

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología
molecular y alternativas terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Irene Pena Viña

Directoras

**Iciar Rodríguez-Avial Infante
Carmen Rodríguez-Avial López Dóriga**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE
CARBAPENEMASAS: TIPOS, EPIDEMIOLOGÍA
MOLECULAR Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS**

IRENE PENA VIÑA

Tesis Doctoral

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



Iciar Rodríguez-Avial Infante, Doctora del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y Carmen Rodríguez-Avial López-Doriga, Profesora del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado: **Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas**, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Doña Irene Pena Viña en el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y, estimando que se encuentra finalizada y en condiciones para optar al grado de Doctor por la UCM, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Dra. Iciar Rodríguez-Avial Infante

Dra. Carmen Rodríguez-Avial López-Doriga

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Juan J. Picazo el haberme acogido en su servicio y el haberme dado la oportunidad de poder realizar mi tesis doctoral.

A mi directora de tesis, la Dra. Iciar Rodríguez-Avial, por haber confiado en mí, por transmitirme su entusiasmo por la investigación y, sobre todo, por el cariño y la dedicación con el que ha dirigido este trabajo.

A la Dra. Carmen Rodríguez-Avial por su apoyo y guía en la codirección de este trabajo.

A la Dra. Esther Culebras, por su constante disponibilidad para ayudarme, por enseñarme a utilizar el MALDI-TOF, así como por sus consejos y sugerencias.

A la Dra. Esther Ríos por echarme una mano y animarme a terminar este proyecto.

Al Dr. Luis Martínez, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecilla, por haberme recibido en su laboratorio y haber puesto a mi disposición todos sus recursos. A su equipo por haberme hecho sentir como en casa, y, en especial al Dr. Jorge Calvo, por compartir conmigo su gran conocimiento sobre mecanismos de resistencia.

A todas las personas que forman parte del Servicio de Microbiología del HCSC, por su apoyo, por compartir conmigo su experiencia y contribuir a que guarde un buen recuerdo de cada uno de ellos.

A Isabel y Belén, mis grandes apoyos morales en todo.

A mis padres y hermanos por sus palabras de ánimo para conseguir todo lo que me propongo.

Y por último, pero no menos importante, a Sergio, por tener tanta paciencia conmigo, por apoyarme y por creer en mí.

A Sergio

ÍNDICE

SUMMARY.....	15
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN.....	25
1. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE	27
1.1 IMPORTANCIA NOSOCOMIAL DE LAS ENTEROBACTERIAS	28
2. ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	29
2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA	30
2.2 MECANISMO DE ACCIÓN	31
2.3 CLASIFICACIÓN Y ESPECTRO ANTIBACTERIANO	31
2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA.....	33
3. β-LACTAMASAS	33
3.1 CLASIFICACIÓN.....	34
3.2 CARBAPENEMASAS.....	37
3.2.1 CLASE A	38
3.2.2 CLASE B O MBL	39
3.2.3 CLASE D U OXACILINASAS	40
3.3 OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS CARBAPENÉMICOS.....	41
4. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS	
(EPC)	41
4.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	41
4.1.1 MUNDIAL	41
4.1.2 EUROPEA.....	44
4.1.3 ESPAÑOLA	46
4.2 ESTRATEGIA PARA LA DETECCIÓN DE EPC	47
4.2.1 <i>SCREENING</i> DE EPC	47
4.2.2 CONFIRMACIÓN DE EPC.....	49
□ MÉTODOS FENOTÍPICOS	49
□ MÉTODOS MOLECULARES	50
4.3 TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR EPC	51
4.4 PREVENCIÓN	52

OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. AISLADOS CLÍNICOS	61
2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	62
2.1 TEST DE HODGE MODIFICADO (THM)	62
2.2 TEST DE SINERGIA CON EDTA	63
2.3 TEST DE SINERGIA CON PBA Y CON CLOXACILINA.....	63
3. MÉTODOS MOLECULARES	64
3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN	64
3.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA CARBAPENEMASAS.....	64
3.3 AMPLIFICACIÓN DEL INTEGRÓN CLASE I.....	66
3.4 DETECCIÓN DE LOS AMPLIFICADOS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	68
3.5 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	68
4. ESTUDIOS DE CLONALIDAD	70
4.1 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE).....	70
4.2 TIPIFICACIÓN MULTILOCUS DE SECUENCIA (MLST)	73
5. MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.....	76
5.1 MÉTODO DEL ÉPSILON-TEST (E-TEST)	76
5.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR.....	76
5.3 CURVAS DE LETALIDAD	79
5.4 TÉCNICA DEL TABLERO DE AJEDREZ (<i>CHECKERBOARD</i>).....	82
6. VALORACIÓN DE OTROS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS	85
6.1 TEST BIOQUÍMICO CARBA NP TEST II (CNP).....	85
6.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.....	86
RESULTADOS	89
1. AISLADOS CLÍNICOS	91
2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	93
2.1 TEST DE HODGE MODIFICADO.....	93

2.2 TEST DE SINERGIA CON EDTA Y TEST DE SINERGIA CON PBA Y CON CLOXACILINA	94
3. MÉTODOS MOLECULARES	95
3.1 GENES QUE CODIFICAN PARA CARBAPENEMASAS	95
3.2 CARACTERIZACIÓN DEL INTEGRON CLASE I	98
4. ESTUDIOS DE CLONALIDAD	99
4.1 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO	99
4.2 TIPIFICACIÓN MULTILOCUS DE SECUENCIA	102
5. MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.....	105
5.1 ANTIMICROBIANOS β -LACTÁMICOS	105
5.1.1 DIFERENCIAS EN LOS PUNTOS DE CORTE PROPUESTOS POR EL CLSI Y POR EL EUCAST PARA LOS CARBAPENÉMICOS	108
5.2 ANTIMICROBIANOS NO β -LACTÁMICOS	109
5.2.1 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS NO β -LACTÁMICOS DE LOS AISLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> DE CADA ST	115
5.3 ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE PLAZOMICINA.....	119
5.3.1 ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LAS COMBINACIONES DE PLAZOMICINA CON 4 ANTIMICROBIANOS.....	121
□ TABLERO DE AJEDREZ	121
□ CURVAS DE LETALIDAD	126
6. VALORACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS	135
6.1 TEST BIOQUÍMICO CARBA NP TEST II	135
6.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.....	137
DISCUSIÓN.....	145
CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFÍA	169
ANEXO.....	191

SUMMARY

Carbapenems are the most broad-spectrum β -lactam antibiotics active against Gram-positive, Gram-negative and anaerobe microorganisms. These agents retain activity against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) or plasmid-mediated AmpC-producing organisms of the *Enterobacteriaceae* family. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* is mediated predominantly by the production of different types of carbapenemases (classes A, B and D), although this resistance can also be due to AmpC overexpression or ESBL enzymes combined with porin loss.

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are usually resistant to other antibiotic classes as quinolones or aminoglycosides. Tigecycline or colistin are often the only agents available.

Currently, CPE are scattered around the world, constituting a major public health problem. To control the spread of these microorganisms is necessary: a rapid identification, a correct treatment and appropriate measures isolation.

The objectives of this study were to characterize carbapenemase genes, clonal relatedness and antimicrobial susceptibility data of CPE isolated over 2 years in our institution. In addition, we analyzed the *in vitro* activity of plazomicin against these isolates and we evaluated other phenotypic detection of CPE techniques such as Carba NP test and MALDI-TOF mass spectrometry.

In this study, 123 CPE were identified *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *E. asburiae* and *E. aerogenes* were the involved species. *K. pneumoniae* was the most isolated specie. VIM-1 was the most common carbapenemase followed by KPC-2, OXA-48 and IMP-22.

