pb	
	HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
	I1-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139 pb	
	I1-R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
PCR MÚLTIPLE X- L/M-N	X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	X-R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
	L/M-F	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG	785 pb	
	L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
	N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559 pb	
	N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
PCR MÚLTIPLE FIA-FIB-W	FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
	FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702 pb	
	FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
	W-F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242 pb	
	W-R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
PCR MÚLTIPLE Y- P-FIC	Y-F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT		
	P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534 pb	
	P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
	FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262 pb	
	FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
PCR MÚLTIPLE A/C-T-FIIAs	A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAAGACCTGGA	465 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
	T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750 pb	
	T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
	FIIAs-F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270 pb	
	FIIAs-R	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
PCR SIMPLE K	K-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	K-R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
PCR SIMPLE B/O	B/O-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	159 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	B/O-R	TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA		
PCR SIMPLE F	F-F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270 pb	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 52°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	F-R	GAAGATCAGTCACACCATCC		

La caracterización de los plásmidos IncL/M se llevó a cabo amplificando por PCR 3 genes conservados de la estructura del plásmido, *repA*, *traU* y *parA*, que codifican proteínas implicadas en la replicación, transferencia y partición del plásmido, respectivamente. Los cebadores y condiciones utilizados para cada gen se muestran en la Tabla 13.

Los plásmidos asociados al grupo IncL/M fueron posteriormente diferenciados en las familias IncL o IncM, basándonos en una actualización del esquema PBRT (“*PBRT update*” [181]). Los cebadores y condiciones empleados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 13.** Cebadores y condiciones de amplificación de genes conservados de la estructura de plásmidos IncL/M [142].

PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Condiciones
<i>repA</i>	RepA-A	GACATTGAGTCAGTAGAAGG	900 pb	1 ciclo de 7 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C
	RepA-B	CGTGCAGTTCGTCTTTCGGC		
<i>traU</i>	TraU-A	ATCTCACGCAATCTTACGTC	400 pb	
	TraU-B	TCGCGTCATGCGTGATCTTC		
<i>parA</i>	ParA-A	GCAGTGAAAACGTTGATCAG	500 pb	
	ParA-B	GATCGCAATGCGTCTTGGTG		

**Tabla 14.** Cebadores y condiciones de amplificación de los grupos IncL e IncM [181].

PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones
IncL (854 pb) e	L-Fw	CGGAACCGACATGTGCCTACT	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	L/M-Rv	GAACTCCGGCGAAAGACCTTC	
IncM (738 pb)	M-Fw	GGATGAAAACACTATCAGATCTGAA	

## 11.2. Análisis del perfil plasmídico (RFLP)

La caracterización de los plásmidos portadores de carbapenemasas incluyó el análisis de los patrones de restricción obtenidos por digestión con distintas enzimas de restricción: *DraI*, *HpaI*, *EcoRI*, y *PstI* (TaKaRa BioInc, Shiga, Japón). Para este experimento se utilizó el ADN plasmídico purificado en el apartado 9.2. Las condiciones de la digestión enzimática para un volumen final de 20 µl fueron las siguientes: 2-4 µl (30-40 U) de enzima de digestión, 2 µl de tampón 10x de la enzima, 10 µl de ADN plasmídico y 4-6 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Las mezclas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% y los fragmentos de ADN

plasmídico se separaron por electroforesis de corriente continua a 100 V durante 4 h. El gel se tiñó con GelRed y se fotografió con el equipo transiluminador.

## **12. Clonaje de genes de resistencia**

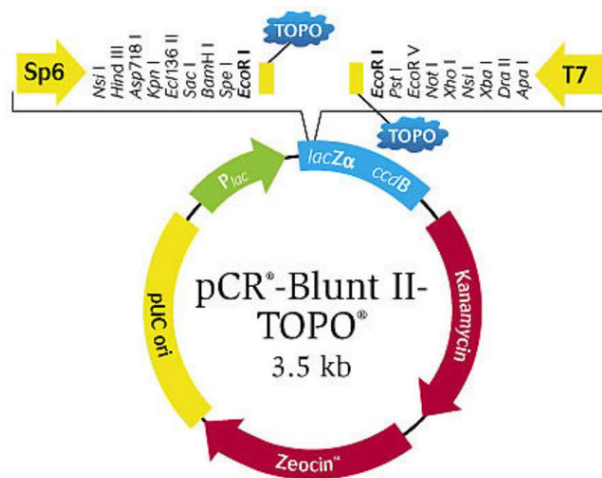
La caracterización de las nuevas variantes de genes de resistencia detectadas en los aislados recogidos durante este estudio, se realizó por experimentos de clonación y mutagénesis dirigida.

### **12.1. Clonación de genes en vectores de expresión**

La clonación de genes en vectores de expresión se llevó a cabo con el kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, e incluyó los siguientes pasos:

- Amplificación de la nueva variante: se amplificó por PCR y se purificó el gen a estudiar siguiendo los procedimientos del apartado 4.2.2.
- Eliminación de A del extremo 3': la eliminación de las colas de poliadenina (poli-A) resultantes de la amplificación se llevó a cabo con una T4 DNA Ligasa (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Esta enzima cataliza la unión covalente entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de dos cadenas de ADN polinucleotídicas dejando extremos romos. Se preparó un volumen final de 7 µl con 5 µl del producto amplificado, 1 µl de T4 DNA Ligasa y 1 µl de dNTPs. La mezcla se incubó a 4°C durante 18 h.
- Clonación: se usó como vector de expresión el plásmido pCR-BluntII-TOPO (3519 pb) (Thermo Fisher Scientific Inc.) (Figura 19). Para cada reacción de ligación del inserto al vector se preparó un tubo con 4 µl de producto de PCR, 1 µl del reactivo “*Salt solution*” (proporcionado por el kit) y 1 µl de plásmido, y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Las reacciones se incubaron en hielo hasta su transformación. Se utilizó un control positivo de la reacción de clonación (proporcionado por el kit) y un control negativo (sin amplificado).
- Transformación por choque térmico: se utilizaron células químicas competentes *NEB® 5-alpha Competent E. coli* (New England Biolabs, Inc.). Se añadió 10-100 ng/ml de ADN plasmídico a cada vial de 50 µl de células y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se incubaron a 42°C durante 30 seg (choque térmico) e inmediatamente después se conservaron en hielo durante 2 min. A continuación se añadió a cada tubo 250 µl de medio de cultivo SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10

mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa) precalentado a 37°C y se incubaron a 37°C con agitación (225 rpm) durante 2 h. Para la selección de transformantes se plaquearon 200 µl de cada cultivo en placas de LB agar suplementadas con kanamicina (50 µg/ml), ampicilina (30 µg/ml) e IPTG-XGal (80 µg/ml) y se incubaron las placas a 37°C durante 24 h. Como control positivo de transformación se utilizó el plásmido pUC19 DNA (10 pg/µl), que se seleccionó en placas con ampicilina (30 µg/ml). Para los controles de clonación se emplearon placas de selección suplementadas con kanamicina (50 µg/ml) y IPTG-XGal (80 µg/ml). Las placas de selección se suplementaron con IPTG-XGal para identificar las colonias de bacterias transformadas que habían captado el vector de expresión con el inserto. El vector pCR-BluntII-TOPO utilizado para la clonación (Figura 19) tiene el sitio de inserción del gen a estudiar localizado entre el gen *lacZα* (codificador de la enzima β-galactosidasa) y su promotor (*P<sub>lac</sub>*). La β-galactosidasa, en presencia del inductor IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido-IPTG), hidroliza el XGal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido-X-Gal) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol (compuesto azul insoluble). Debido a este mecanismo, las colonias que hayan transformado el vector sin el inserto, en presencia de IPTG-XGal expresarán la β-galactosidasa y crecerán de color azul. Al contrario, las colonias que hayan captado el vector con el inserto, no expresarán el gen *lacZ* y serán de color blanco. La presencia de los genes clonados en las células transformantes (colonias blancas) se confirmó por PCR (procedimientos de los apartados 4.2.1 y 4.2.2) y se guardaron en glicerol 40% a -70°C.



**Figura 19.** Mapa genético del vector de expresión pCR-BluntII-TOPO.

## 12.2. Mutagénesis dirigida

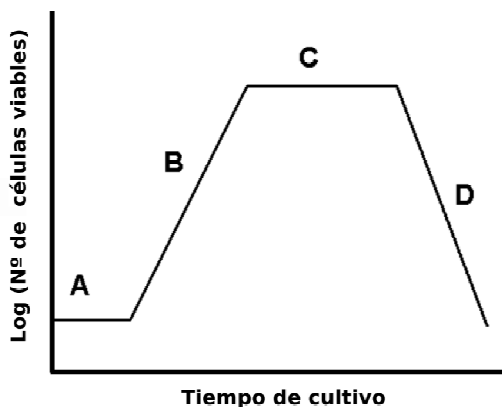
La mutagénesis dirigida consiste en la incorporación de un cambio nucleotídico específico en un determinado gen, con el fin de identificar qué efecto tiene la mutación sobre el fenotipo de dicho gen. Este experimento se llevó a cabo para estudiar el perfil de sensibilidad a antibióticos de determinados genes de resistencia respecto a las nuevas variantes génicas descritas durante este estudio. Para este experimento se utilizó el vector de expresión pCR-BluntII-TOPO del apartado anterior y el kit Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, Inc). Se realizaron los siguientes pasos:

- Extracción de ADN plasmídico: se purificó el ADN plasmídico de la cepa portadora del gen de estudio con el kit QiAPrep Spin Miniprep Kit High-Yield Protocol (Qiagen).
- Diseño de oligos específicos: se utilizó la herramienta NEBasechanger para diseñar, a partir del gen de estudio, cebadores específicos que incluían la mutación nucleotídica que queríamos introducir en el ADN plasmídico.
- Amplificación de ADN plasmídico con la mutación: la reacción de amplificación por PCR se realizó empleando los reactivos del kit Q5® Site-Directed Mutagenesis y los oligos diseñados en el apartado anterior. Se preparó una reacción con un volumen final de 25 µl con los siguientes componentes: 12,5 µl Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix, 1,25 µl de cada uno de los oligos, 1 µl de ADN purificado (1-25 ng/µl), y 9 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 30 seg a 98°C; 25 ciclos de 10 seg a 98°C, 30 min a 72°C y 2 min a 72°C; y una extensión final de 2 min a 72°C.
- Reacción KLD: el producto amplificado se incubó con la mezcla de enzimas KLD (*Kinase-Ligase-DpnI*) proporcionada por el kit. Se preparó un volumen final de 10 µl con 1 µl de producto de PCR, 1 µl de enzima KLD, 5 µl de tampón de la enzima y 3 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla KLD incorpora una kinasa que añade grupos 5'-fosfato en los extremos de las cadenas de ADN, una ligasa que establece uniones covalentes entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de las dos hebras de ADN, y una enzima DpnI, que degrada el ADN metilado. La digestión con KLD permite una rápida circularización del producto de PCR (no metilado) y la eliminación del ADN molde (metilado).

- Transformación por choque térmico: el plásmido con la mutación se transformó de nuevo en células químicas competentes *E. coli* 5-alpha (New England Biolabs, Inc.) siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 12.1. Los transformantes con el gen mutado se confirmaron por PCR y secuenciación (procedimientos 7.1 y 7.2).

### **13. Estudio del efecto de la resistencia sobre coste biológico**

El crecimiento bacteriano hace referencia al aumento del número de células de una especie microbiana a lo largo del tiempo en un medio de cultivo provisto de nutrientes y bajo las condiciones de temperatura, pH y concentración de gases requeridos por la bacteria.



**Figura 20.** Curva de crecimiento bacteriano (A=fase de latencia, B=fase exponencial; C=fase estacionaria y D=fase de muerte).

La curva del crecimiento bacteriano (Figura 20) es la representación gráfica del número de células viables por mililitro que existen en un medio de cultivo líquido inoculado por un cultivo crecido previamente hasta la saturación. Esta curva tiene 4 fases:

- 1) Fase de latencia o período de adaptación en el que las células se adaptan a las condiciones de crecimiento y no se dividen.
- 2) Fase exponencial o fase logarítmica en el que la actividad metabólica es máxima, las células empiezan a dividirse de forma constante y el número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual.
- 3) Fase estacionaria, en la que la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos.

4) Fase de muerte o de declinación, en la que las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren.

La persistencia de las bacterias resistentes y su viabilidad frente a otras bacterias está condicionada por la ausencia de un coste biológico (“*fitness*”) asociado a la presencia de dichos determinantes genéticos de resistencia. Las curvas de crecimiento permiten conocer la tasa de crecimiento y la densidad máxima que alcanzan las bacterias ante unas condiciones determinadas, de manera que se puede estimar su coste biológico.

El objetivo de este experimento fue estudiar la estabilidad de los plásmidos portadores de carbapenemasas en determinados clones e inferir su efecto real sobre el *fitness* bacteriano. Para ello se calcularon y compararon las tasas de crecimiento relativo de las cepas salvajes con plásmidos portadores de carbapenemasas (“*wildtypes*”), las células transconjugantes/transformantes obtenidas en los apartados 9.1 y 9.2, y las células curadas (sin plásmido).

### 13.1. Estudio de la estabilidad de los plásmidos

Los procedimientos empleados para inducir la pérdida o curación de los plásmidos portadores de carbapenemasas en las bacterias de este estudio se describen a continuación:

- Temperatura de crecimiento elevada: se realizaron cultivos sucesivos de 16 colonias diferentes (16 linajes) de cada una de las cepas en placas de LB agar sin antibiótico incubadas a 42°C durante 18 h. Tras 7 días, colonias aisladas de cada uno de los linajes fueron reestriadas por duplicado en placas LB agar con y sin antibiótico (ertapenem 0,5 µg/ml). El mismo procedimiento se realizó en paralelo a 37°C. La pérdida del plásmido se confirma con aquellas colonias que crecen en la placa sin antibiótico pero que no lo hacen en la placa correspondiente con antibiótico.

- Electroporación sin ADN: la electroporación consiste en aplicar un campo eléctrico a las células con el fin de aumentar la permeabilidad de su membrana, de manera que se pueda introducir material genético (ADN plasmídico) en su interior. Sin embargo, durante este ensayo se aplicó a las células un choque eléctrico con el fin de generar poros en la membrana que permitieran la salida al exterior del ADN plasmídico. La preparación de las células electrocompetentes a partir de las células con plásmido y la

electroporación sin ADN se realizó siguiendo los mismos procedimientos que en el apartado 9.3.

### **13.2. Cinética de crecimiento bacteriano**

El crecimiento bacteriano se determinó por cuantificación de la densidad óptica (DO) empleando el sistema Bioscreen C Analyzer (OyGrowth Curves Ab. Ltd.). Para estos ensayos se hicieron 4 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas de cada una de las cepas. Se inocularon 4 cultivos de 1 ml de LB caldo con 4 colonias diferentes de cada cepa (réplicas biológicas) y se incubaron de 12-16 h a 37°C con agitación. Posteriormente se prepararon diluciones 1:1000 (1µl de cultivo en 999 µl de medio LB caldo) y se dispensaron 300 µl de cada cultivo diluido en dos pocillos de una placa de bioscreen de 96 pocillos (réplicas técnicas). Al menos dos pocillos por placa se sembraron con medio de cultivo sin bacteria (control negativo). Como microorganismo de referencia se incluyó en cada placa la cepa *E. coli* J53 Azide®. Las condiciones de medición del equipo Bioscreen C Analyzer fueron las siguientes: incubación a 37°C durante 16 h con agitación continua, con un intervalo de medición de 4 min, y una longitud de onda del filtro de 600 nm. Las tasas de crecimiento relativo se calcularon dividiendo la tasa de crecimiento de la cepa correspondiente por la tasa de crecimiento promedio de la cepa *wildtype* del mismo experimento.

## **14. Secuenciación del genoma completo**

Tras la caracterización de los genes de resistencia de todas las cepas de este estudio, se procedió a la purificación y secuenciación del genoma completo (WGS, del inglés “*Whole Genome Sequencing*”) de aquellos clones que se consideraron de mayor interés.

### **14.1. Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo con el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard® (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se partió de cultivos de LB caldo de 3ml crecidos durante 18 h en presencia de ertapenem (0,5 µg/ml). La adecuada purificación del genoma se confirmó mediante PCR y electroforesis en corriente continua (apartados 4.2.1 y 4.2.2), y medición de la concentración de ADN con los equipos NanoDrop™ 1000 y Qubit™ Fluorometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

### 14.2. Secuenciación masiva

La secuenciación completa del genoma (WGS) se realizó utilizando la plataforma Genome Analyzer Iix Illumina HiSeq-2500 (Illumina, San Diego, CA).

### 14.3. Análisis bioinformático

El ensamblaje de los genomas se realizó con el programa SPAdes (v.3.5.0) [182] y su calidad se evaluó mediante la herramienta QUAST [183].

La presencia de genes de resistencia a antibióticos y diversidad de plásmidos se estudió utilizando bases de datos de genes y herramientas genómicas *in silico* (ARG-ANNOT y PlasmidFinder, respectivamente). El contenido plasmídico se analizó con la herramienta PLACNET (PlasmidConstellation Network-PLACNET) [184] en combinación con plasmidSPAdes (v.3.5.0) [185]. Los *contigs* resultantes se anotaron con la herramienta Prokka (v1.12) y sus funciones génicas se clasificaron de acuerdo con la base de datos de grupos ortólogos de proteínas (COG) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). La comparación de las secuencias de los genomas con secuencias conocidas de la base de datos NCBI se realizó empleando las herramientas BLASTN y BLASTP.

Para inferir la filogenia, se obtuvo el genoma común (“*core genome*”) de las cepas disponibles en la base de datos de NCBI (incluidos nuestros aislados). La detección de variantes (“*variant calling*”) y el alineamiento de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, “*Single nucleotide polymorphisms*”) se realizó utilizando la herramienta Snippy v3.1 (<https://github.com/tseemann/snippy>). Para generar un árbol de máxima verosimilitud se utilizó el software IQ-tree, seleccionando la opción de detección automática para emplear el mejor modelo evolutivo [186]. El trazado del árbol se realizó mediante la aplicación iTOL [187].

## 15. Análisis estadístico

Las diferencias observadas en las tasas de incidencia acumulada de EPC a lo largo del estudio se evaluaron con una regresión de *Poisson* elaborada mediante el software STATA (Stata Statistical Software: Release 11. College Station, TX: Stata Corp LP). Los análisis estadísticos restantes se realizaron empleando el software RStudio (RStudio, Boston, MA, <http://www.rstudio.com/>). Las diferencias entre las prevalencias

y las frecuencias de determinados clones entre los diferentes servicios y períodos se analizaron aplicando la prueba  $\chi^2$  de Pearson y el test exacto de Fisher, respectivamente. La comparación de medianas de los datos cuantitativos se realizó apropiadamente mediante las pruebas T Student y U de Mann-Whitney. La significación estadística entre los distintos índices de diversidad (SDI) y las diferentes tasas de crecimiento relativo se estimó mediante la prueba T Student pareada. En todos los casos el valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

---

## RESULTADOS

---

*“Un viaje de mil millas comienza con un solo paso”*

Lao Tse



### **Estudio R-GNOSIS: Epidemiología y estudio microbiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas.**

En este Capítulo se estudia la epidemiología y la diversidad de especies de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y enterobacterias productoras de BLEE (E-BLEE) aisladas en el Hospital Universitario Ramón y Cajal durante el proyecto R-GNOSIS. También se caracterizaron los genes de resistencia de la población de EPC, así como sus perfiles de sensibilidad antibiótica y los cambios en la diversidad clonal a lo largo del tiempo de estudio.



## 1. Epidemiología de las EPC y E-BLEE durante el proyecto R-GNOSIS

### 1.1. Incidencia de pacientes colonizados por EPC y E-BLEE

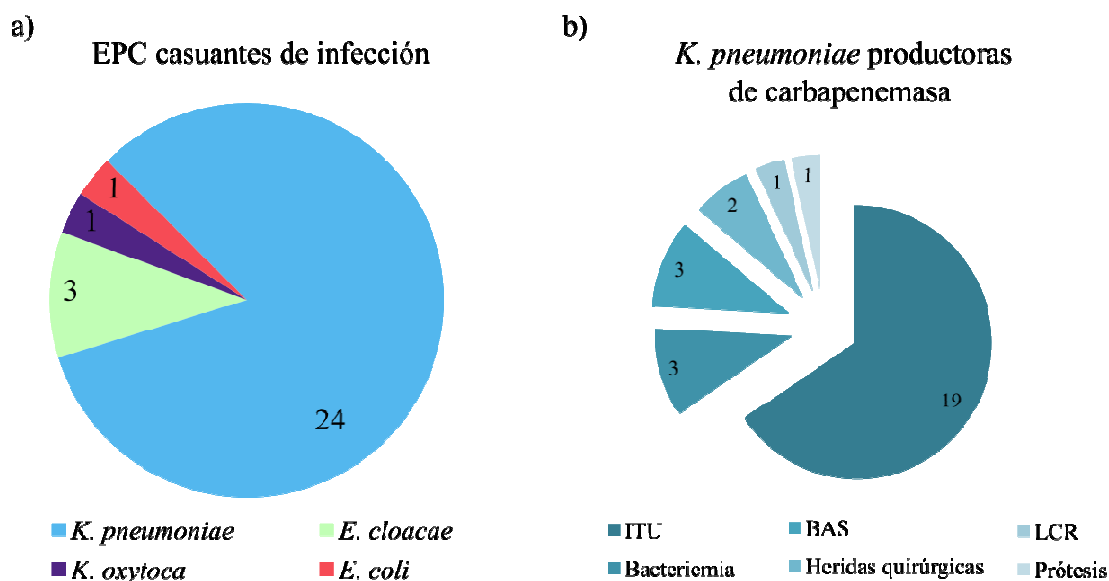
Durante el estudio R-GNOSIS (marzo de 2014 a marzo de 2016), se recogieron un total de 15.556 torundas rectales pertenecientes a 8.209 pacientes ingresados en dos unidades médicas (G=Gastroenterología y P=Neumología) y dos unidades quirúrgicas (N=Neurocirugía y U=Urología) del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Durante este periodo se detectaron 198 EPC (no duplicados) procedentes de 162 pacientes (2%; IC 95% 1,7%-2,3%) y 730 aislados productores de BLEE (no duplicados) pertenecientes a 687 pacientes (8,4%; IC 95% 7,8%-9%). El 15,3% (105/687) de los pacientes colonizados por E-BLEE estuvieron simultáneamente colonizados por EPC. En el apartado 1.3 se detallan las especies bacterianas con carbapenemasas y BLEE.

El rango de edad de los pacientes colonizados con EPC fue de 26 a 98 años, siendo la mediana de edad del grupo igual a 74 años. No se encontraron diferencias significativas en la edad de los pacientes entre los distintos servicios. El 60% (98/162) de los pacientes colonizados con EPC eran hombres.

El 17,3% (28/162) de los pacientes colonizados por EPC desarrollaron una infección causada por el mismo microorganismo. Las infecciones más frecuentes fueron las del tracto urinario (ITU) (78,6%; 22/28), seguidas de bacteriemias (10,7%; 3/28), infecciones respiratorias (10,7%; 3/28) e infecciones de heridas quirúrgicas (7,14%; 2/28). En dos pacientes las EPC fueron causantes de meningitis postquirúrgica (3,57%; 1/28) e infección protésica (3,57%; 1/28). *K. pneumoniae* fue el microorganismo aislado en la mayor parte de las muestras clínicas (85,7%; 24/28) (Figura 21). Las especies *E. cloacae* (10,7%; 3/28) y *K. oxytoca* (3,6%; 1/28) se detectaron causando ITU, mientras que *E. coli* (3,6%; 1/28) se aisló en una herida quirúrgica junto a *K. pneumoniae*.

En general, la mediana de días de ingreso (LOS, “*Length of stay*”) de los pacientes colonizados por EPC fue de 15,5 días (rango 1-215 días), aunque observamos diferencias entre las unidades médicas (12,5 días, rango 1-161 días) y las quirúrgicas (25,5 días, rango 1-215 días) ( $p<0,01$ ). Al analizar los datos de los cuatro servicios participantes, observamos que los ingresos en la unidad de Neurocirugía fueron más

largos que en el resto de servicios [ $G_{LOS}$ = 16 días (1-131);  $P_{LOS}$ = 11 días (1-161);  $N_{LOS}$ =65 días (6-215); y  $U_{LOS}$ =14 días (1-105)] ( $p<0,01$ ).



**Figura 21.** a) EPC causantes de infección entre los pacientes colonizados del estudio R-GNOSIS; b) muestras clínicas con aislamiento de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa. (ITU=Infección del tracto urinario; BAS=Broncoaspirado; LCR= Líquido cefalorraquídeo).

En un total de 43 pacientes (26,6%; 43/162) la colonización por EPC se detectó al ingreso (0,5%, 43/8209). La revisión de las historias clínicas mostró que 37 de estos pacientes (22,8%; 37/162) habían tenido ingresos previos en nuestro centro durante el año anterior y además en 2 de los casos se pudo constatar que la colonización ocurrió durante dichas hospitalizaciones. Finalmente, los 6 pacientes restantes colonizados al ingreso (3,7%; 6/162) eran enfermos crónicos derivados de otros hospitales o institucionalizados en centros de cuidados sanitarios.

Por otro lado, en 91 pacientes (56,2%, 91/162) el cultivo recogido al ingreso fue negativo y la colonización con EPC se detectó durante ese mismo ingreso en posteriores muestras (1,1%, 91/8.209). Para este grupo de pacientes, la mediana de días de ingreso (LOS) fue 27 días (rango 3-170 días) y también se demostraron diferencias entre los servicios médicos (21 días, rango 3-135 días) y quirúrgicos (49 días, rango 4-170 días) ( $p<0,01$ ). De nuevo, se observó que los ingresos en el servicio de Neurocirugía eran más prolongados que en el resto de las unidades [ $G_{LOS}$ = 26,5 días (3-131);  $P_{LOS}$ = 13 días (4-135);  $N_{LOS}$ =65,5 días (8-170); y  $U_{LOS}$ =18 días (4-105)] ( $p<0,01$ ). En estos pacientes,

la mediana de días de ingreso transcurridos hasta la detección de la colonización por EPC (LOS-1) fue de 18 días (rango 1-130 días), encontrándose de nuevo diferencias entre los servicios médicos (14 días, rango 6-129 días) y quirúrgicos (29 días, rango 1-130 días) ( $p < 0,05$ ). Las pruebas estadísticas demostraron de nuevo diferencias significativas entre la unidad de Neurocirugía y los restantes servicios [ $G_{LOS-1} = 16$  días (6-48);  $P_{LOS-1} = 11$  días (7-129);  $N_{LOS-1} = 39,5$  días (10-130); y  $U_{LOS-1} = 15$  días (2-56)] ( $p < 0,01$ ).

En 28 pacientes no se recogió torunda al ingreso, pero se observó crecimiento con EPC en el primer cultivo semanal recogido. De estos pacientes, 23 habían tenido ingresos previos en nuestro hospital y en 6 de los casos se confirmó la detección de EPC durante dicha hospitalización.

Por otro lado, en 91 pacientes se recogió una torunda al alta, y en 81 de ellos se confirmó la colonización con CPE, mientras que en 10 pacientes el cultivo fue negativo (11%, 10/91).

Considerando el total de pacientes, el porcentaje de colonizados con EPC permaneció prácticamente invariable a lo largo del tiempo. Asimismo, mediante una regresión de *Poisson* se confirmó que la variación mensual en la incidencia de EPC a lo largo del estudio en los cuatro servicios no fue significativa ( $p = 0,41$ ; IRR=0,01; IC 95% 0,98-1,02).

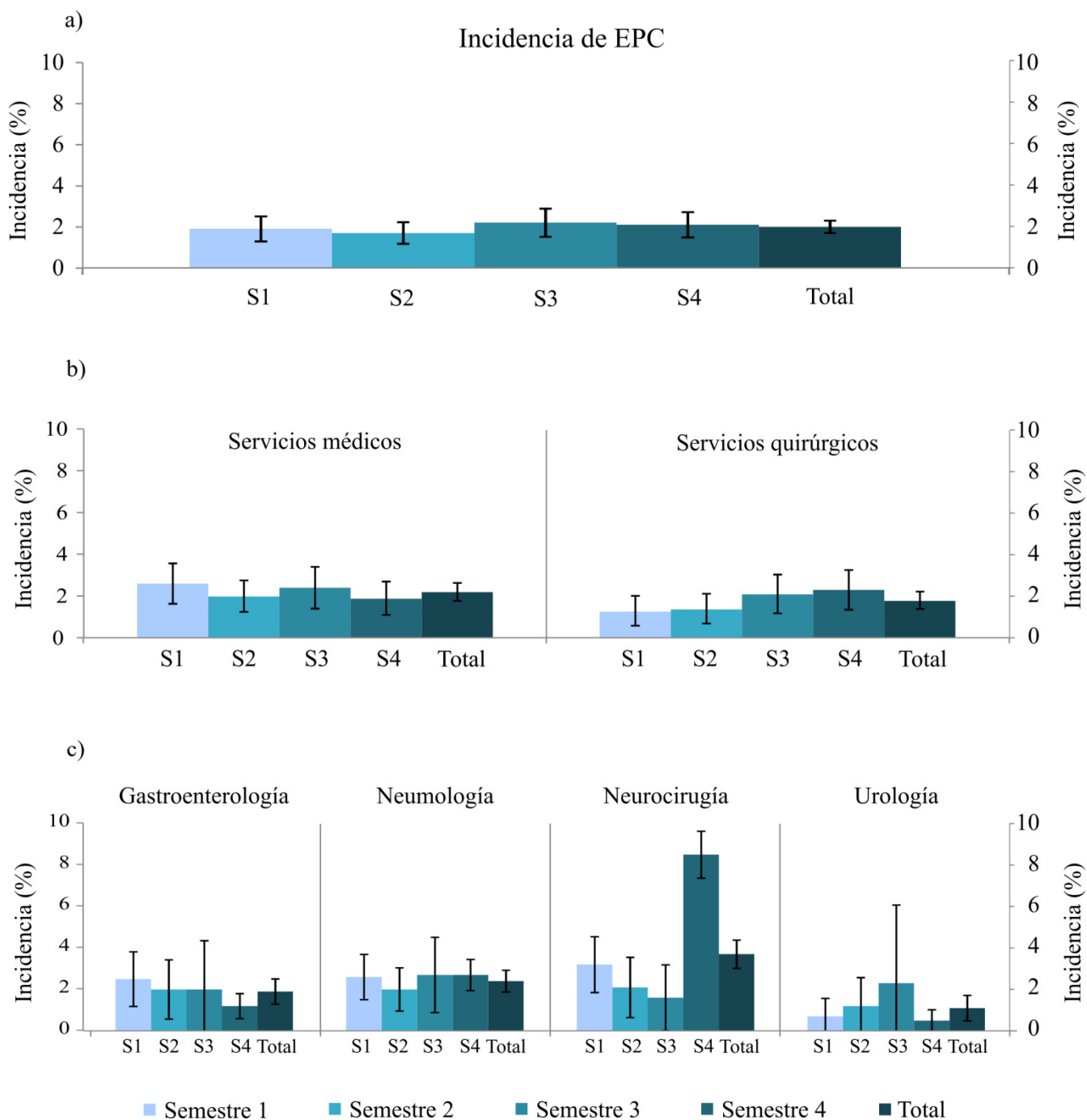
A pesar de que el proyecto R-GNOSIS estableció dos periodos de estudio (periodo 1 y 2), con el objetivo de analizar y comparar de manera secuencial los datos recogidos se definieron 4 semestres como series temporales [semestre 1 (S1)= marzo 2014-agosto 2014; semestre 2 (S2)= septiembre 2014-marzo 2015; semestre 3 (S3)= abril 2015-septiembre 2015; y semestre 4 (S4)= octubre 2015-marzo 2016]. El mes de marzo del año 2015, periodo de lavado del estudio entre los períodos 1 y 2, se incluyó en el semestre 2. El número total de aislados EPC y E-BLEE recogidos durante el estudio, y la incidencia y número de pacientes colonizados que se detectaron en cada tipo de unidad hospitalaria y en cada uno de los servicios se muestra por semestres en la Tabla 15. Los porcentajes de incidencia de pacientes colonizados por EPC de cada semestre se representan en la Figura 22.

**Tabla 15.** Distribución semestral de los casos de colonización con EPC y E-BLEE durante el estudio R-GNOSIS.

Servicio	Semestre <sup>1</sup>	N° pacientes (cribado)	EPC				E-BLEE			
			Aislados	Pacientes	Incidencia (%)	± IC 95 %	Aislados	Pacientes	Incidencia (%)	± IC 95 %
Gastroenterología	S1	550	17	14	2,5%	1,32	54	50	9,1%	2,40
	S2	615	13	12	2,0%	1,09	71	67	10,9%	2,46
	S3	408	10	8	2,0%	1,35	58	51	12,5%	3,21
	S4	591	8	7	1,2%	0,87	53	51	8,6%	2,26
	<b>TOTAL</b>	<b>2164</b>	<b>48</b>	<b>41</b>	<b>1,9%</b>	<b>0,57</b>	<b>236</b>	<b>219</b>	<b>10,1%</b>	<b>1,27</b>
Neumología	S1	469	13	12	2,6%	1,43	51	50	10,7%	2,79
	S2	697	24	14	2,0%	1,04	46	42	6,0%	1,77
	S3	480	16	13	2,7%	1,45	58	56	11,7%	2,87
	S4	527	15	14	2,7%	1,37	28	26	4,9%	1,85
	<b>TOTAL</b>	<b>2173</b>	<b>68</b>	<b>53</b>	<b>2,4%</b>	<b>0,65</b>	<b>183</b>	<b>174</b>	<b>8,0%</b>	<b>1,14</b>
Total SM	S1	1019	30	26	2,6%	1,0	105	100	9,8%	1,83
	S2	1312	37	26	2,0%	0,8	117	109	8,3%	1,49
	S3	888	26	21	2,4%	1,0	116	107	12,0%	2,14
	S4	1118	23	21	1,9%	0,8	81	77	6,9%	1,48
	<b>TOTAL</b>	<b>4337</b>	<b>116</b>	<b>94</b>	<b>2,2%</b>	<b>0,4</b>	<b>419</b>	<b>393</b>	<b>9,1%</b>	<b>0,85</b>
Neurocirugía	S1	217	7	7	3,2%	2,35	19	18	8,3%	3,67
	S2	239	7	5	2,1%	1,81	21	21	8,8%	3,59
	S3	245	4	4	1,6%	1,59	21	19	7,8%	3,35
	S4	211	24	18	8,5%	3,77	18	18	8,5%	3,77
	<b>TOTAL</b>	<b>912</b>	<b>42</b>	<b>34</b>	<b>3,7%</b>	<b>1,23</b>	<b>79</b>	<b>76</b>	<b>8,3%</b>	<b>1,79</b>
Urología	S1	729	6	5	0,7%	0,60	65	62	8,5%	2,02
	S2	821	11	10	1,2%	0,75	60	58	7,1%	1,75
	S3	664	18	15	2,3%	1,13	67	58	8,7%	2,15
	S4	746	5	4	0,5%	0,52	40	40	5,4%	1,62
	<b>TOTAL</b>	<b>2960</b>	<b>40</b>	<b>34</b>	<b>1,1%</b>	<b>0,38</b>	<b>232</b>	<b>218</b>	<b>7,4%</b>	<b>0,94</b>
Total SQ	S1	946	13	12	1,3%	0,7	84	80	8,5%	1,77
	S2	1060	18	15	1,4%	0,7	81	79	7,5%	1,58
	S3	909	22	19	2,1%	0,9	88	77	8,5%	1,81
	S4	957	29	22	2,3%	0,9	58	58	6,1%	1,51
	<b>TOTAL</b>	<b>3872</b>	<b>82</b>	<b>68</b>	<b>1,8%</b>	<b>0,4</b>	<b>311</b>	<b>294</b>	<b>7,6%</b>	<b>0,83</b>
<b>TOTAL</b>	S1	1965	43	38	1,9%	0,6	189	180	9,2%	1,28
	S2	2372	55	41	1,7%	0,5	198	188	7,9%	1,09
	S3	1797	48	40	2,2%	0,7	204	184	10,2%	1,40
	S4	2075	52	43	0,2%	0,6	139	135	0,7%	0,35
	<b>TOTAL</b>	<b>8209</b>	<b>198</b>	<b>162</b>	<b>2,0%</b>	<b>0,3</b>	<b>730</b>	<b>687</b>	<b>8,4%</b>	<b>0,60</b>

<sup>1</sup>Semestres= S1 (marzo 2014-agosto 2014), S2 (septiembre 2014-marzo 2015), S3 (abril 2015-septiembre 2015) y S4 (octubre 2015-marzo 2016)

SM=Servicios médicos (Gastroenterología+Neumología); SQ= Servicios quirúrgicos (Neurocirugía+Urología).



**Figura 22.** Incidencia semestral de EPC durante el estudio R-GNOSIS.

- a) Incidencia de EPC por semestres.
- b) Incidencia de EPC por tipo de servicio.
- c) Incidencia de EPC en cada servicio.

### 1.2. Incidencia de EPC y E-BLEE con y sin precauciones de contacto

Como se ha descrito en el apartado de material y métodos, durante el proyecto R-GNOSIS se definieron dos periodos de intervención, periodo 1 (P1=marzo 2014-febrero 2015) y periodo 2 (P2=abril 2015-marzo 2016), en los cuales se implementó

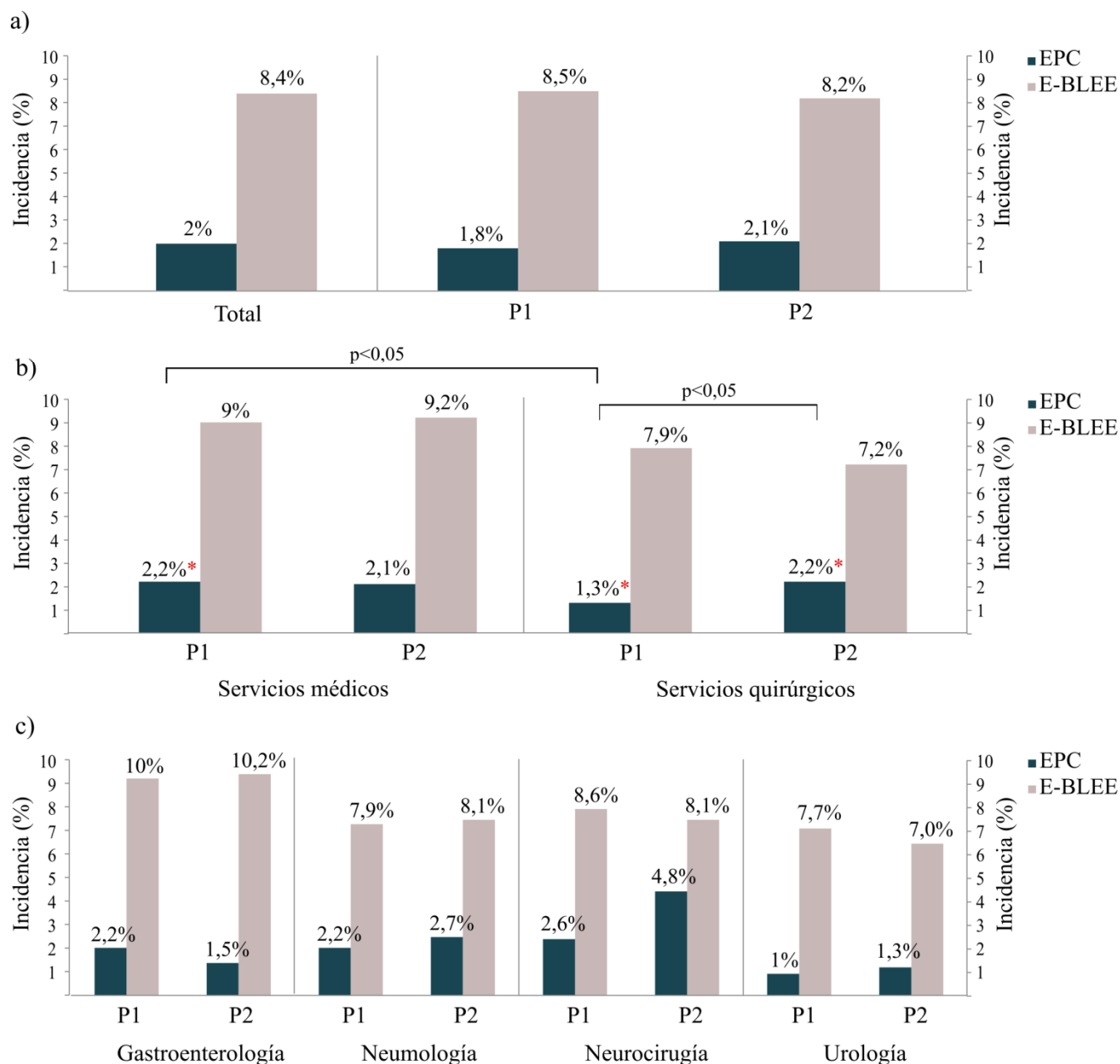
alternativamente en los servicios médicos y quirúrgicos la estrategia de aislamiento de contacto para portadores de E-BLEE. Debemos destacar que en todos los casos de colonización y/o infección con EPC se llevaron a cabo las medidas de control y prevención de la infección que indica las recomendaciones de la CM [167]. En el análisis que se detalla a continuación se incluyen los casos nuevos de colonización con EPC detectados durante el periodo de lavado (marzo 2015) como parte del periodo 1.

Durante el primer periodo, entre el total de pacientes muestreados se detectó un 1,8% (79/4.337) de colonización con EPC. En el segundo periodo se observó un aumento no significativo de esta cifra, alcanzando un 2,1% (83/3.872). Por otro lado, el porcentaje de portadores fecales de BLEE disminuyó entre el primer periodo [8,5% (368/4.337)] y el segundo [8,2% (319/3.872)], aunque de nuevo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los porcentajes de incidencia se recogen en la Tabla 16 y se representan en la Figura 23a.