Clonal diversity was identified among different species. Among the *K. pneumoniae* isolates, ten sequence types (STs) were identified but two clones were dominant: ST11 containing mainly VIM-1-producing isolates and ST101 constituted by KPC-2-producing strains.

Meropenem was the most active carbapenem. All isolates were resistant to imipenem. Breakpoints for carbapenems proposed by the CLSI were more sensitive in detecting CPE than those proposed by the EUCAST. Meropenem was the carbapenem that presented major discrepancies.

These isolates were often resistant to non β -lactam antibiotics studied. Amikacin and fosfomicin were the most active agents. We must mention the high resistance to tigecycline among *K. pneumoniae* isolates and colistin among *Enterobacter* spp. isolates. Percentage of resistance to aminoglycosides was higher among KPC-2-producing isolates than among VIM-1-producing isolates. Among *K. pneumoniae* strains, the highest rates of resistance to colistin and fosfomicin were detected in isolates VIM-1-producers .

Plazomicin showed a good *in vitro* activity. Overall, 99% of isolates presented plazomicin MICs ≤ 2 mg/l, with MIC₅₀ and MIC₉₀ of 0,25 y 1 mg/l, respectively. The highest MIC values were detected among *S. marcescens* isolates (4 mg/l). Plazomicin-fosfomicin and plazomicin-colistin were the most synergistic combinations. Plazomicin-tigecycline was the less effective combination. No antagonist interactions were detected with plazomicin and the evaluated antibiotics

Carba NP test and MALDI-TOF were a good option for detection carbapenemase activity.

ABREVIATURAS

A	Adenina
A/C	Amoxicilina/ ácido clavulánico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>bla</i>	β -lactamasa
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
C	Citosina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI₅₀	Concentración mínima inhibitoria capaz de inhibir al 50% de la población bacteriana
CMI₉₀	Concentración mínima inhibitoria capaz de inhibir al 90% de la población bacteriana
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C_{ss}	<i>Steady-state concentration</i> (Concentración en estado estacionario)
Da	Dalton
EARS-Net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPC	Enterobacterias productoras de carbapenemasa
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FIC	Concentración inhibitoria fraccionada
G	Guanina
GES	<i>Guiana extended spectrum</i>
GIM	<i>German imipenemase</i>
HCl	Ácido clorhídrico
HCSC	Hospital Clínico San Carlos
I	Intermedio
IMI	<i>Imipenem-hydrolyzing β-lactamase</i>

IMP	<i>Active on imipenem</i>
IN	Infecciones nosocomiales
ITU	Infección del tracto urinario
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
M	Molar
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization</i> (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz)
MBL	Metalo-β-lactamasa
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MH	<i>Mueller Hinton</i>
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NaCl	Cloruro de sodio
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
ng	Nanogramo
NMC	<i>Not metalloenzyme carbapenemase</i>
Omp	<i>Outer membrane protein</i> (Proteína externa de membrana)
OXA	<i>Oxacillin-hydrolyzing</i>
pb	Pares de bases
PBA	Ácido fenilborónico
PBP	<i>Penicillin binding proteins</i> (Proteínas de unión a la penicilina)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en campo pulsado)
P/T	Piperacilina/tazobactam
R	Resistente

rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
S	Sensible
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
SME	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
SLV	<i>Single-locus variant</i> (Variante de un único locus)
spp	Especie
SS	Suero salino
ST	<i>Sequence type</i> (Secuenciotipo)
T	Timina
T^a	Temperatura
THM	Test de Hodge modificado
TOF	<i>Time Of Flight</i> (Tiempo de vuelo)
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonias
μg	Microgramo
μl	Microlitro
VIM	<i>Verona integron-encoded metallo-β-lactamase</i>

INTRODUCCIÓN

1. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

La familia *Enterobacteriaceae* forma el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica. Esta familia se engloba dentro del dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria y orden Enterobacteriales. Se han descrito 47 géneros y a todo un conjunto de enterobacterias no clasificadas (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy), aunque menos de 20 especies son las responsables del 95% de las infecciones ¹.

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, ya que se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como también formando parte de la microbiota del tracto intestinal del ser humano y de los animales ¹. Su ubiquidad y su frecuente adquisición de elementos genéticos móviles demuestran que sus hospedadores están expuestos regularmente a nuevas cepas con nuevo material genético (incluyendo resistencia antibiótica) a través del agua, los alimentos, los animales o de fuentes inanimadas en la comunidad, en el hospital o en un viaje ².

Producen infecciones oportunistas cuando existen factores predisponentes, excepto los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* y ciertas especies de *Escherichia coli* y *Klebsiella rhinoscleromatis*, que se consideran patógenos primarios porque siempre están asociados a enfermedad. Las especies de esta familia que causan infecciones oportunistas en el hombre con más frecuencia son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* y *Morganella morganii* entre otras. Las principales infecciones en las que están implicadas son las del tracto urinario y

respiratorio y en las infecciones de heridas, aunque se pueden aislar en cualquier otra muestra ¹.

1.1 IMPORTANCIA NOSOCOMIAL DE LAS ENTEROBACTERIAS

Las infecciones nosocomiales (IN) se pueden definir como infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital, que no estaban presentes ni en el período de incubación ni en el momento del ingreso del paciente. Las IN ocasionan una elevada mortalidad, prolongan la estancia hospitalaria y aumentan los costes asistenciales.

Según el National Healthcare Safety Network (NHSN), programa de referencia de vigilancia de las IN en Estados Unidos, aproximadamente el 43% de los microorganismos gramnegativos están implicados en las IN ³. De estos, las enterobacterias representan el 75%. Las especies más prevalentes son *E. coli* y *Klebsiella* spp. (figura 1), aunque la frecuencia relativa de los diferentes microorganismos puede variar en función del foco de infección.

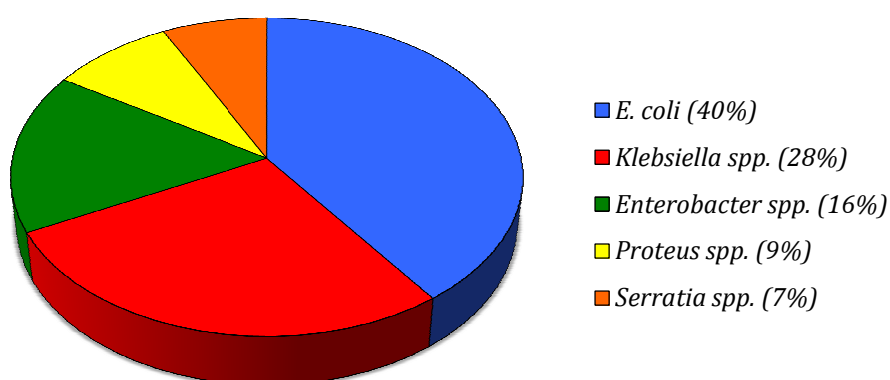


Figura 1. Distribución de los géneros de enterobacterias aislados en infecciones nosocomiales.

K. pneumoniae es un microorganismo que está muy adaptado al ambiente hospitalario, pudiendo sobrevivir mucho tiempo en las manos del personal sanitario y en el ambiente gracias a su cápsula hidrófila, que le permite resistir a la desecación en el medio y sobrevivir en la piel; además dicha cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis y de los diversos factores bactericidas del huésped ⁴.

Los humanos podemos ser portadores de *K. pneumoniae* durante muchos años, con el riesgo de adquirir infecciones por esta bacteria y de diseminarla en cualquier lugar. Se ha demostrado que los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* tienen de dos a cuatro veces más infecciones asociadas a cuidados sanitarios que los no colonizados ⁵.