Por otra parte, al analizar los datos de incidencia en los distintos servicios en cada periodo de estudio, se encontraron diferencias significativas (Figura 23b y Tabla 16). Durante el primer período de intervención, las medidas de aislamiento de contacto de portadores de E-BLEE se implementaron en los servicios quirúrgicos. Durante este periodo, la tasa de colonización por EPC fue mayor en las unidades médicas (2,2%; 52/2.331) que en las unidades quirúrgicas (1,3%; 27/2.006) ( $p < 0,05$ ). Durante el mismo periodo, la tasa de portadores de E-BLEE fue también superior en las unidades médicas (9%; 209/2.331) respecto a las quirúrgicas (7,9%; 159/2.006). En el segundo periodo, la estrategia de intervención se invirtió y las medidas de aislamiento de portadores de E-BLEE se aplicaron en las unidades médicas. Durante esta segunda parte del estudio, se observó una incidencia similar de portadores de EPC en los servicios médicos (2,1%, 42/2006) y quirúrgicos (2,2%, 41/1866), mientras que se registró de nuevo una mayor incidencia de pacientes colonizados por E-BLEE en las unidades médicas (9,2%; 184/2006) que en las quirúrgicas (7,2%; 135/1866) ( $p < 0,01$ ).

Si comparamos estos mismos datos de incidencia de EPC y E-BLEE a lo largo del tiempo en cada tipo de unidad encontramos también variaciones significativas. En los servicios quirúrgicos, a pesar de la retirada de las medidas de aislamiento de contacto, durante el segundo periodo se registró una disminución en la tasa de portadores de E-BLEE (7,9%-7,2%), y un aumento de pacientes colonizados por EPC (1,3%-2,2%)

( $p < 0,05$ ). Por el contrario, en los servicios médicos, durante la aplicación de la estrategia de aislamiento de contacto en el segundo periodo, se observó un aumento poco relevante de colonización por E-BLEE (9%-9,2%) y una disminución en la incidencia de EPC (2,2%-2,1%).



**Figura 23.** Incidencia de EPC y E-BLEE durante el estudio R-GNOSIS.

a) Incidencia total y prevalencia por periodos.

b) Incidencia por tipo de servicio hospitalario.

c) Incidencia por servicios hospitalarios.

P1=Periodo 1; P2= Periodo 2.

**Tabla 16.** Distribución de casos de colonización con EPC y E-BLEE durante el estudio R-GNOSIS por servicios y periodos.

Servicios	Periodo <sup>1</sup>	Estrategia de intervención <sup>2</sup>	Total de pacientes	EPC				E-BLEE			
				Aislados	Pacientes	%	±IC 95%	Aislados	Pacientes	%	±IC 95%
<b>TOTAL</b>			8209	198	162	<b>2,0%</b>	0,30	730	687	<b>8,4%</b>	0,60
<b>SM</b>	<b>P1</b>	PE	2331	67	52	2,2%	0,60	222	209	9,0%	1,16
<b>SQ</b>	<b>P1</b>	AC+PE	2006	31	27	1,3%	0,50	165	159	7,9%	1,18
<b>TOTAL</b>	<b>P1</b>		4337	98	79	<b>1,8%</b>	0,40	387	368	<b>8,5%</b>	0,83
<b>SM</b>	<b>P2</b>	AC+PE	2006	49	42	2,1%	0,63	197	184	9,2%	1,26
<b>SQ</b>	<b>P2</b>	PE	1866	51	41	2,2%	0,67	146	135	7,2%	1,18
<b>TOTAL</b>	<b>P2</b>		3872	100	83	<b>2,1%</b>	0,46	343	319	<b>8,2%</b>	0,87
<b>Gastroenterología</b>	<b>P1</b>	EP	1165	30	26	2,2%	0,85	125	117	10,0%	1,73
	<b>P2</b>	EP+AC	999	18	15	1,5%	0,75	111	102	10,2%	1,88
	<b>Total</b>		2164	48	41	<b>1,9%</b>	0,57	236	219	<b>10,1%</b>	1,27
<b>Neumología</b>	<b>P1</b>	EP	1166	37	26	2,2%	0,85	97	92	7,9%	1,55
	<b>P2</b>	EP+AC	1007	31	27	2,7%	1,0	86	82	8,1%	1,69
	<b>Total</b>		2173	68	53	<b>2,4%</b>	0,65	183	174	<b>8,0%</b>	1,14
<b>SM</b>	<b>TOTAL</b>		4337	116	94	<b>2,2%</b>	0,43	419	393	<b>9,1%</b>	0,85
<b>Neurocirugía</b>	<b>P1</b>	EP+AC	456	14	12	2,6%	1,47	40	39	8,6%	2,57
	<b>P2</b>	EP	456	28	22	4,8%	1,97	39	37	8,1%	2,51
	<b>Total</b>		912	42	34	<b>3,7%</b>	1,23	79	76	<b>8,3%</b>	1,79
<b>Urología</b>	<b>P1</b>	EP+AC	1550	17	15	1,0%	0,49	125	120	7,7%	1,33
	<b>P2</b>	EP	1410	23	19	1,3%	0,60	107	98	7,0%	1,33
	<b>Total</b>		2960	40	34	<b>1,1%</b>	0,38	232	218	<b>7,4%</b>	0,94
<b>SQ</b>	<b>TOTAL</b>		3872	82	68	<b>1,8%</b>	0,41	311	294	<b>7,6%</b>	0,83

<sup>1</sup>Periodo= P1 (marzo 2014-marzo 2015) y P2 (abril 2015-marzo 2016).

<sup>2</sup>Estrategia de intervención sólo para portadores de BLEE.

IC(95%)= Intervalos de confianza del 95%; SM= Servicios médicos; SQ= Servicios quirúrgicos; PE= Precauciones estándar; AC= Aislamiento de contacto.

Si analizamos la prevalencia de portadores de EPC y E-BLEE de cada uno de los servicios a lo largo del tiempo (Figura 23c y Tabla 16), observamos de nuevo que, en general, en todos los servicios, excepto Gastroenterología, la incidencia de portadores de EPC aumentó en el segundo periodo [Gastroenterología (P1=2,2%; P2=1,5%), Neumología (P1=2,2%; P2=2,7%), Neurocirugía (P1=2,6%; P2=4,8%), y Urología (P1=1%; P2=1,3%)]. Hay que resaltar que, a pesar de la implementación de la estrategia de aislamiento de contacto durante el segundo periodo en los servicios médicos, el porcentaje de portadores de E-BLEE aumentó ligeramente en dichas unidades durante la última parte del estudio [Gastroenterología (P1=10%; P2=10,2%), Neumología (P1=7,9%; P2=8,1%)] y disminuyó en las quirúrgicas [Neurocirugía (P1=8,6%; P2=8,1%), Urología (P1=7,7%; P2=7%)].

### 1.3. Diversidad y distribución de especies bacterianas

Durante el estudio R-GNOSIS se recogieron en nuestro hospital 198 EPC y 730 E-BLEE (no duplicadas por pacientes). La información sobre la aparición y distribución de aislados EPC y E-BLEE entre los distintos servicios participantes se muestra organizada por semestres y periodos en las Tablas 17 y 18, respectivamente.

Durante todo el estudio y en todos los servicios, la especie productora de carbapenemasa más frecuente fue *K. pneumoniae* (53,5%; 106/198), seguido de *E. coli* (19,2%; 38/198) y *E. cloacae* complex (11,1%; 22/198). Ocasionalmente y mayoritariamente durante la primera parte del estudio se detectaron también otras especies de EPC: *Citrobacter freundii* (4,5%; 9/198), *K. oxytoca* (4%; 8/198), *Klebsiella aerogenes* (3%; 6/198), *Kluyvera* spp. (3%; 6/198), *Citrobacter koseri* (0,5%; 1/198), *Raoultella ornithinolytica* (0,5%; 1/198) y *Raoultella planticola* (0,5%; 1/198).

Por otro lado, el microorganismo productor de BLEE más frecuente en los cuatro servicios durante todo el estudio fue *E. coli* (78,5%; 573/730), seguido de *K. pneumoniae* (17%; 124/730). Se detectaron también esporádicamente otras especies portadoras de BLEE distribuidas a lo largo del tiempo en las diferentes unidades: 12 *E. cloacae* complex, 11 *C. freundii*, 4 *K. oxytoca*, 3 *Enterobacter kobei*, 2 *C. koseri* y 1 *K. aerogenes*.

**Tabla 17.** Distribución y diversidad (SDI) semestral y por periodos de especies bacterianas portadoras de carbapenemasa (EPC) durante el estudio R-GNOSIS.

Servicio	Semestre	Kp	Ec	Ecl	Kaer	Ek	Cf	Ck	Ko	Ka	Ro	Rp	TOTAL	SDI
Gastroenterología	S1	4	6	5	-	-	-	1	-	1	-	-	17	0,77
	S2	6	1	3	1	-	-	-	1	1	-	-	13	0,77
	S3	3	4	1	-	-	1	-	1	-	-	-	10	0,8
	S4	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0,53
	<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>48</b>	<b>0,74</b>
Neumología	S1	4	2	3	-	-	2	-	-	1	1	-	13	0,86
	S2	10	5	1	1	-	3	-	3	1	-	-	24	0,78
	S3	11	2	2	-	-	1	-	-	-	-	-	16	0,52
	S4	9	3	1	-	-	1	-	-	-	-	1	15	0,63
	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>7</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>68</b>	<b>0,7</b>
Neurocirugía	S1	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0,29
	S2	3	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	7	0,81
	S3	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,5
	S4	22	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	0,16
	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>42</b>	<b>0,34</b>
Urología	S1	3	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	6	0,73
	S2	4	-	2	2	-	1	-	2	-	-	-	11	0,84
	S3	11	3	1	2	-	-	-	-	1	-	-	18	0,61
	S4	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,8
	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>40</b>	<b>0,71</b>
<b>Total S1</b>		17	11	8	-	-	2	1	-	3	1	-	43	0,73
<b>Total S2</b>		23	8	7	4	-	4	-	7	2	-	-	55	0,77
<b>Total S3</b>		28	9	5	2	-	2	-	1	1	-	-	48	0,62
<b>Total S4</b>		38	10	2	-	-	1	-	-	-	-	1	52	0,43
Gastroenterología	P1	10	7	8	1	-	-	1	1	2	-	-	30	0,77
	P2	8	7	1	-	-	1	-	1	-	-	-	18	0,68
Neumología	P1	14	7	4	1	-	5	-	3	2	1	-	37	0,77
	P2	20	5	3	-	-	2	-	-	-	-	1	31	0,56
SM	P1	24	14	12	2	-	5	1	4	4	1	-	67	0,79
	P2	28	12	4	-	-	3	-	1	-	-	1	49	0,61
Neurocirugía	P1	9	3	1	-	-	-	-	1	-	-	-	14	0,57
	P2	25	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	28	0,2
Urología	P1	7	2	2	2	-	1	-	2	1	-	-	17	0,76
	P2	13	5	2	2	-	-	-	-	1	-	-	23	0,64
SQ	P1	16	5	3	2	-	1	-	3	1	-	-	31	0,71
	P2	38	7	3	2	-	-	-	-	1	-	-	51	0,43
<b>Total P1</b>		40	19	15	4	-	6	1	7	5	1	-	98	0,77
<b>Total P2</b>		66	19	7	2	-	3	-	1	1	-	1	100	0,54
<b>TOTAL</b>		<b>106</b>	<b>38</b>	<b>22</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>198</b>	<b>0,66</b>

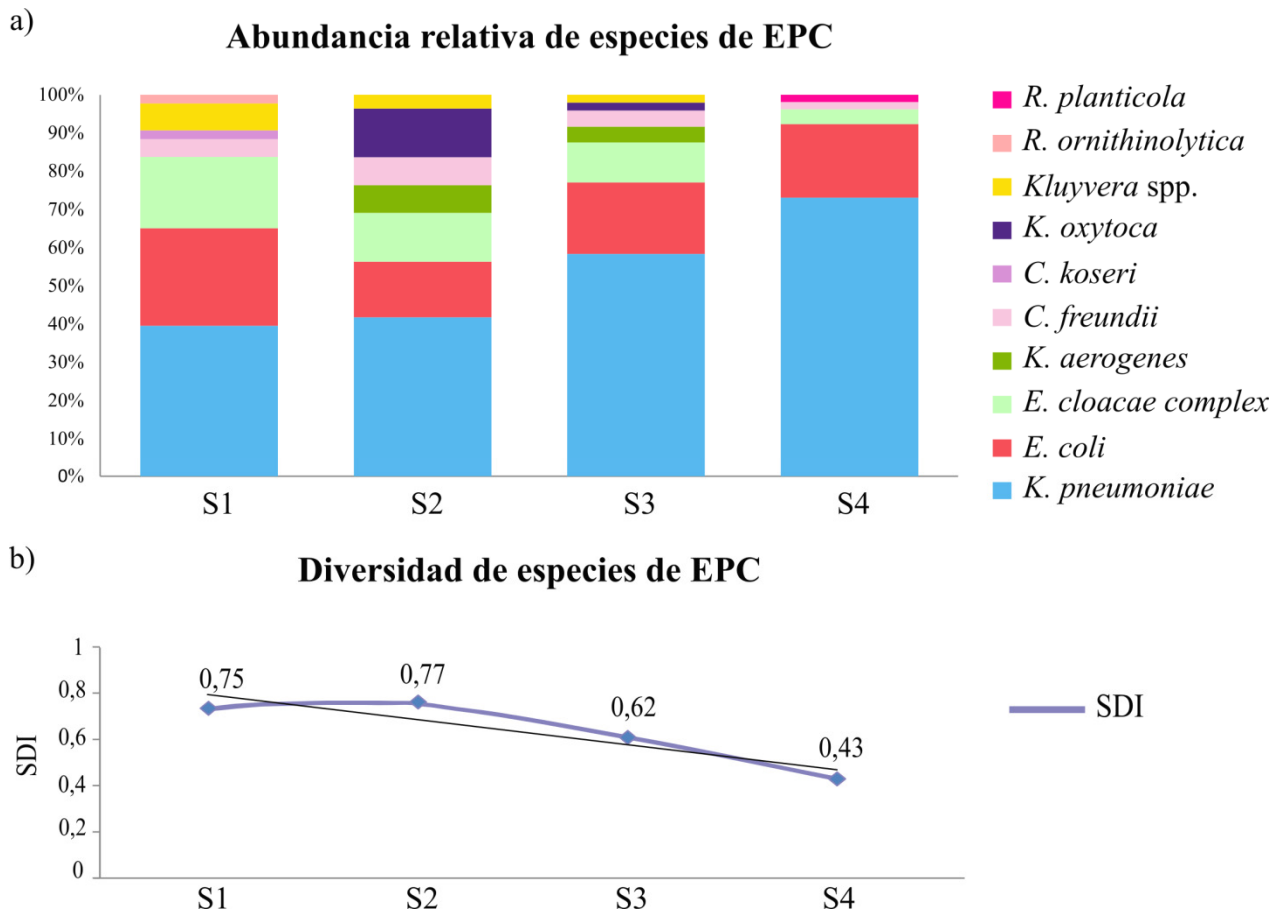
Kp=*K. pneumoniae*, Ec=*E. coli*, Ecl=*E. cloacae* complex, Kaer=*K. aerogenes*, Ek= *E. kobei*; Cf=*C. freundii*, Ck=*C. koseri*, Kox=*K. oxytoca*, Ka=*Kluyvera* spp., Ro=*R. ornithinolytica*, Rp=*R. planticola*.

**Tabla 18.** Distribución y diversidad (SDI) semestral y por periodos de especies bacterianas portadoras de BLEE durante el estudio R-GNOSIS.

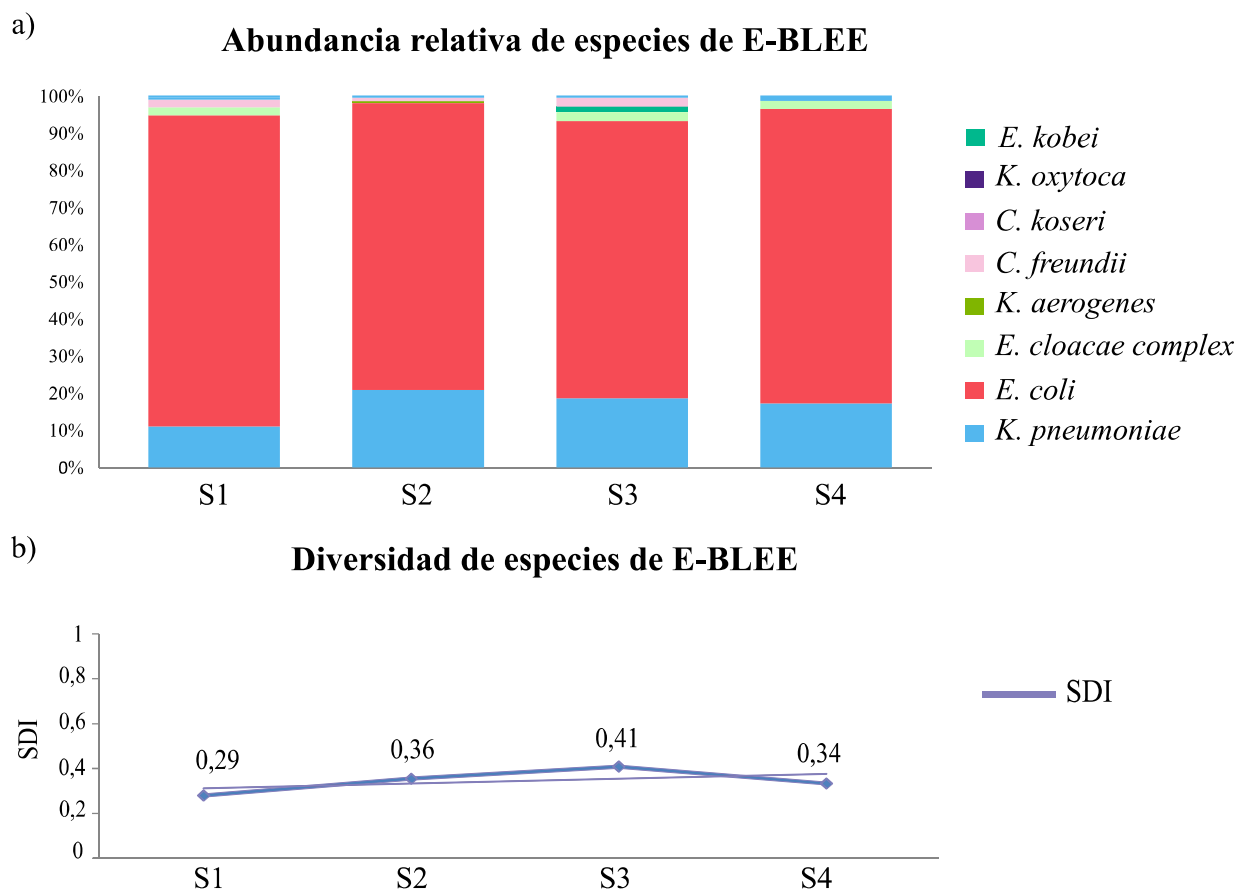
Servicio	Semestre	Kp	Ec	Ecl	Kaer	Ek	Cf	Ck	Ko	Ka	Ro	Rp	TOTAL	SDI
Gastroenterología	S1	8	44	-	-	-	1	-	1	-	-	-	54	0,32
	S2	17	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71	0,37
	S3	18	37	2	-	1	-	-	-	-	-	-	58	0,46
	S4	12	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53	0,36
	<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>176</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>236</b>	<b>0,39</b>
Neumología	S1	3	43	4	-	-	1	-	-	-	-	-	51	0,28
	S2	9	35	-	-	-	1	-	1	-	-	-	46	0,39
	S3	6	49	-	-	1	2	-	-	-	-	-	58	0,28
	S4	5	21	1	-	-	-	-	1	-	-	-	28	0,42
	<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>148</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>183</b>	<b>0,33</b>
Neurocirugía	S1	4	13	-	-	-	1	1	-	-	-	-	19	0,51
	S2	6	14	-	-	-	1	-	-	-	-	-	21	0,49
	S3	4	15	-	-	-	2	-	-	-	-	-	21	0,47
	S4	4	12	1	-	-	-	-	1	-	-	-	18	0,53
	<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>54</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>79</b>	<b>0,44</b>
Urología	S1	6	59	-	-	-	1	-	-	-	-	-	66	0,19
	S2	9	49	-	1	-	-	-	-	-	-	-	59	0,29
	S3	10	51	3	-	1	1	1	-	-	-	-	67	0,4
	S4	3	36	1	-	-	-	-	-	-	-	-	40	0,19
	<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>195</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>232</b>	<b>0,28</b>
<b>Total S1</b>		21	159	4	-	-	4	1	1	-	-	-	190	0,29
<b>Total S2</b>		41	152	-	1	-	2	-	1	-	-	-	197	0,36
<b>Total S3</b>		38	152	5	-	3	5	1	-	-	-	-	204	0,41
<b>Total S4</b>		24	110	3	-	-	-	-	2	-	-	-	139	0,34
Gastroenterología	P1	25	98	-	-	-	1	-	1	-	-	-	125	0,35
	P2	30	78	2	-	1	-	-	-	-	-	-	111	0,44
Neumología	P1	12	78	4	-	-	2	-	1	-	-	-	97	0,34
	P2	11	70	1	-	1	2	-	1	-	-	-	86	0,33
SM	P1	37	176	4	-	-	3	-	2	-	-	-	222	0,35
	P2	41	148	3	-	2	2	-	1	-	-	-	197	0,4
Neurocirugía	P1	10	27	-	-	-	2	1	-	-	-	-	40	0,47
	P2	8	27	1	-	-	2	-	1	-	-	-	39	0,49
Urología	P1	15	108	-	1	-	1	-	-	-	-	-	125	0,24
	P2	13	87	4	-	1	1	1	-	-	-	-	107	0,32
SQ	P1	25	135	-	1	-	3	1	-	-	-	-	165	0,31
	P2	21	114	5	-	1	3	1	1	-	-	-	146	0,37
<b>Total P1</b>		62	311	4	1	-	6	1	2	-	-	-	387	0,33
<b>Total P2</b>		62	262	8	-	3	5	1	2	-	-	-	343	0,38
<b>TOTAL</b>		<b>124</b>	<b>573</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>730</b>	<b>0,35</b>

Kp=*K. pneumoniae*, Ec=*E. coli*, Ecl=*E. cloacae* complex, Kaer=*K. aerogenes*, Ek=*E. kobei*; Cf=*C. freundii*, Ck=*C. koseri*, Ko=*K. oxytoca*, Ka=*Kluyvera* spp., Ro=*R. ornithinolytica*, Rp=*R. planticola*.

Para analizar la diversidad de especies, se calculó el índice de dominancia (SDI) de las especies productoras de carbapenemasa y BLEE en cada uno de los servicios y tipo de servicio durante cada semestre y periodo. Como se observa en las Figuras 24 y 25, en general, la diversidad de especies portadoras de EPC experimentó una disminución notable a lo largo del estudio ( $SDI_{S1}=0,73$ ;  $SDI_{S2}=0,77$ ;  $SDI_{S3}=0,62$ ; y  $SDI_{S4}=0,43$ ), mientras que la diversidad de especies de las E-BLEE tendió a aumentar ligeramente ( $SDI_{S1}=0,29$ ;  $SDI_{S2}=0,36$ ;  $SDI_{S3}=0,41$ ; y  $SDI_{S4}=0,34$ ). Si comparamos ambos periodos, la disminución de la diversidad de especies portadoras de carbapenemasa ( $SDI_{P1}=0,77$  y  $SDI_{P2}=0,54$ ) fue casi significativa desde el punto de vista estadístico ( $p=0,051$ ).

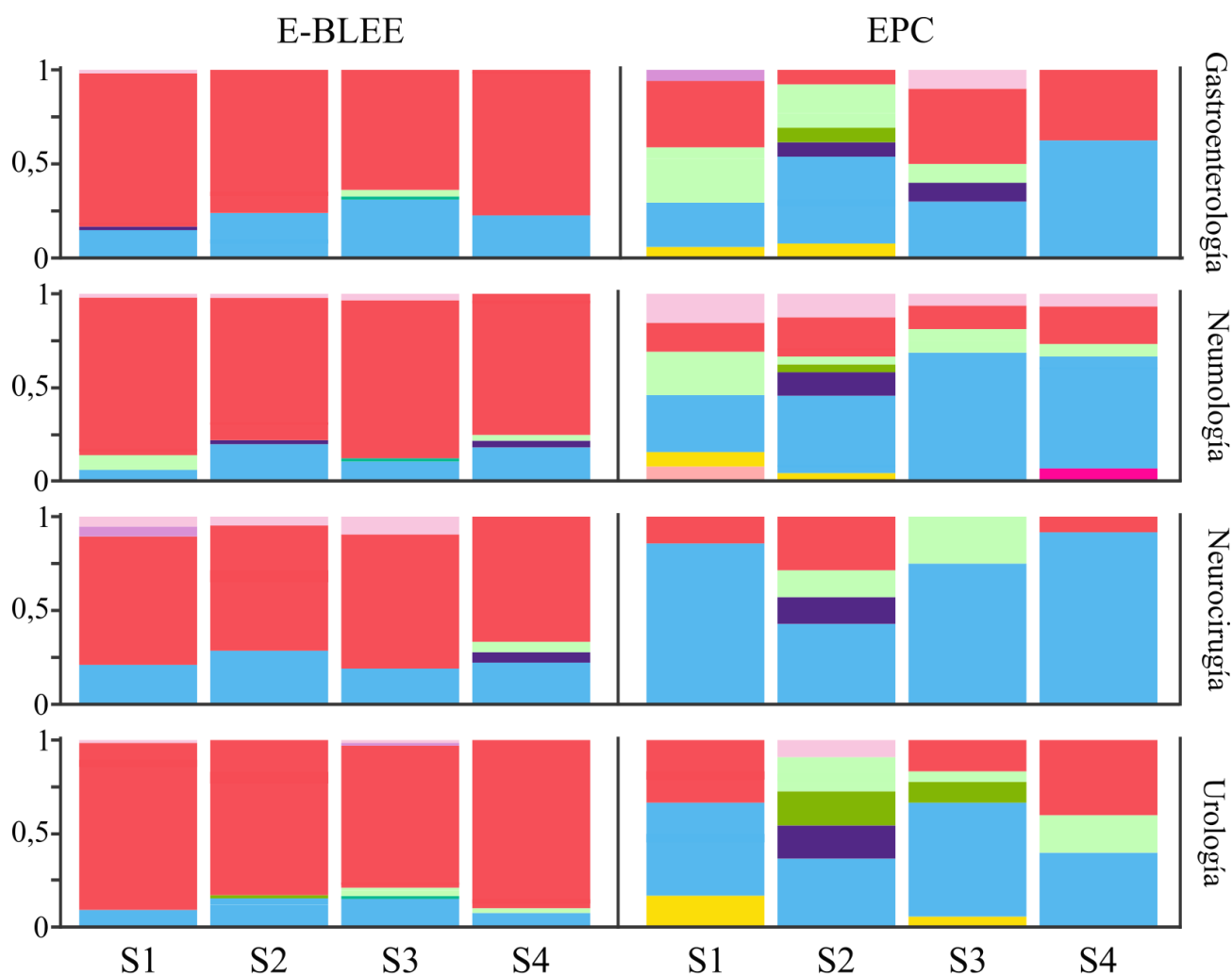


**Figura 24.** Abundancia relativa de especies de EPC por semestres (a) y diversidad de especies de EPC por semestres (b).



**Figura 25.** Abundancia relativa de especies de E-BLEE por semestres (a) y diversidad de especies de E-BLEE por semestres (b).

Como se observa en la Figura 24, la disminución de la diversidad de especies portadoras de EPC coincidió con un mayor registro de aislados *K. pneumoniae* y una notable disminución en la aparición de especies minoritarias. Si analizamos los SDI de las EPC de cada servicio individualmente, la disminución de la diversidad de especies al final del estudio tuvo lugar en todas las unidades [Gastroenterología ( $SDI_{P1}=0,77$  vs.  $SDI_{P2}=0,68$ ), Neumología ( $SDI_{P1}=0,77$  vs.  $SDI_{P2}=0,56$ ), Neurocirugía ( $SDI_{P1}=0,57$  vs.  $SDI_{P2}=0,2$ ), y Urología ( $SDI_{P1}=0,76$  vs.  $SDI_{P2}=0,64$ )]. Sin embargo, al analizar cómo evoluciona la diversidad de especies de la población de E-BLEE en cada servicio, no se observaron tendencias a lo largo del tiempo (Figura 25). En la Figura 26 se representa la abundancia relativa semestral de especies de EPC y E-BLEE de cada una de las unidades.



### Identificación bacteriana

<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Kluyvera spp.</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter kobei</i>	<i>Raoultella planticola</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	

**Figura 26.** Abundancia relativa de especies portadoras de EPC o E-BLEE en cada servicio por semestres durante el estudio R-GNOSIS.

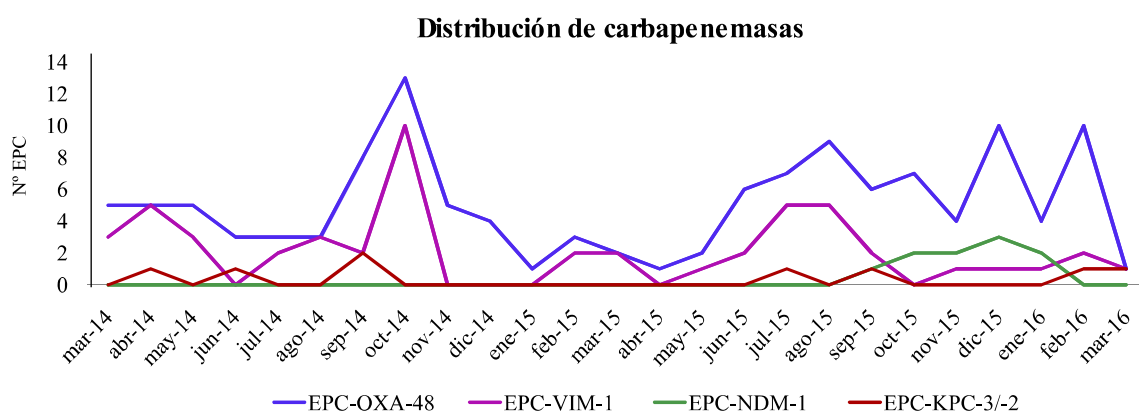
## 2. Caracterización molecular de las EPC

Los 198 aislados recogidos durante el estudio que mostraron un perfil fenotípico de resistencia a los antibióticos carbapenémicos se caracterizaron molecularmente para estudiar sus características microbiológicas y los cambios en la estructura poblacional a lo largo del tiempo.

## 2.1. Caracterización de los genes de resistencia

Todos los genes de carbapenemasa y de BLEE de las 198 EPC fueron caracterizados por PCR y secuenciación. El 64,1% (127/198) de los aislados fueron productores de OXA-48, el 26,8% (53/198) de VIM-1, el 5,0% (10/198) de NDM-1, y el 3,5% (7/198) de KPC-3. Además, se identificó un aislado de *C. freundii* productor de dos carbapenemasas (VIM-1+ KPC-2).

La distribución de los diferentes tipos de carbapenemasa según la especie bacteriana, así como la coproducción de enzimas de BLEE por parte de algunos aislados, se muestra en la Tabla 19. En la Figura 27 se representa la distribución a lo largo del tiempo de los cuatro tipos de carbapenemasa detectados durante el proyecto R-GNOSIS. Podemos observar que las enterobacterias productoras de OXA-48 fueron las más prevalentes durante todo el estudio.



**Figura 27.** Distribución de las EPC a lo largo del tiempo de estudio en función del tipo de carbapenemasa.

En 25 pacientes (15,4%) se detectó colonización con dos (21/25) o tres (4/25) especies diferentes de EPC portadoras del mismo gen de carbapenemasa (cocolonización). La mayoría de ellos expresaban OXA-48 (20/25, 80%), aunque también se detectó cocolonización con productores de VIM-1 (3/25, 12%), KPC-3 (1/25, 4%) y NDM-1 (1/25, 4%). El estudio más detallado de estos aislados se abordará en los Capítulos 2 y 4. Además, en siete pacientes se registró coexistencia de especies diferentes productoras de distintas carbapenemasas: *K. pneumoniae*-VIM-1 con *E. coli*-OXA-48 (2/162); *K. pneumoniae*-OXA-48 con *E. coli*-VIM-1 (1/162); *K. pneumoniae*-OXA-48 con *E. cloacae* complex-VIM-1 (1/162) *E. coli*-VIM-1 con *K. pneumoniae* y

*E. coli*-KPC-3 (1/162); *K. pneumoniae*-OXA-48 y *K. pneumoniae*-NDM-1 (1/162) y *K. pneumoniae*-VIM-1 y *K. pneumoniae*-NDM-1 (1/162).

**Tabla 19.** Distribución de genes *bla*<sub>carbapenemasa</sub> y *bla*<sub>BLEE</sub> según la especie bacteriana.

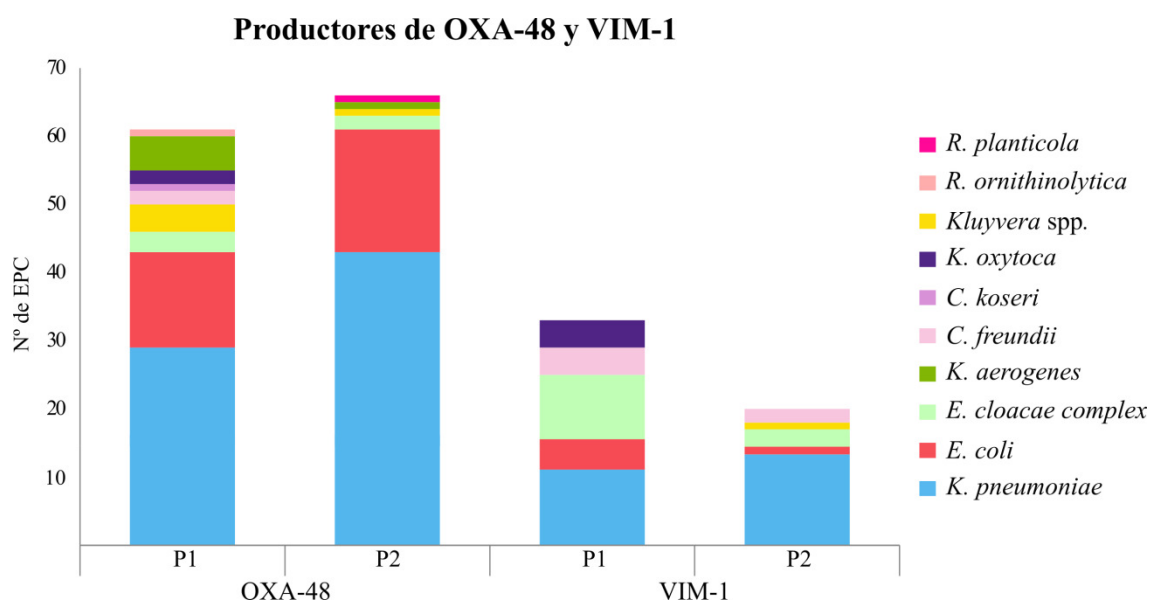
<b>Carbapenemasa</b>	<i>Kp</i> (n=106)	<i>Ec</i> (n=38)	<i>Ecl</i> (n=22)	<i>Kaer</i> (n=6)	<i>Cf</i> (n=10)	<i>Ck</i> (n=1)	<i>Kox</i> (n=8)	<i>Ka</i> (n=6)	<i>Ro</i> (n=1)	<i>Rp</i> (n=1)	<b>Total</b> (n=198)
<b>Productores de OXA-48 (n=127)</b>	<b>72</b>	<b>32</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>127</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	10	25	3	5	2	1	1	-	1	-	48
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	58	3	1	-	-	-	1	-	-	1	64
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	6
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Productores de VIM-1 (n=53)</b>	<b>22</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>53</b>
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	4	5	15	1	5	-	3	-	-	-	33
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Productores de NDM-1 (n=10)</b>	<b>10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>10</b>
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<b>Productores de KPC-3 (n=7)</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7</b>
<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	2	1	2	-	-	-	1	-	-	-	6
<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<b>Productores de múltiples CP (n=1)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> + <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1

Kp=*K. pneumoniae*, Ec=*E. coli*, Ecl=*E. cloacae* complex, Kaer=*K. aerogenes*, Cf=*C. freundii*, Ck=*C. koseri*, Kox=*K. oxytoca*, Ka= *Kluyvera* spp., Ro=*R. ornithinolytica*, Rp=*R. planticola*.

Más de la mitad de los aislados de EPC (55,5%; 110/198) eran también coproductores de BLEE, y el 80% de ellas fueron portadoras de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (88/110) (88,6% CTX-M-15, 1,1% CTX-M-14, 1,1% CTX-M-1, 2,3% CTX-M-9). Los aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48+CTX-M-15 fueron los más prevalentes durante el estudio (29,3%; 58/198), aunque también se detectaron otras especies productoras de CTX-M-15 (Tabla 19). De manera esporádica, entre los portadores de

OXA-48 se detectó también coproducción de CTX-M-1, CTX-M-14 y CTX-M-9. Además, en todos los aislados de *Kluyvera* spp. se identificó una nueva variante de CTX-M, caracterizada y numerada en este trabajo como CTX-M-213 (6,8%) (Capítulo 3). En los aislados de *K. pneumoniae* productores de NDM-1 se detectó coproducción de CTX-M-15 y DHA-1, una  $\beta$ -lactamasa AmpC plasmídica con actividad cefamicinasa (Capítulo 4). Por otro lado, en 23 aislados (20,9%; 23/110) se detectaron genes *bla*<sub>SHV</sub>, identificándose las variantes SHV-28 (17,4%) y SHV-12 (82,6%), asociados mayoritariamente a *K. pneumoniae* productora de OXA-48 y VIM-1, respectivamente (Tabla 19).

En la Figura 28 se recoge el número de aislados de cada especie productores de OXA-48 y VIM-1 recogidos durante cada periodo y en la Tabla 20 los índices de diversidad de especies por periodos en cada servicio.



**Figura 28.** Distribución de especies productoras de OXA-48 y VIM-1 durante ambos periodos.

**Tabla 20.** Índice de diversidad de especies de las poblaciones productoras de OXA-48 y VIM-1 distribuido por servicios y periodos de estudio.

	Gastroenterología		Neumología		Neurocirugía		Urología		Total	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P1	P1	P2
OXA-48	0,73	0,6	0,68	0,44	0,67	0,15	0,86	0,64	<b>0,70</b>	<b>0,54</b>
VIM-1	0,64	1	0,75	0,67	0,33	0,7	0,75	0,6	<b>0,70</b>	<b>0,62</b>

En general, en todos los servicios y durante todo el estudio, el porcentaje de aislados productores de OXA-48 fue considerablemente superior al de otras EPC. *K. pneumoniae*-OXA-48 (56,7%; 72/127) fue el microorganismo más prevalente, seguido de *E. coli*-OXA-48 (25,2%; 32/127). Entre los aislados productores de OXA-48, se detectaron también en menor proporción aislados pertenecientes a las especies *E. cloacae* complex (3,9%; 5/127), *K. aerogenes* (3,9%; 5/127), *C. freundii* (1,6%; 2/127), *K. oxytoca* (1,6%; 2/127) y otras poco frecuentes como *Kluyvera* spp. (4,7%; 6/127), *C. koseri* (0,8%; 1/127), *R. ornithinolytica* (0,8%; 1/127) y *R. planticola* (0,8%; 1/127). Cabe destacar que durante este estudio se hizo la primera descripción de *Kluyvera* spp. productora de OXA-48 (Capítulo 3).

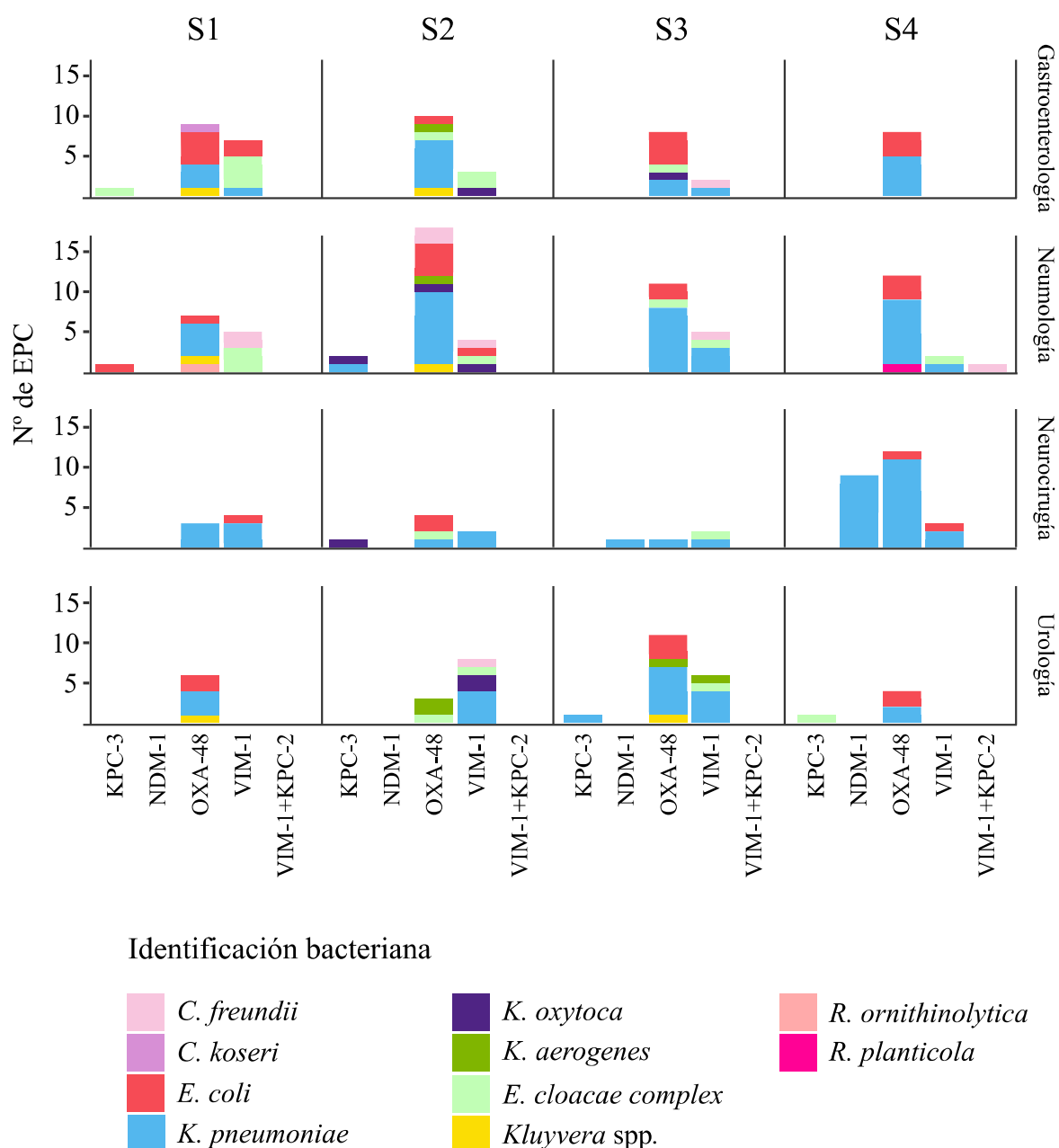
A pesar de la presencia de todas estas especies minoritarias, la población productora de OXA-48 presentó un índice de diversidad de especies relativamente bajo ( $SDI_{OXA-48}=0,61$ ). Comparando ambos periodos observamos que el número de aislados productores de OXA-48 aumentó ligeramente en la segunda parte del estudio [periodo 1=61/99 (61,6%) vs. periodo 2=66/99 (66,6%)] y que la diversidad de especies disminuyó significativamente ( $SDI_{OXA-48-P1}=0,70$  vs.  $SDI_{OXA-48-P2}=0,52$ ;  $p<0,05$ ). La prevalencia de *K. pneumoniae*-OXA-48 fue la que más se incrementó en el segundo periodo [periodo 1=29/61 (47,5%) vs. periodo 2=43/66 (65,1%);  $p<0,05$ ], seguido de la de *E. coli*-OXA-48 [periodo 1=14/61 (22,9%) vs. periodo 2=18/66 (27,3%)].

La segunda carbapenemasa más prevalente del estudio fue la enzima VIM-1 y de nuevo *K. pneumoniae* fue la especie portadora predominante (41,5%; 22/53). El gen *bla*<sub>VIM-1</sub> fue detectado también en otras especies: *E. cloacae* complex (28,3%; 15/53), *C. freundii* (11,3%; 6/53), *E. coli* (9,4%; 5/53), *K. oxytoca* (7,5%; 4/53) y *K. aerogenes* (1,9%; 1/53). La diversidad de especies productoras de VIM-1 fue superior al de las EPC-OXA-48 ( $SDI_{VIM-1}= 0,70$ ), aunque no hubo cambios significativos a lo largo del tiempo ( $SDI_{VIM-1-P1}=0,70$  vs.  $SDI_{VIM-1-P2}=0,62$ ). El número de aislados de productores de VIM-1 disminuyó significativamente durante el segundo periodo [periodo 1=33/99 (33,3%) vs. periodo 2=20/99 (20,2%);  $p<0,05$ ], aunque la prevalencia de *K. pneumoniae* respecto al resto de especies productoras de VIM-1 se elevó significativamente al final del estudio [periodo 1=10/33 (30,3%) vs. periodo 2=12/20 (60%);  $p<0,05$ ].

Por otro lado, en el segundo periodo se describió por primera vez en nuestro hospital un brote por enterobacterias productoras de NDM-1. Esta metalo- $\beta$ -lactamasa

fue identificada únicamente en aislados de *K. pneumoniae* procedentes de 9 pacientes ingresados en el servicio de Neurocirugía (Capítulo 4). Por ultimo, la enzima KPC-3 se detectó esporádicamente en diversas especies a lo largo del estudio (Tabla 19), siendo la mayor parte de ellos detectados en el primer periodo [periodo 1=5/99 (5%) vs. periodo 2=2/99 (2%)].

La Figura 29 representa la distribución semestral de las distintas enzimas de carbapenemasa en función de la localización hospitalaria y la especie bacteriana productora.



**Figura 29.** Distribución de los genes *bla<sub>carbapenemasa</sub>* entre las especies bacterianas de los distintos servicios hospitalarios y semestres de estudio.

## 2.2. Sensibilidad a antibióticos

Los perfiles de resistencia de todas las EPC recogidas durante el estudio se muestran en la Tabla 21 y están representados en la Figura 30.

En general, los aislados productores de NDM-1, VIM-1 y KPC-3 presentaron altas tasas de resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido y a las combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, los aislados portadores de OXA-48 sólo mostraron resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación cuando eran coproductores de BLEE.

**Tabla 21.** Perfiles de resistencia de los aislados de EPC a los distintos antimicrobianos.

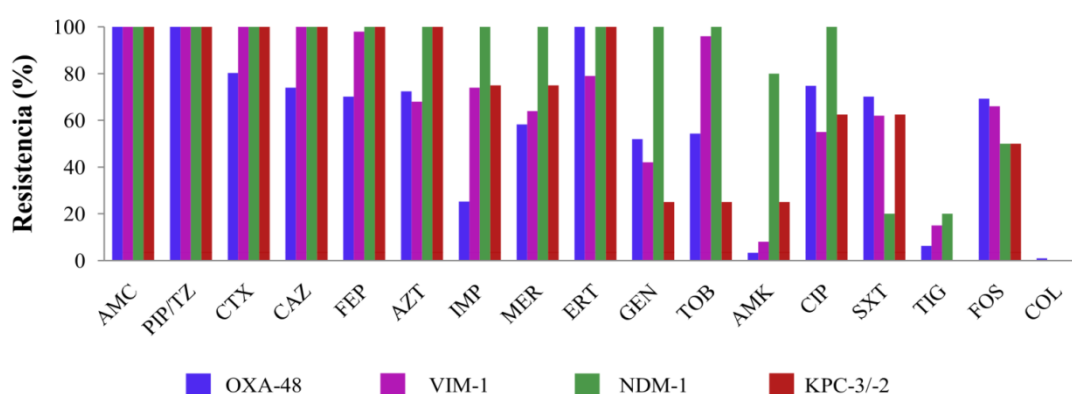
Antibióticos	OXA-48 (n=127)		VIM-1 (n=53)		NDM-1 (n=10)		KPC-3/-2 (n=8)		Total (n=198)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
AMC	127	100	53	100	10	100	8	100	198	100
PIP/TZ	127	100	53	100	10	100	8	100	198	100
CTX	102	80,3	53	100	10	100	8	100	173	87,4
CAZ	94	74	53	100	10	100	8	100	165	83,3
FEP	89	70,1	52	98,1	10	100	8	100	159	80,3
AZT	92	72,4	36	67,9	10	100	8	100	146	73,7
IMP	38	29,9	34	64,2	10	100	6	75	88	44,4
MER	71	55,9	33	62,3	10	100	6	75	120	60,6
ERT	126	99,2	42	79,2	10	100	8	100	186	93,9
GEN	66	52	22	41,5	10	100	2	25	100	50,5
TOB	69	54,3	51	96,2	10	100	2	25	132	66,7
AMK	4	3,1	4	7,5	8	80	2	25	18	9,1
CIP	95	74,8	29	54,7	10	100	5	62,5	139	70,2
SXT	89	70,1	33	62,3	2	20	5	62,5	129	65,2
TIG	8	6,3	8	15,1	2	20	0	0	18	9,1
FOS	88	69,3	35	66	5	50	4	50	132	66,7
COL	1	0,8	0	0	0	0	0	0	1	0,5

AMC=Amoxicilina-ácido clavulánico; PIP/TZ=Piperacilina-tazobactam; CTX=Cefotaxima; CAZ=Ceftazidima; FEP=Cefepime; AZT=Aztreonam; IMP=Imipenem; MER=Meropenem; ERT=Ertapenem; GEN=Gentamicina; TOB=Tobramicina; AMK=Amikacina; CIP=Ciprofloxacino; SXT=Trimetoprim-sulfametoxazol; TIG=Tigeciclina; FOS=Fosfomicina; y COL=Colistina.

La enzima NDM-1 fue la que mayor resistencia confirió a los antibióticos carbapenémicos (100% a imipenem, 100% a meropenem y 100% a ertapenem), seguida

de KPC-3 (75% a imipenem, 75% a meropenem y 100% a ertapenem) y VIM-1 (64,2% a imipenem, 62,3% a meropenem y 79,2% a ertapenem). Los aislados productores de OXA-48, mostraron tasas de resistencia a carbapenemicos inferiores: 29,9% a imipenem, 55,9% a meropenem y 99,2% a ertapenem.

Los perfiles de sensibilidad al resto de antimicrobianos fueron variables, siendo la amikacina (90,9%) y la tigeciclina (90,9%) los antibióticos que mostraron mayores valores de sensibilidad. Solamente se detectó un aislado de *K. pneumoniae* productor de OXA-48 resistente a colistina.



**Figura 30.** Porcentajes de resistencia de las EPC a los distintos grupos de antimicrobianos. AMC=Amoxicilina-ácido clavulánico; PIP/TZ=Piperacilina-tazobactam; CTX=Cefotaxima; CAZ=Ceftazidima; FEP=Cefepime; AZT=Aztreonam; IMP=Imipenem; MER=Meropenem; ERT=Ertapenem; GEN=Gentamicina; TOB=Tobramicina; AMK=Amikacina; CIP=Ciprofloxacino; SXT=Trimetoprim-sulfametoxazol; TIG=Tigeciclina; FOS=Fosfomicina; y COL=Colistina.

### 2.3. Estructural poblacional

Las técnicas de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) revelaron una elevada diversidad clonal de EPC en nuestro hospital durante el estudio R-GNOSIS.

#### 2.3.1. *Klebsiella pneumoniae*

En general, 91 de los 106 aislados de *K. pneumoniae* se agruparon en 11 patrones principales de PFGE (A-K), que se correspondieron con 8 secuencias tipo (STs) diferentes y en la mayoría de los casos se asociaron con la producción de un determinado gen de carbapenemasa: OXA-48/ST11/clon A (n=43); VIM-1/ST54/clon B (n=17); NDM-1/ST101/clon C (n=8); OXA-48/ST307/clon D (n=6) y clon J (n=3);

OXA-48/ST15/clon E (n=4), clon I (n=2), y clon K (n=1); VIM-1/ST15/clon I (n=1); OXA-48/ST392/clon F (n=2); OXA-48/ST405/clon G (n=2); y NDM-1/ST437/clon H (n=2). Entre los aislados restantes de *K. pneumoniae* se identificaron perfiles de PFGE y STs no relacionados: clones L-T con OXA-48 (n=9), clones U-X con VIM-1 (n=4), y clones Y-Z con KPC-3 (n=2). Todos los aislados pertenecientes a los clones A/ST11/OXA-48 y B/ST54/VIM-1 fueron también coproductores de CTX-M-15 y SHV-12, respectivamente.

El análisis de los patrones de macrorrestricción con el programa *Bionumerics* agrupó los aislados de *K. pneumoniae* según los STs y los semestres, pero no acorde al tipo de carbapenemasa o a la ubicación del paciente (Figura 31).

En *K. pneumoniae*, el clon A/ST11/OXA-48 fue el más prevalente durante todo el estudio (40,6%; 43/106). En la Figura 32a vemos que el número de aislados tipificados como ST11 fue relativamente constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, si comparamos la incidencia del clon A/ST11/OXA-48 entre el primer periodo (55%; 22/40) y el segundo (35%; 21/66) respecto al resto de clones de *K. pneumoniae* observamos diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). Estos datos son resultado de la emergencia de nuevos clones, mayoritariamente productores de OXA-48 y con un único o escasos representantes, que tuvo lugar durante el segundo periodo.

El clon B/ST54/VIM-1 fue el segundo clon de *K. pneumoniae* más frecuente del estudio (16%; 17/106), especialmente en los servicios quirúrgicos (14/17). Como se observa en la Figura 32b, fue detectado de manera intermitente a lo largo del tiempo, pero en general, su prevalencia respecto al total de aislados de *K. pneumoniae* disminuyó si comparamos el primer periodo (22,5%; 9/40) y el segundo (12,1%; 8/66).

El tercer clon más frecuente de *K. pneumoniae* fue el clon C/ST101, productor de NDM-1+CTX-M-15+DHA-1 (7,5%, 8/106) y se detectó únicamente en el servicio de Neurocirugía durante el cuarto semestre de estudio. Este clon C/ST101/NDM-1 junto con el predominante clon A/ST11 productor de OXA-48, fueron responsables de la elevada prevalencia de EPC de esta unidad durante el segundo periodo (4,8%).

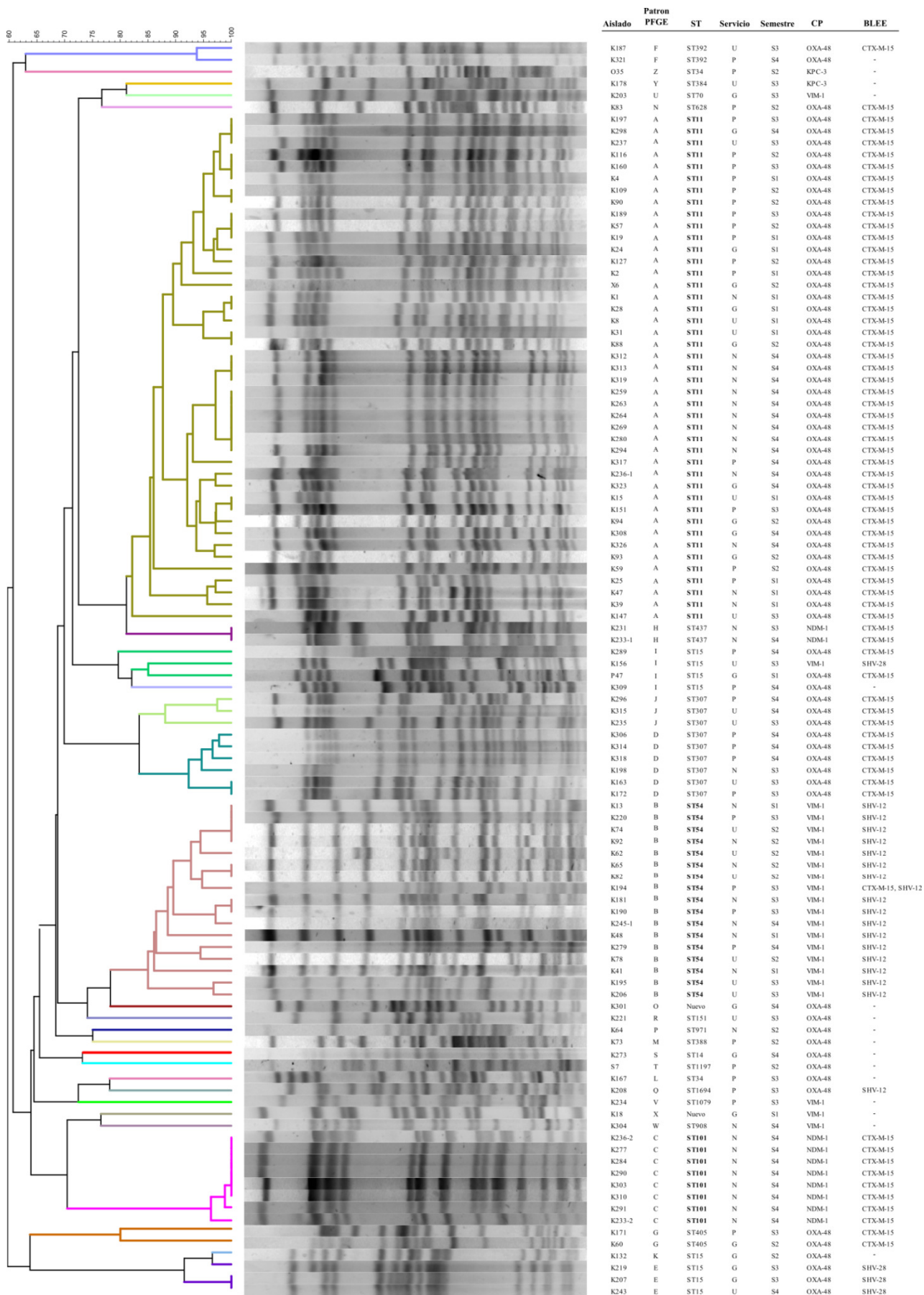
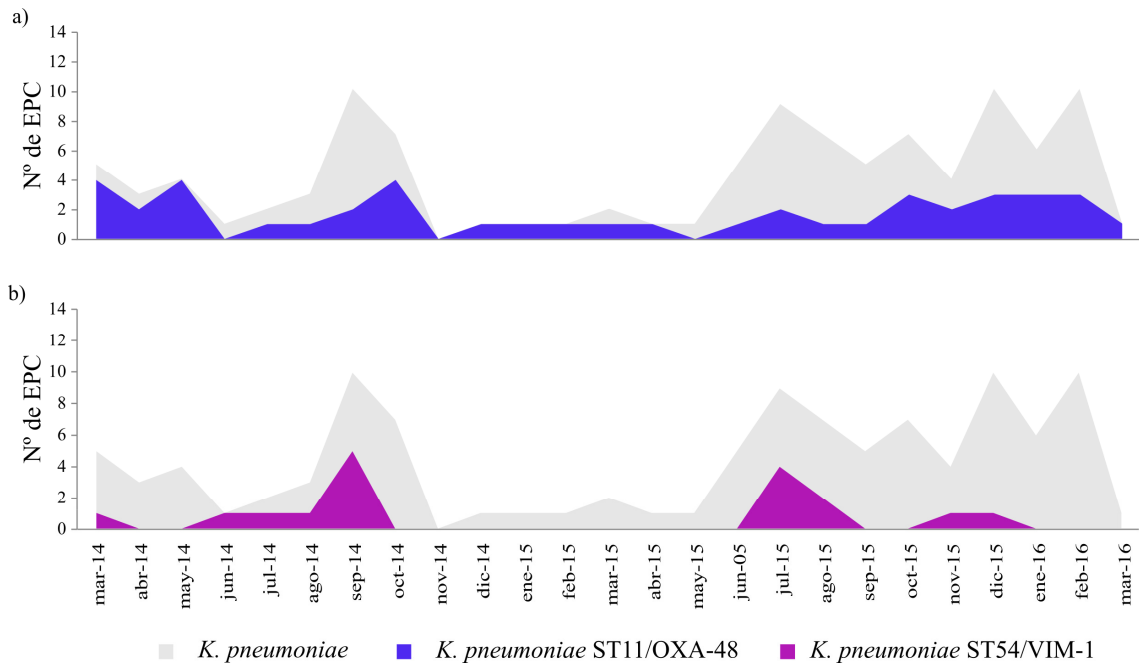


Figura 31. Dendrograma de los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa.



**Figura 32.** Distribución por meses de los clones de *K. pneumoniae* A/ST11/OXA-48 (a) y B/ST54/VIM-1 (b) respecto al total de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas.

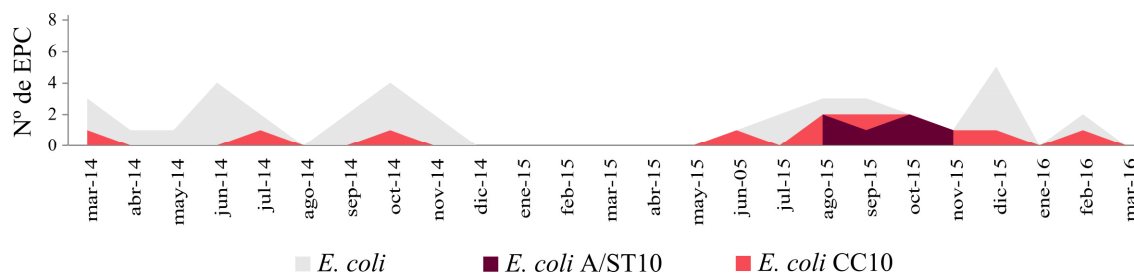
### 2.3.2. *Escherichia coli*

Los aislados identificados como *E. coli* se agruparon en 30 patrones de restricción diferentes que se correspondieron con 26 STs distintas (Figura 34). Trece de los aislados se agruparon dentro del Complejo Clonal 10 (CC10): OXA-48/ST10/clones A-D (n=9), OXA-48/ST607/clon E (n=1), VIM-1/ST43/clon F (n=1) y dos nuevas variantes de ST10 (VIM-1/clon G y OXA-48/clon H). Entre los productores de OXA-48 se identificaron otros dos clones con más de un representante: OXA-48/ST453/clon I (n=3) y OXA-48/ST354/clon J (n=2). Los aislados de *E. coli* restantes, en su mayoría productores de OXA-48, exhibieron perfiles de PFGE no relacionados entre sí. A 9 de ellos se les asignó una ST conocida (clones K-R), aunque también se detectaron 9 ST nuevos (clones S- $\alpha$ ) y 3 aislados no tipificables mediante MLST (clones  $\beta$ - $\delta$ ). En general, entre la población de *E. coli* no se detectó una alta tasa de coproducción de BLEE (18,4%, 7/38) y fue en todos los casos asociado con la producción de OXA-48.

El análisis con el programa *Bionumerics* mostró una alta diversidad de perfiles de restricción entre los aislados de *E. coli*, independientemente de la localización hospitalaria y del tipo de carbapenemasa producida. Hay que destacar, que algunos

aislados pertenecientes al ST10 mostraron perfiles de PFGE no relacionados (clones A-D) y no se agruparon juntos en el dendrograma (Figura 34).

Como se representa en la Figura 33, los clones agrupados dentro del CC10 (34,2%; 13/38) fueron detectados principalmente entre mayo de 2015 y febrero de 2016, de manera que se observaron diferencias significativas en su incidencia entre el primer periodo (15,8%; 3/19) y el segundo (47,4%; 10/19) ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que aunque la mayoría de estos aislados fueron productores de OXA-48 (11/13), dos de ellos amplificaron *bla*<sub>VIM-1</sub>. El clon A/ST10/OXA-48, agrupado dentro de este CC10, fue el más frecuente de la población total de *E. coli* (15,8%, 6/38) y fue detectado únicamente entre agosto y noviembre de 2015 ( $p < 0,05$ ) en el servicio de Gastroenterología (4/6).



**Figura 33.** Distribución por meses de los aislados de *E. coli* pertenecientes al complejo clonal 10 (CC10).

### 2.3.3. Otras especies de EPC

Mediante el análisis de PFGE se observaron patrones de restricción no relacionados entre todos los aislados productores de carbapenemasa de las especies *K. aerogenes* (6 clones) y *K. oxytoca* (8 clones) (Figuras 35 y 36).

Como se observa en la Figura 37, entre los 22 aislados pertenecientes al grupo *E. cloacae* complex se detectó una elevada diversidad clonal (16 clones). Se identificaron 2 clones principales, mayoritariamente productores de VIM-1: clon A (n=6) y clon B (n=3). Los demás aislados mostraron patrones de restricción diferentes (C-U), aunque en algunos casos bastante relacionados.

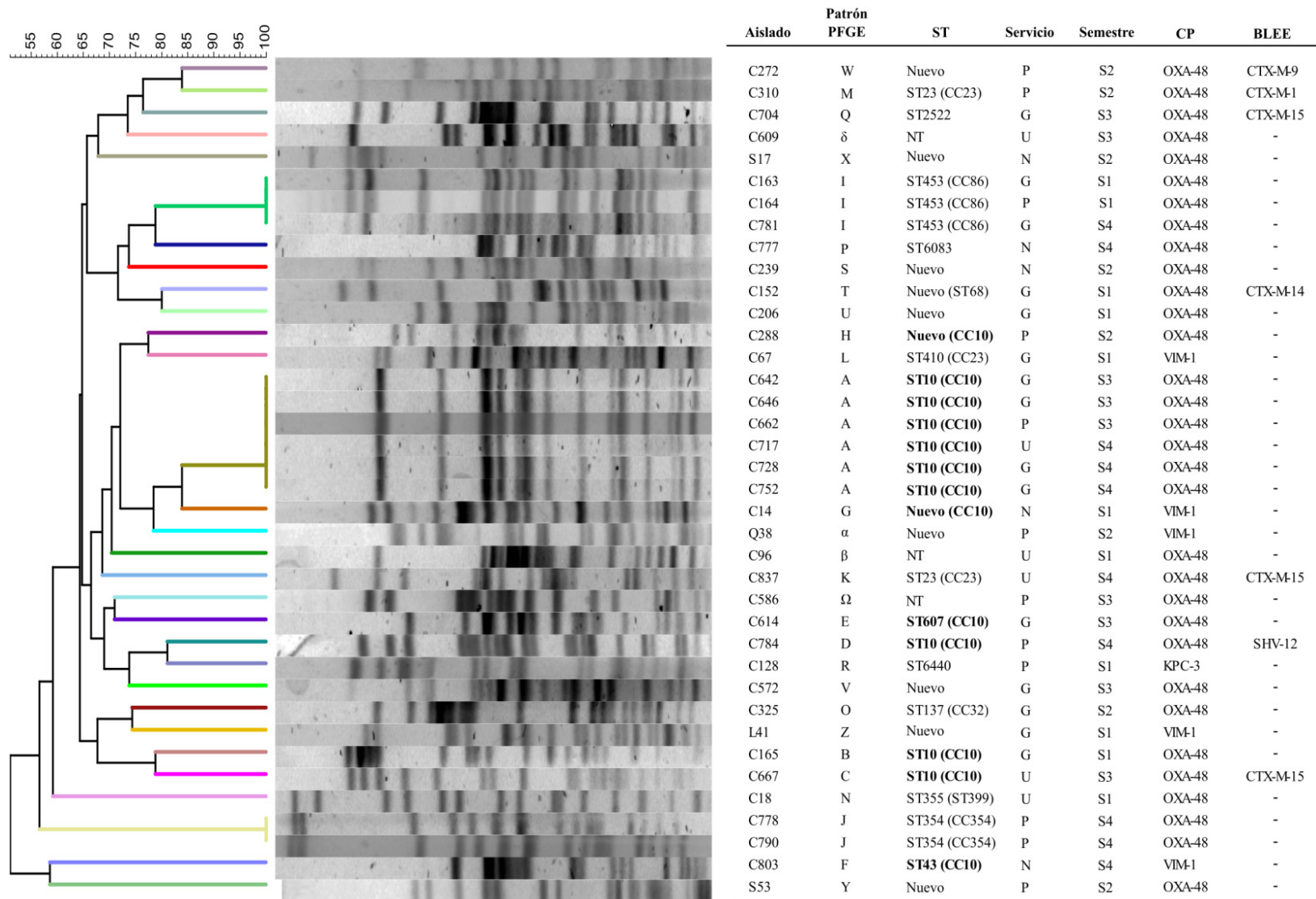


Figura 34. Dendrograma de los aislados *E. coli* productores de carbapenemasa.

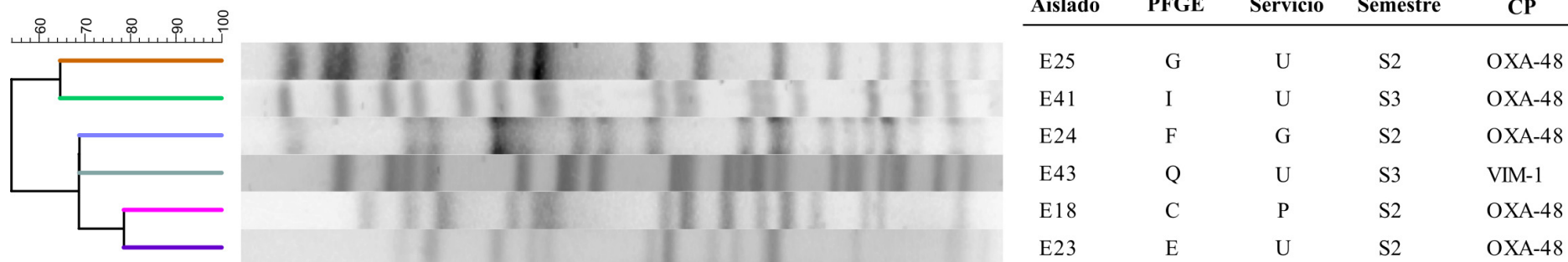


Figura 35. Dendrograma de los aislados *K. aerogenes* productores de carbapenemasa

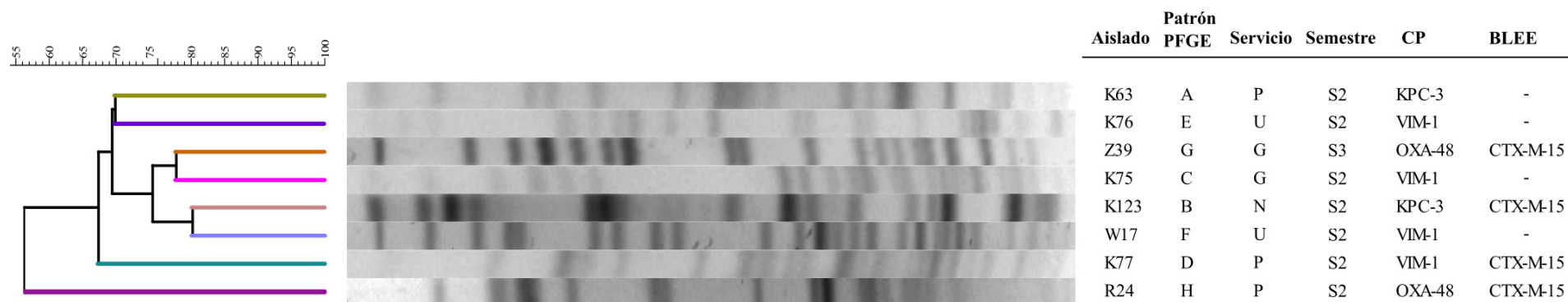
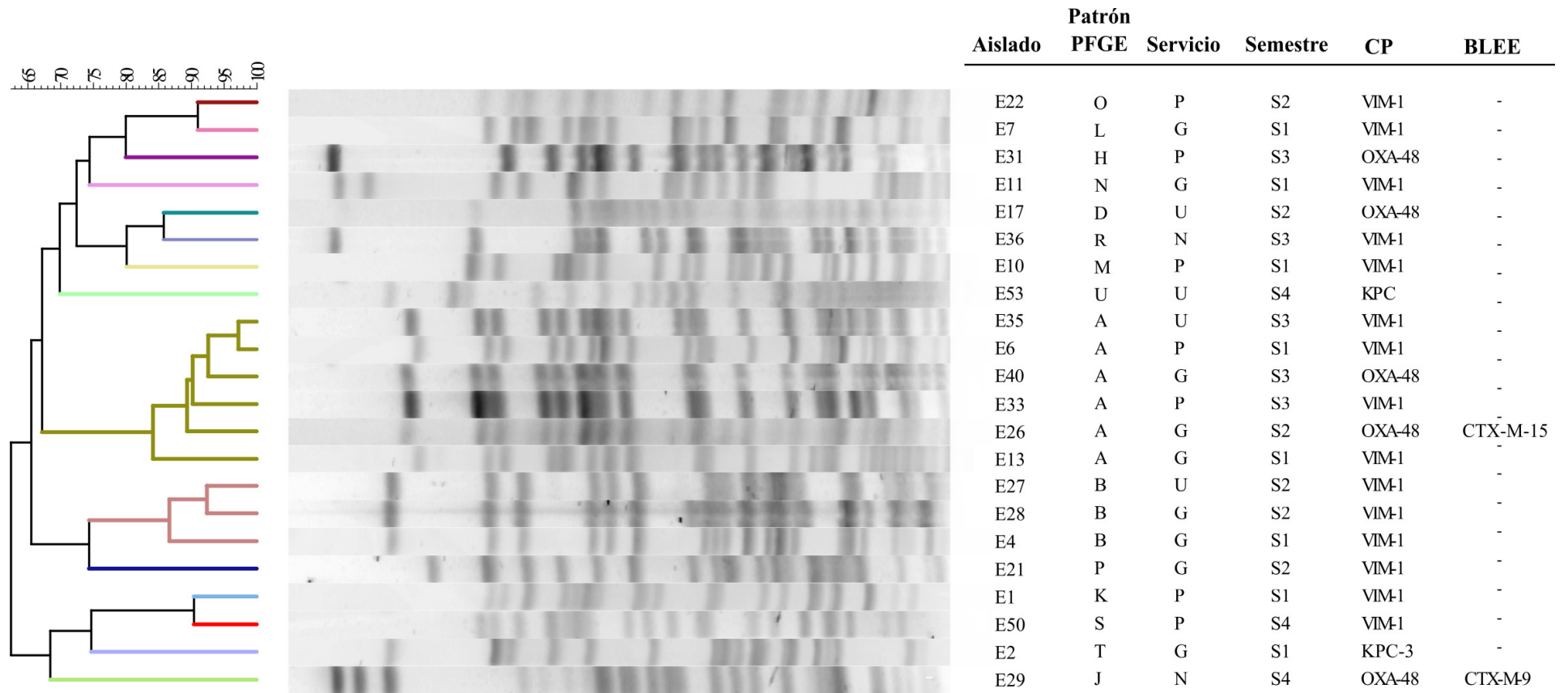


Figura 36. Dendrograma de los aislados *K. oxytoca* productores de carbapenemasa.



**Figura 37.** Dendrograma de los aislados *E. cloacae* complex productores de carbapenemasa.

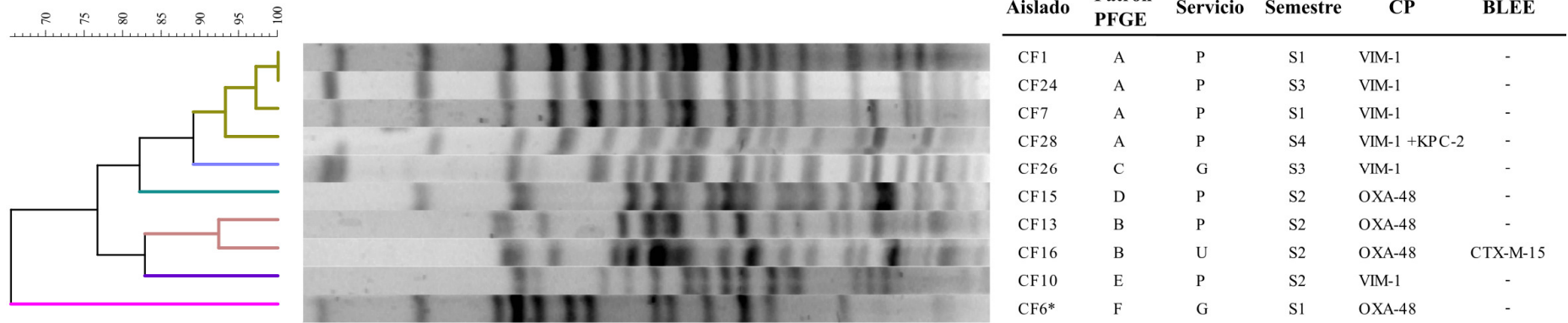


Figura 38. Dendrograma de los aislados *Citrobacter* spp. productores de carbapenemasa. (\**C. koseri*)



Figura 39. Dendrograma de los aislados de *Raoultella* spp. productores de carbapenemasa.

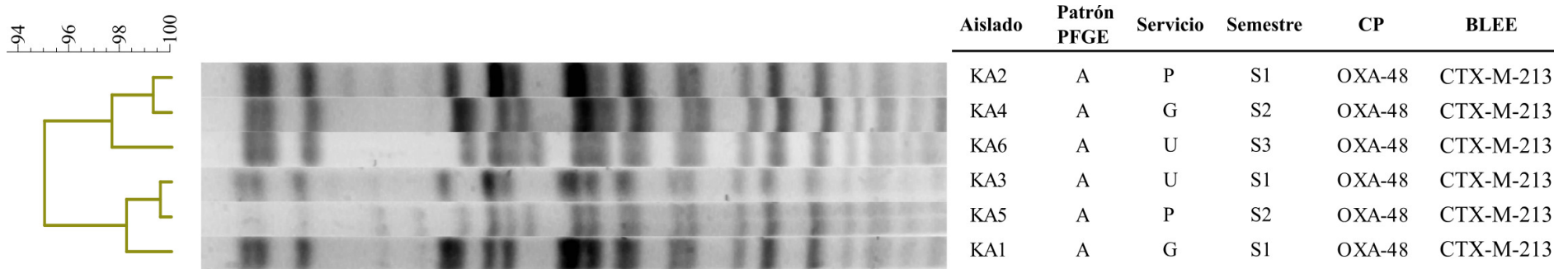


Figura 40. Dendrograma de los aislados de *Kluyvera* spp. productores de carbapenemasa.

Por otra parte, entre los 10 aislados identificados como *C. freundii* se detectaron 5 patrones de PFGE: clon A (n=4), clon B (n=2) y clones C, D y E (n=1). Como se observa en la Figura 38, todos los representantes del clon A fueron productores de VIM-1 e incluso uno de ellos fue coproductor de un segundo tipo de carbapenemasa (KPC-2). El perfil de restricción del aislado *C. koseri* se incluyó también en la Figura 38.

En la Figura 39 podemos observar los perfiles de restricción y datos epidemiológicos recogidos de los dos aislados pertenecientes al género *Raoultella*.

Finalmente, como se observa en la Figura 40, todos los aislados de *Kluyvera* spp. mostraron un perfil de PFGE casi idéntico (índice de similitud >0,95).

#### 2.4. Análisis de diversidad clonal

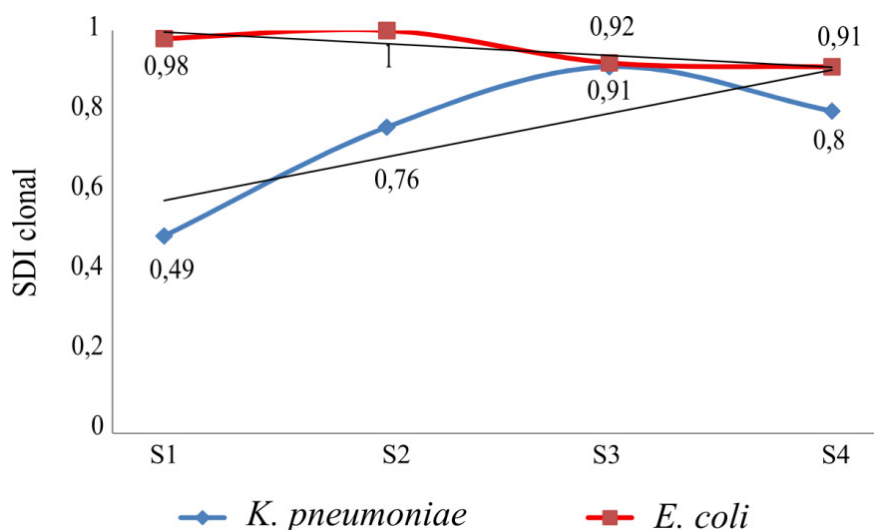
La diversidad de clones (patrones de PFGE) de las especies productoras de carbapenemasa fue analizada basándonos de nuevo en el índice de diversidad de Simpson (SDI). El índice de dominancia de clones no se aplicó a las especies de EPC con un único aislado (*C. koseri*, *R. ornithinolytica* y *R. planticola*).

Durante el estudio R-GNOSIS, las especies *K. aerogenes* ( $SDI_{K. aerogenes}=1$ ) y *K. oxytoca* ( $SDI_{K. oxytoca}=1$ ) mostraron valores máximos de diversidad clonal, ya que no se detectó entre su población ningún clon con más de un representante. *E. coli* ( $SDI_{E. coli}=0,97$ ) y *E. cloacae* complex ( $SDI_{E. cloacae complex}=0,92$ ) presentaron una alta variabilidad clonal, alcanzando valores de SDI muy cercanos a la unidad. Por otro lado, entre las especies de *K. pneumoniae* y *C. freundii* se detectaron varios patrones de PFGE con un número variable de representantes, lo cual se tradujo en valores de diversidad clonal inferiores a los anteriores ( $SDI_{K. pneumoniae}=0,80$ ;  $SDI_{C. freundii}=0,80$ ). Finalmente, la única especie que mostró el valor mínimo de diversidad fue *Kluyvera* spp. ( $SDI_{Kluyvera spp.}=0$ ), ya que todos sus aislados se consideraron clonales.

*K. pneumoniae* y *E. coli* fueron las especies de mayor relevancia epidemiológica del estudio, por lo que se analizaron los cambios en la diversidad clonal de ambas poblaciones a lo largo del tiempo. El resto de especies portadoras de carbapenemasas no se incluyeron en este análisis debido a su bajo número de representantes. En la Figura 41 se representan los SDI de *K. pneumoniae* y *E. coli* durante los cuatro semestres del

estudio [(SDI<sub>Kp-S1</sub>=0,49; SDI<sub>Kp-S2</sub>=0,76; SDI<sub>Kp-S3</sub>=0,91; SDI<sub>Kp-S4</sub>=0,8), (SDI<sub>Ec-S1</sub>=0,98; SDI<sub>Ec-S2</sub>=1; SDI<sub>Ec-S3</sub>=0,92; SDI<sub>Ec-S4</sub>=0,91)].

Los índices de diversidad clonal de ambas especies en cada uno de los servicios durante los dos periodos se recogen en la Tabla 22. Si comparamos la distribución de clones de *K. pneumoniae* durante ambos periodos, observamos que la diversidad aumentó significativamente en la última parte del estudio (SDI<sub>Kp-P1</sub>=0,66; SDI<sub>Kp-P2</sub>=0,86) ( $p<0,05$ ). Por el contrario, la diversidad clonal de *E. coli* disminuyó ligeramente entre ambos periodos (SDI<sub>Ec-P1</sub>= 0,99; SDI<sub>Ec-P2</sub>=0,90).