Por otro lado, a pesar de no tener una gran resistencia intrínseca a los antimicrobianos, *K. pneumoniae* puede adquirir gran cantidad de plásmidos con genes de resistencia. En los últimos años, existe un claro aumento en la prevalencia de *K. pneumoniae* resistente a múltiples antimicrobianos, la cual hace que el tratamiento antimicrobiano de las infecciones sea muy complicado.

2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

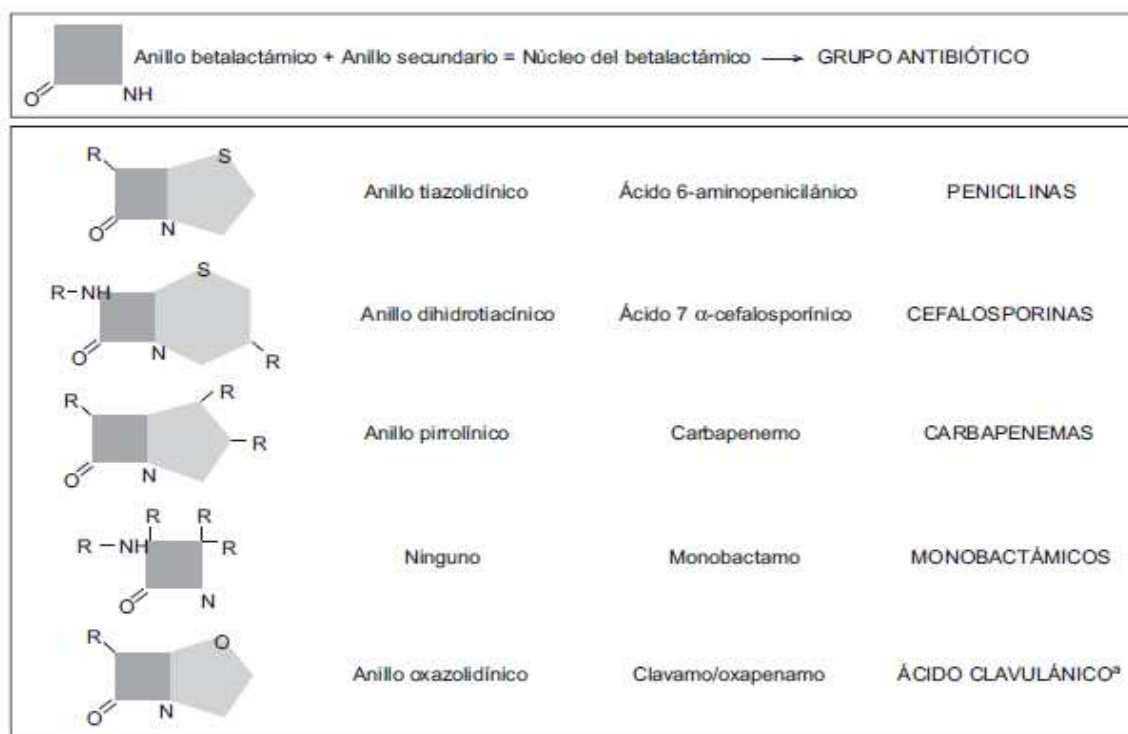
Los antibióticos β -lactámicos constituyen uno de los grupos más importantes dentro de la terapéutica antiinfecciosa. Actualmente, son los antimicrobianos más prescritos porque son el tratamiento de elección en numerosas infecciones.

El descubrimiento de este amplio grupo de antimicrobianos se debe a Fleming, quien en 1928 denominó penicilina a la sustancia producida por un hongo, *Penicillium notatum*, que provocaba la lisis de distintas especies de *Staphylococcus* spp. A finales de la década de 1940, la penicilina G estaba disponible para su uso general en EEUU, lo

que marca el inicio de la era antibiótica moderna. A partir de entonces fueron desarrolladas diversas moléculas semisintéticas con un mayor espectro antibacteriano.

2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Todos los fármacos pertenecientes a este gran grupo presentan en su estructura química el anillo β -lactámico, responsable del mecanismo de acción, de la escasa toxicidad directa y del principal mecanismo de resistencia (β -lactamasas). A este anillo β -lactámico se encuentra unido un anillo secundario, que es diferente en cada grupo de β -lactámicos, formando ambos un núcleo (figura 2). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales a este núcleo unido a pequeñas alteraciones en la estructura química determina las diferencias en cuanto al espectro antibacteriano, a las propiedades farmacocinéticas y a la resistencia a las β -lactamasas ⁶.



^aTodos los inhibidores de las beta-lactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura beta-lactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 2. Estructura química de las diferentes clases de β -lactámicos ⁶.

2.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos ⁷:

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana.** Inhiben la última etapa de biosíntesis del peptidoglucano: la formación de las uniones cruzadas (transpeptidación). Las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas que participan en esta etapa son también capaces de unirse covalentemente a las penicilinas y a otros antibióticos β -lactámicos. De ahí que se denominen proteínas de unión a la penicilina (PBP) ⁸. Para que actúen los β -lactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular.
- **Activación de una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano.** Las cepas que carecen de autolisina inhiben su crecimiento en presencia de β -lactámico, pero no se destruyen completamente.

2.3 CLASIFICACIÓN Y ESPECTRO ANTIBACTERIANO

La clasificación de los antibióticos β -lactámicos así como su espectro antibacteriano se muestra en la tabla 1.

En general, el espectro de los β -lactámicos incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas (porque carecen de pared celular) ni sobre bacterias intracelulares como las clamidias o las rickettsias, ya que tienen escasa capacidad de penetración dentro de las células. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de β -lactamasas, probablemente unida a una penetración lenta debida a las características de la pared ⁶.

Tabla 1. Principales antibióticos β -lactámicos.

CLASE	β -LACTÁMICO
PENICILINAS	<p>Sensibles a las β-lactamasas:</p> <p>Espectro reducido: penicilina G, penicilina V.</p> <p>Activas frente a enterobacterias (aminopenicilinas): ampicilina, amoxicilina.</p> <p>Activas frente a enterobacterias y <i>Pseudomonas</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina. ▪ Acilureidopenicilinas: azlocilina, mezlocilina, piperacilina. <p>Resistentes a las β-lactamasas:</p> <p>Antiestafilocócicas: cloxacilina, oxacilina, meticilina.</p>
	<p>Primera generación: cefazolina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cefadroxilo, cefalexina, cefradina.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Muestran una actividad centrada sobre todo en las bacterias grampositivas. <p>Segunda generación: cefamandol, cefonicid, cefuroxima, cefaclor, cefprozilo, cefamicinas (cefoxitina, cefotetan).</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Son activas frente a bacilos gramnegativos como <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i> y algunas enterobacterias. Mantiene cierta actividad frente a los cocos grampositivos.
	<p>Tercera generación: cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, moxalactam, cefdinir, cefditoreno, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Son muy activas frente a estreptococos y a bacilos gramnegativos pero la actividad frente a los cocos gram positivos está reducida. <p>Cuarta generación: cefepima, cefpiroma.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tienen el mayor espectro de actividad de todos los grupos de cefalosporinas.. <p>Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, <i>Listeria monocytogenes</i> y estafilococos resistentes a meticilina.</p>
	<p>Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tienen el espectro antibacteriano más amplio de la clase de los β-lactámicos, sobre todo porque son estables frente a las β-lactamasas. Carecen de actividad frente a estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a ampicilina y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>.
CARBAPENÉMICOS	<p>Aztreonam.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Es el único monobactámico disponible para uso clínico. Posee una excelente actividad sobre bacterias gram negativas aerobias. Carece de actividad frente a gram positivos y anaerobias.
MONOBACTÁMICOS	<p>Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inactivan las β-lactamasas , evitando que se fijan a los β-lactámicos y los destruyan.
INHIBIDORES DE β-LACTAMASAS	