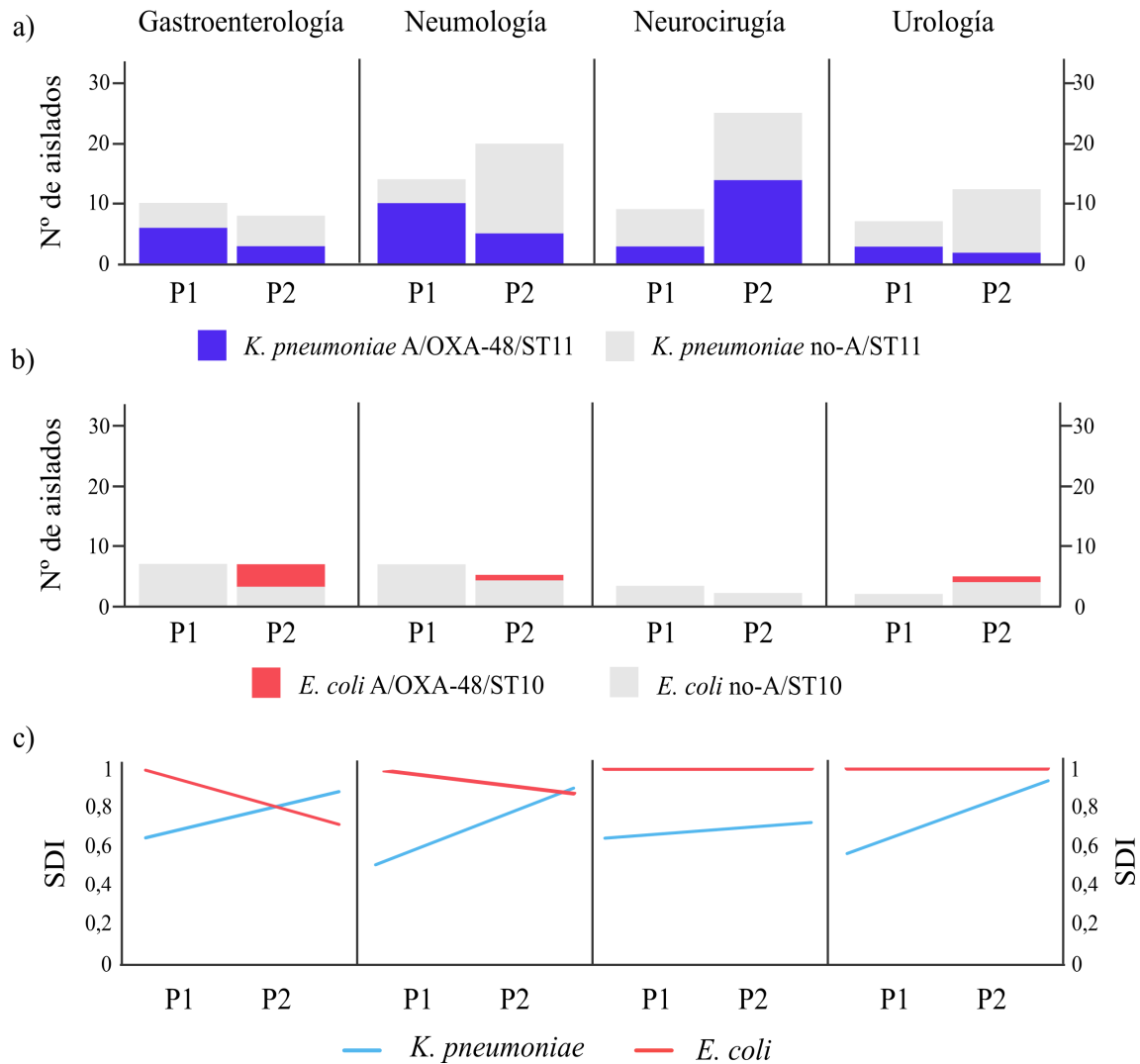
**Figura 41.** Índices de diversidad clonal de la población de *K. pneumoniae* y *E. coli* durante los cuatro semestres de estudio.

**Tabla 22.** Índices de diversidad clonal de las especies *K.pneumoniae* y *E.coli* distribuido por servicios y periodos de estudio.

	Gastroenterología		Neumología		Neurocirugía		Urología		Total	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P1	P1	P2
<i>Kp</i>	0,64	0,86	0,50	0,89	0,64	0,72	0,57	0,94	<b>0,66</b>	<b>0,86</b>
<i>Ec</i>	1	0,7	1	0,9	1	1	1	1	<b>0,99</b>	<b>0,9</b>

Como se ha indicado en apartados anteriores, durante todo el estudio el clon A/ST11/OXA-48 fue el mayoritario en la población de *K. pneumoniae*, sin embargo, la emergencia significativa de nuevos clones productores de OXA-48 con bajo número de representantes, disminuyó la clonalidad de esta especie durante el último periodo del

estudio (7 clones en el primer periodo y 13 en el segundo). También se detectó un aumento de la diversidad clonal entre los aislados productores de VIM-1 comparando ambos periodos (2 clones en el primer periodo y 5 en el segundo).



**Figura 42.** Distribución por servicios y periodos de los clones epidémicos *K. pneumoniae*-A/ST11 (a) y *E. coli*-A/ST10 (b) e índices de diversidad clonal (SDI) de las poblaciones *K. pneumoniae* y *E. coli* en los cuatro servicios durante ambos periodos de estudio.

Si analizamos los cambios a lo largo del tiempo de la diversidad clonal en cada servicio, observamos un incremento de los SDI en todos ellos durante la última parte del estudio (Figura 42c). En el servicio de Neurocirugía, este incremento no fue tan evidente, debido probablemente a la emergencia de los clones productores de NDM-1

(clon C-ST101 y clon H-ST437). La aparición de estos dos clones contribuyó a aumentar la diversidad total de *K. pneumoniae* al final del estudio, pero tuvo el efecto contrario en la propia unidad, donde la diversidad no se incrementó tanto como en los servicios en los que predominaron OXA-48 y VIM-1.

Por otro lado, de acuerdo con los patrones de PFGE, la población de *E. coli* mostró una elevada diversidad clonal que tendió a reducirse en el segundo periodo (18 clones en el periodo 1 y 14 clones en el periodo 2). Como vemos en la Figura 42, la disminución de los SDI sólo tuvo lugar en las unidades médicas, donde resaltó la emergencia de los clones A/ST10/OXA-48 (Gastroenterología) y J/ST354/OXA-48 (Neumología), llegando incluso a mostrar índices de diversidad inferiores que *K. pneumoniae*. En la Figura 42 se observa la distribución de los clones principales *K. pneumoniae*-A/ST11 y *E. coli*-A/ST10 respecto al resto de aislados de ambas especies.

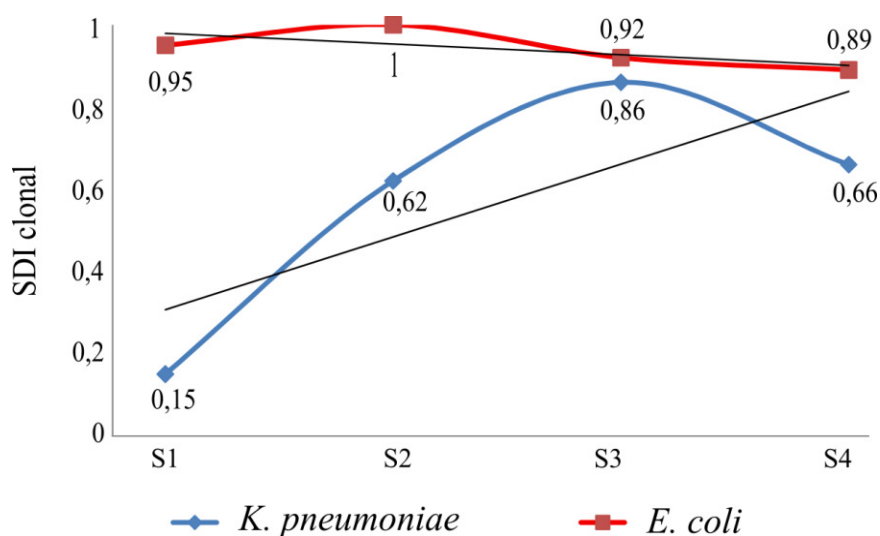
## 2.5. Clones epidémicos productores de OXA-48

Como hemos visto anteriormente, la carbapenemasa predominante durante todo el estudio fue OXA-48. El 67,9% (72/106) de los aislados de *K. pneumoniae* y el 84,2% (32/38) de los aislados de *E. coli* fueron productores de esta enzima. Si comparamos el índice de diversidad del conjunto de aislados de *K. pneumoniae*-OXA-48 ( $SDI_{Kp-OXA-48}=0,64$ ) respecto al de la población total ( $SDI_{Kp}=0,80$ ) observamos que la población productora de OXA-48 resultó tener una mayor clonalidad. Este efecto no fue tan marcado en la especie *E. coli*, donde los aislados productores de OXA-48 mostraron prácticamente el mismo SDI que la población total ( $SDI_{Ec-OXA-48}=0,96$  vs.  $SDI_{Ec}=0,97$ ).

En la Figura 43, se representan por semestres los índices de diversidad de la población productora de OXA-48 de ambas especies [ $(SDI_{Kp-OXA-48-S1}=0,15$ ;  $SDI_{Kp-OXA-48-S2}=0,62$ ;  $SDI_{Kp-OXA-48-S3}=0,86$ ;  $SDI_{Kp-OXA-48-S4}=0,66$ ), ( $SDI_{Ec-OXA-48-S1}=0,95$ ;  $SDI_{Ec-OXA-48-S2}=1$ ;  $SDI_{Ec-OXA-48-S3}=0,92$ ;  $SDI_{Ec-OXA-48-S4}=0,89$ )].

Si comparamos la distribución de clones de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48 durante los dos periodos, observamos que tal y como ocurre en la población total, al final del estudio la diversidad de *K. pneumoniae* aumentó ( $SDI_{Kp-OXA-48-P1}= 0,43$ ;  $SDI_{Kp-OXA-48-P2}= 0,72$ ) y la de *E. coli* disminuyó ( $SDI_{Ec-OXA-48-P1}= 0,99$ ;  $SDI_{Ec-OXA-48-P2}=0,89$ ). En la Tabla 23 se recogen los índices de

diversidad clonal de las poblaciones *K. pneumoniae*-OXA-48 y *E. coli*-OXA-48 en cada uno de los servicios durante los dos periodos.



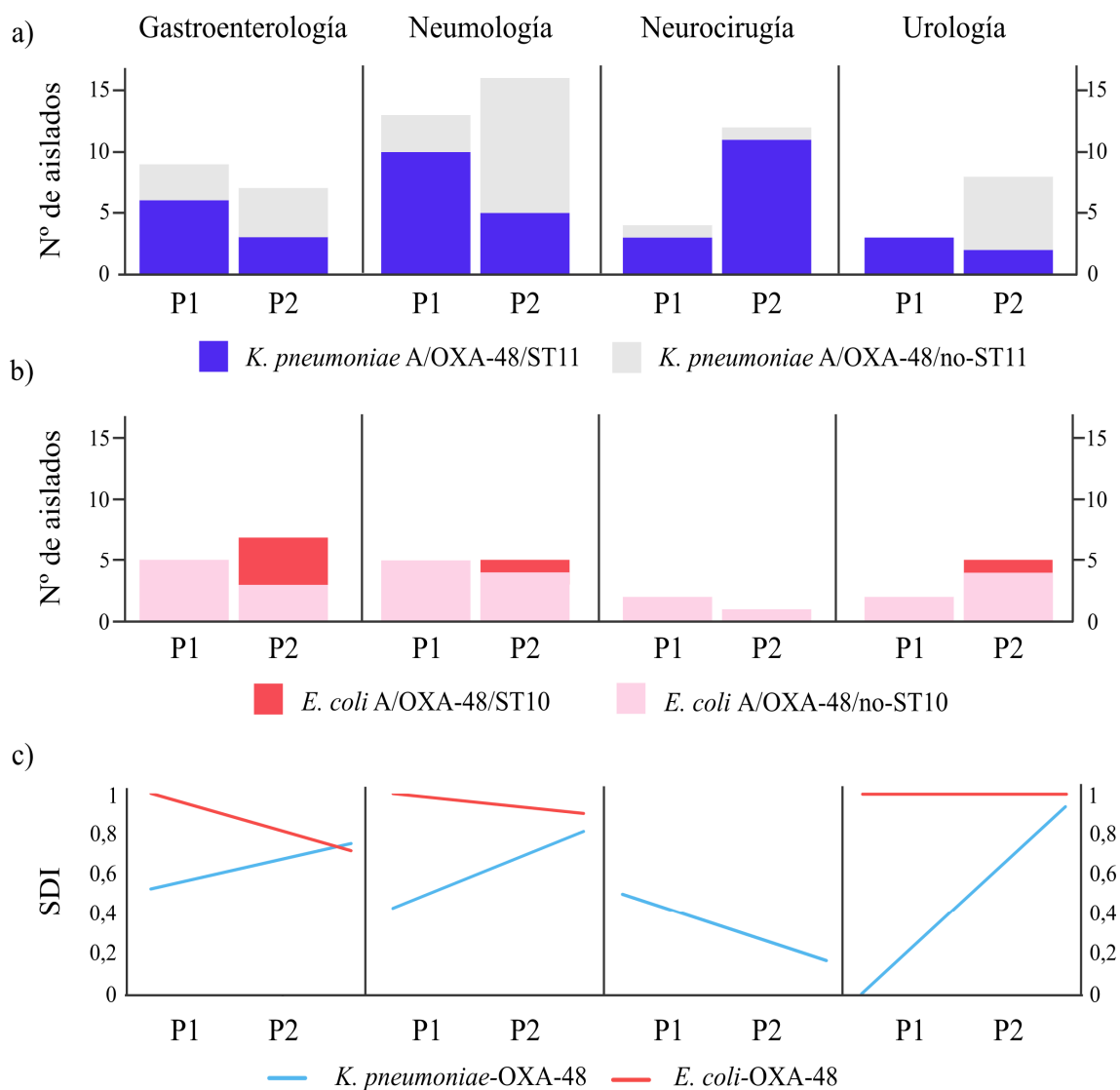
**Figura 43.** Índices de diversidad clonal semestrales de la población *K. pneumoniae* y *E. coli* productora de OXA-48.

**Tabla 23.** Índices de diversidad clonal (SDI) de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48 distribuido por servicios y periodos de estudio.

	Gastroenterología		Neumología		Neurocirugía		Urología		Total	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P1	P1	P2
<i>Kp</i> -OXA-48	0,53	0,75	0,42	0,81	0,5	0,17	0	0,93	<b>0,43</b>	<b>0,72</b>
<i>Ec</i> -OXA-48	1	0,71	1	0,9	1	0	1	1	<b>0,99</b>	<b>0,89</b>

Los clones *K. pneumoniae*-A/ST11/OXA-48 y *E. coli*-A/ST10/OXA48 fueron considerados los de mayor relevancia desde el punto de vista epidemiológico, por lo que su papel en la diversidad clonal de dichas especies pudo resultar fundamental. A pesar de su elevada prevalencia durante todo el estudio, la incidencia del clon *K. pneumoniae* A/ST11/OXA-48 (59,7%, 43/72) respecto a los clones no-ST11/OXA-48 disminuyó significativamente entre el primer periodo (75,9%; 22/29) y el segundo (48,9%; 21/43) ( $p < 0,05$ ). En la Figura 44a se representa la distribución de los clones ST11 y no-ST11 en cada servicio durante ambos periodos. En las unidades de Gastrología, Neumología y Urología, aunque el clon ST11 se mantuvo predominante, durante el segundo periodo su prevalencia disminuyó ligeramente y además se produjo la emergencia de un gran número de clones no-ST11. Sin embargo, en el servicio de Neurocirugía la incidencia del clon ST11/OXA-48 se disparó en la última parte del estudio y no se detectaron

nuevos clones productores de OXA-48. Si analizamos estos resultados en términos de diversidad clonal observamos que el SDI de los aislados *K. pneumoniae*-OXA-48 aumentó notablemente en el segundo periodo en todas las unidades, excepto en Neurocirugía, donde se tendió a la clonalidad (Figura 44c).



**Figura 44.** Distribución por servicios y periodos de los clones epidémicos *K. pneumoniae*-A/ST11/OXA-48(a) y *E. coli*-A/ST10/OXA-48 (b) e índices de diversidad clonal (SDI) de las poblaciones *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de OXA-48 en los cuatro servicios durante ambos periodos de estudio (c).

Por otro lado, entre los aislados *E. coli*-OXA-48 se identificó un clon predominante, el clon A/ST10, que fue únicamente detectado durante el segundo

periodo ( $p < 0,05$ ) y principalmente en la unidad de Gastroenterología. Por ello, a pesar del bajo número de aislados detectados, la diversidad clonal de la población de *E. coli*-OXA-48 de este servicio tendió a disminuir a lo largo del tiempo (Figura 44b y 44c). La SDI en el servicio de Neumología también se redujo ligeramente en el segundo periodo, pero fue debido a la detección del clon J/ST354/OXA-48. La diversidad clonal en el servicio de Urología se mantuvo en valores máximos porque todos aislados *E. coli*-OXA-48 detectados exhibieron patrones de PFGE diferentes. En la unidad de Neurocirugía se registró durante ambos periodos la prevalencia más baja de *E. coli*-OXA-48 y los datos fueron insuficientes para comparar la diversidad.

### **Cocolonización por enterobacterias productoras de OXA-48, VIM-1 y KPC-3.**

En el presente Capítulo se aborda el estudio de la transferencia *in vivo* de los genes *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-3</sub> entre diferentes especies de enterobacterias recogidas a partir de un subgrupo de pacientes cocolonizados del estudio R-GNOSIS.



## 1. Características de los pacientes cocolonizados

Con el propósito de caracterizar a este subgrupo de pacientes, se definió el término cocolonización como la colonización en un mismo paciente por diferentes especies de enterobacterias o por diferentes clones de la misma especie productoras del mismo tipo de carbapenemasa.

De los 162 pacientes del estudio, 25 (15,4%) presentaron cocolonización con dos (21/24) o tres (4/25) EPC diferentes. En este capítulo, se estudiaron únicamente los 23 pacientes (14,2%, 23/162) cocolonizados con enterobacterias productoras de OXA-48 (20/23), VIM-1 (2/23) y KPC-3 (1/23). El estudio de los pacientes cocolonizados por cepas productoras de NDM-1 se recoge en el Capítulo 4.

Los datos demográficos, los días totales de ingreso (LOS) y los días totales de ingreso hasta la detección del primer cultivo positivo para EPC (LOS-1) de los pacientes cocolonizados por EPC (23/162) se compararon con los datos de los pacientes colonizados por una única especie bacteriana (139/162) (Tabla 24).

**Tabla 24.** Datos recogidos sobre los pacientes del estudio R-GNOSIS.

	TOTAL		Cocolonizados		Colonizados	
	Me	Rango	Me	Rango	Me	Rango
Edad	74	26-98	80	38-98	74	26-95
LOS	16	1-215	28	1-161	16	1-215
LOS-1	10	1-211	3*	1-45	11*	1-211
LOS-2	-	-	14	4-81	-	-
	N	%	N	%	N	%
Hombres	97	59,9%	14	60,9%	83	59,7%
Muestras clínicas	28	17,3%	6	26,1%	22	15,8%
<b>TOTAL</b>	<b>162</b>	<b>2,0%</b>	<b>23</b>	<b>14,2%</b>	<b>139</b>	<b>85,8%</b>

Me=Mediana; LOS= Días de ingreso; LOS-1=Días de ingreso hasta la detección del primer cultivo positivo; LOS-2= Días de ingreso hasta la detección del segundo cultivo positivo. \*p<0,01

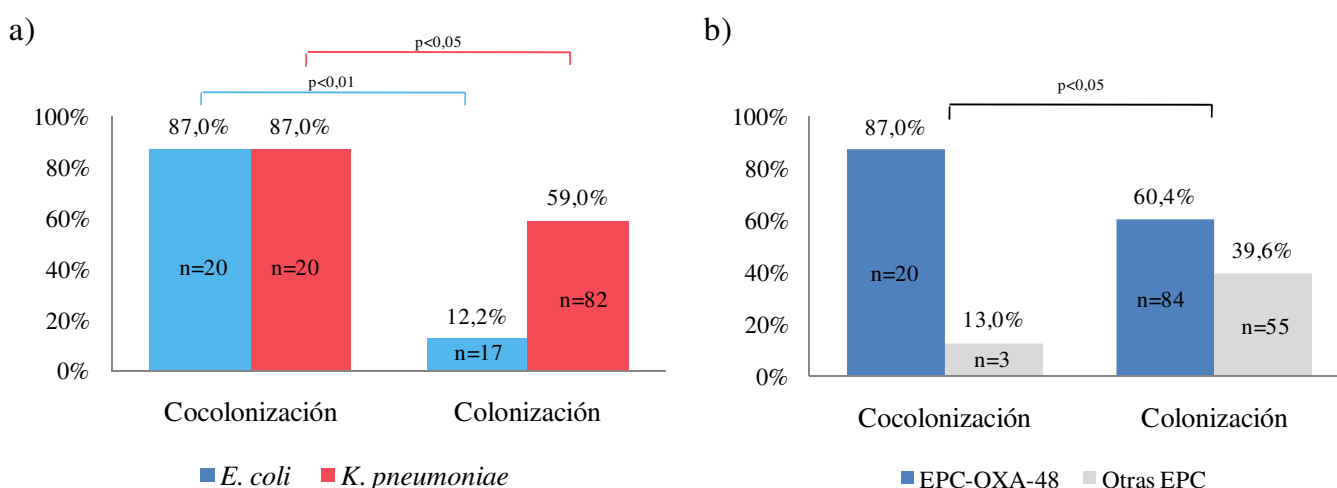
En el subgrupo de pacientes cocolonizados, la mediana de edad fue de 80 años (rango 38-98), mientras que en el segundo grupo fue de 74 años (rango 26-95) (p>0,05). La mediana de los días totales de ingreso fue superior en los pacientes cocolonizados en comparación con los colonizados por una única EPC (28 días vs. 16 días) (p>0,05). Por el contrario, la mediana de días desde el ingreso hasta la detección del primer cultivo

positivo para EPC fue superior en el grupo de los pacientes colonizados por una sola especie de EPC frente a los cocolonizados (11 vs. 3 días) ( $p<0,01$ ). En un total de 22 pacientes colonizados (15,8%; 22/139) y 6 pacientes cocolonizados (26,1%; 6/23) se recogieron muestras clínicas por EPC posteriores a la colonización (Tabla 24).

En general, los eventos de cocolonización fueron más frecuentes en los servicios médicos (9 pacientes en Neumología y 6 pacientes en Gastroenterología) que en los quirúrgicos (6 pacientes en Urología y 2 en Neurocirugía), aunque no se encontraron diferencias significativas (Tabla 25).

## 2. Eventos y dinámica de cocolonización

*K. pneumoniae* y *E. coli* fueron las especies más frecuentemente identificadas en los casos de cocolonización, detectándose cada una de ellas en un total de 20 pacientes (87,0%; 20/23). Además, en 19 de los pacientes (82,6%; 19/23) se demostró cocolonización por ambas especies (Tabla 25). En los pacientes cocolonizados, el porcentaje de colonización por *E. coli* y *K. pneumoniae* (87,0%) fue significativamente superior al obtenido para cada una de las especies entre los pacientes colonizados por una única EPC [(*E. coli*=17/139, 12,2%) ( $p<0,01$ ) y (*K. pneumoniae*= 82/139, 59,0%) ( $p<0,05$ )] (Figura 45a). Otras especies como *C. freundii* (3 pacientes), *K. oxytoca* (3 pacientes), *Kluyvera* spp. (2 pacientes) y *R. ornithinolytica* (1 paciente) se detectaron de forma esporádica (Tabla 25).



**Figura 45.** a) Incidencia de cocolonización y colonización por *K. pneumoniae* y *E. coli*; y b) Incidencia de cocolonización y colonización por EPC-OXA-48 y otras EPC.

**Tabla 25.** Datos de los pacientes cocolonizados por EPC durante el estudio R-GNOSIS.

Paciente	Edad	Sexo	Servicio	EPC (n°)	Motivo de ingreso	LOS (días)	Primer cultivo positivo			Segundo cultivo positivo			Muestra clínica	Ingreso previo
							Especie bacteriana	Mecanismo de resistencia	LOS-1 (días)	Especie bacteriana	Mecanismo de resistencia	LOS-2 (días)		
1	81	V	P	2	Exacerbación de EPOC	9	Ka + Ro	OXA-48	9	NEG	-	-	-	NO
2	98	V	U	2	Neumonía, ERC	15	Kp + Ec	OXA-48	2	Kp + Ec	OXA-48	8	Kp (Orina y BAS)	SI
3	40	M	N	2	Espondilodiscitis	35	Kp	OXA-48	13	Kp + Ec	OXA-48	19	-	SI
4	88	M	G	2	Diverticulitis aguda	28	Ec	OXA-48	3	Kp	OXA-48	14	Kp (Orina)	SI
5	80	V	P	3	Neumonía	29	Ka	OXA-48	1	Kp + Ec	OXA-48	15	-	SI
6	65	M	P	2	Exacerbación de EPOC	161	Kp	OXA-48	15	Kp + Ec	OXA-48	26	Kp + Ec (Herida)	SI
7	83	V	P	3	Fibrosis pulmonar	81	Kp+Ko	OXA-48	17	Kp + Cf	OXA-48	81	-	SI
8	38	V	P	2	Proteinosis alveolar	9	Kp + Ec	OXA-48	2	Kp + Ec	OXA-48	9	-	NO*
9	78	V	P	3	Neoplasia pulmonar	30	Kp + Cf	OXA-48	16	Ec + Cf	OXA-48	23	-	SI
10	52	M	G	2	IP (CPRE)	1	Ec + Ko	OXA-48	1	NR	-	-	-	SI
11	85	M	G	2	Exacerbación de EPOC	20	Ec	OXA-48	1	Kp + Ec	OXA-48	11	-	SI
12	86	M	P	2	Neumonía	3	Kp + Ec	OXA-48	2	NR	-	-	-	NO*
13	94	M	U	2	ERC	6	Kp + Ec	OXA-48	2	Kp + Ec	OXA-48	6	-	SI
14	84	V	G	2	ERA	23	Kp + Ec	OXA-48	21	NR	-	-	-	NO
15	87	V	U	2	Infiltración de tumor vejiga	19	Kp + Ec	OXA-48	1	Kp + Ec	OXA-48	4	-	SI
16	68	V	N	2	Aneurisma cerebral	84	Kp	OXA-48	45	Kp + Ec	OXA-48	53	Kp (Orina)	NO
17	49	V	U	2	Colangitis aguda	5	Kp + Ec	OXA-48	3	NR	-	-	Kp (Prótesis)	SI
18	87	V	U	2	Colangitis aguda	20	Kp + Ec	OXA-48	1	Kp + Ec	OXA-48	6	-	SI
19	71	M	P	2	Neumonía	11	Kp + Ec	OXA-48	5	Kp + Ec	OXA-48	11	-	SI
20	90	M	G	2	Colangitis aguda	9	Kp + Ec	OXA-48	9	NR	-	-	-	SI
21	72	V	G	2	Septicemia	41	Kp	VIM-1	14	Ec	VIM-1	20	-	SI
22	64	V	U	2	IP (Endoscopia)	79	Cf	VIM-1	27	Ko	VIM-1	79	Ko (Orina)	SI
23	66	V	P	3	Neumonía	14	Ec	KPC-3	1	Kp	KPC-3	14	-	SI

V=varón; M=mujer; G=Gastroenterología; P=Neumología; N=Neurocirugía; U=Urología; LOS= Días de ingreso; LOS-1=Días de ingreso hasta la detección del primer cultivo positivo; LOS-2= Días de ingreso hasta la detección del segundo cultivo positivo; NEG=Ausencia de crecimiento bacteriano; NR=Muestra no registrada; BAS=Broncoaspirado; IP= Ingreso programado; EPOC=Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC=Enfermedad renal crónica; ERA= Enfermedad renal aguda; CPRE= Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica; Ka=*Kluyvera* spp.; Ro= *R. ornithinolytica*; Kp= *K. pneumoniae*; Ec= *E. coli*; Ko= *K. oxytoca*; Cf= *C. freundii*).

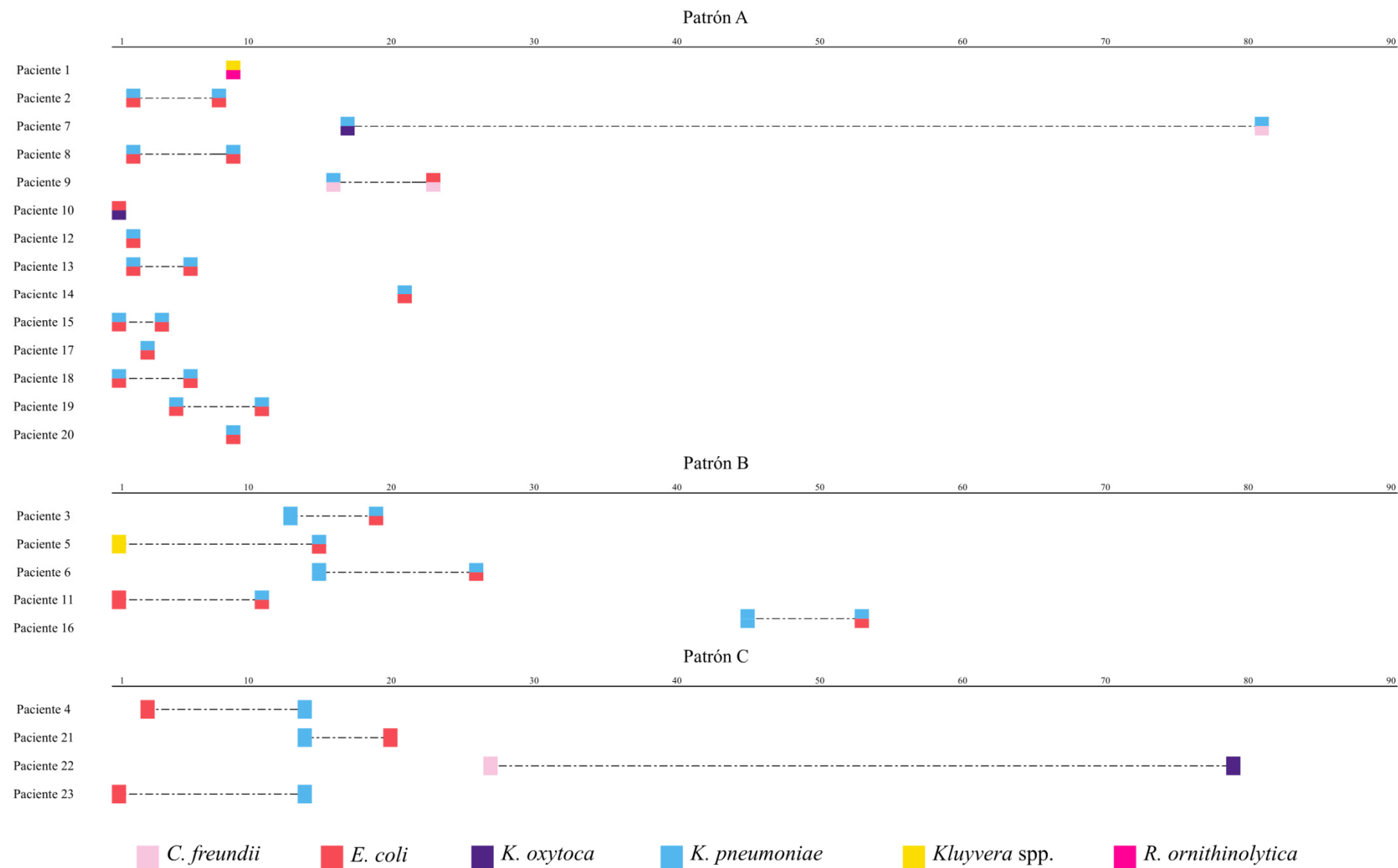
\*Paciente sin ingreso previo en nuestro hospital pero asociado a cuidados sanitarios en otros centros.

Teniendo en cuenta el tipo de carbapenemasa producida, como se muestra en la Tabla 25, la mayor parte de los eventos de cocolonización se produjeron por enterobacterias productoras de OXA-48 (86,9%; 20/23%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 25b), y más en concreto por *K. pneumoniae* y *E. coli* (73,9%; 17/23). De manera minoritaria se identificó cocolonización por enterobacterias productoras de VIM-1 (2 pacientes) y KPC-3 (1 paciente) (Tabla 25).

*K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48 se detectaron de forma simultánea en 15 pacientes (65,2%; 15/23). En 4 de los 15 casos, se había registrado una colonización por *K. pneumoniae*-OXA-48 en ingresos previos (pacientes 13, 15, 17 y 20) y en otros 10 pacientes (66,7%; 10/15) ambas especies se detectaron directamente en la primera muestra positiva. En aquellos casos en los que se recogieron cultivos sucesivos, se observó que los pacientes con la primera muestra positiva para estas dos especies, en el segundo cultivo volvían a ser positivos [*K. pneumoniae* (83,3%; 10/12) y *E. coli* (77,8%; 7/9)]. Por otro lado, excepto en el caso 9, el resto de especies (*Kluyvera* spp., *C. freundii* y *K. oxytoca*), así como las enterobacterias productoras de VIM-1 y KPC-3, fueron identificadas de manera aislada en un único cultivo (primer o segundo cultivo positivo) (Tabla 25).

Durante el análisis de la dinámica de cocolonización se detectaron 3 patrones: 1) cocolonización en el primer cultivo positivo (patrón A), 2) colonización en el primer cultivo positivo y cocolonización en el segundo cultivo positivo (patrón B) y 3) colonización por EPC diferentes en el primer y segundo cultivo positivo (patrón C).

Como se refleja en la Figura 46, en 14 de los 23 pacientes (70%) se detectó cocolonización por EPC directamente en el primer cultivo positivo (patrón A) siendo todos estos microorganismos productores de OXA-48. Cabe destacar que 10 de estos pacientes (71,4%) habían tenido un ingreso previo en nuestro hospital y otros 2 (14,3%) habían estado ingresados en otros centros. En 5 pacientes (21,7%) la cocolonización se detectó en el segundo cultivo positivo (patrón B). De nuevo, todos fueron portadores de EPC-OXA-48, y además en 3 de ellos la EPC identificada en el primer cultivo fue *K. pneumoniae*. Por último, el patrón C se identificó en las cocolonizaciones por enterobacterias productoras de VIM-1 y KPC-3, y en un solo caso de cocolonización por EPC-OXA-48.



**Figura 46.** Dinámica de cocolonización durante el estudio R-GNOSIS. La escala numérica indica el día de colonización y cocolonización desde el ingreso.

### 3. Estructura poblacional

De los 23 pacientes cocolonizados se aislaron un total de 49 aislados de EPC. En este grupo de aislados la relación clonal fue analizada mediante las técnicas de PFGE y MLST (Tabla 26). Como era de esperar, entre aislamientos de la misma especie procedentes de cultivos positivos sucesivos del mismo paciente se observaron perfiles de PFGE y secuencias tipo idénticos.

*K. pneumoniae* presentó una mayor clonalidad entre sus aislados ( $SDI_{K. pneumoniae}=0,85$ ) que el resto de especies. Se identificaron un total de 12 patrones de restricción y 10 STs distintos. En ocho pacientes se detectó el clon de alto riesgo A/ST11/OXA-48 (40%; 8/20), en otros tres el clon ST15/OXA-48 (15%; 3/20) y en otros dos el clon ST307/OXA-48 (10%; 2/20). El resto de aislados mostraron patrones de PFGE y STs diferentes. Cabe destacar que en todos los pacientes con sucesivas muestras donde se detectó colonización con el clon A/ST11-OXA-48 de *K. pneumoniae*, se demostró la persistencia de dicho clon. Como vemos en la Tabla 26, la mayoría de estos clones de *K. pneumoniae* se asociaron a la coproducción de CTX-M-15.

Entre la población de *E. coli*, se encontró una mayor diversidad genética ( $SDI_{E. coli}=0,97$ ), ya que se asignaron 18 perfiles de PFGE y 11 STs diferentes. Como observamos en la Tabla 26, 4 pacientes presentaron colonización por aislados productores de OXA-48 pertenecientes al complejo clonal 10 (20%; 4/20). En dos de estos pacientes, se recogió un segundo cultivo y en ellos se detectó de nuevo el crecimiento del clon OXA-48-CC10.

El análisis de los patrones de restricción en el resto de especies reveló un único clon de *Kluyvera* spp. (A), dos clones de *C. freundii* (B y D) y tres clones de *K. oxytoca* (F, G y H).

**Tabla 26.** Características principales de las EPC detectadas en pacientes cocolonizados y los plásmidos portadores de carbapenemasa identificados.

Paciente	Primer cultivo positivo									Segundo cultivo positivo								
	Especie bacteriana	Patrón PFGE/ST	Genes CP	Genes BLEE	TC/TM	Plásmidos				Especie bacteriana	Patrón PFGE/ST	Genes CP	Genes BLEE	TC/TM	Plásmidos			
						Tamaño (kb)	PBRT <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	Perfil RFLP						Tamaño (kb)	PBRT <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	Perfil RFLP
1	<i>Ro</i>	A	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ka</i>	A	OXA-48	CTX-M-213	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Ec</i>	β/NT	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	β/NT	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
3	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
										<i>Ec</i>	S/ST nuevo	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
4	<i>Ec</i>	U/ST nuevo	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	I/ST15	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48 +CTX-M-15	60	IncL	+	A
5	<i>Ka</i>	A	OXA-48	CTX-M-213	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
										<i>Ec</i>	W/ST nuevo	OXA-48	CTX-M-9	OXA-48	60	IncL	+	A
6	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
										<i>Ec</i>	Y/ST nuevo	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
7	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Ko</i>	H	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Cf</i>	D	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
8	<i>Kp</i>	N/ST628	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	N/ST628	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Ec</i>	H/CC10*	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	H/CC10*	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
9	<i>Kp</i>	U/ST1197	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	M/ST23	OXA-48	CTX-M-1	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Cf</i>	B	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Cf</i>	B	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
10	<i>Ko</i>	G	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ec</i>	I/ST453	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Ec</i>	T/ST nuevo	OXA-48	CTX-M-14	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
										<i>Ec</i>	T/ST nuevo	OXA-48	CTX-M-14	OXA-48	60	IncL	+	A
12	<i>Kp</i>	G/ST 405	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ec</i>	Ω/NT	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> PBRT indica la clasificación de los plásmidos acorde a su grupo de incompatibilidad (Inc).

<sup>2</sup> PCR indica la amplificación de los 3 genes: *repA*, *traU* y *parA*.

\*CC10= Nueva variante de ST10.

TC= Transconjugante; TM= Transformante.

**Tabla 26.** Continuación.

Paciente	Primer cultivo positivo									Segundo cultivo positivo								
	Especie bacteriana	Patrón PFGE/ST	Genes CP	Genes BLEE	TC/TM	Plásmidos				Especie bacteriana	Patrón PFGE/ST	Genes CP	Genes BLEE	TC/TM	Plásmidos			
						Tamaño (kb)	PBRT <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	Perfil RFLP						Tamaño (kb)	PBRT <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	Perfil RFLP
13	<i>Kp</i>	F/ST392	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48+ CTX-M-15	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	F/ST392	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48+ CTX-M-15	60	IncL	+	A
	<i>Ec</i>	δ/NT	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	δ/NT	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
14	<i>Kp</i>	E/ST15	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ec</i>	A/ST10	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>Kp</i>	D/ST307	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	D/ST307	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Ec</i>	V/ST nuevo	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	V/ST nuevo	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
16	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
										<i>Ec</i>	P/ST6083	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
17	<i>Kp</i>	R/ST151	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ec</i>	A/ST10	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>Kp</i>	E/ST15	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	E/ST15	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Ec</i>	A/ST10	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	A/ST10	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
19	<i>Kp</i>	J/ST307	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Kp</i>	J/ST307	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A
	<i>Ec</i>	J/ST354	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	J/ST354	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A
20	<i>Kp</i>	A/ST11	OXA-48	CTX-M-15	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ec</i>	I/ST453	OXA-48	-	OXA-48	60	IncL	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>Kp</i>	Y/ST nuevo	VIM-1	-	VIM-1	60	IncL	+	A	<i>Ec</i>	L/ST410	VIM-1	-	VIM-1	60	IncL	+	A
22	<i>Cf</i>	B	VIM-1	CTX-M-15	VIM-1	60	IncL	+	A	<i>Ko</i>	F	VIM-1	-	VIM-1	60	IncL	+	A
23	<i>Ec</i>	R/ST6440	KPC-3	-	KPC-3	60	IncN	-	B	<i>Kp</i>	Ω/ST34	KPC-3	-	KPC-3	60	IncN	-	B

<sup>1</sup> PBRT indica la clasificación de los plásmidos acorde a su grupo de incompatibilidad (Inc).

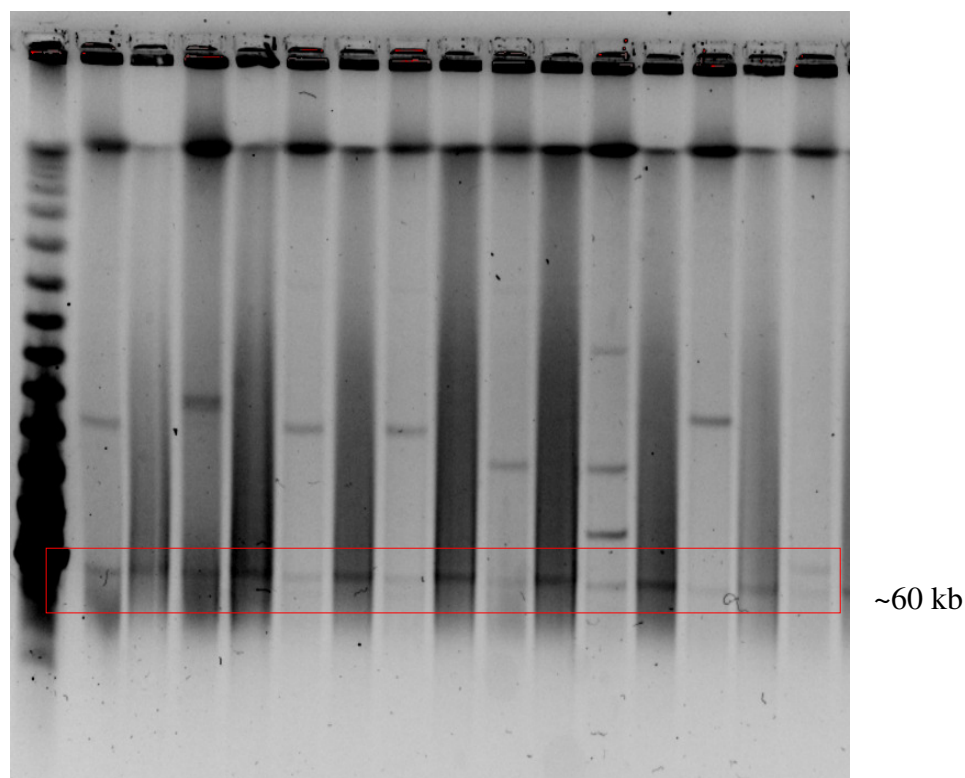
<sup>2</sup> PCR indica la amplificación de los 3 genes: *repA*, *traU* y *parA*.

\*CC10= Nueva variante de ST10.

TC= Transconjugante; TM= Transformante.

#### 4. Transferabilidad de genes de resistencia y caracterización de plásmidos

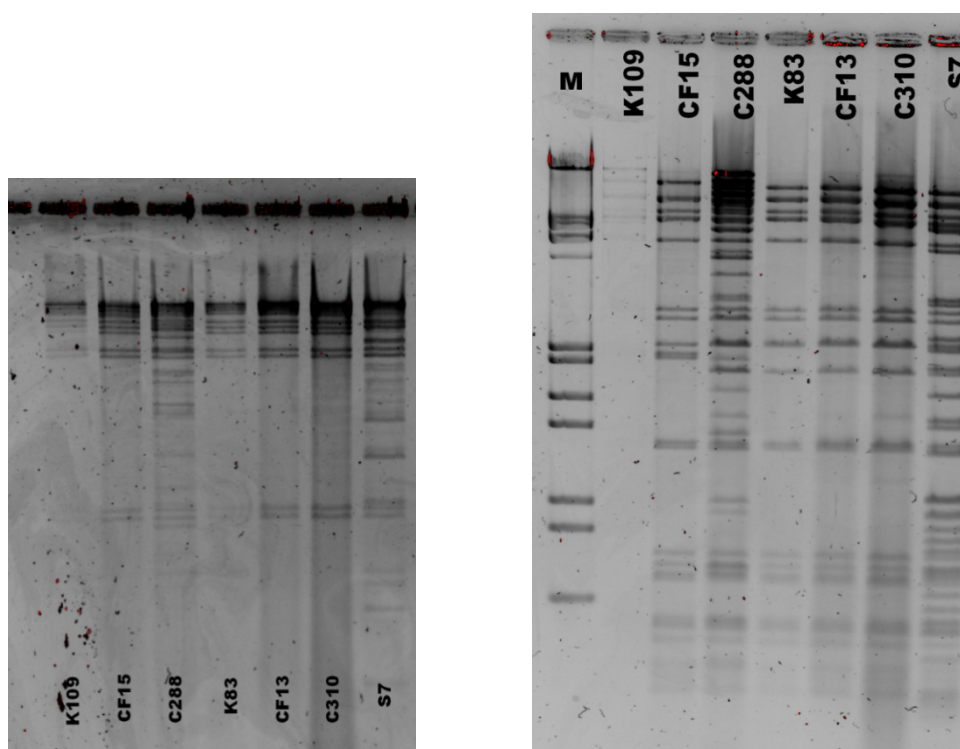
Los genes *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-3</sub> se transfirieron con éxito a la cepa receptora *E. coli* J53 Azide® en todos los casos excepto en la especie *Kluyvera* spp. A partir de los dos aislamientos de *Kluyvera* spp. se obtuvieron por choque térmico transformantes *E. coli*-DHA5α portadores de OXA-48. La digestión con la endonucleasa S1 y los experimentos de hibridación revelaron que *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>KPC-3</sub> residían en plásmidos transferibles de aproximadamente 60 kb, tanto en las cepas *wildtype* como en los transconjugantes (TC) y transformantes (TM) obtenidos en el paso anterior (Figura 47).



**Figura 47.** Digestión con la endonucleasa S1 de los aislados salvajes y sus respectivos transconjugantes.

Los transconjugantes y transformantes que contenían los plásmidos con los genes *bla*<sub>OXA-48</sub> y *bla*<sub>VIM-1</sub> amplificaron mediante PCR para el grupo de incompatibilidad IncL y para los genes *repA*, *parA* y *traU*, relacionando por tanto todos estos plásmidos con el plásmido IncL/M-pOXA-48a anteriormente descrito [142]. En los TC procedentes de los aislados de *K. pneumoniae*-OXA-48 de los pacientes 4 y 13 se

detectó también *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en el mismo plásmido que el gen *bla*<sub>OXA-48</sub>. En uno de los transformantes obtenidos a partir de *Kluyvera* spp. se detectó un gen *bla*<sub>FOX-8</sub> en un plásmido pequeño de ~10 kb. Los patrones de RFLP obtenidos por digestión con las enzimas *Dra*I y *Hpa*I mostraron perfiles de restricción comparables entre todos estos plásmidos portadores de OXA-48 y VIM-1 (perfil A) (Figura 48). Por otro lado, los plásmidos de ~60 kb portadores del gen *bla*<sub>KPC-3</sub> no amplificaron para los genes *repA*, *traU* y *parA*, y siguiendo el esquema PRBT se les asignó el grupo de incompatibilidad IncN. Los perfiles de restricción de estos plásmidos portadores de KPC-3 fueron diferentes de los obtenidos a partir de los plásmidos con OXA-48 y VIM-1, aunque estuvieron relacionados entre sí (perfil B).



**Figura 48.** Digestión con *Hpa*I (izquierda) y *Dra*I (derecha) del ADN plasmídico purificado a partir de los transconjugantes y transformantes.

En general, como se observa en la Tabla 27, en los TC-OXA-48 se detectaron elevados porcentajes de resistencia a los antibióticos carbapenems (70% ertapenem, 60% imipenem y 19% meropenem). Al contrario que las cepas salvajes, estos TC-OXA-48 mostraron una elevada sensibilidad a las cefalosporinas de amplio espectro y al aztreonam. Por otra parte, todos los transconjugantes portadores de pVIM y

pKPC-3 mostraron resistencia a los carbapenems y a las cefalosporinas de amplio espectro.

**Tabla 27.** Resistencia a antibióticos de las EPC recogidas de pacientes cocolonizados y los transconjugantes y transformantes obtenidos a partir de estos aislados.

Antibióticos	OXA-48		VIM-1		KPC-3	
	WT	TC/TM	WT	TC	WT	TC
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
AMC	43 (100)	43 (100)	4 (100)	4 (100)	2 (100)	2 (100)
PIP/TZ	43 (100)	43 (100)	4 (100)	4 (100)	2 (100)	2 (100)
CTX	30 (69,8)	6 (13,9)	4 (100)	4 (100)	2 (100)	2 (100)
CAZ	26 (60,5)	6 (13,9)	4 (100)	4 (100)	2 (100)	2 (100)
FEP	24 (55,8)	3 (7,0)	4 (100)	2 (50)	2 (100)	2 (100)
AZT	24 (55,8)	5 (11,6)	1 (25)	1 (25)	2 (100)	2 (100)
IMP	8 (18,6)	26 (60,5)	1 (25)	4 (100)	2 (100)	2 (100)
MER	27 (62,8)	8 (18,6)	3 (75)	3 (75)	2 (100)	2 (100)
ERT	43 (100)	30 (69,8)	2 (50)	3 (75)	2 (100)	2 (100)
GEN	22 (51,2)	2 (4,6)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOB	22 (51,2)	1 (2,3)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AMK	1 (2,3)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CIP	30 (69,8)	1 (2,3)	3 (75)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
SXT	29 (67,4)	1 (2,3)	3 (75)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
TIG	2 (4,6)	1 (2,3)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
FOS	31 (72,1)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
COL	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

WT= *Wildtype*; TC=Transconjugantes; TM=Transformantes.

AMC=Amoxicilina-ácido clavulánico; PIP/TZ=Piperacilina-tazobactam; CTX=Cefotaxima; CAZ=Ceftazidima; FEP=Cefepime; AZT=Aztreonam; IMP=Imipenem; MER=Meropenem; ERT=Ertapenem; GEN=Gentamicina; TOB=Tobramicina; AMK=Amikacina; CIP=Ciprofloxacino; SXT=Trimetoprim-sulfametoxazol; TIG=Tigeciclina; FOS=Fosfomicina; y COL=Colistina.



### **Primera descripción de aislados de *Kluyvera* spp. productores de OXA-48 y CTX-M-213.**

En este capítulo se describe la adquisición de *bla*<sub>OXA-48</sub> por aislados de *Kluyvera* spp. mediante transferencia lateral de un plásmido relacionado con IncL/M-pOXA-48a y su posterior diseminación interpaciente a través de un único clon. Además, se describe y caracteriza la nueva variante cromosómica CTX-M-213 cuyo gen responsable está presente en estos mismos aislados.



## 1. Identificación de los aislados bacterianos y datos clínicos

Entre abril de 2014 y julio de 2015 se detectaron seis pacientes colonizados con *Kluyvera* spp. productora de OXA-48 en tres servicios de nuestro hospital (Gastroenterología, Neumología y Urología).

Los seis aislados fueron inicialmente identificados como *Kluyvera ascorbata* mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), aunque con unos grados de identidad que confirmó únicamente la identificación a nivel de género (1,7-2) (Tabla 28). En tres aislados, la identificación como *Kluyvera georgiana* mostró índices inferiores a los obtenidos para *K. ascorbata* y en otros tres casos no se obtuvieron coincidencias (Tabla 28).

**Tabla 28.** Grados de identidad en la identificación por MALDI-TOF MS de los aislados de *Kluyvera* spp. recogidos durante el proyecto R-GNOSIS.

<i>Kluyvera</i> spp.	KA1	KA2	KA3	KA4	KA5	KA6
<i>K. ascorbata</i>	1,73	1,76	1,87	1,82	1,92	1,81
<i>K. georgiana</i>	1,71	-	-	-	1,73	1,81

Por otro lado, la identificación basada en la amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S tampoco permitió discriminar a nivel de especie, ya que se obtuvo un 100% de identidad tanto con *K. ascorbata* como con *K. georgiana*.

La mediana de edad de estos pacientes fue 75 años (rango=59-81) y cuatro de ellos fueron varones. La mediana de días de ingreso (LOS) fue de 15 días (rango= 9-40 días) y de 11,5 días (rango=1-41 días) hasta la detección de la colonización por *Kluyvera* spp. productora de OXA-48 (LOS-Ka). En dos pacientes, los aislados de *Kluyvera* spp.-OXA-48 se encontraron colonizando junto con otras especies de enterobacterias productoras de OXA-48: *R. ornithinolytica* (paciente 2) y *E. coli* y *K. pneumoniae* (paciente 5) (Capítulo 2). Los datos de los pacientes y las características principales de los aislados se recogen en la Tabla 29.

Todos los pacientes, excepto el paciente 5, tuvieron un cultivo de vigilancia epidemiológica negativo al ingreso y la colonización por *Kluyvera* spp.-OXA-48 fue detectada en una de las muestras semanales (paciente 3) o al alta (pacientes 1, 2, 4 y 6). Excepto el paciente 2, todos habían tenido hospitalizaciones previas en nuestro hospital, durante las que se había recogido al menos un cultivo negativo para EPC.

**Tabla 29.** Datos recogidos de los pacientes colonizados por *Kluyvera* spp. productora de OXA-48, características fenotípicas y genotípicas de los aislados y caracterización plasmídica de los transformantes con OXA-48 obtenidos.

	KA1	KA2	KA3	KA4	KA5	KA6
<b>Pacientes</b>	1	2	3	4	5	6
<b>Edad (años) / Sexo</b>	76 / varón	81 / varón	64 / varón	73 / mujer	80 / varón	59 / mujer
<b>Servicio</b>	Gastroenterología	Neumología	Urología	Gastroenterología	Neumología	Urología
<b>Fecha aislamiento</b>	abril 2014	abril 2014	agosto 2014	diciembre 2014	septiembre 2014	jul-15
<b>LOS (días)</b>	40	9	14	16	29	8
<b>LOS-Kg (días)</b>	41	10	13	16	1	9
<b>Cocolonización</b>	-	<i>Ro</i>	-	-	<i>Kp y Ec</i>	-
<b>Motivo de ingreso</b>	Angiodisplasia de colon	Exacerbación de EPOC	Orquiepididimitis	Rectorragia con anemización	Neumonía	Complicación cirugía renal
<b>Muestra clínica</b>	No	No	No	No	No	No
<b>CMI (µg/mL)</b>						
<b>AMP</b>	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<b>AMC</b>	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8
<b>PIP/TZ</b>	>64	>64	>64	64	>64	64
<b>CF</b>	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<b>CZ</b>	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<b>CXM</b>	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<b>FOX</b>	16	≤8	16	≤8	≤8	≤8
<b>FEP</b>	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
<b>CTX</b>	>32	8	16	≤1	32	16
<b>CAZ</b>	>16	>16	>16	≤1	>16	>16
<b>IMP</b>	≤1	≤1	≤1	≤1	2	≤1
<b>ERT</b>	2	1	4	4	2	2
<b>MER</b>	≤1	≤1	1	2	≤1	≤1
<b>Otras corresponsibilidades</b>	-	CIP, SXT	CIP, SXT	CIP, TIG	SXT	-
<b>Genes de resistencia</b>						
<i>bla</i> <sub>Carbapenemasa</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
<i>bla</i> <sub>BLEE</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-213</sub>
<b>Otros</b>	-	<i>bla</i> <sub>FOX-8</sub>	-	-	-	-
<b>Plásmidos (TM)</b>						
<b>Perfil de resistencia</b>	ERT, MER	CAZ, CTX, MER	IMP, ERT, MER	IMP, ERT, MER	MER	MER, ERT
<b>Genes de resistencia</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> <i>bla</i> <sub>FOX-8</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
<b>Tamaño (kb)</b>	~60	~60	~60	~60	~60	~60
<b>Grupo de Incompatibilidad PCR</b>	IncL	IncL	IncL	IncL	IncL	IncL
<b>(<i>repA</i>, <i>traU</i>, <i>parA</i>)</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Patrón RFLP</b>	A	A	A	A	A	A

CMI=Concentración mínima inhibitoria; AMP=Ampicilina; AMC=Amoxicilina- ácido clavulánico; PIP/TZ=Piperacilina-tazobactam; CF=Cefalotina; CZ=Cefazolina; CXM=Cefuroxima; FOX=Cefoxitina; FEP=Cefepime; CTX=Cefotaxima; CAZ=Ceftazidima; IMP=Imipenem; MER=Meropenem; ERT=Ertapenem; CIP=Ciprofloxacino; TIG=Tigeciclina; y SXT=Sulfometoxazol.

Como se describió en la Figura 40 (Capítulo 1), a pesar de haber sido localizados en distintos servicios hospitalarios y en meses diferentes, todos los aislamientos exhibieron un patrón de PFGE muy relacionado, con un nivel de similitud >95%, por lo que se consideraron pertenecientes al mismo clon.

## 2. Caracterización genotípica y fenotípica de la resistencia

La amplificación por PCR demostró la presencia de *bla*<sub>OXA-48</sub> y la coproducción de una enzima del grupo CTX-M-9 en todos los aislados de *Kluyvera* spp. La secuenciación mostró que todos los aislamientos albergaban una nueva variante cromosómica de CTX-M, diferente de CTX-M-13 en una única sustitución aminoacídica en la posición 56 (Lys-56-Glu) (Figura 49). La nueva variante fue anotada y numerada en la base de datos de NCBI como CTX-M-213 (MH094805).

```

CTX-M-13      MVT KRMQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
KA 1         MVT KR VQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
KA 2         MVT KR VQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
KA 3         MVT KR VQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
KA 4         MVT KR VQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
KA 5         MVT KR VQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
KA 6         MVT KR VQRMMFAAAA CIP LL LGS AP LYA QT SAV QQ KLA ALEKS SGGRL GVA LI DTE DNTQ
*****:*****

```

**Figura 49.** Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de los genes *bla*<sub>CTX-M-13</sub> y *bla*<sub>CTX-M-213</sub> de todos los aislados de *Kluyvera* spp. En rojo está marcada la sustitución de aminoácido (K56E) detectada en la variante CTX-M-213 respecto al gen *bla*<sub>CTX-M-13</sub>.

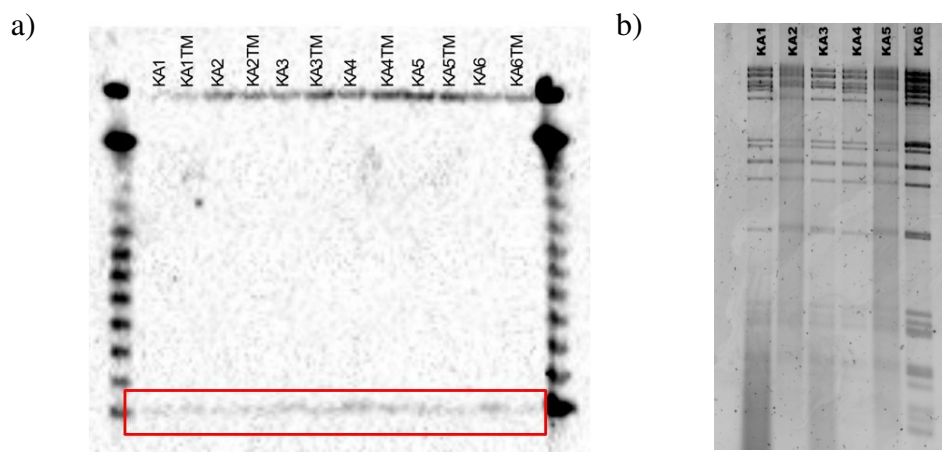
Todos los aislados de *Kluyvera* spp. fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de primera generación (cefazolina y cefalotina), cefuroxima y ertapenem (rango 1-4 mg/L). En todos los casos, excepto el aislado KA4, presentaron resistencia a cefotaxima (83,3%; >16 mg/L) y ceftazidima (83,3%; rango 8- >32 mg/L). Los carbapenémicos imipenem y meropenem, al igual que cefepime, mostraron valores de CMI sensibles en el 100% de los aislados. Como se observa en la Tabla 29, en cuatro casos se observó corresponsencia a otros antimicrobianos (50,0% ciprofloxacino, 50,0% sulfometoxazol y 16,7% tigeciclina).

## 3. Tipado de plásmidos

Mediante choque térmico se obtuvo de cada aislado de *Kluyvera* spp. un transformante con *bla*<sub>OXA-48</sub>. Las técnicas de hibridación-*SI* y PCR para el tipado de plásmidos

(esquema PBRT y genes *repA*, *traU* y *parA*) mostraron que el gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se localizaba, tanto en la cepa salvaje como en los transformantes, en un plásmido IncL de aproximadamente ~60 kb (Figura 50a), relacionado con el plásmido IncL/M-pOXA-48a previamente descrito [142]. Además, la digestión con las enzimas de restricción *HpaI* y *DraI* del ADN plasmídico purificado a partir de los seis transformantes mostró perfiles de restricción comparables entre todos ellos (Figura 50b).

Todos los transformantes fueron resistentes a meropenem, mientras que la resistencia a ertapenem (66,7%) e imipenem (33,3%) fue variable. El transformante obtenido a partir del aislado KA2 (KA2-TM) presentó también resistencia a ceftazidima y cefotaxima. Entre los transformantes no se detectó coresistencia a ningún otro antimicrobiano (Tabla 29).



**Figura 50.** a) Imagen de la hibridación-S1 del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en todos los aislados de *Kluyvera* spp. y sus respectivos transformantes; y b) digestión con *DraI* del ADN plasmídico purificado a partir de los seis transformantes.

#### 4. Fenotipo de resistencia de *bla*<sub>CTX-M-213</sub>

Los experimentos de clonación y mutagénesis dirigida de sitio nos permitieron obtener células transformantes *E. coli* DH5- $\alpha$  que albergaban plásmidos portadores de los genes *bla*<sub>CTX-M-213</sub> (pCTX-M-213) o *bla*<sub>CTX-M-13</sub> (pCTX-M-13).

Los valores de CMI para ambas cepas mostraron que la glutamina en la posición 56 del gen *bla*<sub>CTX-M-213</sub> era responsable de la actividad ligeramente inferior a la de CTX-M-13 frente a los antibióticos estudiados. La variante CTX-M-213 expresó resistencia frente a cefotaxima, pero a diferencia de CTX-M-13, fue sensible a ceftazidima, cefepime y amoxicilina-clavulánico (Tabla 30).

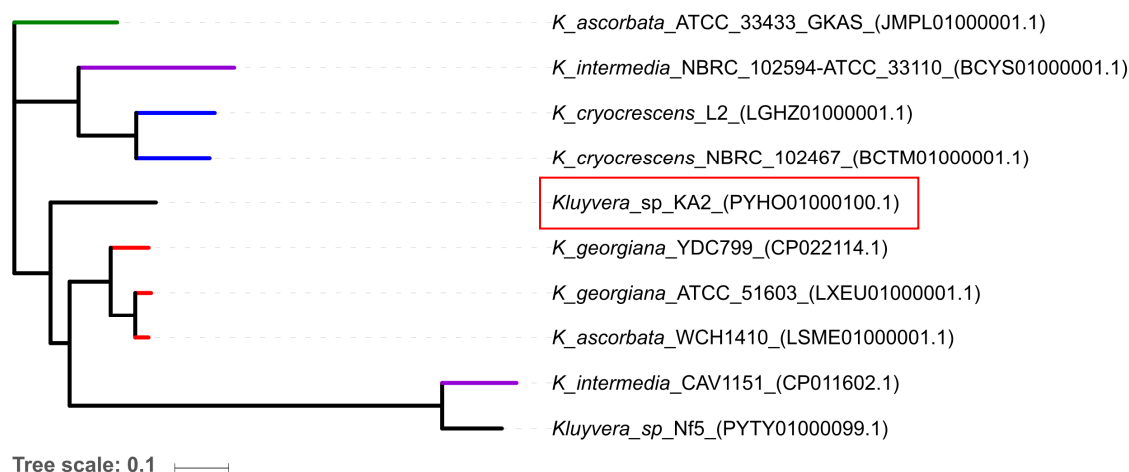
**Tabla 30.** Valores de CMI de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en los transformantes productores de CTX-M-213 y CTX-M-13, y la cepa isogénica *E. coli*-DHA5a.

Antibiótico	Rango de CMI (mg/L)		
	<i>E. coli</i> -DHA5a (pCTX-M-213)	<i>E. coli</i> -DHA5a (pCTX-M-13)	<i>E. coli</i> -DHA5a
AMX	256	256	$\leq 8$
AMC	3-4	12	$\leq 8$
PIP/TZ	1-1,5	0,5-1	0,5
CXM	256	256	0,125
FOX	3-6	1,5-6	0,125
FEP	1-1,5	1,5-8	<0,06
CTX	3-8	16-24	<0,06
CAZ	0,38	0,75-1	<0,06
IMP	0,19-0,25	0,125-0,19	0,125
ERT	0,008-0,012	0,012-0,016	0,0625
MER	0,012-0,032	0,016-0,032	0,125

CMI=Concentración mínima inhibitoria; AMX=Amoxicilina; AMC=Amoxicilina-ácido clavulánico; PIP/TZ=Piperacilina-tazobactam; CXM=Cefuroxima; FOX=Cefoxitina; FEP=Cefepime; CTX=Cefotaxima; CAZ=Ceftazidima; IMP=Imipenem; ERT=Ertapenem; y MER=Meropenem.

### 5. Secuenciación genómica y análisis bioinformático

La secuencia del genoma completo de la cepa KA2 fue incorporada a la base de datos de GenBank (PYHO01000100.1). El análisis comparativo de KA2 con las 9 secuencias de *Kluyvera* spp. encontradas en la base de datos GenBank, reveló un genoma común (*core genome*) de 616933 pb que incluía 69272 SNPs (Figura 51).



**Figura 51.** Árbol filogenético del *core genome* de KA2 (recuadrada en rojo) y las 9 cepas de referencia de la base de datos GenBank. Las unidades de la escala son cambios nucleotídicos (SNPs) por posición.

En el árbol filogenético (Figura 51) observamos que la cepa KA2 mantenía una mayor relación evolutiva con las cepas *K. georgiana* de la base de datos que con otras especies del género *Kluyvera*.

El análisis del genoma completo de KA2 demostró la presencia del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en un plásmido IncL/M de ~63,5 kb, el gen cromosómico responsable de la nueva variante CTX-M-213, un gen *pbp2* cromosómico, dos genes de resistencia a aminoglucósidos codificados en un integrón de clase 1 (*sul1* y *aadA2*) y el gen *bla*<sub>FOX-8</sub> localizado en un plásmido IncQ de ~9 kb.

El gen *bla*<sub>CTX-M-213</sub> se localizó en una región cromosómica conservada correspondiente al gen constitutivo *bla*<sub>CTX-M</sub> del género *Kluyvera* (Figura 52a). Esta región compartió una sintenia similar con otra secuencia de *K. ascorbata* (WCH1410), portadora de una variante diferente de CTX-M (NZ\_LSME00000000). Se encontró una región de 3072 pb con el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> y cuatro genes hipotéticos, con una identidad del 99% con un plásmido portador de CTX-M-9 (pKnNDM1) procedente de *R. planticola* (NC 023911) (Figura 52a). Esta región de ~3 kb se encontró también con un 99% de similitud en plásmidos de otras especies: *E. cloacae* pMRVIM0813 (KP975077.1), *E. cloacae* pQC (DQ108615.1) y *E. coli* pMSP071 (AF174129.3) (Figura 52b).

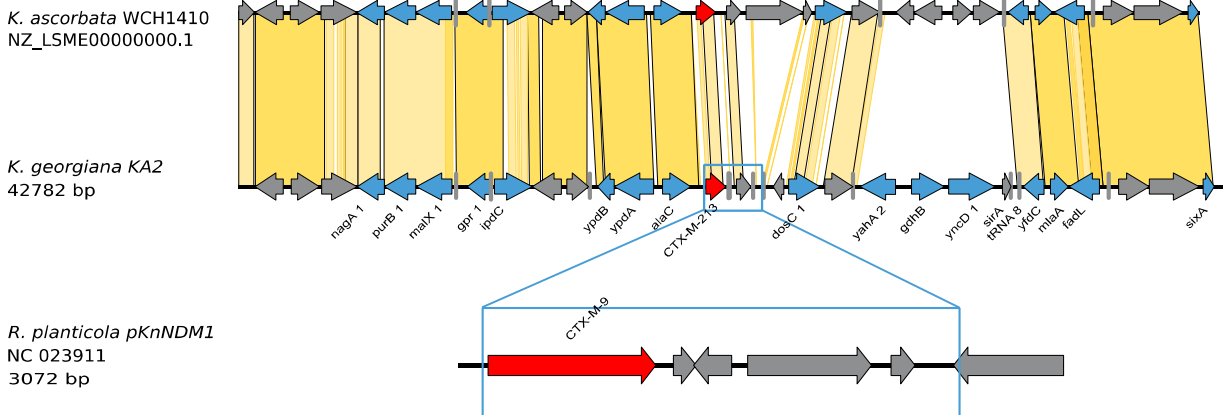
Tras el análisis con el programa *PlasmidFinder* se identificaron 3 plásmidos clasificados como IncF (~177 kb), IncQ (~9 kb) e IncL/M (~63,5 kb) en la cepa KA2. Acorde con los resultados obtenidos mediante S1-PFGE, la secuenciación reveló que el plásmido IncL/M portador de *bla*<sub>OXA-48</sub>, pOXA-48, tenía un tamaño de 63678 pb, y que era idéntico (cobertura 100%, identidad 99%) a cuatro plásmidos previamente descritos: 3 procedentes de *K. pneumoniae* [pKpn-E1.Nr7 (63581 pb) (CP018461.1), pKp\_Goe\_795-2 (63593 pb) (KC757416.2) y pKPoxa-48N1 (62592 pb) (KM406491.1)] y otro de *E. coli* [pEC745\_OXA48 (63544 pb) (CP015075.2)]. Asimismo, se analizaron los 87 ORF (“*open reading frame*”=marco abierto de lectura) detectados en pOXA-48 (Figura 53). Entre ellos se identificaron 43 proteínas hipotéticas con funciones desconocidas y otras 44 proteínas con diversas funciones tales como mecanismos de defensa [*bla*<sub>OXA-48</sub> ( $\beta$ -lactamasa), *relB* (componente antitoxina), *mrr* (endonucleasa de restricción), *vapI* (sistema de mantenimiento del plásmido)], replicación del plásmido o recombinación [(*dinB1* (ADN polimerasa), *xerD* (recombinasa específica de sitio), *radC* (proteína de reparación de ADN), *ssb* (proteína

de unión al ADN) y *repA*, *repB* y *repC* (replicas)], transferencia conjugativa [*traH-traJ*, *traL-traR*, *traU*, *traW*, *trbA* y *trbC*] o secreción y transporte [*mobA-mobC*] (Figura 53).

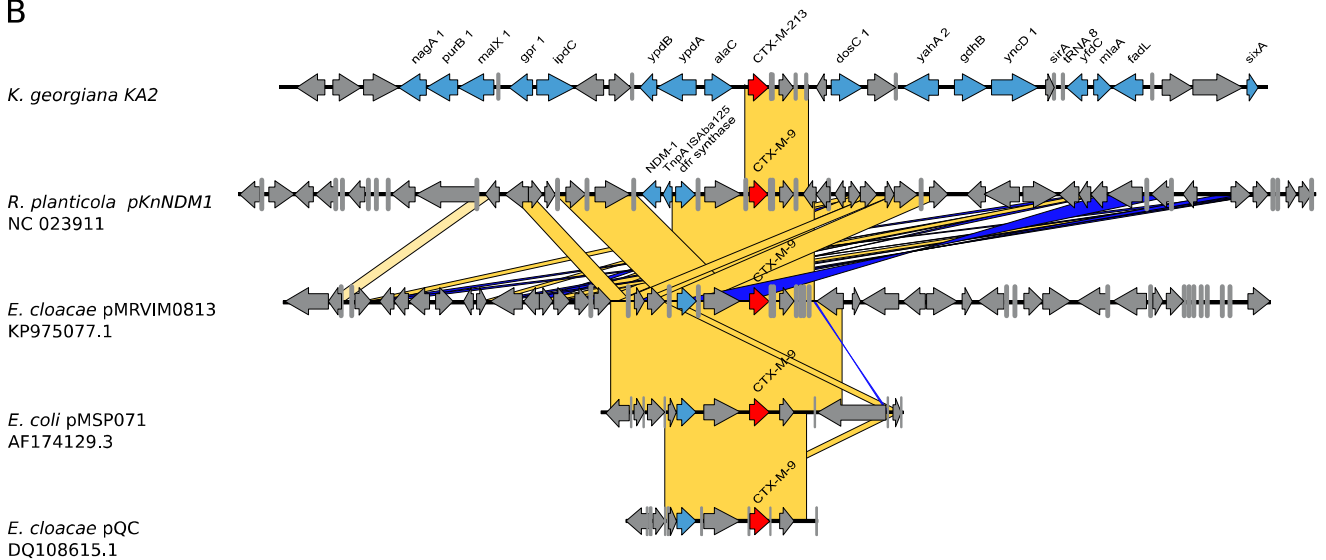
En la cepa secuenciada, junto con el plásmido pOXA-48 se detectó la presencia de un megaplásmido IncF, pKA2\_2 (177186 pb) que mostró similitud con dos plásmidos de la base de datos: el primero, unnumed1 (231294 pb) procedente de la cepa FDAARGOS\_431 de *R. ornithinolytica* (CP023893.1) (cobertura 47%, identidad 99%); y el segundo, pOZ172 (127005 pb) de la cepa B38 de *C. freundii* (CP016763.1) (cobertura 51%, identidad 99%) (Figura 54). Entre los 164 ORFs contenidos en pKA2\_2, se describieron 83 como proteínas hipotéticas y las otras 81 como proteínas con funciones conocidas: mecanismos de defensa [*ardA* (proteína antirrestricción), *hsdM* (sistema de restricción-modificación tipo I), *hsdS* (endonucleasa de restricción), *mcrB* (endonucleasa de restricción específica de metilcitosina), *acrB-mdtA* (bombas de expulsión de múltiples fármacos), *stbD* (componente antitoxina)], replicación y recombinación [*pine* (DNA recombinasa específica del sitio), *yhdJ* (metilasa de modificación del ADN), *recD* (exonucleasa), *xerC*, *xerD* (recombinasas específicas del sitio), *dinP* (DNA polimerasa)] y secreción y transporte [*virB4*, *traD* (sistemas de secreción tipo IV)]. Además, se observó que este plásmido portaba también diferentes genes relacionados con el transporte de iones inorgánicos y la resistencia a metales pesados [*zitB* y *czcA* (proteína de la bomba de eflujo de cobalto-zinc-cadmio), *mgtA* (ATPasa transportadora de magnesio), *ftn* (ferritina), *fepC* (sistema de transporte de Fe<sup>3+</sup>-sideróforos)]. Como se describe en la Figura 54, el contenido genético de pKA2\_2 se caracterizó totalmente, aunque debido al alto número de transposasas encontradas en este plásmido, su secuencia no pudo cerrarse completamente.

El tercer plásmido localizado en KA2, pKA2\_3 (IncQ, 8789 pb), compartió una cobertura del 68% y 99% de identidad con otros plásmidos pequeños de ~9 kb procedentes de *Aeromonas hydrophila*\_AO1 (pBRST7.6), *K. pneumoniae*\_I212 (pKPSH212), e incluso de una bacteria no cultivada (pGNB2) (EU925817, KT896501 yDQ460733, respectivamente). El contenido genético de este plásmido incluyó 8 ORFs que codificaban 2 proteínas de función no conocida, una con función de defensa con actividad antimicrobiana [*bla*<sub>FOX-8</sub>, (β-lactamasa de clase C)], dos con funciones de replicación y recombinación [*repA*, *repC* (proteínas reguladoras)], dos relacionadas con secreción y transporte [*mobC*, *mobD* (relaxasas)] y una implicada en el mobiloma [*IS4-like* (secuencia de inserción)] (Figura 54).

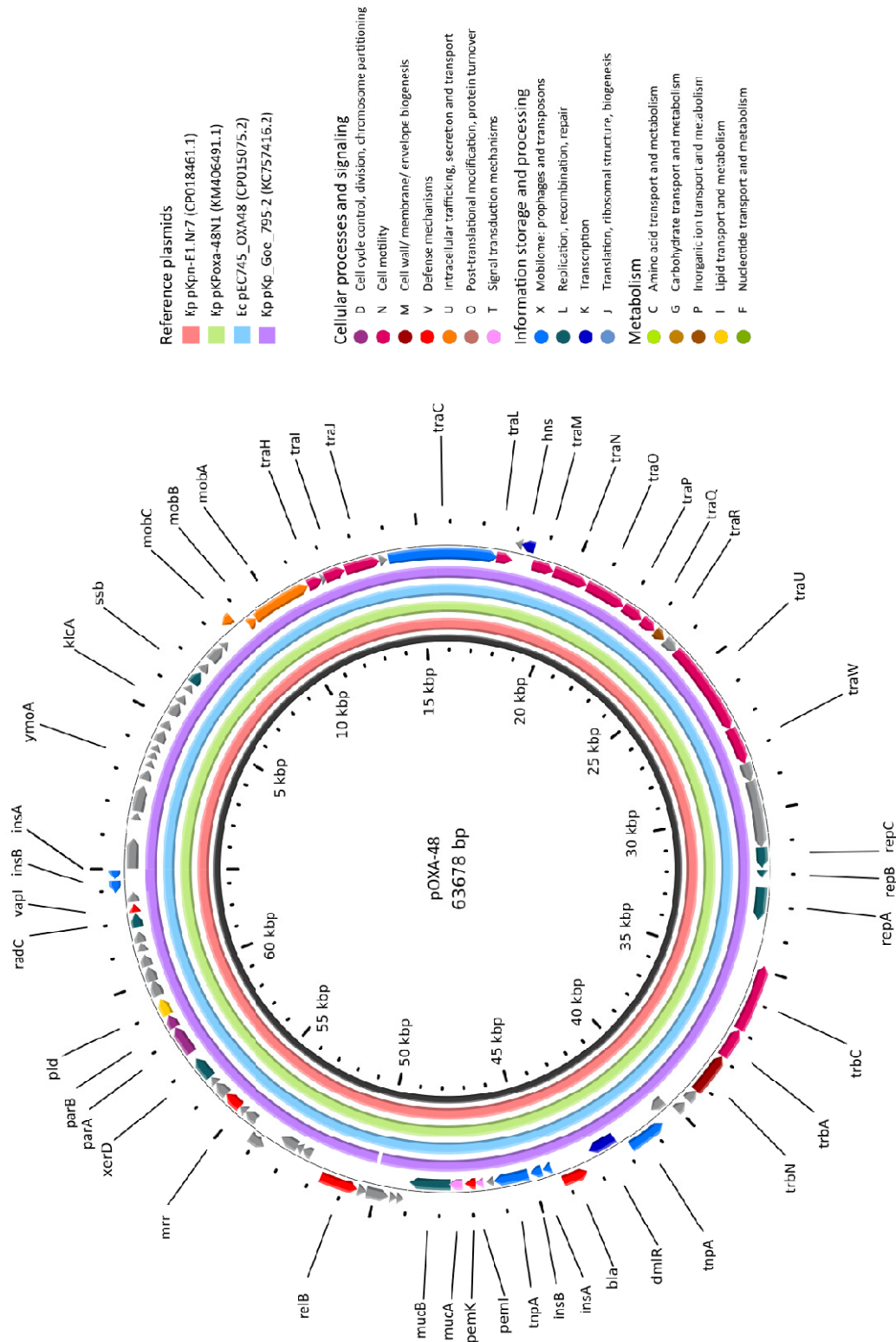
A



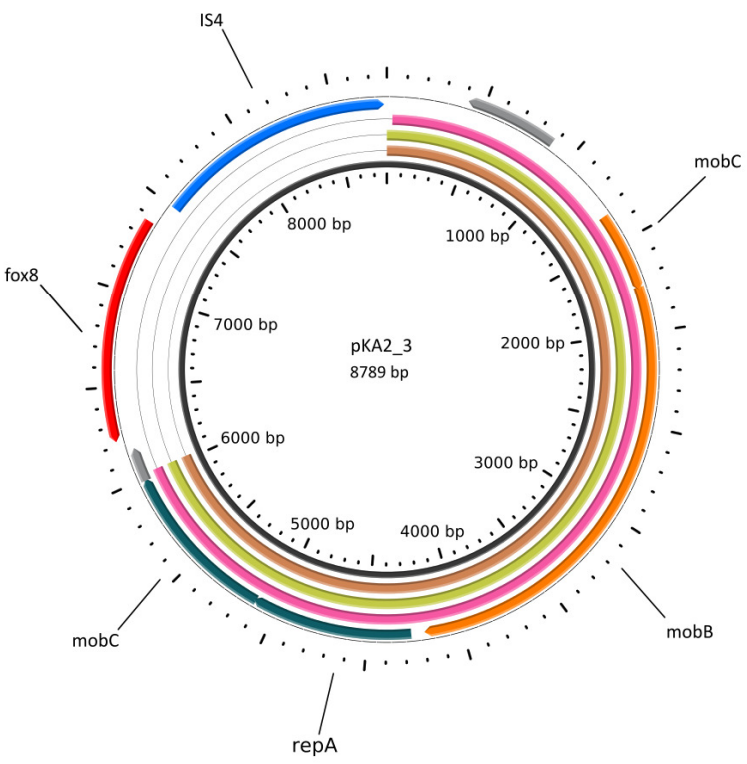
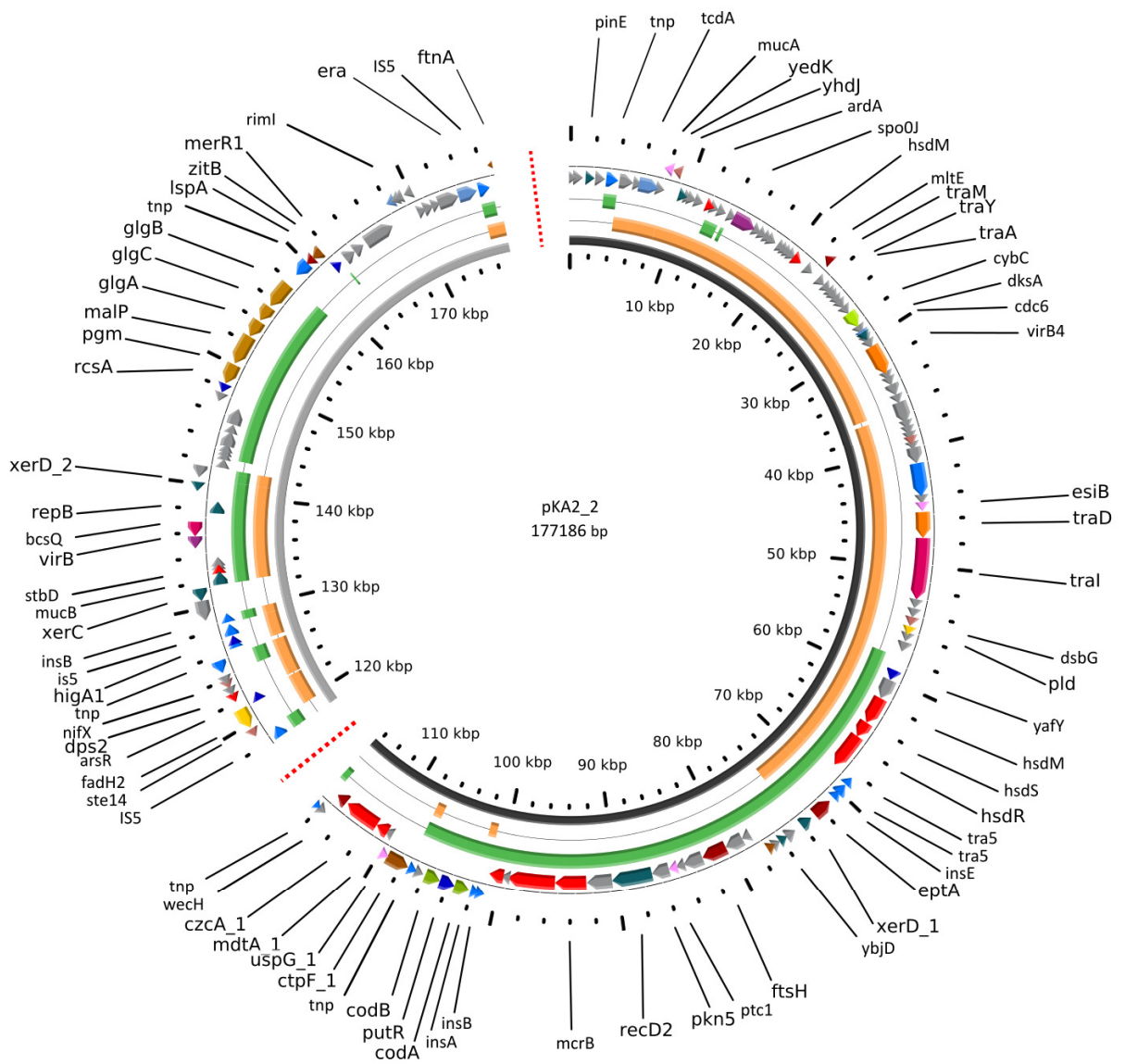
B



**Figura 52.** Mapa lineal del contexto genético de *bla*<sub>CTX-M-213</sub> respecto a otras regiones relacionadas encontradas en las bases de datos del genoma. Las regiones sombreadas en amarillo indican una identidad de entre el 69% y el 100% (a). Un fragmento de ~42 kb adyacente del gen *bla*<sub>CTX-M-213</sub> de la cepa KA2 se comparó con los genomas completos de *Kluyvera* spp. de las bases de datos y se obtuvo una alta identidad con una región conservada del genoma de ~3 kb del plásmido pKnNDM1 de *R. planticola*. Esta misma región se encontró también en otros plásmidos con distintos porcentajes de cobertura e identidad (b).