2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los β -lactámicos básicamente mediante 3 mecanismos diferentes ⁹ que, en ocasiones, pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a otras familias de antibióticos ¹⁰:

- **Destrucción del antibiótico mediante β -lactamasas.** Es lo más frecuente. Estas enzimas reaccionan de forma covalente con el anillo β -lactámico, lo hidrolizan con rapidez e inactivan al fármaco.
- **Incapacidad para penetrar en el lugar de acción debido a las porinas o a las bombas de expulsión.** La ausencia o delección de porinas evitan que el antibiótico atraviese la membrana externa de los microorganismos gramnegativos para alcanzar la PBP mientras que las bombas lo expulsan a través de la misma.
- **Modificación de la diana en las PBPs.** Diferentes alteraciones (mutaciones, hiperexpresión, modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión del β -lactámico a la proteína, lo que disminuye su actividad.

3. β -LACTAMASAS

En el caso de las enterobacterias, la producción de β -lactamasas es el mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos más importante por su frecuencia y eficacia. Se cree que las β -lactamasas son fruto de una evolución de las PBP, ya que comparten un alto grado de homología con ellas ¹¹. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos.

3.1 CLASIFICACIÓN

En 1980 Ambler clasifica a las β -lactamasas en cuatro clases en función de su estructura molecular: A, B, C y D ¹². Las enzimas de los grupos A, C y D son serin- β -lactamasas, que contienen una serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo- β -lactamasas (MBL), dependientes de Zn^{+2} . En 1988, Bush propone una clasificación en la que relaciona el tipo de sustrato, la capacidad inhibitoria y la estructura molecular de las enzimas ¹³. Esta clasificación, se revisó en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros ¹⁴ y se actualizó por Bush y Jacoby en el año 2010 ¹⁵. Tanto la clasificación de Bush-Jacoby como la de Ambler están relacionadas y son las que se utilizan en la actualidad (tabla 2):

- **Grupo 1.** Las β -lactamasas de este grupo se corresponden con la clase molecular C de Ambler. Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico. La mayoría de ellas son cromosómicas y se encuentran en *P.aeruginosa* y en algunas especies de enterobacterias. También pertenecen a este grupo enzimas codificadas en plásmidos, cuyo perfil de resistencia es indistinguible de las otras.
- **Grupo 2.** En este grupo se incluye un gran número de enzimas que son sensibles a la acción de los inhibidores de β -lactamasas y que se relaciona con las clases A (la mayor parte) y D de Ambler. En su mayoría son plasmídicas. Existen 12 subgrupos en función de los sustratos que hidrolizan.
- **Grupo 3.** Incluye enzimas de la clase molecular B de Ambler. Son MBL que requieren para actuar de la unión de Zn^{+2} a su centro activo y que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero que no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam. Son capaces de hidrolizar diferentes tipos de sustratos. En su mayoría son cromosómicas.

- **Grupo 4** (incluido en la clasificación inicial, no aparece en la actualización del año 2010). Este grupo engloba las penicilinasas que no se inhiben por el ácido clavulánico. Todas ellas están codificadas en el cromosoma y sin clasificación, según los criterios de Ambler. Estas enzimas podrían ser clasificadas en los grupos anteriores pero hasta el momento no están completamente caracterizadas.

Tabla 2. Distribución de las β -lactamasas de acuerdo a su funcionalidad ¹⁵.

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler (1980)	Sustrato preferencial	Inhibidos por:		Características	Beta-lactamasas representativas
				CLAV o TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamicinas	AmpC, P99, AACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis elevada de ceftazidima y de otros oximino-beta-lactámicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sí	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas 1ª generación	Sí	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	Sí	No	Hidrólisis elevada de oximino-beta-lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	No	No	Hidrólisis elevada de oximino-beta-lactámicos y resistencia a clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbencilina	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbencilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbencilina, cefepima	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbencilina, cefepima, y cefpiroma	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas 1ª-4ª generación	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oximino-beta-lactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación	Sí	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis elevada de carbapenemas, oximino-beta-lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (subgrupo B1 y B3)	Carbapenemas	No	Sí	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenemas pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (subgrupo B2)	Carbapenemas	No	Sí	Hidrólisis de carbapenemas	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconocido	Penicilinas	No	Desconocido	Desconocidas	Penicilinas

3.2 CARBAPENEMASAS

Las carbapenemasas fueron conocidas desde la introducción del imipenem en 1980 en *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*¹⁶. Desde su descubrimiento en bacterias de interés clínico en Japón en los años 90, las carbapenemasas han ido aumentando en interés, no sólo por su significado clínico sino también por el estudio de la relación estructura/función¹⁷.

En 1988, las carbapenemasas fueron incluidas por primera vez en la clasificación funcional propuesta por Bush, en los grupos 2df, 2f y 3¹³. Según la clasificación molecular de Ambler, estas enzimas se agrupan en tres clases: clase A (penicilinasas), clase B (metaloenzimas) y clase D (oxacilinasas). Con el tiempo, se fueron proponiendo distintas subclasificaciones para las MBL^{14,18-22}. Actualmente, las MBL se dividen en tres subclases (B1, B2, B3) basadas en la combinación de características estructurales, la afinidad del zinc para los dos sitios de unión y el perfil de hidrólisis¹⁸. Casi todas las MBL adquiridas pertenecen a la subclase B1, lo que indica una mayor propensión de los miembros de esta subclase a ser capturados y diseminados con elementos genéticos móviles²³.

Las carbapenemasas representan la familia de β -lactamasas más versátil, con un amplio espectro. Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los β -lactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de los β -lactámicos²⁴⁻²⁶. Algunos investigadores han preferido la nomenclatura de “enzimas que hidrolizan carbapenémicos” al término “carbapenemasas”, sugiriendo que los carbapenémicos son sólo una parte de sus sustratos²².

Hasta la década de los 90, todas las carbapenemasas fueron descritas como específicas de especie, codificadas en cromosomas, con una serie de características bien definidas ²⁷. Sin embargo, el patrón de diseminación de estas enzimas ha cambiado a partir del descubrimiento de las carbapenemasas IMP-1 , ARI-1 (OXA-23) y KPC-1 codificadas en plásmidos ²⁸⁻³¹. Lo que una vez fue considerado un problema de expansión clonal de especies ahora es un problema global de dispersión entre especies.

Las carbapenemasas han sido principalmente aisladas en la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Dentro de las enterobacterias, estas enzimas se aíslan principalmente en *K. pneumoniae* y en menor medida en *E. coli* y otras especies, con una prevalencia más alta en el sur de Europa y Asia que en otras partes del mundo ³².

3.2.1 CLASE A

Las carbapenemasas de la clase A, que pertenecen al grupo 2f de Bush-Jacoby ¹⁴, se pueden dividir en 5 grupos en base a su filogenética: GES, KPC, SME, IMI y NMC-A ^{27,33,34}. Las enzimas SME, NMC e IMI están codificadas en cromosomas mientras que las enzimas GES y KPC se encuentran codificadas en plásmidos. El gen *bla*_{KPC} está asociado el transposón Tn4401 ^{35,36}. Clínicamente, el grupo que más interés tiene es el de las enzimas KPC. Existen 11 tipos descritos.