**Figura 53.** Características principales del plásmido pOXA-48 detectado en la cepa KA2. El círculo negro interno representa la secuencia de pOXA-48 y los círculos externos de color los alineamientos con plásmidos de referencia. Las flechas representan los genes e indican la orientación de los mismos. Las flechas grises se corresponden con proteínas hipotéticas de función desconocida, y los colores restantes representan la función del gen según la clasificación de la base de datos COG. Kp=*K. pneumoniae*; Ec=*E. coli*.



- Reference plasmids**
- Cf pOZ172 (CP016763.1)
  - Ro unnamed1 plasmid (CP023893.1)
  - uncultured bacterium pGNB2 (DQ460733.1)
  - Ahy pBRST7.6 (EU925817)
  - Kp pKPSH212 (KT896501.1)
- Cellular processes and signaling**
- D Cell cycle control, division, chromosome partitioning
  - N Cell motility
  - M Cell wall/ membrane/ envelope biogenesis
  - V Defense mechanisms
  - U Intracellular trafficking, secretion and transport
  - O Post-translational modification, protein turnover
  - T Signal transduction mechanisms
- Information storage and processing**
- X Mobilome: prophages and transposons
  - L Replication, recombination, repair
  - K Transcription
  - J Translation, ribosomal structure, biogenesis
- Metabolism**
- C Amino acid transport and metabolism
  - G Carbohydrate transport and metabolism
  - P Inorganic ion transport and metabolism
  - I Lipid transport and metabolism
  - F Nucleotide transport and metabolism

**Figura 54.** Características principales de los plásmidos pKA2\_2 y pKA2\_3 detectados en la cepa KA2. El círculo negro representa la secuencia de los plásmidos pKA2\_2 (IncF) y pKA2\_3 (IncQ) detectados en KA2, y los círculos externos de color los alineamientos de ambos con plásmidos de referencia. Las flechas representan los genes e indican la orientación de los mismos. Las flechas grises se corresponden con proteínas hipotéticas de función desconocida y los colores restantes representan la función del gen según la clasificación de la base de datos COG. En el plásmido pKA2\_2, las líneas rojas discontinuas indican los puntos donde las secuencias no se cerraron (Cf= *C. freundii*; Ro= *R. ornithinolytica*; Ahy=*Aeromonas hydrophila*; Kp=*K. pneumoniae*)



### **Brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1.**

En este Capítulo se describe un brote por *K. pneumoniae* productora de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1 en el Servicio de Neurocirugía entre septiembre de 2015 y febrero de 2016. Previamente al brote, no se habían detectado casos de colonización y/o infección por microorganismos productores de NDM en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.



## **1. Descripción epidemiológica del brote y medidas de control**

### **1.1. Evolución del brote y características de los pacientes**

El posible caso índice (paciente 1) fue un varón de 36 años de origen pakistaní y residente en nuestro país, que fue trasladado desde el aeropuerto de Adolfo Suárez-Barajas e ingresado en el Servicio de Neurocirugía de nuestro hospital el 26 de agosto de 2015. Este paciente había recibido atención sanitaria en su país de origen tras sufrir un accidente de tráfico en noviembre de 2014. El 15 de septiembre fue intervenido quirúrgicamente en nuestro hospital y el 23 de octubre fue trasladado a un hospital de Valencia, lugar de residencia del paciente. El día 22 de septiembre de 2015 se aisló a partir de un cultivo de vigilancia (torunda rectal) un aislado *K. pneumoniae* (Kp) con un fenotipo multirresistente compatible con una carbapenemasa de tipo metalo- $\beta$ -lactamasa (aislado 1A). El sistema eazyplex® SuperBug CRE demostró que el aislado 1A era productor de NDM-1 y coproductor de una CTX-M del grupo 1.

El 22 de septiembre de 2015 se confirmó también crecimiento de una *K. pneumoniae* con el mismo perfil de multirresistencia en una muestra rectal procedente de un segundo paciente (paciente 2), un varón de 68 años que compartía habitación (Hab-A) con el caso índice. El mismo día, se recogió una muestra clínica (orina) de dicho paciente en la que también creció una *K. pneumoniae* productora de metalo- $\beta$ -lactamasa que fue posteriormente confirmada como NDM-1.

Ante los primeros aislamientos de Kp-NDM en el Hospital Ramón y Cajal se analizaron de forma retrospectiva todos los aislados de EPC recogidos en el Servicio de Neurocirugía en las semanas previas al 22 de septiembre. Este análisis permitió identificar otra muestra positiva con este mismo fenotipo de resistencia (Kp-NDM) procedente del paciente 2 con fecha del 10 de septiembre de 2015 (aislado 2). El 26 de octubre del mismo año se identificó en el paciente 1 un segundo aislado Kp-NDM-1 con un perfil de multirresistencia distinto al primero (aislado 1B). Los siguientes casos de colonización con Kp-NDM-1 ocurrieron entre noviembre de 2015 y febrero de 2016 (Figura 55).

El 27 de noviembre y el 2 de diciembre, se recogieron del paciente 4 dos muestras clínicas, un broncoaspirado y una orina, respectivamente, en las que también se aisló

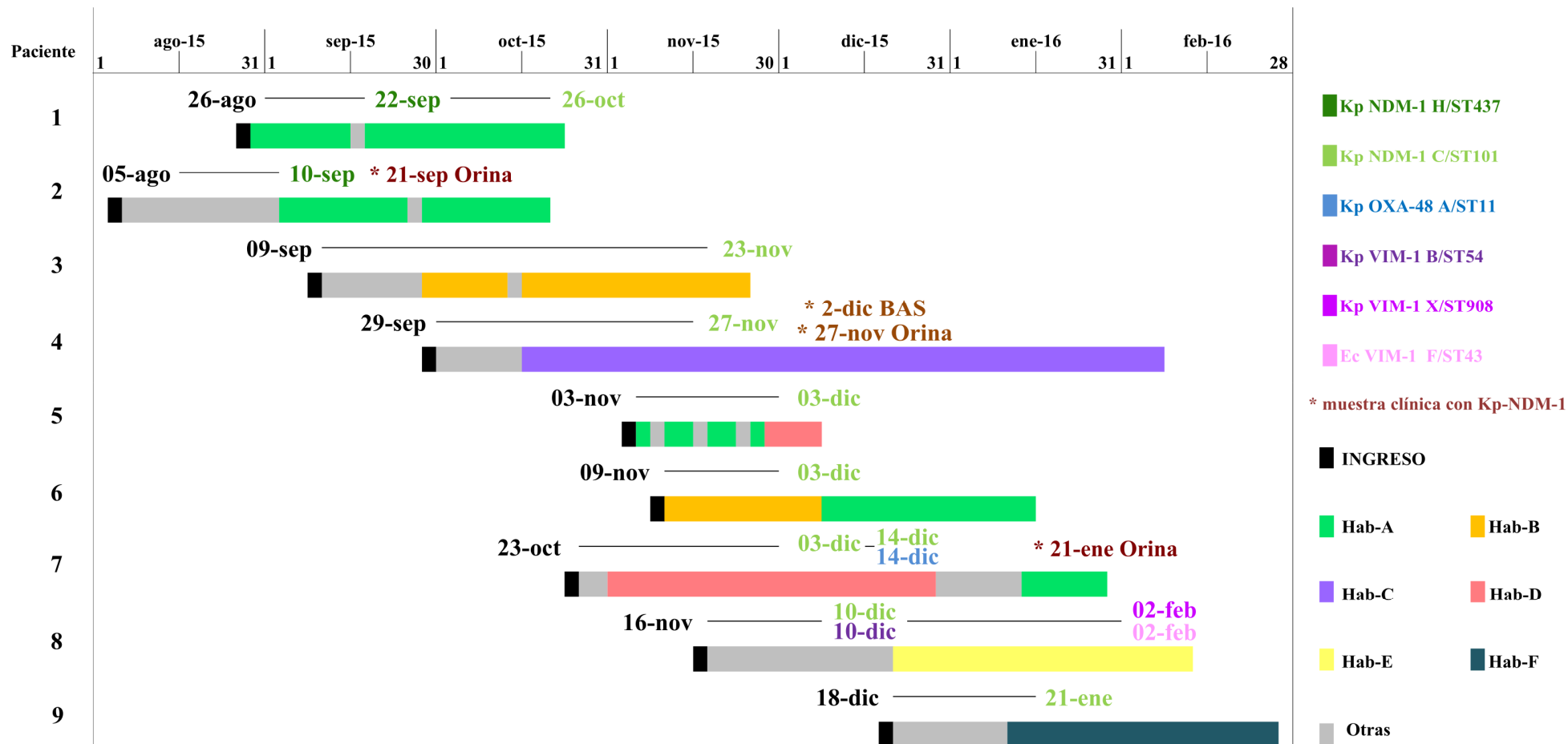
Kp-NDM-1. Cabe destacar que ambos tipos de muestras se habían recogido en las semanas previas y el resultado había sido negativo. El 21 de enero de 2016 también se aisló una EPC-NMD-1 en una muestra de orina del paciente 7. En total, entre los 9 pacientes del brote, 3 presentaron infección por una EPC-NDM-1 (33,3%). No se encontraron diferencias significativas entre esta tasa de infección y la detectada en los pacientes no colonizados por cepas productoras de NDM-1 (16,3%; 25/153).

En los pacientes 7 y 8 también se detectó colonización por enterobacterias productoras de otros tipos de carbapenemasas: aislado 7B (*K. pneumoniae* productor de OXA-48), aislados 8B y 8C (*K. pneumoniae* productor de VIM-1) y aislado Ec-8D (*E. coli* productor de VIM-1). Hay que resaltar que los aislados 7B y 8B se detectaron colonizando simultáneamente con los aislados 7A y 8A productores de NDM-1, el 14 y 10 de diciembre respectivamente. Por otro lado, los aislados 8C y Ec-8D se recogieron el 2 de febrero de 2016, 54 días después de la colonización de dicho paciente con Kp-NDM-1 (aislado 8).

En tres pacientes se detectaron aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE (pacientes 1, 2 y 4) en las semanas anteriores al brote. Sin embargo, en ningún caso se detectó colonización previa con EPC. Hay que destacar que los 9 pacientes del brote, incluido el caso índice, tuvieron una muestra negativa al ingreso.

En la Figura 55 se muestra la distribución en el tiempo de todos los casos de colonización con EPC del brote, los diferentes clones y las habitaciones donde estuvieron ingresados los pacientes.

La mediana de edad de los pacientes colonizados con Kp-NDM-1 fue de 80 años y 8 de ellos fueron hombres (88,9%; 8/9). La mediana de días de ingreso (LOS) de estos pacientes fue de 75 días (rango 58-132) y de 36 días (rango 27-75) hasta la detección del primer aislado productor de NDM-1 (LOS-1). En el caso del paciente 1, los días de ingreso transcurridos hasta la detección de cocolonización con un segundo clon productor de NDM-1 fue de 61 días (LOS-2) (Tabla 31). La antibioterapia previa a la detección de los aislados EPC-NDM-1 de los 9 pacientes se recoge en la Tabla 31.



**Figura 55.** Distribución de casos durante el brote por *K. pneumoniae*-NDM-1+CTX-M-15+DHA-1 en el Servicio de Neurocirugía entre septiembre de 2015 y febrero de 2016. Las cajas de colores indican la habitación donde se encontraban hospitalizados los pacientes durante el brote, el texto en negro las fechas de ingreso y el texto en color la fecha de detección de los primeros aislados correspondientes a cada clon. Los asteriscos en rojo indican la fecha y los pacientes en los que se detectó una muestra clínica con EPC-NDM-1.

**Tabla 31.** Datos de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* productora de NDM-1.

Paciente	Sexo	Edad	Motivo ingreso	LOS	LOS-1	LOS-2	Aislados NDM-1	Muestra clínica (+) NDM-1	Antibióterapiaprevia (días inicio: días fin de tratamiento)
1	V	36	Apofisalgia cervical	58	27	61	1A/1B		AMC (+14:+43), CF (+21:+22), CIP (+55:+58)
2	V	68	Parkinson	76	36	-	2	Orina	CF (+13), LEV (+29:+33), CAZ+LEV+VAN (+34:+36)
3	V	84	Tumor cerebral	75	59	-	3		CF (+6:+8, +20:+21, +35:+37), AMC (+45:+61), CIP (+64:+69)
4	M	80	TCE	132	59	-	4	Orina y BAS	AMC (+1:+4), VAN+MER (+6:+15, +37:+45), MER (+16:+20), PIP/TZ (+24:+35), VAN+MER+CIP (+46:+52)
5	V	29	Lesión intracraneal	34	30	-	5		CTX+VAN+CAZ (+1:+9), VAN+CAZ (+10:+30)
6	V	87	Crisis epiléptica	65	24	-	6		CAZ+VAN+MET (+1:+8), AMC (+9:+24)
7	V	92	TCE	92	41	-	7A	Orina	CIP (+28:+36)
8	V	49	Hemorragia subaracnoidea	88	29	-	8A		VAN+MER (+12:+13) MER+LIN (+14:+29)
9	V	89	Hematoma subdural crónico	69	34	-	9		CIP (+2:+14)
<b>Mediana</b>		80		75	36	-			

V=Varón; M= Mujer; LOS= Días de ingreso; LOS-1=Días de ingreso hasta la detección de la primera EPC-NDM-1; LOS-2= Días de ingreso hasta la detección de la segunda EPC-NDM-1; BAS= Broncoaspirado; TCE=Traumatismo craneoencefálico; AMC=amoxicilina-ácido clavulánico; CF= Cefazolina; CIP=Ciprofloxacino; LEV=Levofloxacino; CAZ=Ceftazidima; CTX=Cefotaxima; VAN=Vancomicina; MER=Meropenem; PIP/TZ=Piperacilina-tazobactam; MET=Metronidazol; LIN=Linezolid.

Como hemos visto en el primer capítulo, la mediana de días de ingreso (LOS) de los pacientes procedentes del Servicio de Neurocirugía fue superior ( $p < 0,01$ ) a la de los pacientes ingresados en las restantes unidades. Además, el tiempo transcurrido hasta la detección de la colonización con una EPC (LOS-1) fue también mayor en este servicio ( $p < 0,01$ ). Los pacientes colonizados por aislados productores de NDM-1 tuvieron ingresos más largos que los pacientes portadores de otras EPC ( $p < 0,01$ ) (Tabla 32). Si comparamos los días transcurridos hasta la detección de la primera EPC (LOS-1), encontramos que los pacientes con EPC-NDM-1 tardaron más tiempo en adquirir la carbapenemasa, aunque esta vez sólo se consideró significativa la diferencia respecto a los pacientes portadores de EPC-OXA-48 ( $p < 0,05$ ) (Tabla 32).

**Tabla 32.** Datos recogidos de los pacientes del estudio R-GNOSIS en función de la carbapenemasa producida.

Carbapenemasa	LOS			LOS-1		
	Me	Rango	p-value	Me	Rango	p-value
<b>OXA-48</b>	14	1-215	0,002	7,5	1-211	0,02
<b>VIM-1</b>	20,5	2-135	0,011	14	1-129	0,09
<b>KPC-3</b>	12	5-50	0,009	5	1-50	0,09
<b>NDM</b>	75	34-132	-	35	24-76	-
<b>TOTAL</b>	65	6-215	0,003	65,5	8-170	0,024

LOS= Días de ingreso; LOS-1= Días transcurridos hasta la detección de EPC-NDM-1.  
p-value (EPC-NDM-1 vs. otras EPC).

## 1.2 Medidas de control

Tras la detección del brote, además de las medidas de precaución estándar y medidas de aislamiento de contacto recomendadas por la CM [167], se llevaron a cabo medidas adicionales:

- Limpieza en profundidad del todo el servicio, incluyendo habitaciones, cuartos de medicación, almacenes, despachos y control de enfermería.
- Cribado a todos los pacientes ingresados en el servicio, con el fin de detectar precozmente los casos y proceder al aislamiento de contacto lo antes posible.
- Refuerzo del cumplimiento de las precauciones estándar por parte de los profesionales sanitarios, siendo la higiene de manos la medida principal.

- Refuerzo del cumplimiento de las precauciones de contacto en todos aquellos pacientes colonizados o infectados, tanto por parte de los familiares como por parte de los profesionales sanitarios.

## **2. Caracterización de las EPC detectadas durante el brote**

La caracterización genotípica por PCR y secuenciación de todas las EPC del brote demostró que todos los aislados con fenotipo NDM coproducían NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1.

Las técnicas de PFGE y MLST agruparon los aislados productores de NDM-1 en dos perfiles de restricción que se correspondieron con dos secuencias tipo (ST) distintas: el clon H/ST437 (aislados 1A y 2) y el clon C/ST101 (aislados 1B, 3, 4, 5, 6, 7A, 8A y 9) (ver dendrograma de *K. pneumoniae* en Figura 31, Capítulo 1). Por otro lado, el aislado 7B detectado en el paciente 7 fue identificado como el clon de alto riesgo de *K. pneumoniae* ST11-OXA-48+CTX-M-15 (clon A). Los aislados de *K. pneumoniae* (8B y 8C) y *E. coli* (Ec-8D) productores de VIM-1 procedentes del paciente 8 se correspondieron con los siguientes patrones de PFGE y ST: clon B/ST54 productor de VIM-1+SHV-28 (aislado 8B), clon X/ST908 productor de VIM-1 (aislado 8C) y clon F/ST43 productor de VIM-1 (aislado Ec-8D).

Por otro lado, las enterobacterias productoras de BLEE que se recogieron en los pacientes 1, 2 y 4, amplificaron el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y todas ellas presentaron un perfil de restricción diferente a las EPC procedentes de los mismos pacientes, por lo que no se incluyeron en la caracterización posterior.

Como se indica en la Tabla 33, todos los aislados Kp-NDM-1+CTX-M-15+DHA-1 fueron resistentes a los principales grupos de antibióticos, aunque se observaron diferencias entre clones. Por ejemplo, los dos aislados del clon H/ST437 (aislados 1A y 2) fueron sensibles a amikacina y resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que todos los aislados del clon C/ST101 mostraron resistencia a amikacina y sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol. Por otro lado, el aislado 2 fue el único que mostró resistencia a tigeciclina y solo los aislados 3, 8A y 9 del clon C fueron sensibles a fosfomicina.

**Tabla 33.** Caracterización de las EPC procedentes de los pacientes del brote por *K. pneumoniae* productora de NDM-1.

Aislados	Especie bacteriana	Paciente	Patrón PFGE	ST	Genes CP	Otros genes	CMI (mg/L)													
							IMP	MER	ERT	CAZ	CTX	FEP	GEN	TOB	AMK	CIP	FOS	TIG	SXT	COL
1A	Kp	1	H	437	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	8	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	≤8	>2	>32	≤1	>2/38	≤2
1B	Kp	1	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	>8	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	>32	≤1	≤2/38	≤2
2	Kp	2	H	437	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	8	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	≤8	>2	>32	>2	>2/38	≤2
3	Kp	3	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	>8	6	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	≤32	≤1	≤2/38	≤2
4	Kp	4	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	>8	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	>32	≤1	≤2/38	≤2
5	Kp	5	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	4	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	>32	≤1	≤2/38	≤2
6	Kp	6	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	8	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	>32	≤1	≤2/38	≤2
7A	Kp	7	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	>8	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	>32	≤1	≤2/38	≤2
7B	Kp	7	A	11	OXA-48	CTX-M-15	2	>8	>4	>16	>32	>16	>8	>8	≤8	>2	>32	≤1	≤2/38	≤2
8A	Kp	8	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	>8	3	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	≤32	≤1	≤2/38	≤2
8B	Kp	8	B	54	VIM-1	SHV-12	4	0.5	2	>16	>32	16	≤2	4	≤8	1	≤32	≤1	≤2/38	≤2
8D	Kp	8	X	908	VIM-1	-	2	4	1	>16	>32	>16	≤2	>8	≤8	>2	>32	≤1	>2/38	≤2
8C	Ec	8	F	43	VIM-1	-	>8	2	1	>16	>32	>16	≤2	4	≤8	≤0,5	≤32	≤1	>2/38	≤2
9	Kp	9	C	101	NDM-1	CTX-M-15 DHA-1	>8	3	>4	>16	>32	>16	>8	>8	>32	>2	≤32	≤1	≤2/38	≤2

El sombreado indica los valores considerados como sensibles según criterios de EUCAST.

Kp=*K. pneumoniae*; Ec=*E. coli*; IMP=Imipenem; ERT=Ertapenem; MER=Meropenem; CAZ=Ceftazicima; CTX=Cefotaxima; FEP=Cefepime; GEN=Gentamicina; TOB=Tobramicina; AMK=Amikacina; CIP=Cirpofloxacino; FOS=Fosfomicina; TIG=Tigeciclina; SXT=Trimetoprim-Sulfametoxazol; COL=Colistina.

### 3. Tipado de plásmidos

A partir de los 14 aislados recogidos durante el brote se obtuvieron 12 transconjugantes con *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> o *bla*<sub>OXA-48</sub>, procedentes de los clones Kp-C/ST101, Kp-A/ST11, Kp-B/ST54, Kp-X/ST908 y Ec-F/ST43. Mediante conjugación y transformación por electroporación no se consiguió obtener transconjugantes ni transformantes a partir de los 2 aislados de *K pneumoniae* pertenecientes al clon H/ST437 (aislados 1A y 2).

En la Tabla 34 se resume toda la información obtenida a partir de la hibridación de los aislados salvajes receptores (*wildtype*) y sus respectivos transconjugantes con los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>DHA-1</sub>. En los aislados pertenecientes al clon H/ST437 (1A y 2) los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>DHA-1</sub> se localizaron en un plásmido de aproximadamente 100 kb. Por el contrario, en los aislados del clon C/ST101 el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> se detectó en un plásmido de aproximadamente 120 kb, mientras que los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>DHA-1</sub> se encontraron en un plásmido de mayor tamaño (~150 kb). En los transconjugantes obtenidos a partir de estos aislamientos del clon C/ST101, únicamente se localizó el plásmido de 120 kb con *bla*<sub>NDM-1</sub>. En los aislados 7B, 8C y Ec-8D y sus respectivos transconjugantes, los genes *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se detectaron en un plásmido de ~60 kb. Por otro lado, en los aislados 8B y TC-8B el gen *bla*<sub>VIM-1</sub> se localizó en un plásmido de aproximadamente 90 kb, que también portaba SHV-12.

Siguiendo el esquema PBRT, tanto al plásmido de OXA-48+CTX-M-15 del aislado TC-7B, como a los plásmidos portadores de VIM-1 de los transconjugantes TC-8C y TC-Ec-8D, se les asignó el grupo de incompatibilidad IncL. Además, estos tres transconjugantes amplificaron mediante PCR los genes *repA*, *traU* y *parA*, relacionados con el plásmido epidémico IncL/M-pOXA-48a previamente descrito [142]. Sin embargo, ni los transconjugantes portadores de NDM-1 obtenidos a partir del clon C/ST101 ni el TC-8B con VIM-1 amplificaron estos genes, pudieron clasificarse de acuerdo a su grupo de incompatibilidad siguiendo el esquema PBRT. No obstante, los plásmidos portadores de NDM-1 del clon C/ST101 se identificaron mediante secuenciación del genoma completo como IncFII (Tabla 34).

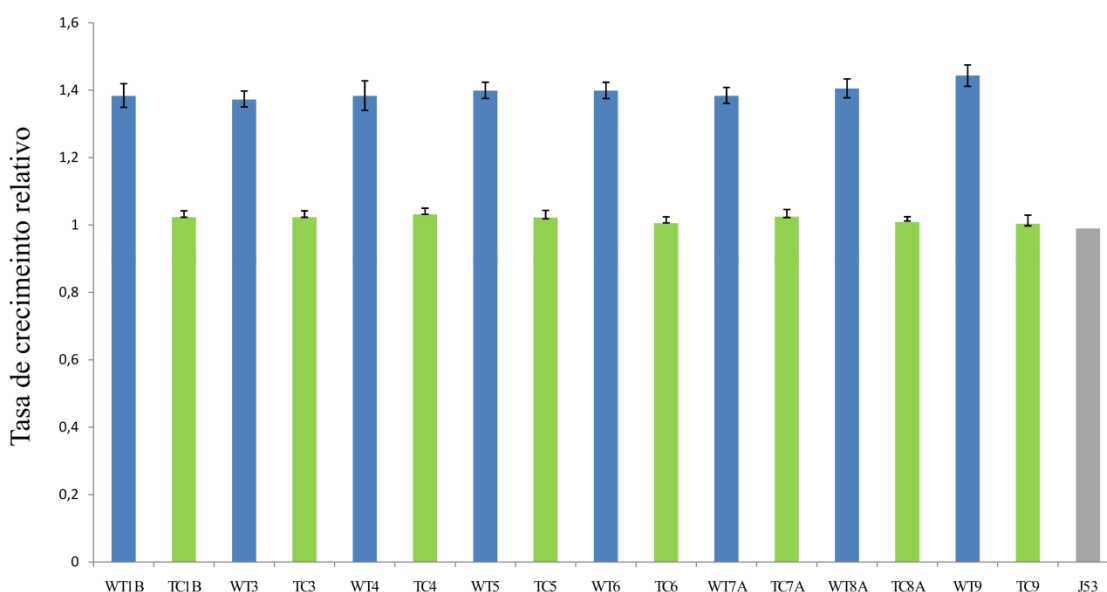
**Tabla 34.** Caracterización de los plásmidos portadores de NDM-1, OXA-48 y VIM-1 de los pacientes implicados en el brote.

Aislados	Paciente	Genes de resistencia (WT)	Plásmidos WT (Kb)	Aislados TC	Genes de resistencia (TC)	Plásmidos TC (Kb)	Grupo de incompatibilidad <sup>1</sup>	CMI (mg/L) (TC)						Perfil de co-resistencia (TC)
								IMP	ERT	MER	CAZ	CTX	FEP	
1A	1	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1B	1	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-1B	NDM-1	~120	IncF	8	2	16	>16	>16	>16	GEN, TOB, AMK
2	2	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-3	NDM-1	~120	IncF	>8	>1	>8	>16	>16	>16	GEN, TOB, AMK
4	4	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-4	NDM-1	~120	IncF	2	>1	>8	>16	>16	>16	GEN, TOB, AMK
5	5	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-5	NDM-1	~120	IncF	>8	>1	8	>16	>16	>16	GEN, TOB, AMK
6	6	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-6	NDM-1	~120	IncF	>8	>1	>8	>16	>16	16	GEN, TOB, AMK
7A	7	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-7A	NDM-1	~120	IncF	>8	>1	4	>16	>16	>16	GEN, TOB, AMK
7B	7	OXA-48 CTX-M-15	~60	TC-7B	OXA-48 CTX-M-15	~60	IncL	8	>1	2	>16	>16	>16	-
8A	8	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-8A	NDM-1	~120	IncF	>8	>1	8	>16	>16	>16	GEN, TOB, AMK
8B	8	VIM-1 SHV-12	~90	TC-8B	VIM-1 SHV-12	~90	NT	8	>1	2	>16	>16	>16	-
8C	8	VIM-1	~60	TC-8C	VIM-1	~60	IncL	8	1	>8	>16	>16	>16	-
Ec-8D	8	VIM-1	~60	TC-Ec-8D	VIM-1	~60	IncL	4	1	4	>16	>16	>16	-
9	9	NDM-1 CTX-M-15 DHA-1	~120 ~150 ~150	TC-9	NDM-1	~120	IncF	>8	>1	>8	>16	>16	>16	GEN

En la Tabla 34 se recogen los datos de sensibilidad antibiótica de todos los transconjugantes obtenidos. Los porcentajes de resistencia a carbapenémicos y a cefalosporinas de amplio espectro entre los TC-NMD-1 fue muy elevada (88,9% imipenem, 100% ertapenem, meropenem, ceftazidima, cefotaxima y cefepima). Además, todos los TC-NDM-1 mostraron corresponsencia a gentamicina, tobramicina y amikacina, excepto el TC-9, que sólo fue corresponsente a gentamicina.

#### 4. Estudio del efecto de la resistencia sobre el coste biológico

Para estimar el coste biológico de los plásmidos portadores de NDM-1 se midieron los cambios de densidad óptica del crecimiento exponencial de las cepas pertenecientes al clon C/ST101 (*wildtypes* y transconjugantes) y se recalculó su tasa de crecimiento relativo (Figura 56).



**Figura 56.** Tasa de crecimiento relativa de los aislados Kp-clon C/ST101 portadores del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> (azul) y sus respectivos transconjugantes (verde). (WT=*wildtype*; TC=transconjugante; J53=cepa receptora *E. coli* J53 ®Azida Sódica).

El test estadístico T-test demostró una diferencia significativa en la tasa de crecimiento relativo de la población *wildtype* respecto a la de la población de transconjugantes ( $p < 0,01$ ). Es decir, las cepas *wildtype* tenían un coste biológico menor que sus respectivos transconjugantes. Sin embargo, si tenemos en cuenta la cepa control *E. coli* J53, observamos que no hay variaciones significativas respecto a los

transconjugantes obtenidos, por lo que se estimó que el coste biológico de este plásmido portador de NDM-1 para esta cepa fue muy bajo.



---

## DISCUSIÓN

---

*“No hay error en admitir que tú solo no puedes mejorar tu condición en el mundo; para crecer, necesitas aliados con los que crecer juntos”*

Confucio



### **1. Estudio R-GNOSIS: Epidemiología y estudio microbiológico de las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC)**

#### **1.1 Epidemiología de las EPC y E-BLEE durante el proyecto R-GNOSIS**

Durante el estudio R-GNOSIS, la incidencia de pacientes colonizados por EPC fue del 2%. La variación registrada en los 4 servicios analizados a lo largo de los 25 meses de estudio no fue significativa. Es importante destacar que el 26,6% de los pacientes ya estaban colonizados por EPC en el momento del ingreso. No obstante, la mayoría de ellos habían tenido ingresos previos en nuestro centro, en otros hospitales o estaban institucionalizados en residencias. Estos datos corroboran lo encontrado por otros autores, que indican que la colonización por EPC también se relaciona con los cuidados sanitarios, incluyendo los centros de cuidados de larga estancia o las residencias de la tercera edad [156–158]. Además, las comorbilidades y estancias hospitalarias previas se consideran factores de riesgo para la colonización por EPC [33,160,161]. Asimismo, en el 56,2% de los pacientes, la colonización con EPC se consideró de adquisición nosocomial, ya que se detectó durante la hospitalización y tras una muestra negativa al ingreso. Estas cifras son muy similares a las obtenidas en un estudio multicéntrico realizado en 34 hospitales españoles entre 2009 y 2012, en los que se definía un 37% de casos asociados a cuidados sanitarios y un 60% de adquisiciones nosocomiales [146].

En general, los pacientes colonizados con EPC de nuestro estudio tuvieron ingresos prolongados (27 días), siendo significativamente más largos en el servicio de Neurocirugía (65,5 días) que en el resto de unidades. La mediana de días de ingreso transcurridos hasta la detección de la colonización por una EPC fue de 18 días, aunque las pruebas estadísticas indicaron que los pacientes ingresados en el servicio de Neurocirugía tardaron más tiempo en colonizarse (39,5 días) que el resto. Numerosos estudios han demostrado que la estancia hospitalaria prolongada y los procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos invasivos se relacionan directamente con la adquisición de EPC [33,160,161]. Durante el estudio R-GNOSIS, el porcentaje de pacientes que negativizaron al alta fue bajo (11%). Estos datos resultan alarmantes ya que el riesgo de que estas EPC se diseminen en el entorno comunitario es muy elevado.

En muchos estudios se ha demostrado que la colonización por EPC es un factor de riesgo para la infección por estos microorganismos [33,160,188]. Durante el estudio R-GNOSIS, el 17,3% de los pacientes colonizados por una EPC desarrollaron una infección por el mismo microorganismo. No existe en España un estudio similar que analice de forma retrospectiva los pacientes colonizados que desarrollan una infección por EPC. No obstante, entre 2009 y 2013, se llevaron a cabo varios estudios que prospectivamente recogieron todos los casos de EPC. En ellos se observó que el porcentaje de infecciones por EPC fue del 67% al 79,2% [124,144,146], lo que indica que posiblemente durante el desarrollo de estos estudios no se recogieron todos los casos de colonización. En estas infecciones, *K. pneumoniae* fue el microorganismo más frecuentemente aislado, seguido de *Enterobacter* spp. y *E. coli*. En nuestro caso y coincidiendo con la literatura, *K. pneumoniae* fue responsable del 85,7% de las infecciones por EPC, seguido de *E. cloacae*, *E. coli* y *K. oxytoca*.

Por otra parte, la emergencia de EPC se ha relacionado directamente con el aumento del consumo de antibióticos carbapenémicos en el tratamiento de infecciones causadas por E-BLEE [161,189–191]. Las E-BLEE están mundialmente diseminadas y son endémicas en muchas regiones del mundo, incluido España [52,71,76]. Los últimos datos indican que la prevalencia de portadores fecales de E-BLEE en nuestro país es de aproximadamente el 6%-8% [71,76] y se estima que esta cifra puede seguir aumentando anualmente en la comunidad con una tasa del 5,38% [76]. La implementación de estrategias de control efectivas es necesaria para evitar la colonización por E-BLEE y reducir el riesgo de infecciones por estos microorganismos multirresistentes. Muy pocos países han publicado documentos oficiales que informen sobre las medidas de control de la infección por estas bacterias. En 2014, el ECDC publicó una revisión donde se analizaba la efectividad de las medidas de control y prevención de la infección dirigidas a controlar la propagación y transmisión de E-BLEE entre pacientes del ámbito sanitario. En este informe, se incluyeron los resultados de 10 estudios realizados en países donde la prevalencia de E-BLEE es endémica. Las conclusiones de esta revisión fueron difíciles de interpretar, ya que múltiples factores limitaron la consistencia de la investigación. Sin embargo, aunque deben interpretarse con precaución, este informe sugirió la posible efectividad de las siguientes medidas: políticas de restricción en el uso de antibióticos, higiene de manos, precauciones de contacto (utilización de guantes y batas), vigilancia activa (detección) durante el brote, cohorte de pacientes, aislamiento

de contacto, detección al ingreso en unidades específicas, aislamiento preventivo de pacientes de alto riesgo, notificación y registro de pacientes, aseo con agentes antisépticos, cohorte del personal sanitario, formación de personal especializado y limpieza ambiental [192].

Durante el estudio R-GNOSIS, la incidencia de pacientes colonizados con E-BLEE fue del 8,4%. Con los datos analizados, no se pudo demostrar la efectividad de las medidas de aislamiento de contacto respecto a las precauciones estándar en la transmisión de las E-BLEE. La incidencia de E-BLEE no se redujo en los servicios en los que se implementó la estrategia de aislamiento de contacto, ni se incrementó cuando estas medidas se retiraron. Nuestros datos sugieren que la prevalencia de E-BLEE no se asociaría a una transmisión hospitalaria y que el reservorio de estos microorganismos es posiblemente de origen comunitario. Asimismo, algunos estudios han demostrado que los individuos procedentes de la comunidad o de centros de larga estancia, pueden actuar como reservorio de aislados productores de BLEE [73,191,193]. Se ha demostrado también que la utilización extrahospitalaria de antibióticos como la cefuroxima y otras cefalosporinas orales de espectro reducido, así como antibióticos no  $\beta$ -lactámicos como las fluoroquinolonas, ha facilitado la selección y establecimiento de estas E-BLEE en la comunidad [76,194–196]. No obstante, encontramos diferencias significativas cuando analizamos la incidencia de EPC. Durante el primer periodo de estudio, la tasa de colonización por EPC fue significativamente menor en los servicios donde se aplicó el aislamiento de contacto para E-BLEE (servicios quirúrgicos). Además, la retirada de estas medidas en el segundo periodo coincidió con un aumento significativo de la incidencia de EPC en estos mismos servicios. Por otro lado, en los servicios donde se aplicaron las medidas de control en el segundo periodo (servicios médicos), el porcentaje de pacientes colonizados se mantuvo estable. Aunque el proyecto R-GNOSIS no se diseñó con el objetivo de evaluar la transmisión de las EPC, nuestros datos indican que el aislamiento de los portadores fecales de E-BLEE podría tener un efecto indirecto protector sobre la adquisición de EPC, ayudando a contener su incidencia. Algunos estudios han demostrado que las medidas para la prevención y control de la infección, particularmente la higiene de manos, son un factor clave para impedir la diseminación de las EPC en los hospitales [197]. La puesta en marcha de medidas, como el aislamiento de contacto y la disposición de personal especializado, ha

resultado efectiva para contener brotes tanto en hospitales como en centros de cuidados sanitarios [156,198–200].

Sin embargo, a pesar de las medidas de control y prevención de la infección, en la última década la prevalencia de portadores fecales de EPC, tanto de individuos sanos como de aquellos con contacto sanitario, ha seguido aumentando de forma progresiva. En los hospitales españoles, varios estudios multicéntricos determinaron que entre 2009 y 2013, *K. pneumoniae* (73.5%-85,6%), *E. cloacae* (6.8%-10.3%) y *E. coli* (1,7%-9%) eran las especies más aisladas, mientras que otras enterobacterias como *K. oxytoca* (2,5%-3,7%) o *C. freundii* (0,4%-2%) se encontraban de manera minoritaria [124,144,146]. Durante el estudio R-GNOSIS, la especie más frecuente entre las EPC recogidas fue *K. pneumoniae*, aunque con un porcentaje más bajo (53,5%) que en los estudios anteriores. *K. pneumoniae* es una enterobacteria muy diseminada en el medio hospitalario, por lo que se asocia generalmente a adquisición nosocomial y a brotes hospitalarios causados por clones epidémicos multirresistentes [31,32]. Por otro lado, el porcentaje de *E. cloacae* productor de carbapenemasa (11,1%) fue muy similar al de los estudios previos, mientras que encontramos una mayor prevalencia de aislados de *E. coli* (19,2%). Otras especies minoritarias como *K. oxytoca* (4%) y *C. freundii* (4,5%) también se detectaron en un porcentaje ligeramente superior al de estudios previos, y además, se encontraron otras enterobacterias poco frecuentes como *Kluyvera* spp. (3%), *K. aerogenes* (3%), *C. koseri* (0,5%) y *Raoultella* spp. (1%). Estos resultados pueden ser reflejo de una eficiente penetración de las carbapenemasas entre los miembros del orden *Enterobacterales*, como ocurrió anteriormente con los aislados productores de CTX-M [72,201,202]. Sin embargo, la distribución de estas especies no fue homogénea durante todo el periodo de estudio. Es de resaltar que la diversidad de especies entre los aislados EPC disminuyó significativamente entre el primer y el segundo periodo. Esta tendencia se atribuyó a un aumento progresivo de los aislados *K.pneumoniae* respecto al resto de especies.

En un estudio reciente de Asensio y cols. se demostró la reducción de un brote hospitalario por *K. pneumoniae* monoclonal productora de CTX-M-15 tras la implementación de medidas de control y prevención [147]. *E. coli* productor de CTX-M es actualmente la enterobacteria productora de BLEE más prevalente en todo mundo. A diferencia de *K. pneumoniae*, la mayoría de estos aislados son de origen comunitario y

no mantienen un relación clonal [54,56,147,191]. En nuestro estudio, la diversidad de especies entre los aislados productores de BLEE no sufrió cambios relevantes a lo largo del tiempo. Como era de esperar, durante todo el tiempo de estudio la especie predominante fue *E. coli* (78,5%), seguido de *K. pneumoniae* (17%). La diversidad de especies de los aislados productores de BLEE recogidos en este trabajo no se vió afectada por las diferentes condiciones de hospitalización, lo que es consistente con la idea de que esta población de E-BLEE es posiblemente de origen comunitario.

### 1.2. Caracterización molecular de las EPC del proyecto R-GNOSIS

En España, la primera descripción de una EPC fue en 2005 y se trató de dos aislados (*K. pneumoniae* y *E. coli*) productores de VIM-1 [122]. Durante los años siguientes, la prevalencia de EPC se mantuvo muy baja, inicialmente asociada a las enzimas VIM-1 y con posterioridad a KPC-2 [107]. Desde 2013, la rápida diseminación de las enzimas OXA-48 ha tenido un gran impacto en la epidemiología mundial, y desde entonces, su endecimidad en países del sur de Europa, como España, supone un grave problema de Salud Pública [17,108]. Entre 2009 y 2013, la enzima OXA-48 (68,8%-74,7%) fue la carbapenemasa predominante en los hospitales españoles, seguida de VIM-1 (22%-25,3%), KPC-2 (2%-3,4%) e IMP (1,6%-2%) [124,144,146]. Un estudio reciente realizado en el norte de Madrid, muestra que entre las EPC causantes de infecciones de origen comunitario, las enzimas OXA-48 (83,3%) y VIM-1 (16,1%) son también las más frecuentes [188].

Coincidiendo con lo recogido en la literatura en España, durante todo el estudio R-GNOSIS las enterobacterias productoras de OXA-48 fueron las más frecuentes (64,1%), seguido de las productoras de VIM-1 (26,8%). Entre los productores de OXA-48, *K. pneumoniae* (56,7%) y *E. coli* (25,2%) fueron las especies predominantes. La diversidad de especies entre la población productora de OXA-48 disminuyó significativamente en el segundo periodo y se atribuyó al aumento significativo de *K. pneumoniae*-OXA-48. En la bibliografía encontramos que *K. pneumoniae*-OXA-48 ya era la EPC más frecuente en los hospitales españoles en 2013, pero con un porcentaje mucho mayor (86,7%) que en nuestro estudio (56,7%). Sin embargo, la prevalencia de aislados *E. coli*-OXA-48 fue preocupantemente superior en nuestra institución (25,2%) respecto a los datos recogidos en 2013 (9,2%) [124]. Entre la población de EPC-VIM-1 de nuestro estudio, *K. pneumoniae* (41,5%) fue también la especie más frecuente,

seguida de *E. cloacae* (28,3%). Estos datos son ligeramente inferiores a los recogidos en 2013 (44,8% *K. pneumoniae*-VIM-1, 29,9% *E. cloacae*-VIM-1) [124]. Por otra parte, la prevalencia de portadores de VIM-1 disminuyó al final del estudio, aunque de nuevo la incidencia de *K. pneumoniae*-VIM-1 en el segundo periodo aumentó significativamente respecto a las demás especies.