El mecanismo hidrolítico de estas enzimas requiere en su sitio activo una serina en la posición 70 ³⁷. Todas tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos) y todas son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam ²⁷. Las oximino-cefalosporinas son débiles sustratos, por lo que las carbapenemasas de la clase A no confieren resistencia a las mismas.

3.2.2 CLASE B O MBL

Las MBL son las carbapenemasas con más diversidad a nivel molecular y con más impacto en la clínica. Pertenecen al grupo 3 de Bush-Jacoby. Las primeras MBL detectadas y estudiadas fueron enzimas cromosómicas presentes en las bacterias ambientales y oportunistas *B. cereus*, *Aeromonas* spp. y *S. maltophilia*³⁸⁻⁴¹. En contraste a las MBL cromosómicas, cuya presencia está directamente relacionada con la prevalencia de las especies que la producen, ha surgido un incremento en la detección y expansión de las MBL adquiridas y transferibles. Existen al menos 9 tipos de MBL adquiridas²³, aunque las más comunes se incluyen en las familias VIM (con 25 tipos descritos), IMP, GIM, SIM y NDM²⁷. Tanto si los genes que codifican las MBL están localizados en el cromosoma como en plásmidos, estos se encuentran formando parte de genes *cassette* en integrones de la clase 1 o son movilizados mediante elementos de inserción ISCR^{16,42}. Recientemente se ha descubierto que ciertos genes *bla*_{VIM} se encuentran localizados en transposones⁴³.

El sitio activo de estas enzimas contiene un ión (o iones) de Zn^{+2} , en lugar de serina como en las enzimas de la clase A y D, esencial para el ataque nucleofílico del anillo β -lactámico. Las MBL pueden hidrolizar todos los β -lactámicos excepto el aztreonam. Esto es debido principalmente al hecho de que las MBL se unen a los monobactámicos con una afinidad muy baja⁴⁴. Además, experimentos de acoplamiento indican que la posición de este antibiótico en el sitio activo no favorece su hidrólisis⁴⁵. No son inhibidas por el ácido clavulánico ni por el tazobactam, pero sí por agentes quelantes como el EDTA²⁷. Al igual que las cepas productoras de KPC, las cepas con MBL también producen otras β -lactamasas. Por ello, aunque las MBL no son capaces de hidrolizar el aztreonam, a menudo se identifican enzimas BLEE que si son capaces de hidrolizarlo⁴⁶.

3.2.3 CLASE D U OXACILINASAS

Las carbapenemasas de la clase D pertenecen al grupo 2df de Bush-Jacoby. Se pueden dividir en varios grupos según la homología de la secuencia: OXA-23 (que incluye a OXA-27 y OXA-49), OXA-24 (que incluye OXA-25, OXA-26 y OXA-40), OXA-48 (que incluye OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232), OXA-58, OXA-72 y OXA-143 ^{26,27,34,47-52}. Los genes de las enzimas OXA pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos. Los plásmidos que contienen los genes *bla*_{OXA-48} están relacionados con las secuencias de inserción IS1999, una IS4 responsable en la movilización y expresión de los genes de resistencia a β -lactámicos ⁵³.

La inmensa mayoría de las OXA que exhiben actividad carbapenemasas se encuentran en especies de *Acinetobacter* spp., aunque está incrementando el número de las mismas en enterobacterias, en particular en *K. pneumoniae* ^{26,54,55}. La expansión de *Acinetobacter* spp. con carbapenemasa parece ser debida a varios clones, mientras que la de las enterobacterias es debida a la transmisión de plásmidos entre las cepas ⁵⁶⁻⁵⁸.

El nivel de actividad hidrolítica exhibida por las carbapenemasas OXA es bastante débil comparada con la de las MBL; las cepas que albergan estas enzimas pueden requerir mecanismos adicionales de resistencia para que las CMIs de imipenem y meropenem estén por encima de los puntos de corte. Esto, junto al hecho de que a menudo son susceptibles a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos, hace que las cepas productoras de estas enzimas sean difíciles de identificar cuando se utilizan los sistemas automatizados ⁵⁹.

La enzima OXA-48 (aislada en enterobacterias, sobre todo *K. pneumoniae*) tiene una mayor actividad carbapenemasa que el resto de las OXA, con las cuales comparte menos de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos ⁶⁰. Su

eficacia para hidrolizar el imipenem es 10 veces mayor que las enzimas OXA de los *Acinetobacter* spp.²⁶. OXA-48 también hidroliza las penicilinas y las primeras cefalosporinas, pero su actividad contra las oximino-cefalosporinas es débil⁶⁰.

3.3 OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS CARBAPENÉMICOS

Además de las carbapenemasas como tal, las β -lactamasas con actividad carbapenemasa más débil pueden conferir resistencia a los carbapenémicos en cepas con captación reducida o hiperexpresión de bombas de expulsión⁶¹. El ertapenem es el carbapenémico más afectado por estos mecanismos².

La resistencia a imipenem asociada con pérdida de porinas y la hiperproducción de la β -lactamasa AmpC ha sido descrita en *P. aeruginosa*, así como en *Enterobacter* spp.^{62,63}. También ha sido descrita la resistencia en *K. pneumoniae* mediante pérdida de porinas OmpK35 y OmpK36 y a la presencia de β -lactamasa AmpC plasmídica⁶⁴. Por otro lado, en *Klebsiella* spp. se ha detectado resistencia a carbapenémicos debida a pérdida de porinas asociada con producción de BLEE SHV⁶⁵.

4. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS (EPC)

4.1 EPIDEMIOLOGÍA

4.1.1 MUNDIAL

Durante la primera década del siglo XXI se produjo una diseminación rápida y extensa de *K. pneumoniae* productora de KPC en la zona noreste de EEUU. Aunque el primer miembro de la familia KPC fue descubierto en *K. pneumoniae* en el Norte de Carolina en 1996, la variante KPC-2 se extendió a lo largo de la costa este de EEUU y en el 2004, fue detectada en Nueva York^{31,66-70}. Simultáneamente surgió una variante

de KPC-2, la KPC-3, causante de brotes en Nueva York entre 2000 y 2001 ⁷¹. Ambas se llegaron a establecer en hospitales de los estados vecinos, aparentemente debido al tránsito de pacientes colonizados.

En el 2005, en Francia se detectó una cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC-2 aislada de un paciente que había estado en Nueva York ⁷². Con el tiempo se han ido aislado *K. pneumoniae* productora de KPC en diversos países como en América Latina, Israel, China y Grecia ⁷³⁻⁷⁸.

Las enzimas KPC han sido detectadas en un gran número de secuenciotipos (ST) de *K. pneumoniae*. Sin embargo, la mayoría de los aislados con estas enzimas pertenecen al ST258. Este ST258 difiere tan solo en una única mutación en un locus de ST11 y está fuertemente asociado con la producción de KPC y con aislados multirresistentes ⁴⁴.

Históricamente, las MBL se encontraron en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. pero recientemente se están diseminando entre las enterobacterias.

Desde su inicial descubrimiento, las MBL SPM (Brasil), GIM (Alemania) y SIM (Corea) no se dispersaron por otros continentes. Sin embargo, VIM e IMP se detectaron en todo el mundo ²⁷.

Desde su primer aislamiento en Japón, *K. pneumoniae* productora de IMP es muy frecuente en este país ⁷⁹. *K. pneumoniae* con IMP-4 ha sido responsable de varios brotes en China y Australia ^{80,81}. También se han detectado otras enterobacterias productoras de IMP, como *S. marcescens* y *E. cloacae*, en Japón, Corea del Sur y Taiwan ²⁷. La diseminación de enterobacterias productoras de IMP en el resto del mundo parece ser limitada con pocos casos identificados en Turquía, Líbano, Brasil y USA ⁸²⁻⁸⁵.

La primera enterobacteria productora de VIM fue *K. pneumoniae* y se detectó por primera vez en los años 2001-2003 en los países del sur de Europa y fue introducida más tarde al norte de Europa y a EEUU principalmente a través de pacientes procedentes de áreas de alta prevalencia ²³. En estos países, la prevalencia continua siendo baja, con algún brote esporádico limitado a un hospital. Otros países con brotes esporádicos son Túnez, Corea del Sur y Venezuela ⁸⁶⁻⁸⁸. Los tipos de VIM que predominan en las enterobacterias son VIM-1 y VIM-4 ¹⁷.

En el 2008, se caracterizó un nueva MBL, la NDM-1, aislada en una *K. pneumoniae* en la India ⁸⁹. A partir de entonces, en el subcontinente indio existe una elevada prevalencia de *K. pneumoniae* productora de NDM. Además, existe un segundo reservorio en el centro de los Balcanes, pero la relación con la epidemia de la India es desconocida ⁹⁰

La reciente diseminación de la carbapenemasa NDM a numerosos países europeos así como a América del Norte, Australia, Japón está atribuida a pacientes relacionados con la India, Pakistán y Bangladesh ⁹¹.

Los genes de esta MBL están en un plásmido, el cual lleva genes de resistencia a macrólidos, aminoglucósidos, rifampicina, sulfametoxazol y aztreonam ⁸⁹. Además, se detectaron algunos aislados resistentes a la colistina y tigeciclina, siendo cepas pan-resistentes ¹⁷.

En el 2001, se identificó en Turquía en una *K. pneumoniae* la enzima OXA-48 ⁶⁰. Desde entonces, ha sido aislada en países del Este y en el norte de África, así como en los países europeos del oeste, principalmente a través de pacientes colonizados procedentes del norte de África ^{2,58,92}. Las cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 pertenecientes al ST395 fueron identificadas en Marruecos, Francia y

Ámsterdam, indicando una diseminación clonal ⁹³. Aunque Oriente medio y el norte de África son los focos de la infección, el reciente aislamiento de *K. pneumoniae* productor de OXA-48 en India, Senegal y Argentina sugiere una expansión global ⁹⁴⁻⁹⁶.

4.1.2 EUROPEA

La distribución europea de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos se muestra en la figura 3. Se puede observar como la mayor prevalencia está en Grecia e Italia.

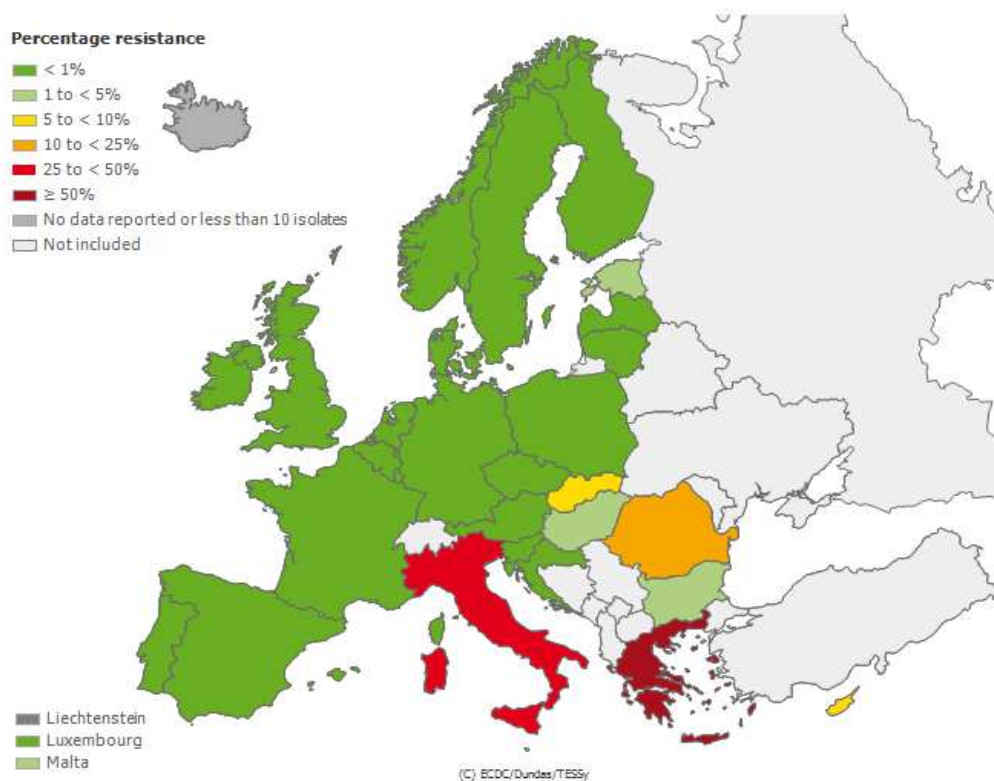


Figura 3. Distribución de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos en Europa (año 2012 EARS).

En la figura 4 se representa la distribución europea de las carbapenemasas así como su nivel de expansión. En los países europeos del norte y oeste la prevalencia de KPC es baja. En estos países (Suíza, Irlanda, Reino Unido, Francia, Suecia, Noruega,

Países Bajos, Dinamarca) se comunican casos aislados relacionados con pacientes procedentes de áreas con elevada prevalencia^{72,97,98}. Existe una alta prevalencia de estas enzimas en Polonia e Italia^{99,100}.

Hasta ahora, las enterobacterias productoras de VIM fueron aisladas con mayor frecuencia en países del Mediterráneo, alcanzando proporciones epidémicas en Grecia^{2,101}.

Recientemente se han producido importantes brotes de enterobacterias con OXA-48 en hospitales de Francia, Alemania y Bélgica¹⁰²⁻¹⁰⁶.

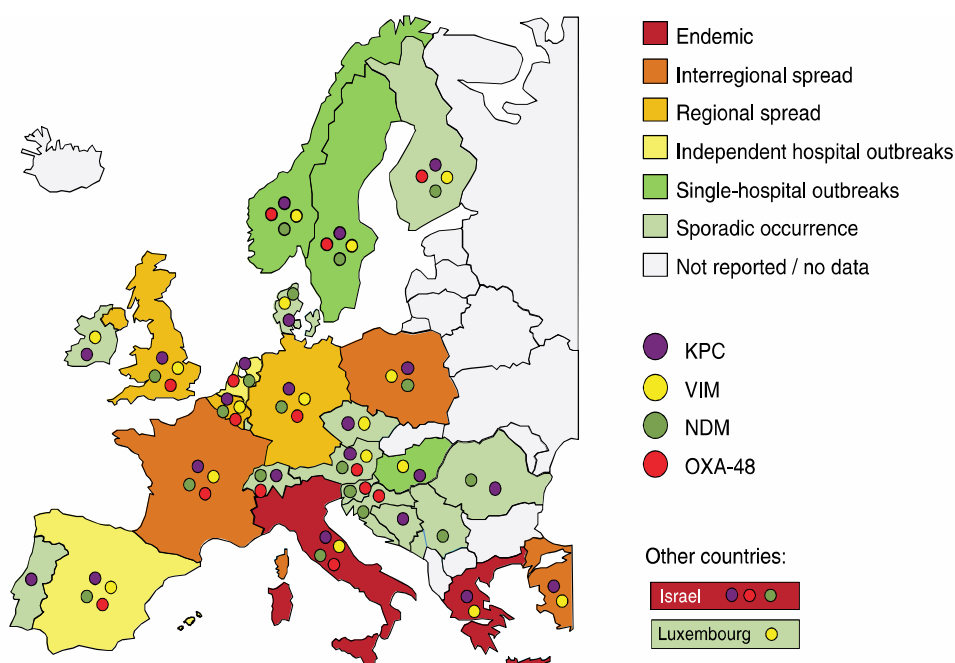


Figura 4. Distribución de las carbapenemasas más prevalentes y el nivel de expansión en los países europeos³².