Durante este estudio no se detectó ninguna enterobacteria productora de IMP. Las enzimas IMP se han detectado con muy baja frecuencia en nuestro país, y únicamente en regiones como Madrid, Guadalajara y Vizcaya [124]. En el segundo periodo se detectó un brote en el servicio de Neurocirugía por aislados *K. pneumoniae* productores de NDM-1 (5%), que se asoció con el ingreso de un paciente de origen pakistání que había recibido atención sanitaria en su país. En nuestro país, se han detectado muy pocos casos de enterobacterias productoras de enzimas NDM y normalmente se han vinculado a contactos con regiones endémicas [18]. Por otro lado, se detectó un porcentaje muy bajo de EPC-KPC-3 (3,5%), mientras que la enzima KPC-2 se identificó solamente en un aislado de *C. freundii*, que también era productor de VIM-1. Coincidiendo con estos resultados, estudios previos han demostrado que las enzimas KPC-3 son predominantes respecto a las KPC-2 en nuestro hospital [115,117].

Uno de los principales factores responsables de la elevada dispersión de las carbapenemasas ha sido su transmisión mediante diversos elementos genéticos transferibles, que con frecuencia portan otros mecanismos de resistencia, como las BLEE y las  $\beta$ -lactamasas AmpC [78,137,203]. El 55,5 % de los aislados EPC de nuestro estudio fueron coproductores de BLEE, siendo las enzimas de la familia CTX-M y en concreto CTX-M-15 las más prevalentes, al igual que se ha demostrado en estudios previos [124]. CTX-M-14 y otras variantes del grupo 9, fueron las BLEE predominantes en nuestro hospital, hasta la emergencia y diseminación de la enzima CTX-M-15 [52,69,204]. Los aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48+CTX-M-15 fueron los más prevalentes durante el estudio R-GNOSIS (29,3%). Esta asociación entre OXA-48 y CTX-M-15 ha sido ampliamente comunicada por otros grupos [137,205]. Las enzimas OXA-48 tienen un perfil hidrolítico muy reducido, y la coproducción de BLEE, como la CTX-M-15, le proporciona un mayor perfil de resistencia [48].

En relación a los perfiles de sensibilidad, un estudio multicéntrico de 2013 describió que las tasas de resistencia a los antibióticos carbapenems entre las EPC eran

del 32,4% para imipenem, 25,3% para meropenem y 92,9% para ertapenem [124]. En nuestro estudio el carbapenem más afectado fue también el ertapenem (93,9%), que mostró valores muy similares a los de 2013. Sin embargo, los porcentajes de resistencia de nuestros aislados a imipenem (44,4%), y especialmente a meropenem (60,9%), fueron superiores a los indicados en la literatura. La diferencia observada entre ambos carbapenémicos podría estar relacionada con la distinta metodología empleada para cada uno de ellos en el estudio de sensibilidad (microdilución para imipenem y tiras en gradiente para meropenem).

En este estudio, se han observado importantes diferencias en la actividad de los carbapenémicos en función del tipo de carbapenemasa. De esta forma, los aislados productores de NDM-1 fueron los que presentaron mayores porcentajes de resistencia a los tres carbapenems, seguidos de las EPC-KPC-3 y las EPC-VIM-1. Las EPC-OXA-48 mostraron tasas de resistencia inferiores que las anteriores (29,9% a imipenem, 55,9% a meropenem y 99,2% a ertapenem). De nuevo, estos porcentajes difieren de los encontrados para esta enzima en la bibliografía, que muestran las mismas tasas de resistencia a ertapenem (95,9%-100%), pero inferiores a imipenem (13,5%-25,2%) y meropenem (20%-22,1%) [124,144]. En general, las tasas de corresponsión a otros antimicrobianos como quinolonas, aminoglucósidos y fosfomicina fueron altas. Los antibióticos que mostraron mayores porcentajes de sensibilidad fueron colistina (99,5%), amikacina (90,9%) y tigeciclina (90,9%). En otras publicaciones también se ha descrito que la colistina (75,2%-95,5%), la amikacina (81,3%-85,3%) y la tigeciclina (67,8%-71%) son los antibióticos que conservan una mayor actividad frente a las EPC detectadas en los hospitales españoles [124,146,206].

La adquisición y transmisión de clones epidémicos bien adaptados al medio hospitalario, ha sido uno de los factores determinantes para la exitosa diseminación mundial de las carbapenemasas entre los miembros del orden *Enterobacterales*. Nuestro estudio reveló que entre especies menos frecuentes, como *E. cloacae* complex, *K. oxytoca* y *C. freundii*, había una amplia variabilidad genética, que se tradujo en una alta diversidad clonal. El papel de otras enterobacterias bien adaptadas al medio hospitalario, como *K. pneumoniae*, ha sido determinante en la emergencia y diseminación de los distintos tipos de carbapenemasas por parte de estas otras especies de enterobacterias.

Entre 2009 y 2013, en los hospitales españoles los principales clones de *K. pneumoniae* eran ST11, ST405 y ST15, y se asociaban principalmente a la producción de las enzimas OXA-48 y VIM-1 [124,144,146]. De forma minoritaria se identificaban otros clones como ST307-OXA-48/OXA-245, ST101-KPC-2 o ST437-OXA-245 [144,207,208]. ST11-OXA-48/VIM-1, ST405-OXA-48, ST15-OXA-48/VIM-1 y ST307-OXA-48, han sido también detectados causando infecciones en hospitales de nuestra región [143], incluso en unidades de cuidados intensivos (UCI) [207] y unidades neonatales [148]. Estos clones epidémicos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas han sido también identificados en hospitales de otros países europeos, como Francia [209], Bélgica [210], Grecia [211], Hungría [212], y Bulgaria [213], entre otros.

Durante nuestro estudio, el clon ST11 de *K. pneumoniae* fue el más prevalente en todos los servicios. Numerosas publicaciones indican que el clon ST11-OXA-48 es el más diseminado en los hospitales españoles y que se encuentra frecuentemente asociado a la coproducción de CTX-M-15 [214]. En estudios previos realizados en nuestra región, ST11 ha sido también relacionado con la producción de otras carbapenemasas, como VIM-1, KPC-2 y OXA-244/OXA-245 [124,144,208,214]. En otras partes del mundo, este clon se ha identificado como portador de otras enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas como NDM-1 y VIM-4 [16]. Sin embargo, en nuestro estudio, ST11 se asoció únicamente a la producción de OXA-48+CTX-M-15. Otros clones con OXA-48 como ST307, ST15, ST405 y ST392, se detectaron en una proporción muy baja entre nuestros pacientes. En la literatura, el clon ST405 se ha asociado únicamente con enzimas del grupo OXA-48 (OXA-48 y OXA-245), y hasta 2013 se encontró ampliamente diseminado en nuestra región, originando importantes brotes hospitalarios [143,145,148]. Hasta 2014, ST405-OXA-48 también fue el clon predominante en nuestra institución (datos no publicados). Sin embargo, entre los pacientes de nuestro estudio únicamente se detectaron dos casos. Esto da consistencia a una publicación de Paño-Pardo y cols., que describe el desplazamiento de ST405-OXA-48 por el clon ST11-OXA-48 a partir del año 2013 [188]. El multicéntrico de Palacios-Baena y cols. [146], demostró que la adquisición del clon ST11 era más frecuente en el ámbito nosocomial, mientras que la del clon ST405 se asocia principalmente a cuidados sanitarios. Por otro lado, en España, el clon ST15 se ha encontrado principalmente asociado a la producción de VIM-1 [144] y en menor proporción a enzimas del grupo

OXA-48 [124,145,215]. En nuestro estudio ST15 se encontró mayoritariamente entre la población con OXA-48.

La emergencia de clones productores de OXA-48 con bajo número de representantes en los últimos meses del estudio se tradujo en una disminución significativa de la incidencia del clon ST11-OXA-48 en el segundo periodo. La exitosa diversificación de la enzima OXA-48 entre distintos clones de *K. pneumoniae* es evidente, y nuestros datos sugieren que el aumento de la diversidad clonal de la población de *K. pneumoniae*-OXA-48 es responsable del aumento de la diversidad clonal total de la especie a lo largo del estudio. Esta tendencia se observó en todos los servicios, excepto en Neurocirugía, donde probablemente la emergencia de los clones C-ST101 y H-ST437 productores de NDM-1 habría impedido la emergencia de estos nuevos clones OXA-48.

Entre los pacientes de este estudio, *E. coli* fue la segunda especie predominante. La mayoría de estos aislados fueron clones productores de OXA-48. En los hospitales españoles, se ha encontrado una amplia variedad de clones *E. coli* (ST10, ST23, ST410, ST2531, ST68, ST69, ST156, entre otros) productores de carbapenemasas, especialmente OXA-48 [124,137,144,146,215]. El clon de alto riesgo ST131 productor de carbapenemasas (OXA-48 y VIM-1) ha sido descrito en algunos de estos estudios como el más frecuente, con una incidencia que va desde el 16,5% al 26% [124,146,149]. La prevalencia del clon ST131 productor de CTX-M-15 es preocupante en nuestra institución [75], sin embargo, al menos durante nuestro estudio, no se ha detectado asociado a la producción de carbapenemasas. El clon más prevalente en este trabajo fue el clon ST10 productor de OXA-48, agrupado dentro del CC10. Este clon ha sido previamente asociado en el ámbito hospitalario con la producción de carbapenemasas de tipo OXA-48 y VIM-1 [137,144,149], y previamente a la diseminación de enzimas CTX-M [69,216].

En general, la diversidad clonal de *E. coli* y de *E.coli*-OXA-48 se mantuvo muy elevada durante todo el estudio, aunque observamos que tendió a disminuir con el paso del tiempo. El único factor que pudo influir en esta tendencia fue la emergencia del clon ST10-OXA-48. Estos aislados se detectaron al final del estudio en el servicio de Gastroenterología, lo que pone de manifiesto la posible transmisión interpaciente de

este clon. Con una baja frecuencia se detectaron los clones ST453-OXA-48 y ST354-OXA-48, mientras que el resto de clones tuvieron un único representante.

Durante este estudio, no solo reportamos un incremento de la prevalencia de *E. coli* entre la población de EPC, también se describe la emergencia de un clon productor de OXA-48 bien adaptado al ámbito hospitalario y asociado a la diseminación de enzimas CTX-M. Este evento coincide en el tiempo con la diversificación de OXA-48 en la especie *K. pneumoniae*. Nuestros datos sugieren que la coexistencia de clones persistentes y altamente transmisibles, como ST11-OXA-48-*K. pneumoniae*, pueden conducir a una adquisición casual de OXA-48 por parte de otras especies de enterobacterias circulantes. La diseminación de esta carbapenemasa a través de clones epidémicos y no epidémicos de *E. coli* puede desencadenar la diseminación y el establecimiento OXA-48 en la comunidad, como sucedió anteriormente con las enzimas CTX-M-15.

A pesar de las medidas de control y prevención de la infección por EPC llevadas a cabo, el aumento de la diseminación policlonal de OXA-48 entre diferentes especies de enterobacterias, especialmente *E. coli* y *K. pneumoniae*, y la coexistencia de estos clones con otras EPC, dibuja una epidemiología compleja y preocupante en nuestro hospital. El refuerzo e implementación adecuada de las medidas de prevención y control de la infección, así como el desarrollo de programas de vigilancia activa para detectar la colonización, son necesarios para prevenir la diseminación global de estas EPC, tanto en los hospitales como en la comunidad.

## **2. Cocolonización por enterobacterias productoras de OXA-48, VIM-1 y KPC-3**

Durante el estudio R-GNOSIS se detectó un 14,2% de pacientes cocolonizados por dos o tres especies diferentes de enterobacterias productoras OXA-48, VIM-1 o KPC-3, pudiendo ser este hecho relevante para la dispersión y persistencia de las EPC, sobre todo en pacientes con ingresos prolongados. En este sentido, se ha descrito que los ingresos hospitalarios prolongados, los ingresos previos y la colonización previa por otros patógenos resistentes, son factores de riesgo para la colonización por EPC [33,160,188]. En nuestro trabajo, los pacientes cocolonizados tuvieron ingresos más largos que los colonizados por una sola EPC. Además, el tiempo transcurrido hasta la

detección de la primera colonización fue significativamente inferior en los pacientes cocolonizados (3 días) que en los colonizados (11 días). Hay que tener en cuenta que en el 61% de los casos, la cocolonización se detectó en la primera muestra positiva, aunque la mayoría de estos pacientes habían tenido ingresos previos en nuestra institución (71,4%) o en otros centros (14,3%). En 2011, Schechner y cols. publicaron que el uso de fluoroquinolonas, los ingresos previos en otros centros sanitarios y los reingresos en menos de 3 meses desde la primera detección de una EPC, son factores que contribuyen a la persistencia de la colonización con EPC [217]. Se estima que el tiempo medio de colonización por una EPC es de 3 meses, aunque en algunos casos puede ser más de un año, incrementando el riesgo de infección y de adquisición de otros microorganismos multirresistentes [33]. También se ha descrito que la colonización del hospedador tiene un papel fundamental en las posibles infecciones producidas por EPC [34,151,152]. En nuestro trabajo, aunque no se encontraron diferencias significativas, el porcentaje de pacientes que desarrolló infección por EPC fue mayor en el subgrupo de pacientes cocolonizados. Nuestros datos sugieren, que los ingresos previos y prolongados podrían aumentar la probabilidad de cocolonización por EPC y que además la cocolonización podría aumentar la frecuencia de infección por estas EPC.

Como hemos comentado en el primer capítulo y coincidiendo con la literatura [124,144,146], *K. pneumoniae* productora de OXA-48 fue el microorganismo más prevalente entre los pacientes del estudio R-GNOSIS. El análisis que se recoge en este capítulo reveló que la cocolonización por enterobacterias productoras de OXA-48 fue la más frecuente. Además, *K. pneumoniae* y *E. coli* fueron las especies predominantes (87%), mostrando ambas una incidencia mucho mayor en este subgrupo de pacientes que entre los pacientes colonizados por una única EPC, especialmente *E. coli*. Como era de esperar, la cocolonización por *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48 fue la combinación más frecuente (74%). En 15 pacientes se detectaron creciendo simultáneamente en el mismo cultivo, aunque en 4 de ellos se detectó colonización previa por *K.pneumoniae*-OXA-48. Nuestros datos sugieren que la cocolonización es más probable si hay una colonización previa por *K. pneumoniae* productora de OXA-48, y que la colonización por *E. coli*-OXA-48 se produce mayoritariamente como un evento de transferencia plasmídica *in vivo* junto con otras EPC-OXA-48, particularmente *K. pneumoniae*.

La transferencia interespecie de los genes *bla*<sub>Carbapenemasa</sub> es un evento frecuente que ha facilitado, en parte, la exitosa diseminación de estas enzimas y que contribuye a la emergencia de clones multirresistentes cada vez mejor adaptados al medio hospitalario [16,215]. Desde su emergencia, OXA-48 se ha asociado en gran medida a la diseminación de plásmidos IncL de ~60 kb relacionados con el plásmido IncL/M-pOXA-48a descrito por Poirel y cols. en 2012 [136,141,142]. En este trabajo describimos la transferencia horizontal de *bla*<sub>OXA-48</sub> a través de distintas especies de enterobacterias, principalmente *K. pneumoniae* y *E. coli*, mediante la diseminación de un único plásmido pOXA-48 IncL de ~60 kb relacionado con el anteriormente descrito. A pesar de que estos aislados *K. pneumoniae*-OXA-48 se asociaron frecuentemente a la producción de CTX-M-15, la transferencia del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> por este plásmido pOXA-48 se demostró solo en dos ocasiones. Estos datos son consistentes con lo encontrado en la literatura, ya que pOXA-48a no suele asociarse a otros genes de resistencia [139,142,145,214,215] y la diseminación de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> en estos plásmidos junto a OXA-48 ocurre con muy baja frecuencia [141,218].

En nuestra región, el papel de determinados clones epidémicos de *K. pneumoniae* como ST11, ST307 o ST405 parece fundamental en el mantenimiento y propagación de estos plásmidos altamente transferibles [145,158,214]. En nuestro estudio, se detectó una elevada clonalidad entre los aislados de *K. pneumoniae* implicados en casos de cocolonización. El clon de alto riesgo ST11-OXA-48 se aisló en el 40% de los pacientes, el clon ST15-OXA-48 en el 15% y el clon ST307-OXA-48 en el 10%. Hay que destacar que ST11-OXA-48 se detectó mayoritariamente en el primer cultivo realizado y que su persistencia se demostró en todos los casos en los que se recogieron muestras sucesivas. Entre la población de *E. coli*, aunque el clon emergente ST10-OXA-48 se identificó en el 20% de los pacientes cocolonizados, el resto de aislados mostraron una alta diversidad clonal. Nuestros resultados sugieren que la alta prevalencia de clones epidémicos y persistentes de *K. pneumoniae* podría favorecer la adquisición de estos plásmidos IncL/M-pOXA-48a por parte de aislados no epidémicos de *E. coli*. En la bibliografía encontramos otros casos de cocolonización en los que se sugiere la transferencia intrapaciente de *bla*<sub>OXA-48</sub> a través de plásmidos IncL o IncL/M de ~60-63 kb, desde clones hospitalarios de *K. pneumoniae* a aislados no clonales de *E. coli* [158,219–221]. No obstante, algunas publicaciones han comunicado la presencia de estos plásmidos pOXA-48 en aislados *E. coli* pertenecientes al clon de alto riesgo

ST131 [150,218]. Como hemos comentado anteriormente, la prevalencia de colonización/infección por *E. coli*-BLEE-ST131 en nuestro hospital es elevada [75], de manera que su coexistencia con EPC portadoras de este plásmido pOXA-48 altamente transferible, podría aumentar el riesgo de propagación e infección por estas enterobacterias multirresistentes.

Por otra parte, en nuestro estudio también describimos la transferencia interespecie de otros genes de carbapenemasas. Por un lado, detectamos dos casos de cocolonización por EPC-VIM-1, en los que se localizó un plásmido pVIM-1 IncL de ~60 kb muy relacionado con pOXA-48. En la literatura encontramos que los plásmidos IncL/M se han identificado como reservorio de otros genes de carbapenemasa como NDM-1, CTX-M-3, KPC-4 e IMP-4, pero no VIM-1 [222,223]. Además, en 2012, Gijón y cols. demostraron que la transferencia de VIM-1 entre portadores fecales de EPC en nuestra institución se asociaba a plásmidos IncN e IncHI2 [121]. En otro paciente describimos la transferencia interespecie de un plásmido IncN de ~60 kb portador de KPC-3, no relacionado con los anteriores. Coincidiendo con estos datos, en nuestro hospital, los genes *bla*<sub>KPC-3</sub> caracterizados en trabajos previos han sido mayoritariamente asociados a plásmidos IncN e IncFII<sub>K</sub> de *E. coli* y *K.pneumoniae* [115,117].

Nuestros datos sugieren que *E. coli* es potencialmente el principal receptor de pOXA-48 y que los clones epidémicos de *K. pneumoniae* bien adaptados al ámbito hospitalario, como ST11-OXA-48, pueden ser el principal reservorio de este plásmido. El riesgo de que estos plásmidos pOXA-48 se diseminen en la comunidad a través de clones epidémicos y no epidémicos de *E. coli* supone una grave amenaza para nuestros sistemas de salud. Además, la coexistencia de este plásmido dominante pOXA-48 con otros plásmidos portadores de carbapenemasas puede facilitar el intercambio de material genético y contribuir a la adquisición casual de otras carbapenemasas, como VIM-1 y KPC-3, que aumenten su perfil de multirresistencia.

### **3. Primera descripción de aislados de *Kluyvera* spp. productores de OXA-48 y CTX-M-213**

En este trabajo se describe por primera vez la colonización rectal de seis pacientes con un clon de *Kluyvera* spp. productor de OXA-48 y portador en el cromosoma de una nueva variante de CTX-M, anotada como CTX-M-213.

El género *Kluyvera* se clasifica dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, incluida en el orden *Enterobacterales*. Las especies de este género comparten características microbiológicas con el resto de las enterobacterias y se consideran parte de la microbiota intestinal humana, causando infección como patógenos oportunistas [20,224]. Las infecciones causadas por las bacterias del género *Kluyvera* afectan mayoritariamente al tracto urinario aunque también se han descrito bacteriemias e infecciones de piel y tejidos blandos [225–228]. En la bibliografía hay muy pocos trabajos en los que se comunique la colonización rectal por *Kluyvera* spp. [225,229]. Algunas de ellas, como *K. ascorbata*, han sido también identificadas en distintas muestras ambientales como suelo, agua, aguas residuales y alimentos de procedencia animal [224]. En este estudio, se recogieron seis aislados de *Kluyvera* spp. procedentes de colonización rectal que en ningún caso se relacionaron con anterioridad o posterioridad a su detección con el desarrollo de un cuadro clínico. En uno de los pacientes, la colonización por *Kluyvera* spp.-OXA-48 se detectó en las primeras 48 h de hospitalización, aunque dicho paciente había tenido ingresos previos en nuestro hospital, mientras que en los cinco casos restantes la adquisición se produjo durante el ingreso. Los aislados fueron recogidos en 3 servicios distintos del hospital y en periodos de tiempo muy alejados, por lo que no se pudo establecer una relación epidemiológica entre los casos. Sin embargo, todos los aislados mostraron el mismo perfil de campo pulsado, sugiriendo una transmisión intrahospitalaria de este clon. Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de *Kluyvera* spp. de persistir en el medio ambiente y su posible papel como reservorio nosocomial de genes de resistencia.

Es de resaltar que las diferentes técnicas empleadas en la identificación a nivel de especie de estos aislados de *Kluyvera* spp. no fueron concluyentes. La identificación realizada mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) permitió clasificar los aislados a nivel de género pero no a nivel de especie, siendo *K. ascorbata* la que mostró un mayor grado de identidad en todos los casos. Se han descrito otros casos de enterobacterias, como el complejo *E. cloacae*, en los que esta técnica no permite identificar a nivel de especie [230]. Hay que tener en cuenta que la técnica MALDI-TOF se basa en la comparación de perfiles espectrales con una base de datos construida a partir de cepas de referencia [231], y que la categorización incorrecta de las cepas que conforman estas bases de datos podría dar lugar a identificaciones poco fiables. Por otra parte, la identificación mediante amplificación y secuenciación del ARNr 16S tampoco

resultó discriminativa a nivel de especie, obteniendo un 100% de identidad tanto para *K. ascorbata* como para *K. georgiana*. Asimismo, la comparación del *core genome* obtenido a partir de KA2 y los genomas disponibles en la base de datos mostró una mayor relación evolutiva de nuestra cepa con *K. georgiana* que con otras especies de *Kluyvera*. Además, una publicación reciente ha sugerido que la cepa *K. ascorbata* WCH1410 podría estar erróneamente identificada y tratarse de un aislado de *K. georgiana* [232]. Nuestro análisis filogenético fue consistente con esta idea, ya que situó a esta cepa en la misma rama que el resto de aislados de *K. georgiana* de la base de datos. Algunos estudios comparativos han demostrado que la secuenciación completa de los genomas aporta ventajas respecto a la secuenciación del ARNr 16S, tanto en la identificación de especies, como en detección de diversidad y predicción de genes [233]. Los resultados de este trabajo indican que sería necesario realizar una reclasificación de las distintas especies del género *Kluyvera*, y que la utilización de herramientas de secuenciación masiva puede ayudar a rectificar las bases de datos disponibles e indirectamente aumentaría la sensibilidad de las técnicas rápidas de identificación de las que disponen actualmente los laboratorios.

Las especies del género *Kluyvera* son consideradas el progenitor natural de las enzimas CTX-M. El origen de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 parece estar relacionado con *K. ascorbata*, mientras que los grupos CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 se cree que han evolucionado a partir de genes de *K. georgiana* [59–62,64]. La nueva variante CTX-M-213 difiere de CTX-M-13 en una única sustitución aminoacídica en la posición 56 (Lys-K-Glu). CTX-M-13 es una enzima poco frecuente del grupo 9, descrita por primera vez en el año 2002 en un aislado de *K. pneumoniae* [234]. Se ha demostrado que la movilización del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> desde el cromosoma de especies del género *Kluyvera* a otras enterobacterias, tiene lugar a través de mecanismos de transferencia en los que están implicados diferentes plataformas genéticas [52,201]. Los elementos de la familia *ISEcp1* están implicados en la movilización de CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-9 y CTX-M-13, entre otros, y también actúan como promotores de su expresión [63,234,235]. *ISCR1* se ha encontrado asociado a integrones de clase 1 y se ha relacionado principalmente con la movilización de genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> [66,70]. También se ha descrito la asociación de otros elementos genéticos como *IS26* con distintos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> [236,237]. En nuestro caso, no se encontró ninguna de estas estructuras genéticas en el entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-213</sub>. El análisis

del genoma completo del aislado KA2, mostró que CTX-M-213 se sitúa en una región muy conservada del cromosoma del género *Kluyvera*, considerada la fuente natural del gen constitutivo *bla*<sub>CTX-M</sub>. El hecho de que esta región se haya localizado con un 99% de similitud en plásmidos portadores de otras variantes CTX-M localizados en diversas especies de enterobacterias [*R. planticola* pKnNDM1 (NC 023911), *E. cloacae* pMRVIM0813 (KP975077.1), *E. cloacae* pQC (DQ108615.1) y *E. coli* pMSP071 (AF174129.3)] sugiere que esta región cromosómica podría ser movilizada desde *Kluyvera* spp. a otras plataformas genéticas mediante diferentes eventos de recombinación.

Los primeros estudios de sensibilidad antimicrobiana realizados con especies del género *Kluyvera* mostraron que estos aislados eran sensibles a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina, cefalotina, cefoxitina y cefotaxima [238]. Posteriormente se publicaron estudios que demostraron que *K. ascorbata* puede presentar resistencia a ampicilina y cefalosporinas de primera y segunda generación y que esta resistencia está mediada por la producción de la enzima CTX-M [62]. Estos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> cromosómicos son débilmente expresados en su contexto original y requieren la presencia de un promotor (normalmente asociados a secuencias de inserción) para aumentar los valores de CMI y ser considerados fenotípicamente resistentes [201]. En los estudios de Sarria y cols. y Carter y cols. aproximadamente el 50% de los aislados recogidos del género *Kluyvera* eran resistentes a ampicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación y ticarcilina [225,226]. En nuestro trabajo, todos los aislados mostraron resistencia a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina, cefazolina y cefuroxima. Además, excepto el aislado KA4, todos fueron resistentes a ceftazidima y cefotaxima. A pesar de que los seis aislados eran productores de OXA-48, la actividad frente a estas cefalosporinas fue atribuida a la expresión de CTX-M-213, ya que OXA-48 hidroliza las penicilinas y carbapenems pero no las cefalosporinas de espectro ampliado como la ceftazidima y la cefotaxima [105]. La caracterización fenotípica de la nueva variante a través de la obtención de clones *E. coli*-DHA5 $\alpha$  con pCTX-M-213, confirmó que CTX-M-213 era responsable de la resistencia a cefotaxima, pero no a ceftazidima. Estos datos eran de esperar, ya que la mayoría de las enzimas CTX-M se caracterizan por tener mayor actividad sobre cefotaxima que sobre ceftazidima [58]. Otros grupos han publicado resultados parecidos con la descripción de otras nuevas variantes de *bla*<sub>CTX-M</sub> [64,239]. Por el contrario, la enzima CTX-M-13 obtenida por

mutagénesis desde CXT-M-213, presentó actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftazidima y unos valores de CMI en el rango de la resistencia para cefepime y amoxicilina-ácido clavulánico, mientras que la variante CTX-M-213 fue sensible a ambos antibióticos.

Como era de esperar, ni la cefoxitina ni los antibióticos carbapenémicos se vieron afectados por la actividad de CTX-M-213 y CTX-M-13. Nuestros resultados sugieren que el aminoácido Lys de la posición 56 podría ser crítico para actividad hidrolítica de CXT-M-13. En general, la presión antibiótica ha desempeñado un papel relevante en la evolución de las enzimas CTX-M movilizadas. El uso de la ceftazidima ha sido determinante en la aparición de nuevas variantes que han mejorado y ampliado su actividad hidrolítica contra este antibiótico [57,201], como podría ser el caso de CTX-M-13.

La exitosa diseminación interespecie de las distintas enzimas CTX-M mediante transferencia lateral de elementos genéticos móviles ha sido también un factor responsable de la endemicidad de estas BLEE en un gran número de países [52,240]. Hoy en día, se está describiendo un escenario muy similar con la aparición y propagación mundial de las EPC [16,131]. Como hemos visto, durante este estudio la incidencia de colonización por EPC fue del 2%. Coincidiendo con estudios previos realizados en hospitales españoles, las especies más frecuentes fueron *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*, mientras que la prevalencia de otras especies como *C. freundii*, *K. oxytoca* o *K. aerogenes* se mantuvo muy baja [124,144]. En este trabajo comunicamos la primera descripción de una especie del género *Kluyvera* productora de la carbapenemasa OXA-48. Cabe destacar que en dos de los pacientes también se recogieron otras enterobacterias (*K. pneumoniae*, *E. coli* y *R. ornithinolytica*) portadoras de plásmidos pOXA-48 relacionados con los encontrados en *Kluyvera* spp. Como sucedió con los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, la transferencia lateral mediada por plásmidos es uno de los factores responsables de la diseminación interespecie de los genes codificadores de carbapenemasas [16]. El plásmido pOXA-48a descrito por Poirel y cols. [142] está desempeñando un papel esencial en la aparición y diseminación del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> en diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* [150,215]. El pOXA-48 descrito en este Capítulo representa el primer plásmido completamente secuenciado de *Kluyvera* spp. portador del gen *bla*<sub>OXA-48</sub>. Se trata de un plásmido IncL

de ~63,5 kb relacionado con el pOXA-48a previamente descrito. Este plásmido transporta también mecanismos de defensa, como sistemas de restricción-modificación y toxina-antitoxina, que ayudan a su mantenimiento en la célula huésped y a otras funciones esenciales, como la replicación, la recombinación y la conjugación.

Con la secuenciación completa de KA2 se encontró un nuevo plásmido IncFII de ~177 kb, pKA2\_2, en el que se localizaban genes de resistencia a aminoglucósidos y sulfonamidas (*aadA2* y *sul1*) en un integrón de clase 1 y otros genes con funciones implicadas en el metabolismo y defensa de la cepa (genes de resistencia a metales pesados y bombas de expulsión). pKA2\_2 compartió una alta similitud con plásmidos presentes en *R. ornithinolytica* y *C. freundii* con multitud de secuencias de inserción, lo que sugiere una diseminación y recombinación de pKA2\_2 entre diferentes especies de enterobacterias. Finalmente, se encontró un tercer plásmido IncQ de ~9 kb (pKA2\_3) portador de FOX-8, una  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC habitualmente localizada en plásmidos. Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de tipo AmpC tienen una prevalencia baja y suelen estar asociadas a otros mecanismos de resistencia como BLEE o carbapenemasas [78–80]. El gen *bla*<sub>FOX-8</sub> se detectó únicamente en KA2 y su transformante. KA2TM fue el único transformante que mostró resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, y se atribuyó a la actividad combinada de los genes *bla*<sub>FOX-8</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>. La presencia en EPC de otros genes de resistencia como *bla*<sub>FOX-8</sub>, *aadA2* y *sul1*, facilita la coselección de estos aislados multirresistentes y favorece su mantenimiento y propagación en el ámbito hospitalario.

El establecimiento de clones epidémicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de OXA-48, junto con la adquisición mediada por plásmidos de esta carbapenemasa por parte de otros patógenos multirresistentes esporádicos, como *Kluyvera* spp., pone de manifiesto la exitosa diversificación de OXA-48 en el entorno hospitalario y en la microbiota intestinal humana.

#### **4. Brote por *K. pneumoniae* productora de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1**

Durante el último semestre del estudio R-GNOSIS se detectó un brote en el Servicio de Neurocirugía producido por dos clones diferentes de *K. pneumoniae* productores de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1. Se trataba de la primera descripción en nuestro hospital de enterobacterias productoras de NDM-1.

Desde su aparición en 2009, la carbapenemasa NDM-1 se ha diseminado en todo el mundo a una velocidad inusitada. En la actualidad se considera endémica en el subcontinente Indio, los Balcanes y Oriente Medio [111,126]. Uno de los principales factores de riesgo para la adquisición de enterobacterias productoras de NDM-1 son los viajes a estas regiones, tanto por turismo como por asistencia sanitaria [101,162,241–243]. En España, la diseminación de enterobacterias productoras de NDM se ha limitado a brotes hospitalarios esporádicos [17] y en la mayoría de los casos se ha establecido un vínculo con el subcontinente Indio. En 2011 se detectó el primer caso, un aislado *E. coli* productor de NDM-1 procedente de un paciente que había viajado a la India y que presentaba diarrea del viajero [242]. En 2012, se aisló una *K. pneumoniae* productora de NDM-1 en un absceso abdominal procedente de un paciente que había estado previamente hospitalizado en la India por una peritonitis [243]. En 2013 se identificó un nuevo caso de colonización con *K. pneumoniae* portadora de NDM-1, también relacionado con la India [244]. En el mismo año, se llevó a cabo un estudio que demostró la diseminación interhospitalaria de un clon de *K. pneumoniae* productor de NDM-7 (ST437) en 7 pacientes ingresados en 3 hospitales de Madrid. En este caso, el único vínculo con regiones endémicas fue a través de un familiar sano de uno de los pacientes [245]. Ruppé y cols describieron en 2014 que la colonización de personas sanas por estas EPC-NDM puede durar menos de un mes desde el retorno de la zona endémica, pero constituye un importante factor de riesgo para la transmisión y diseminación de estas EPC [162].

En nuestro trabajo, el paciente índice fue un hombre de origen pakistaní, residente en España, pero que había recibido atención sanitaria en su país de origen tras sufrir un accidente de tráfico. El paciente fue trasladado a nuestro hospital en agosto de 2015, aunque la colonización por EPC-NDM-1 no se detectó hasta 27 días después. Las primeras muestras rectales de este paciente fueron negativas, lo que sugiere que el tratamiento antibiótico recibido durante la hospitalización podría haber facilitado un proceso de selección de estas EPC. Además, dicho paciente presentó cocolonización por un segundo clon de *K. pneumoniae* productor de NDM-1, que no se detectó hasta 61 días después del ingreso y que fue responsable del brote durante los siguientes meses. Se ha demostrado que el tratamiento antibiótico previo, especialmente con fluoroquinolonas y otras penicilinas antipseudomónicas, favorece la selección de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas [34,35,153,217]. Este paciente fue

tratado con ciprofloxacino las semanas previas a la detección del segundo clon productor de NDM-1, lo que también podría haber facilitado la diseminación intrapaciente de esta carbapenemasa. Asimismo, hay que señalar que los pacientes colonizados por EPC-NDM-1 tuvieron ingresos significativamente más prolongados y tardaron más tiempo en adquirir la EPC-NDM-1 que los colonizados por otras EPC.

Aunque las principales vías de transmisión de las EPC son las manos del personal sanitario, los equipos sanitarios y las superficies ambientales también contribuyen a la diseminación de estos microorganismos multirresistentes [246]. Los nichos ambientales tienen un papel fundamental en la epidemiología de las carbapenemasas NDM, tanto en los hospitales como en la comunidad. Varios estudios han demostrado que el agua potable, las aguas residuales y el suelo pueden ser reservorios ambientales de enterobacterias productoras de NDM-1 en regiones endémicas [128,247–249]. En el estudio de Seara y cols. de 2014 también identificaron un posible reservorio ambiental en uno de los hospitales [245]. Durante nuestro brote, no se pudo demostrar la existencia de un foco ambiental, aunque no podemos descartar que estos microorganismos productores de NDM-1 pudieran haber persistido en las habitaciones donde permanecieron ingresados algunos de los pacientes. Además, hay que destacar que, a pesar de las medidas de control y prevención implementadas, en abril de 2016 y ya fuera del periodo de estudio del proyecto R-GNOSIS, se detectaron dos nuevos casos de colonización por *K. pneumoniae* productora de NDM-1 tras el reingreso de uno de estos pacientes.

Por otra parte, las enzimas NDM se han detectado en una amplia variedad de enterobacterias, aunque los principales reservorios son *K. pneumoniae* y *E. coli* [101,127,130,132]. En nuestro estudio, todo indica que en el primer paciente tuvo lugar la transferencia *in vivo* de *bla*<sub>NDM-1</sub> entre los clones H/ST437 y C/ST101 de *K. pneumoniae*. Ambos clones han sido previamente descritos como portadores de OXA-48 y KPC-2 [137,144], aunque en este trabajo se describieron únicamente asociados a NDM-1. En la bibliografía encontramos que el clon ST101 había sido relacionado previamente con la enzima NDM-1 [132,250] y el clon ST437 con NDM-7 [245], lo que indica su facilidad para la adquisición de este tipo de mecanismo de resistencia y refrendando su consideración como clones de alto riesgo. Otros clones epidémicos de *K. pneumoniae* (ST15 y ST11) y de *E. coli* (ST10, ST410 y ST131),

frecuentes en nuestra región y en nuestro hospital, también han sido asociados a NDM-1 [132,250,251]. Afortunadamente, durante este brote no se detectó la transferencia de *bla*<sub>NDM-1</sub> a estos clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*, ni a otras especies de enterobacterias como *E. coli*.

En general, la transferabilidad de NDM-1 se ha vinculado a diversos plásmidos conjugativos de distinto tamaño [101,127]. Estos plásmidos han sido clasificados mediante el esquema PBRT como IncN2, IncA/C, IncL/M, IncF, IncX, o IncH, aunque en ocasiones se ha tratado de plásmidos no tipables [132,250]. También se ha descrito que *bla*<sub>NDM-1</sub> puede tener localización cromosómica, aunque con una frecuencia muy baja [127,132]. En este trabajo, el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> tuvo localización plasmídica en todos los aislados. En el primer clon (clon H/ST437) se identificó un plásmido de ~100 kb que portaba tanto la NDM-1, como las otras β-lactamasas CTX-M-15 y DHA-1. Este plásmido no se pudo transferir a cepas isogénicas de *E. coli*, ni se pudo clasificar con el método PBRT. Por otro lado, en el clon C/ST101 se detectaron dos plásmidos, uno de ~120 kb portador de NDM-1 (IncF) y otro de ~150 kb portador de CTX-M-15 y DHA-1. En este caso, pudimos obtener transconjugantes con pNDM-1 que nos permitieron estudiar el perfil de resistencia de esta enzima y su coste biológico respecto a las cepas salvajes.

En general, la diseminación de los genes *bla*<sub>NDM-1</sub> se ha asociado a plásmidos que suelen estar asociados con otros mecanismos de resistencia, tanto β-lactamasas (AmpC, BLEE o incluso otras carbapenemasas) como genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos. En muchas ocasiones, las únicas opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones producidas por estas EPC panresistentes son tigeciclina, colistina y fosfomicina [125,127,133]. Entre los aislados EPC-NDM-1 recogidos durante este brote, los únicos antibióticos que mostraron sensibilidad fueron amikacina y colistina en el caso del clon H/ST437, y tigeciclina, cotrimoxazol y colistina en el caso del clon C/ST101. Los transconjugantes con NDM-1 obtenidos desde el clon C/ST101 mostraron unas tasas de resistencia muy elevadas frente a los carbapenems y las cefalosporinas de amplio espectro. Además, estos resultados sugirieron que los genes responsables de la resistencia a los aminoglucósidos se encontraban posiblemente en el mismo plásmido que NDM-1.

Por otra parte, el ensayo de *fitness* nos permitió comprobar que el coste biológico de este plásmido para el clon C/ST101 de *K. pneumoniae* es muy bajo. Sin embargo, los experimentos de estabilidad plasmídica no nos permitieron obtener células curadas de plásmido para ninguno de los dos clones, sugiriendo que estos elementos genéticos están altamente adaptados a estas cepas de *K. pneumoniae*.

Hay que destacar que la coproducción de CTX-M-15 y DHA-1 por parte de enterobacterias productoras de NDM ha sido descrita previamente. En nuestra región, el aislado *E. coli*-ST156-NDM-1 identificado por Solé y cols. en 2011 mostró el mismo perfil genotípico que nuestros aislados [242]. CTX-M-15 es actualmente la BLEE más extendida en todo el mundo y su diseminación a través de EPC ha sido ampliamente demostrada [16,201]. Por otro lado, DHA-1 es una  $\beta$ -lactamasa AmpC plasmídica poco frecuente, aunque su coproducción por cepas NDM-1 ha sido descrita también en otros estudios [247,252].

Por otro lado, en dos pacientes incluidos en el brote se detectó la coexistencia del clon C/ST101-NDM-1 con otras enterobacterias productoras de otras carbapenemasas. Concretamente, detectamos los clones epidémicos ST11-OXA-48+CTX-M-15 y ST54-VIM-1+SHV-12 de *K. pneumoniae* y otros dos aislados no epidémicos productores de VIM-1 (*K. pneumoniae*-X/ST908 y *E. coli*-F/ST43). Excepto en el clon B/ST54-VIM-1, OXA-48 y VIM-1 se identificaron un plásmido de ~60 kb IncL, relacionados con el descrito en los Capítulos 2 y 3 de esta tesis y también en la bibliografía [142].

El ingreso de pacientes procedentes de países endémicos debe alertar del riesgo de introducción de esas cepas multirresistentes en los hospitales. La situación que describimos, a pesar de la vigilancia y medidas de control epidemiológico adoptadas, evidencia su difícil control y una rápida diseminación que podría estar asociada al tipo de microorganismo. Nuestros resultados reafirman la facilidad de propagación de estas carbapenemasas NDM-1 a través de clones epidémicos con una elevada capacidad de dispersión y de persistencia en el ambiente hospitalario.

## **5. Discusión final**

Los resultados de esta tesis indican que *K. pneumoniae* continúa siendo el principal reservorio de los genes de carbapenemasa y en particular de OXA-48. No obstante, se describe también la dispersión de la enzima OXA-48 entre distintas especies de

enterobacterias y diferentes clones epidémicos y no epidémicos, especialmente de *E. coli*, reflejando la alta y rápida capacidad de diseminación de esta carbapenemasa. La transferencia *in vivo* del plásmido IncL-pOXA-48, principalmente desde clones nosocomiales de *K. pneumoniae* a aislados clonalmente no relacionados de *E. coli*, pero también a otras especies de enterobacterias poco frecuentes en la microbiota humana como *Kluyvera* spp., pone también de manifiesto la potencial capacidad de diseminación interespecie de  $bla_{OXA-48}$  y de su emergencia en especies con menor relevancia clínica que *K. pneumoniae* y *E. coli*. Asimismo, la dispersión de este plásmido pOXA-48 a través de clones circulantes bien adaptados de *E. coli* podría facilitar la introducción y diseminación incontrolada de esta carbapenemasa en la comunidad, como sucedió años atrás con la enzima CTX-M-15. Asimismo, el riesgo de adquisición de otros mecanismos de resistencia, incluidas otras carbapenemasas como VIM-1 y KPC-3, por parte de este plásmido dominante y altamente transferible podría dar lugar a la aparición y selección de clones panresistentes con una elevada capacidad de propagación tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario. En este contexto, la introducción de nuevas carbapenemasas, por el momento infrecuentes en nuestro medio, como NDM-1, acrecienta más la dimensión del problema y su control epidemiológico.