4.1.3 ESPAÑOLA

La primera descripción de EPC en España fue en el 2005. Se aislaron un *E. coli* y una *K. pneumoniae* productores de VIM-1 en el Hospital de Vall d'Hebron de Barcelona ¹⁰⁷.

En el 2007, *Tato et al.* describieron el primer brote de VIM-1 en España. Los aislados pertenecían a distintas especies de enterobacterias, incluyendo *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *K. oxytoca*. Los análisis clonales revelaron que los aislados de *K. pneumoniae* pertenecían al mismo clon mientras que los aislados de *E. cloacae* pertenecían a distintos clones ¹⁰⁸. En los años siguientes, se fueron describiendo distintos brotes de enterobacterias productoras de VIM-1 en distintos hospitales españoles ¹⁰⁹⁻¹¹¹. También se han descrito otras MBL, como IMP-8, IMP-22, IMP-28 y en el 2011 se comunicó la primera NDM-1 en España, en un *E. coli* aislado de un portador español que viajó a la India ¹¹²⁻¹¹⁵.

En el 2010, se describieron enterobacterias productoras de KPC en 2 hospitales de Madrid: 3 aislados de *C. freundii* productores de KPC-2 y varios aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-3 pertenecientes a 2 clones no relacionados ^{116,117}.

En el 2011 se publicó el primer brote de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 en España. El caso índice fue un paciente trasladado de una UCI de Marruecos a una de Barcelona. Los estudios epidemiológicos demostraron que se trató del clon ST101, que previamente fue encontrado en los países del norte de África y responsable de la expansión de OXA-48 en otros países europeos ¹¹⁸. En el 2012, se describió otro brote por *K. pneumoniae* con OXA-48, en el que el 70% perteneció a un clon con ST405, descrito en Marruecos y Bélgica ¹¹⁹.

4.2 ESTRATEGIA PARA LA DETECCIÓN DE EPC

La detección de EPC incluye un primer paso de *screening* seguido de un segundo paso de confirmación mediante métodos fenotípicos y/o genotípicos (figura 5).

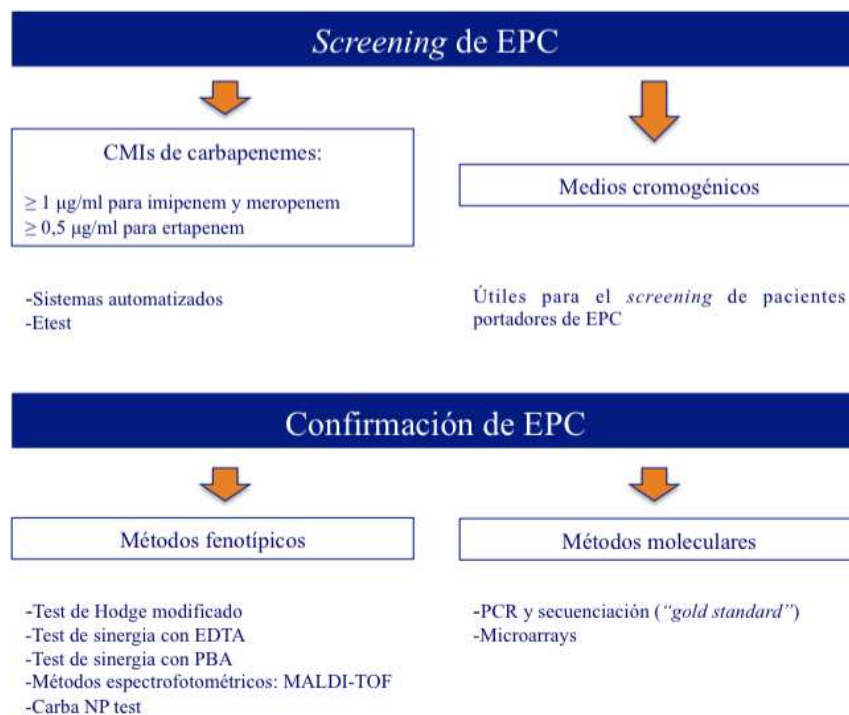


Figura 5. Esquema para la detección de EPC.

4.2.1 SCREENING DE EPC

El *screening* de EPC en muestras clínicas está basada en el análisis de susceptibilidad a los carbapenémicos de los aislados productores de carbapenemasas comparados con los aislados de la población *wild-type*. Las CMI de imipenem y meropenem de $\geq 1 \text{ mg/l}$ y de ertapenem de $\geq 0,5 \text{ mg/l}$ pueden indicar una posible producción de carbapenemasas.

El ertapenem parece ser un buen candidato para la detección de la mayoría de las EPC, sobre todo de KPC, ya que los valores de CMI de ertapenem a menudo son más

altos que los de otros carbapenémicos ¹²⁰. El inconveniente es que le falta especificidad porque una permeabilidad disminuida combinada con enzimas BLEE o AmpC puede afectar a las CMI de ertapenem ¹²¹. Los otros 2 carbapenémicos, imipenem y meropenem, tienen mayor especificidad. En la gran mayoría de los casos el meropenem es el carbapenémico más activo, puesto que sus CMI suelen ser las más bajas. Por ello, este carbapenémico no sería el más adecuado para la detección de EPC, ya que tendría poca sensibilidad. Todo esto, hace que el imipenem sea el carbapenémico de elección para un primer paso en la detección de EPC, aunque hay que tener en cuenta que las CMI de imipenem suelen ser elevadas en caso de *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. y *M. morgani* debido a otros mecanismos de resistencia.

El *screening* de EPC se lleva a cabo mediante sistemas automatizados para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, que están basados en la reconstitución con una suspensión bacteriana de diferentes concentraciones de una serie de antimicrobianos liofilizados en unos paneles y su posterior lectura, realizando la interpretación de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a los puntos de corte establecidos en cada caso. Además, tienen configurados unas recomendaciones de “sistemas expertos” que permiten inferir mecanismos de resistencia a través de las CMI de los antimicrobianos obtenidas. Ejemplos de sistemas automatizados son: Wider, Vitek, MicroScan, Phoenix...

Estos sistemas presentan ciertos inconvenientes. Por un lado, se han descrito discrepancias en las CMI de los carbapenémicos cuando se comparan con las obtenidas por los métodos estándar de microdilución en caldo, resultando menores ^{122,123}. Por otro lado, el fenómeno de la heterorresistencia a los carbapenémicos puede dificultar la detección de EPC utilizando estos métodos ¹²⁴. Todo esto hace que los sistemas automatizados no sean una herramienta fiable para la detección de todas las EPC. Por

ello, antes de proceder a realizar los métodos de confirmación, es recomendable comprobar las CMI de los carbapenémicos, por ejemplo, mediante tiras E-test.

Se han diseñado medios de cultivo cromogénicos que contienen un carbapenémico capaces de reconocer especies de enterobacterias (CHROMagar KPC; CHROMagar, Paris, France). Por lo tanto, con este medio también se podrían detectar EPC, aunque no el tipo de carbapenemasa. Son útiles en el proceso de *screening* de pacientes colonizados por estas cepas. La principal desventaja es la falta de sensibilidad, ya que no detectan cepas productoras de carbapenemasas con un bajo nivel de resistencia.