Los estudios de vigilancia epidemiológica en el medio hospitalario son necesarios para conocer los mecanismos de dispersión de las EPC y poder diseñar medidas adecuadas para el control y prevención de su diseminación. El escenario descrito durante este trabajo es altamente complejo, donde la diseminación policlonal, la persistencia y emergencia de clones epidémicos, la transferencia *in vivo* de los genes de carbapenemasa y los brotes hospitalarios vinculados con patógenos poco frecuentes y de otras áreas geográficas, contribuyen a la evolución y endemia local de estos microorganismos productores de carbapenemasas y en particular de OXA-48.



---

## CONCLUSIONES

---

*“El secreto del cambio está en centrar toda tu energía, no en luchar contra el pasado, sino en construir todo lo nuevo”*

Sócrates



## CONCLUSIONES

---

1. La incidencia de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) durante el estudio R-GNOSIS fue del 8,4%. No se observaron diferencias a lo largo del tiempo, ni tampoco tras la implementación de medidas de precaución de contacto orientadas a reducir su transmisión. La diversidad de especies en esta población se mantuvo estable, siendo *E. coli* la especie predominante.
2. El 2% de los pacientes que participaron en el estudio presentaron colonización por enterobacterias productoras de carbapenemasa (EPC). Aunque la incidencia se mantuvo invariable a lo largo del tiempo, se detectó una posible contención de estas EPC como consecuencia de las medidas de aislamiento de contacto empleadas para reducir la transmisión de portadores de enterobacterias con BLEE. La diversidad de especies de EPC detectadas se redujo a lo largo del estudio, debido principalmente al aumento de la prevalencia de *K. pneumoniae* con estas enzimas.
3. En el 56,2% de los pacientes, la colonización por EPC fue de adquisición nosocomial, mientras que en el 22,8% se asoció a ingresos previos en nuestro hospital y en el 3,7% se relacionó con cuidados sanitarios en otros centros sanitarios. En general se trató de pacientes con edad avanzada y estancias hospitalarias prolongadas.
4. La enzima OXA-48 fue la carbapenemasa más frecuente durante el estudio R-GNOSIS (64,1%), seguido de VIM-1 (26,8%), NDM-1 (5,3%) y KPC-3 (3,5%). La coproducción de BLEE se detectó en más de la mitad de las EPC (55,5%), siendo la más frecuente la asociación de OXA-48 y CTX-M-15 en *K. pneumoniae* (29,3%).
5. *K. pneumoniae* es el principal reservorio de genes de carbapenemasa, siendo los clones ST11-OXA-48 y ST54-VIM-1 los más prevalentes. No obstante, en la última parte del estudio se observó una disminución de su diversidad debido a la diseminación de OXA-48 a través de múltiples clones emergentes de esta misma especie. Este hecho indica la elevada capacidad de diseminación de esta enzima, que también se refleja en su introducción en otras enterobacterias, algunas de ellas con menor significación epidemiológica.
6. Se describe el aumento de la prevalencia de clones no relacionados de *E. coli* productores de OXA-48, pero también de clones epidémicos previamente asociados a la

dispersión mundial de las enzimas CTX-M, como el CC10, lo que aumentaría el riesgo de introducción y propagación de esta carbapenemasa en el ámbito comunitario.

**7.** En el subgrupo de pacientes cocolonizados, la diseminación del gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se asoció con la dispersión de un plásmido IncL-pOXA-48 altamente transmisible. Nuestros resultados sugieren que la transferencia *in vivo* de este plásmido ocurrió principalmente desde clones epidémicos y persistentes de *K. pneumoniae* a clones no relacionados de *E. coli*.

**8.** La transferencia *in vivo* de genes de carbapenemasa diferentes a *bla*<sub>OXA-48</sub> se produjo con menor frecuencia. En los pacientes cocolonizados por enterobacterias productoras de VIM-1 se identificaron plásmidos IncL relacionados con pOXA-48, mientras que en la cocolonización por productores de KPC-3 se asoció a plásmidos IncN no relacionados con los anteriores.

**9.** Se describe por primera vez la adquisición de *bla*<sub>OXA-48</sub> por *Kluyvera* spp. a través de la transferencia lateral de un plásmido IncL-pOXA-48 y su posterior diseminación entre pacientes a través de un único clon. En todos los aislados se caracterizó la nueva variante CTX-M-213, localizada en una región conservada del cromosoma del género *Kluyvera* y diferente de CTX-M-13 en una única sustitución aminoacídica (Lys-56-Glu).

**10.** Las técnicas rápidas de identificación que disponemos actualmente, como el MALDI-TOF MS y la amplificación y secuenciación del ARNr 16S, no discriminan entre las distintas especies del género *Kluyvera*, poniendo de manifiesto la necesidad de aplicar nuevas herramientas, como la secuenciación masiva, que permitan mejorar y completar las bases de datos utilizadas en la identificación de estos microorganismos.

**11.** Se describe por primera vez en nuestro hospital un brote asociado a dos clones de *K. pneumoniae* (ST437 y ST101), ambos productores de NDM-1, CTX-M-15 y DHA-1. Su origen se vinculó a la asistencia sanitaria de un paciente procedente de una región endémica (Pakistán). Los estudios de sensibilidad antibiótica mostraron que los clones de *K. pneumoniae* ST101 y ST437 productores de NDM-1 eran resistentes a todos los antibióticos excepto colistina y amikacina en el caso del clon ST101, y colistina, tigeciclina y cotrimoxazol en el caso del clon ST437.

**12.** La coexistencia del clon ST101-NDM-1 de *K. pneumoniae* con otros epidémicos de esta especie como ST54-VIM-1 y ST11-OXA-48, y con otros clones no epidémicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* portadores de plásmidos relacionados con IncL-pOXA-48, podría facilitar el intercambio genético de estos genes de carbapenemasa y contribuir a la emergencia de clones panresistentes mejor adaptados al ámbito hospitalario y a la comunidad.

**13.** Los resultados y conclusiones de esta tesis ponen de manifiesto el complejo panorama de las enterobacterias productoras de carbapenemasas y la penetración eficaz de estas enzimas en nuestro hospital. Su detección, caracterización, seguimiento continuo y análisis a diferentes niveles constituye, tal y como señalan los diferentes planes de lucha contra la resistencia a antimicrobianos, un pilar esencial para su contención.



---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- [1] Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2015;33:692–9. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004.
- [2] Bennet P. Genome plasticity. *Methods in Molecular Biology* 2005;266:71–113.
- [3] Sussmann OA, Mattos L, Restrepo A. Resistencia Bacteriana. vol. 6. 1993. doi:10.4067/S0301-732X2002000200008.
- [4] Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American Journal of Infection Control* 2007;35. doi:10.1016/j.ajic.2007.10.006.
- [5] López-Pueyo MJ, Barcenilla-Gaite F, Amaya-Villar R, Garnacho-Montero J. Multirresistencia antibiotica en unidades de criticos. *Medicina Intensiva* 2011;35:41–53. doi:10.1016/j.medin.2010.07.011.
- [6] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18:268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- [7] Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-venezia S, Dhaher Y, Edgar R, *et al.* Introduction of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* to Israeli hospitals by medical tourism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66:2763–6. doi:10.1093/jac/dkr382.
- [8] Rogers BA, Aminzadeh Z, Hayashi Y, Paterson DL. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clinical Infectious Diseases* 2011;53:49–56. doi:10.1093/cid/cir273.
- [9] Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, *et al.* High Rate of acquisition but short duration of carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* after travel to the tropics. *Clinical Infectious Diseases* 2015;61:593–600. doi:10.1093/cid/civ333.
- [10] Food and Agriculture Organization. El plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020. 2016. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004.
- [11] ECDC. The bacterial challenge: time to react. 2009. doi:10.2900/2518.
- [12] Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases* 2006;42:S82–9. doi:10.1086/499406.
- [13] O’Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [14] Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. 2016. doi:ISBN 978 92 4 350976 1.
- [15] European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* - first update. 2018.
- [16] Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18:413–31. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x.
- [17] Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance* 2015;20:30062. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062.
- [18] Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Ruiz-garbajosa P, Horcajada JP, Luis J, *et al.* La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2015;32:666–70.
- [19] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos. 2014.
- [20] Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S,

- Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2016;66:5575–99. doi:10.1099/ijsem.0.001485.
- [21] Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The prokaryotes: Gammaproteobacteria. 2013. doi:10.1007/978-3-642-38922-1.
- [22] Hill MJ, Drasar BS. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 1975;16:318–23. doi:10.1136/gut.16.4.318.
- [23] Paul E, Elisabeth B, Charles B, Elisabeth P, Les D, Steven G, *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–8. doi:10.1016/j.molcel.2009.10.020.The.
- [24] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* 2009;9:313–23. doi:10.1038/nri2515.The.
- [25] Pérez Guerrero P, Galán Sánchez F, Gutiérrez Saborido D, Guerrero Lozano I. Infecciones por enterobacterias. *Medicine (Spain)* 2014;11:3276–82. doi:10.1016/S0304-5412(14)70768-1.
- [26] Gutiérrez Saborido D, Pérez Guerrero P, Ruiz Blasco E, Ríos Holgado I. Formas clínicas de infecciones por enterobacterias. *Medicine (Spain)* 2014;11:3283–90. doi:10.1016/S0304-5412(14)70769-3.
- [27] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998;11:142–201.
- [28] Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;181:1753–4. doi:10.1086/315418.
- [29] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123–40. doi:10.1038/nrmicro818.
- [30] Podschun, Ullmann. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* 1998;11:589–603.
- [31] Carpenter JL. *Klebsiella* pulmonary infections - occurrence at one medical-center and review. *Reviews of Infectious Diseases* 1990;12:672–82.
- [32] Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2008;29:1099–106. doi:10.1086/592412.
- [33] Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18:439–48. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03823.x.
- [34] Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:1028–33. doi:10.1128/AAC.01020-07.
- [35] Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, Vrtizili S, Chelvatzoglu FC, Papaioannou V, *et al.* Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case - control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 60:1124–30. doi:10.1093/jac/dkm356.
- [36] Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter* 2015;28:1–9.
- [37] Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2009;27:116–29. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001.
- [38] Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, *et al.* Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of Antibiotics* 1979;32:1–12. doi:10.7164/antibiotics.32.1.
- [39] Bush K. A resurgence of  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*

- 2015;46:483–93.  
doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.08.011.
- [40] Waxman DJ, Yocum RR, Strominger JL. Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 1980;289:257–71. doi:10.1098/rstb.1980.0044.
- [41] Josephine HR, Kumar I, Pratt RF. The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic  $\beta$ -lactams. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126:8122–3. doi:10.1021/ja048850s.
- [42] Spratt BG. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975;72:2999–3003.  
doi:10.1073/pnas.72.8.2999.
- [43] Kitano K, Tomasz A. Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1979;16:838–48. doi:10.1128/AAC.16.6.838.
- [44] Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;28:837.
- [45] Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2001;4:500–8. doi:10.1016/S1369-5274(00)00242-3.
- [46] Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 2005;8:525–33. doi:10.1016/j.mib.2005.08.016.
- [47] Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1995;8:557–84. doi:Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance.
- [48] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine* 2012;18:263–72.  
doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003.
- [49] Ambler RP. The Structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 1980;289:321–31. doi:10.1098/rstb.1980.0049.
- [50] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54:969–76. doi:10.1128/AAC.01009-09.
- [51] Philippon A, Labia R, Jacoby G. MINIREVIEW Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989;33:1131–6. doi:10.1128/AAC.33.8.1131.Updated.
- [52] Cantón R, Coque TM. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 2006;9:466–75. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011.
- [53] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18:657–86. doi:10.1128/CMR.18.4.657.
- [54] Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11:625–31. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01194.x.
- [55] Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:2122–5. doi:10.1128/AAC.49.5.2122.
- [56] Díaz M, Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Martínez Peinado C, et al. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: Segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2009;27:503–10. doi:10.1016/j.eimc.2008.09.006.
- [57] Bonnet R. Growing group of extended spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48:1–14. doi:10.1128/AAC.48.1.1.
- [58] Rossolini GM, Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 2008;14:33–41. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x.
- [59] Rodríguez MM, Power P, Radice M,

- Vay C, Famiglietti A, Galleni M, *et al.* Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: A possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:4895–7. doi:10.1128/AAC.48.12.4895-4897.2004.
- [60] Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, *et al.* Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:2112–5. doi:10.1128/AAC.49.5.2112-2115.2005.
- [61] Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler Class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:4038–40. doi:10.1128/AAC.46.12.4038.
- [62] Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:3045–9. doi:10.1128/AAC.46.9.3045-3049.2002.
- [63] Poirel L, Decousser J, Nordmann P. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*CTX-M beta-lactamase gene 2003;47:2938–45. doi:10.1128/AAC.47.9.2938.
- [64] Rodríguez MM, Power P, Sader H, Galleni M, Gutkind G. Novel chromosome-encoded CTX-M-78 beta-lactamase from a *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54:3070–1. doi:10.1128/AAC.01615-09.
- [65] Poirel L, Decousser J, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*CTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:447–50. doi:10.1128/AAC.49.1.447.
- [66] Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR Elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2006;70:296–316. doi:10.1128/MMBR.00048-05.
- [67] Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New  $\beta$ -lactamases. *New England Journal of Medicine* 2005;352:380–91. doi:10.1056/NEJMr041359.
- [68] Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe 2008;13:1–11.
- [69] Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais Â, Galán JC, Alvarado A, *et al.* Spread of *bla*CTX-M-14 is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:5204–12. doi:10.1128/AAC.01706-08.
- [70] Novais Â, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán JC, Peixe L, *et al.* Dissemination and persistence of *bla*CTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- $\alpha$ , and IncFI groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006;50:2741–50. doi:10.1128/AAC.00274-06.
- [71] Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews* 2013;26:744–58. doi:10.1128/CMR.00023-13.
- [72] Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing ESBL CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases* 2008;14:195–200. doi:10.3201/eid1402.070350.
- [73] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61:273–81. doi:10.1093/jac/dkm464.
- [74] Pitout JDD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary health region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:2846–51. doi:10.1128/AAC.00247-09.
- [75] Merino I, Hernández-García M, Turrientes MC, Pérez-Viso B, López-Fresneña N, Díaz Agero C, *et al.* Emergence of ESBL-*E. coli*-ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2018. doi:10.1093/jac/dky296

- [76] Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases* 2016;63:310–8. doi:10.1093/cid/ciw283.
- [77] Jacoby GA. AmpC B-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2009;22:161–82. doi:10.1128/CMR.00036-08.
- [78] Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2013;32:253–9. doi:10.1007/s10096-012-1737-0.
- [79] Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, *et al.* Clonal structure, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:309–16. doi:10.1128/AAC.01656-12.
- [80] Sageerabano S, Malini A, Mangaiyarkarasi T, Hemalatha G. Phenotypic detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase and Amp-C  $\beta$ -lactamase producing clinical isolates in tertiary care hospital: a preliminary study. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine* 2015;6:383–7. doi:10.4103/0976-9668.160014.
- [81] Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem 1991;35:1093–8. doi:10.1128/AAC.35.6.1093.
- [82] Martínez-Martínez L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection* 2008;14:82–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x.
- [83] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007;20:440–58. doi:10.1128/CMR.00001-07.
- [84] Calvo J, Canton R, Fernández Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. 2011.
- [85] Yang Y, Wu P, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990;34:755–8. doi:10.1128/AAC.34.5.755.
- [86] Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C, *et al.* Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996;40:2080–6.
- [87] Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:7693–7. doi:10.1073/pnas.91.16.7693.
- [88] Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:622–32. doi:10.1128/AAC.44.3.622-632.2000.
- [89] Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 2004;234:209–13. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.028.
- [90] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases* 2009;9:228–36. doi:10.1016/S1473-3099(09)70054-4.
- [91] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-sanchez A, Biddle JW, Christine D, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* 2001;45:1151–61. doi:10.1128/AAC.45.4.1151.
- [92] Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Anson LW, Pankhurst L, Sebra R, *et al.* Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 2017;7:1–11. doi:10.1038/s41598-017-06256-2.

- [93] Walsh TR, Toleman M a., Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18:306–25. doi:10.1128/CMR.18.2.306-325.2005.
- [94] Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991;35:147–51. doi:10.1128/AAC.35.1.147.
- [95] Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994;38:71–8. doi:10.1128/AAC.38.1.71.
- [96] Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, *et al.* PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:2909–13.
- [97] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, *et al.* Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999;43:1584–90.
- [98] Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:891–7. doi:10.1128/AAC.44.4.891-897.2000.
- [99] Walsh TR. Emerging carbapenemases: A global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010;36:S8–S14. doi:10.1016/S0924-8579(10)70004-2.
- [100] Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* 2002;8:321–31. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x.
- [101] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *blaNDM-1*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:5046–54. doi:10.1128/AAC.00774-09.
- [102] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54:24–38. doi:10.1128/AAC.01512-08.
- [103] Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, *et al.* OXA-163, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:2546–51. doi:10.1128/AAC.00022-11.
- [104] Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19:E230–2. doi:10.1111/1469-0691.12146.
- [105] Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:15–22. doi:10.1128/AAC.48.1.15.
- [106] Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4896–9. doi:10.1128/AAC.00481-11.
- [107] Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, *et al.* Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveillance* 2010;15:pii=19711.
- [108] Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrašević A, Canton R, Carmeli Y, *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013, G M Rossolini National Reference Laboratory for Antibiotic Resistance Monitoring in Gram-negative Bacteria. *Euro Surveillance* 2013;18:pii=20525. doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20525.
- [109] Rasmussen JW, Højby N. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy 2007;60:470–82. doi:10.1093/jac/dkm226.
- [110] Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hackel M, Johnson JL, Badal RE. *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing KPC beta-lactamase in Israel, Puerto Rico, Colombia and Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009;34:384–5. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.05.005.
- [111] Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of Internal Medicine* 2015;277:501–12. doi:10.1111/joim.12342.
- [112] Muñoz-Price S, Poirel L, Bonomo R, Schwaber M, Daikos G, Cormican M, *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infectious Diseases* 2015;13:785–96. doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7.Clinical.
- [113] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews* 2015;28:565–91. doi:10.1128/CMR.00116-14.
- [114] Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *blaKPC* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:1257–63. doi:10.1128/AAC.01451-07.
- [115] Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, *et al.* Emergence of *blaKPC-3-Tn4401a* associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010;65:1608–14. doi:10.1093/jac/dkq174.
- [116] Gómez-Gil MR, Paño-Pardo JR, Romero-Gómez MP, Gasior M, Lorenzo M, Quiles I, *et al.* Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010;65:2695–7. doi:10.1093/jac/dkq352.
- [117] Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijón D, Pintado V, Valverde A, *et al.* Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013;68:2487–92. doi:10.1093/jac/dkt237.
- [118] Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000–2004). *Microbial Drug Resistance* 2006;12:223–30. doi:10.1089/mdr.2006.12.223.
- [119] Zhao W, Hu Z. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiology* 2011;6:317–33. doi:10.2217/fmb.11.13.
- [120] Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Dispersal of carbapenemase *blaVIM-1* gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54:320–7. doi:10.1128/AAC.00783-09.
- [121] Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;50:1558–63. doi:10.1128/JCM.00020-12.
- [122] Tortola MT, Lavilla S, Miro E, JJ G, Larrosa N, M S, *et al.* First Detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:3492–4. doi:10.1128/AAC.49.8.3492.
- [123] Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, *et al.* Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clinical Infectious Diseases* 2007;45:1171–8. doi:10.1086/522288.
- [124] Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59:3406–12. doi:10.1128/AAC.00086-15.
- [125] Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY

- Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:1274–8. doi:10.1128/AAC.01497-10.
- [126] Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos a P, Santos O'Connor F, Giesecke J. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveillance* 2010;15:pii=19716. doi:19716 [pii].
- [127] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 2010;10:597–602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
- [128] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases* 2011;11:355–62. doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7.
- [129] Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum  $\beta$ -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66:689–92. doi:10.1093/jac/dkq520.
- [130] Berrazeg M, Diene SM, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, *et al.* New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using google maps. *Euro Surveillance* 2014;19:pii=20809. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.20.20809.
- [131] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:1791–8. doi:10.3201/eid1710.110655.
- [132] Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*NDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:5403–7. doi:10.1128/AAC.00585-11.
- [133] Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66:2295–7. doi:10.1093/jac/dkr296.
- [134] Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49:718–21. doi:10.1128/JCM.01773-10.
- [135] Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* 2014;20:821–30. doi:10.1111/1469-0691.12719.
- [136] Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan ÖA, Feriha C, Cuzon G, *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54:1369–73. doi:10.1128/AAC.01312-09.
- [137] Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Eurosurveillance* 2013;18:pii=20549. doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.31.20549.
- [138] Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of  $\beta$ -lactam resistance genes. *Journal of Bacteriology* 2006;188:6506–14. doi:10.1128/JB.00375-06.
- [139] Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:2950–4. doi:10.1128/AAC.01672-07.
- [140] Giani T, Conte V, Di Pilato V, Aschbacher R, Weber C, Larcher C, *et al.* *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012;56:2211–3. doi:10.1128/AAC.00035-12.
- [141] Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clinical Microbiology and Infection* 2011;17:E24–6. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03669.x.
- [142] Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012;56:559–62. doi:10.1128/AAC.05289-11.
- [143] Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gómez-Gil R, Mora-

- Rillo M, Romero-Gómez MP, *et al.* Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013;68:89–96. doi:10.1093/jac/dks364.
- [144] Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:6344–7. doi:10.1128/AAC.01513-13.
- [145] Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013;68:317–21. doi:10.1093/jac/dks383.
- [146] Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernandez-Martinez M, *et al.* Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. *Journal of Infection* 2016;72:152–60. doi:S0163-4453(15)00343-6 [pii]v10.1016/j.jinf.2015.10.008.
- [147] Asensio Egea M, Huertas Vaquero MH, Muñoz-cuevas C, Gaitán Pitera J, Herráez Carrera Ó, Alcázar Carmona, Patricia Patiño Ortega D, *et al.* Diseminación monoclonal de *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-15 multirresistente . Impacto de las medidas para controlar el brote. *Official Journal of the Spanish Society of Chemotherapy* 2018;31:237–46.
- [148] Machuca J, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Gracia-Ahufinger I, Ruiz-Carrascoso G, Rodríguez-López F, *et al.* Characterization of an outbreak due to CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* lacking the *bla*OXA-48 gene belonging to clone ST405 in a neonatal unit in southern Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016;71:2353–5. doi:10.1093/jac/dkw137.
- [149] Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero B, Lara N, Aracil B, *et al.* Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016;71:2131–8. doi:10.1093/jac/dkw148.
- [150] Fernández J, Montero I, Fleites A, Rodicio MR. Cluster of *Escherichia coli* isolates producing a plasmid-mediated OXA-48 beta-lactamase in a Spanish hospital in 2012. *Journal of Clinical Microbiology* 2014;52:3414–7. doi:10.1128/JCM.01271-14.
- [151] Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews* 2012;25:682–707. doi:10.1128/CMR.05035-11.
- [152] Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, *et al.* Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2009;30:972–6. doi:10.1086/605922.
- [153] Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:1180–5. doi:10.1086/648451.Risk.
- [154] World Health Organization. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. vol. 61. 2014. doi:10.1007/s13312-014-0374-3.
- [155] Prabaker K, Lin MY, McNally M, Cherabuddi K, Ahmed S, Norris A, *et al.* Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a multihospital study. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2012;33:1193–9. doi:10.1086/668435.
- [156] Endimiani A, DePasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, *et al.* Emergence of *bla*KPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;64:1102–10. doi:10.1093/jac/dkp327.
- [157] Navarro-San Francisco C, Mora-Rillo M, Romero-Gómez MP, Moreno-Ramos F, Rico-Nieto A, Ruiz-Carrascoso G, *et al.* Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a major clinical challenge. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19:E72–9. doi:10.1111/1469-0691.12091.
- [158] Ruiz-Garbajosa P, Hernández-García M, Beatobe L, Tato M, Méndez MI, Grandal M,

- et al.* A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015;71:348–52. doi:10.1093/jac/dkv355.
- [159] ECDC. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. vol. 17. 2012. doi:10.2900/86011.
- [160] Paño Pardo JR, Villar SS, Ramos Ramos JC, Pintado V. Infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2014;32:41–8. doi:10.1016/S0213-005X(14)70173-9.
- [161] Kwak YG, Choi S-H, Choo EJ, Chung J-W, Jeong J-Y, Kim NJ, *et al.* Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among hospitalized patients. *Microbial Drug Resistance* 2005;11:165–9. doi:10.1089/mdr.2005.11.165.
- [162] Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, El-Mniai A, Boussadia Y, Consigny PH, *et al.* Acquisition of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Eurosurveillance* 2014;19:1–4. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20768.
- [163] Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E, *et al.* Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *Journal of Hospital Infection* 2010;74:344–9. doi:10.1016/j.jhin.2009.07.022.
- [164] Swaminathan M, Sharma S, Blash SP, Patel G, Banach DB, Phillips M, *et al.* Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the setting of endemicity. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2013;34:809–17. doi:10.1086/671270.
- [165] Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2017;23:1–11. doi:10.1016/j.jiac.2016.09.008.
- [166] Bou G, Chaves F, Oliver A, Oteo J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. 2015. doi:10.1016/j.eimc.2015.12.013.
- [167] Plan de Prevención y control frente a la infección por EPC en la Comunidad de Madrid. Versión 1. n.d.
- [168] Monstein HJ, Östhlm-Balkhed Å, Nilsson M V., Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in *Enterobacteriaceae*. *Apmis* 2007;115:1400–8. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x.
- [169] Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:154–5. doi:10.1093/jac/dki412.
- [170] Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated in Rome, Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:103–8. doi:10.1128/JCM.01542-07.
- [171] Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-Van Hall MA. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch Hospital. *Emerging Infectious Diseases* 2006;12:807–12. doi:10.3201/eid1205.050910.
- [172] Weill FX, Demartin M, Tandé D, Espié E, Rakotoarivony I, Grimont PAD. SHV-12-like extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:2432–7. doi:10.1128/JCM.42.6.2432-2437.2004.
- [173] Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance* 2004;10:334–40. doi:10.1089/mdr.2004.10.334.
- [174] Poirel L, Walsh TR, Cuveillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011;70:119–23. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
- [175] Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR, Hujer KM, Perez F, *et al.* Presence

- of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *bla*KPC in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:2680–2. doi:10.1128/AAC.00158-08.
- [176] Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen P a, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33:2233–2239. doi:0095-1137/.
- [177] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Patrick a D, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:4178–82. doi:10.1128/JCM.43.8.4178.
- [178] Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* 2006;60:1136–51. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
- [179] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 1988;26:2465–6.
- [180] Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 2005;63:219–28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- [181] Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS ONE* 2015;10:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0123063.
- [182] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing 2012;19:455–77. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- [183] Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29:1072–5. doi:10.1093/bioinformatics/btt086.
- [184] Lanza VF, de Toro M, Garcillán-Barcia MP, Mora A, Blanco J, Coque TM, *et al.* Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS Genetics* 2014;10:e1004766. doi:10.1371/journal.pgen.1004766.
- [185] Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics* 2016;32:3380–7. doi:https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw493.
- [186] Nguyen *et al.* Respond. *American Journal of Public Health* 2015;105:e2. doi:10.2105/AJPH.2015.302827.
- [187] Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research* 2011;39:475–8. doi:10.1093/nar/gkr201.
- [188] Paño-Pardo JR, López Quintana B, Lázaro Perona F, Ruiz Carrascoso G, Romero-Gómez MP, Loeches Yagüe B, *et al.* Community-onset bloodstream and other infections, caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: epidemiological, microbiological, and clinical features. *Open Forum Infectious Diseases* 2016;3:1–7. doi:10.1093/ofid/ofw136.
- [189] Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P. Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Critical Care* 2010;14:R113. doi:10.1186/cc9062.
- [190] Patel G, Bonomo RA. 'Stormy waters ahead': global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology* 2013;4:1–17. doi:10.3389/fmicb.2013.00048.
- [191] Pitout JDD, Laupland KB. *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 2018;8:159–66.
- [192] European Centre for Disease Prevention and Control. Systematic review of the effectiveness of infection control measures to prevent the transmission of extended spectrum *Enterobacteriaceae* through cross-border transfer of patients. 2014. doi:10.2900/850536.
- [193] Rodríguez-Baño J, Navarro M.

- Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection* 2008;14:104–10. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01866.x.
- [194] Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JDD, Quentin C, Calbo ES, *et al.* A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nonhospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* 2009;49:682–90. doi:10.1086/604713.
- [195] Rodríguez-baño J, Navarro MD, Martínez-martínez L, Muniain MA, Perea J, Pérez-cano R, *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1089–94. doi:10.1128/JCM.42.3.1089.
- [196] Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruíz M, Peña C, *et al.* Community-onset bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clinical Infectious Diseases* 2010;50:40–8. doi:10.1086/649537.
- [197] Palmore TN, Henderson DK. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a call for cultural change. *Annals of Internal Medicine* 2014;160:567–70. doi:10.7326/M14-1918.
- [198] Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, *et al.* Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clinical Infectious Diseases* 2011;52:848–55. doi:10.1093/cid/cir025.
- [199] Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, van der Zee A, van Burgh S, de Greeff SC, *et al.* Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Eurosurveillance* 2014;19:1–12. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20723.
- [200] Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, *et al.* Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2010;31:341–7. doi:10.1086/651097.
- [201] Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology* 2012;3:doi:10.3389/fmicb.2012.00110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110.
- [202] Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martínez E, *et al.* First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49:1993–6. doi:10.1128/JCM.00045-11.
- [203] Gómara M, López-Calleja AI, Iglesia BMPV, Cerón IF, López AR, Pinilla MJR. Detection of carbapenemases and other mechanisms of enzymatic resistance to  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* with diminished susceptibility to carbapenems in a tertiary care hospital. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2018;36:296–301. doi:10.1016/j.eimc.2017.07.006.
- [204] Valverde A, Coque TM, García-San Miguel L, Baquero F, Cantón R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61:64–72. doi:10.1093/jac/dkm403.
- [205] Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4398–401. doi:10.1128/AAC.00329-11.
- [206] Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Madrid, Spain: High percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2014;43:460–4. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.01.021.
- [207] Oteo J, Alcaraz R, Bou G, Conejo C, Díaz-lamas AM, Fernández-martínez M, *et al.* Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among patients admitted to ICUs in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015;70:2916–8. doi:10.1093/jac/dkv187.
- [208] Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Ortega A, Zamarrón P, Saez D, *et al.* The spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones

- of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016;71:3392–9. doi:10.1093/jac/dkw321.
- [209] Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalié L, Van der Mee-Marquet N, *et al.* Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clinical Microbiology and Infection* 2014;20:O1121–3. doi:10.1111/1469-0691.12727.
- [210] Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende De Castro R, Bauraing C, Gérard M, *et al.* Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012;39:168–72. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.005.
- [211] Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, *et al.* Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013;68:84–8. doi:10.1093/jac/dks356.
- [212] Melegh S, Kovács K, Gám T, Nyul A, Patkó B, Tóth Á, *et al.* Emergence of VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone in the Clinical Centre University of Pécs, Hungary. *Clinical Microbiology and Infection* 2014;20:2013–5. doi:10.1111/1469-0691.12293.
- [213] Markovska R, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, *et al.* Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Apmis* 2015;123:887–94. doi:10.1111/apm.12433.
- [214] Brañas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana M, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2016;46:111–6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019.
- [215] Arana DM, Saez D, García-Hierro P, Bautista V, Fernández-Romero S, De la Cal M, *et al.* Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clinical Microbiology and Infection* 2015;21:148.e1-148.e4. doi:10.1016/j.cmi.2014.07.008.
- [216] Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais Á, Pérez-Vázquez M, *et al.* Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009;34:173–6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006.
- [217] Schechner V, Kotlovsky T, Tarabeia J, Kazma M, Schwartz D, Navon-Venezia S, *et al.* Predictors of rectal carriage of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) among patients with known CRE carriage at their next hospital encounter. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2011;32:497–503. doi:10.1086/659762.
- [218] Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012;67:1660–5. doi:10.1093/jac/dks124.
- [219] Skalova A, Chudejova K, Rotova V, Medvecky M, Studentova V, Chudackova E, *et al.* Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic and evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017;61:pii: e01889-16. doi:10.1128/AAC.01889-16.
- [220] Göttig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VAJ. *In vivo* horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clinical Infectious Diseases* 2015;60:1808–15. doi:10.1093/cid/civ191.
- [221] Willemsen I, van Esser J, Kluytmans-van den Bergh M, Zhou K, Rossen JW, Verhulst C, *et al.* Retrospective identification of a previously undetected clinical case of OXA-48-producing *K. pneumoniae* and *E. coli*: the importance of adequate detection guidelines. *Infection* 2016;44:107–10. doi:10.1007/s15010-015-0805-7.
- [222] Bonnin RA, Nordmann P, Carattoli A, Poirel L. Comparative genomics of IncL/M-type plasmids: Evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:674–6. doi:10.1128/AAC.01086-12.
- [223] Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* 2013;303:298–304.

doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001.

[224] Farmer JJ, Fanning GR, Huntley-Carter GP, Holmes B, Hickman FW, Richard C, *et al.* *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: Identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1981;13:919–33.

[225] Sarria JC, Vidal AM, Kimbrough III RC. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clinical Infectious Diseases* 2001;33:e69–74. doi:10.1086/322686.

[226] Carter JE, Evans TN. Clinically significant *Kluyvera* infections. *American Journal of Clinical Pathology* 2005;123:334–8. doi:10.1309/61XP4KTLJYW5H35.

[227] Moonah S, Deonaraine K, Freeman C. Multidrug resistant *Kluyvera ascorbata* septicemia in an adult patient: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2010;4:197. doi:10.1186/1752-1947-4-197.

[228] López-Larramona G, Gómez-de-Oña E, Maestre-Muñiz MM, Ruiz-Chicote AM, Galán-Dorado E, González-Delgado L. Bacteriemia por *Kluyvera ascorbata* en un paciente adulto. *Rev Esp Quimioter* 2013;26:226–7.

[229] Fainstein V, Hopfer R, Mills K, Bodey G. Colonization by or diarrhea due to *Kluyvera* species. *The Journal of Infectious Diseases* 1982;145:127.

[230] Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiology Letters* 2012;328:46–53. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02479.x.

[231] Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Asociación Colombiana de Infectología* 2017;22:35–45. doi:10.22354/in.v0i0.703.

[232] Rodriguez MM, Ghiglione B, Power P, Naas T, Gutkind G. Proposing *Kluyvera georgiana* as the origin of the plasmid-mediated resistance gene *fosA4*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2018;956:AAC.00710-18. doi:10.1128/AAC.00710-18.

[233] Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee H, Perkins D. Analysis of the microbiome:

Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;469:895–906. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.083.

[234] Chanawong A, Zali FHM, Heritage J, Xiong J, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13 and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:630–7. doi:10.1128/AAC.46.3.630.

[235] Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*CTX-M genes. *FEMS Microbiology Letters* 2004;234:201–7. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.051.

[236] Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, *et al.* *bla*CTX-M genes in *Escherichia coli* strains from Croatian hospitals are located in new (*bla*CTX M 3a) and widely spread (*bla*CTX-M-13a and *bla*CTX-M-15) genetic structures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:1630–5. doi:10.1128/AAC.01431-08.

[237] Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, Von Baum H, Witte W. A novel IS26 structure surrounds *bla*CTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *Journal of Medical Microbiology* 2010;59:580–7. doi:10.1099/jmm.0.016188-0.

[238] Freney J, Husson MO, Gavini F, Madier S, Martra A, Izard D, *et al.* Susceptibilities to antibiotics and antiseptics of new species of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1988;32:873–6. doi:10.1128/AAC.32.6.873.

[239] Cheng J, Gao W, Yin J, Sun Z, Ye Y, Gao YF, *et al.* Phenotypic and molecular characterization of two novel CTX-M enzymes carried by *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Biology Reports* 2010;37:1261–7. doi:10.1007/s11033-009-9499-1.

[240] Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;64:i3–10. doi:10.1093/jac/dkp256.

[241] Livermore DM, Walsh TR, Toleman MA. Balkan NDM-1: escape or transplant? *The Lancet Infectious Diseases* 2011;11:586. doi:10.1016/S1473-3099(11)70202-X.

[242] Solé M, Pitart C, Roca I, Fàbrega A, Salvador P, Muñoz L, *et al.* First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1

- carbapenemase in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4402–4. doi:10.1128/AAC.00642-11.
- [243] Oteo J, Domingo-García D, Fernández-Romero S, Saez D, Guiu A, Cuevas O, *et al.* Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Journal of Medical Microbiology* 2012;61:864–7. doi:10.1099/jmm.0.043190-0.
- [244] Gil-Romero Y, Sanz-Rodríguez N, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. Nueva descripción en España de un portador de *Klebsiella pneumoniae* productora de una carbapenemasa NDM-1. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2013;31:418–9. doi:10.1016/j.eimc.2012.10.009.
- [245] Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blanco V, Mingorance J, Gómez-Gil R, *et al.* Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2015;46:169–73. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.001.
- [246] European Centre for Disease Prevention and Control. Systematic review of the effectiveness of infection control measures to prevent the transmission of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* through cross-border transfer of patients. 2014. doi:doi 10.2900/418192.
- [247] Novovic K, Filipic B, Veljovic K, Begovic J, Mirkovic N, Jovicic B. Environmental waters and *bla*NDM-1 in Belgrade, Serbia: endemicity questioned. *Science of the Total Environment* 2015;511:393–8. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.072.
- [248] Rathinasabapathi P, Hiremath DS, Arunraj R, Parani M. Molecular detection of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) positive bacteria from environmental and drinking water samples by loop mediated isothermal amplification of *bla*NDM-1. *Indian Journal of Microbiology* 2015;55:400–5. doi:10.1007/s12088-015-0540-x.
- [249] Islam MA, Islam M, Hasan R, Hossain MI, Nabi A, Rahman M, *et al.* Environmental spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing multidrug-resistant bacteria in Dhaka, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology* 2017;83:e00793-17.
- [250] Wailan AM, Sartor AL, Zowawi HM, Perry JD, Paterson DL, Sidjabat HE. Genetic contexts of *bla*NDM-1 in patients carrying multiple NDM-producing strains 2015;59:7405–10. doi:10.1128/AAC.01319-15.Address.
- [251] Bonnin R.A, Poirel L, Carattoli A, Nordmann P. Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLoS ONE* 2012;7:e34752. doi:10.1371/journal.pone.0034752.
- [252] Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, Ang I, *et al.* Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS ONE* 2011;6:e17989. doi:10.1371/journal.pone.0017989.



---

## **ANEXO**

---



# Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones

Marta Hernández-García<sup>1,2</sup>, Blanca Pérez-Viso<sup>1,2</sup>, M. Carmen Turrientes<sup>1,3</sup>, Cristina Díaz-Agero<sup>4</sup>, Nieves López-Fresneña<sup>4</sup>, Marc Bonten<sup>5</sup>, Surbhi Malhotra-Kumar<sup>6</sup>, Patricia Ruiz-Garbajosa<sup>1,2</sup> and Rafael Cantón <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; <sup>2</sup>Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain; <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; <sup>5</sup>University of Antwerp (UAntwerp), Antwerp, Belgium; <sup>6</sup>University Medical Center Utrecht (UMC Utrecht), Utrecht, The Netherlands

\*Corresponding author. Tel: +34-913368832; E-mail: rafael.canton@salud.madrid.org  <http://orcid.org/0000-0003-1675-3173>

Received 24 February 2018; returned 16 April 2018; revised 23 May 2018; accepted 22 June 2018

**Objectives:** To describe the incidence and microbiological features of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) from colonized patients in a Spanish university hospital during a cluster-randomized study [the Resistance of Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies (R-GNOSIS) project] on isolation strategies for faecal ESBL carriers.

**Methods:** From March 2014 to March 2016, 15 556 rectal swabs from 8209 patients admitted in two surgical wards and two medical wards were collected and seeded on ESBL and CPE chromogenic agars. Carbapenemase characterization (PCR and sequencing) was performed, and antibiotic susceptibility (MIC), clonality (PFGE and MLST) and diversity (Simpson diversity index estimation) were determined.

**Results:** One hundred and ninety-eight CPE isolates, mainly *Klebsiella pneumoniae* (53.5%) and *Escherichia coli* (19.2%), were identified in 162 patients (2%). Prevalence of CPE carriage remained unchanged over time. Overall, amikacin (9.6%), tigecycline (9.6%) and colistin (0.5%) showed low non-susceptibility. The most frequent carbapenemase was OXA-48 (64.1%), followed by VIM-1 (26.8%), NDM-1 (5.3%) and KPC-3 (3.5%), and these were co-produced with ESBLs in 43.9%. OXA-48 plus CTX-M-15 was the most frequent association. Two major *K. pneumoniae* clones were identified (OXA-48-CTX-M-15-ST11 and VIM-1-SHV-12-ST54) with considerable genetic diversity among the remaining isolates, including OXA-48-*E. coli*. Species diversity tended to decrease from 0.75 in the first 6 months of the study to 0.43 in the final months. The emergence of new clones (i.e. OXA-48-*Kluyvera* spp. and NDM-1-*K. pneumoniae* ST437 and ST101) and displacement of other particular clones were also demonstrated.

**Conclusions:** We describe a polyclonal and changeable CPE population over time. Coexistence of worldwide disseminated clones, such as ST11-OXA-48-*K. pneumoniae*, with unrelated and emerging OXA-48-*E. coli* clones, depicts a disturbing CPE epidemiology in our institution.

## Introduction

The emergence and dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) have been described worldwide. Carbapenemase genes are often contained on mobile genetic elements that facilitate transfer among different Enterobacteriaceae species. Carbapenemase production is normally linked to

successful MDR clones commonly associated with healthcare-related infections and increased morbidity and mortality.<sup>1,2</sup>

Until 2009, CPE prevalence in Spain was relatively low and normally related to VIM-1 and KPC enzymes.<sup>3-5</sup> Recently, CPE prevalence significantly increased owing to the dissemination of successful *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring *bla*<sub>OXA-48</sub>, mainly linked to healthcare exposure and prolonged hospital stay.<sup>6-8</sup>