4.2.2 CONFIRMACIÓN DE EPC

- **MÉTODOS FENOTÍPICOS**

Estos métodos detectan la producción de una carbapenemasa por una cepa productora de esta enzima. En contraste con las técnicas moleculares tienen la ventaja de que no sólo detectan las carbapenemasas conocidas, si no que son capaces de detectar nuevas carbapenemasas. El principal inconveniente es que no son capaces de identificar con precisión la carbapenemasa producida.

El **test de Hodge modificado (THM)**¹²⁵ es un método basado en la degradación de un carbapenémico por una cepa productora de carbapenemasa que permite que una cepa sensible a carbapenémicos se extienda creciendo más cerca del disco que contiene el carbapenémico, distorsionando el halo de inhibición.

Los **métodos basados en la inhibición por EDTA**¹²⁵ se utilizan para la detección de MBL. El EDTA es un compuesto que se une al centro activo de las enzimas de clase B de Ambler que contiene iones de Zn⁺².

Los **métodos basados en la inhibición por ácido borónico**⁷⁴ se utilizan para la detección de carbapenemasas de la clase A. Tienen algunas limitaciones en las especies de enterobacterias productoras de AmpC (*Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, *M. morgani*, *Providencia* spp, *Serratia* spp...) porque el ácido borónico también les afecta. La inhibición de la actividad de las cefalosporinas se consigue mediante el uso de cloxacilina. Combinando el ácido borónico y la cloxacilina se consigue diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas clase A de las cepas productoras de AmpC¹²⁶.

Los **métodos espectrofotométricos**¹²⁰ están basados en la medida de la hidrólisis del imipenem con una longitud de onda de 297 nm con un extracto que contiene carbapenemasas obtenido después de 18 horas de un caldo de cultivo. Con este método se puede diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas de las cepas resistentes por otros mecanismos distintos. Últimamente se ha propuesto el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección de la actividad carbapenemasa, basada en el análisis del espectro de degradación de una molécula de un carbapenémico¹²⁷.

El **test Carba NP (CNP)**¹²⁸ es un test bioquímico que está basado en la hidrólisis *in vitro* del imipenem. La hidrólisis es detectada por un cambio en el valor del pH (el colorante pasa de rojo a amarillo/naranja).

- **MÉTODOS MOLECULARES**

Las técnicas moleculares siguen siendo el método de referencia para la identificación de genes que codifican enzimas carbapenemasas. Las ventajas de estas técnicas son el poco tiempo que necesitan (sobre todo las PCR a tiempo real), una elevada sensibilidad y especificidad. Por el contrario, las principales desventajas son el

alto coste, el requerimiento de microbiólogos entrenados y que se puede perder la detección de nuevos genes que codifiquen carbapenemasas.

La mayoría de estas técnicas están basadas en la **PCR** y pueden estar seguidas de una **secuenciación** si es necesaria la identificación exacta del gen. Existen técnicas de PCR de detección de un único gen o de múltiples genes de las carbapenemasas más prevalentes (VIM, IMP, NDM, KPC y OXA).

Otros métodos moleculares son los **microarrays**¹²⁹. Estos son métodos más versátiles que pueden ser implantados en la rutina para detectar todas las clases de carbapenemasas con una alta sensibilidad y especificidad.

Estas técnicas tienen interés epidemiológico, no clínico, ya que no es necesaria una identificación precisa del tipo de carbapenemasa para tratar a los pacientes o para prevenir brotes.

4.3 TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR EPC

La experiencia en el tratamiento antimicrobiano de las infecciones por EPC está basada en estudios con un número limitado de pacientes, con un bajo o medio grado de evidencia, y por lo tanto, el tratamiento óptimo no está bien establecido¹³⁰. La selección de los agentes antimicrobianos adecuados para el tratamiento depende de la sensibilidad *in vitro* de los mismos así como de la localización de la infección. Las opciones para el tratamiento de pacientes infectados por EPC son limitadas. Además de tener resistencia a los β -lactámicos presentan resistencias asociadas a otros grupos de antimicrobianos, tales como fluorquinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol. Muchos aislados son sensibles a amikacina o gentamicina y la mayoría de los aislados son sensibles a tigeciclina y colistina¹³¹. Sin embargo, en algunas áreas la resistencia a colistina puede ser muy alta debido a la expansión clonal de cepas resistentes^{132,133}.

Existen estudios que demuestran la sinergia con el uso de tratamientos combinados, en especial con un carbapenémico más un agente activo (aminoglucósidos, colistina o tigeciclina)^{44,134-138}.

Actualmente, existen diversos agentes en varias fases de desarrollo para el tratamiento de bacilos gramnegativos multirresistentes. Entre los más importantes se encuentran:

- **Plazomicina (ACHN-490)**. Es un derivado de la sisomicina que no se inactiva por las enzimas modificadoras de aminoglucósidos más habituales, por lo que mantiene actividad frente a enterobacterias, *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. Sin embargo, no es activa frente a bacterias productoras de metilasas 16S ribosomal ARN, las cuales son frecuentemente coproducidas con carbapenemasas NDM^{139,140}.
- **Avibactam (NXL-104)**. Es un inhibidor de serin-carbapenemasas tales como KPC, pero no inhibe MBL¹⁴¹. Las combinaciones de avibactam con varios β -lactámicos han mostrado resultados prometedores¹⁴².

4.4 PREVENCIÓN

Los pacientes colonizados por EPC sirven como reservorio para la transmisión durante los brotes¹⁴³. La vigilancia por parte del equipo sanitario y la rápida detección a través del laboratorio es la clave para prevenir la expansión de EPC. El cultivo de una torunda rectal es el método mejor aceptado para la detección de portadores.

Tanto las guías US CDC como las ECDC recomiendan la realización de las siguientes medidas: higiene de manos, precaución con los contactos, aislamiento de los pacientes, dedicación exclusiva del personal sanitario, minimizar el uso de dispositivos

invasivos (particularmente catéteres urinarios), promover o reforzar la vigilancia antibiótica y realizar un *screening* de EPC ^{144,145}.

Los pacientes colonizados, pero no infectados, no deberían de ser tratados con ningún antimicrobiano.

OBJETIVOS

Las EPC están ampliamente diseminadas por todo el mundo, constituyendo un importante problema de salud. Para el control de estos microorganismos, es necesario una rápida identificación de los mismos, un tratamiento adecuado y unas correctas medidas de aislamiento de los pacientes. Todo ello, hizo plantearnos el conocer la situación de nuestro hospital en este aspecto.

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Detectar fenotípicamente las EPC que se aíslen de muestras clínicas en el Hospital Clínico San Carlos en un periodo de dos años e identificarlas a nivel de especie.
2. Determinar los datos epidemiológicos de los pacientes en los que se aíslen estos microorganismos.
3. Caracterizar a nivel molecular los tipos de carbapenemasa producidos por cada especie.
4. Establecer mediante PFGE los clones circulantes para las diferentes especies.
5. Determinar mediante MLST los clones de *K. pneumoniae* y estudiar su evolución en el periodo de estudio.

6. Estudiar la sensibilidad de estos aislados a los carbapenémicos así como a los antimicrobianos más útiles en el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos. Analizar las relaciones entre especies y clones con el perfil de resistencia.

7. Evaluar la actividad *in vitro* de plazomicina, nuevo aminoglucósido en Fase 3, tanto solo como en combinación con otros antimicrobianos, frente a estos aislados.

8. Valorar otras técnicas fenotípicas de detección de EPC como son el test bioquímico CNP y la espectrometría de masas MALDI-TOF.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. AISLADOS CLINICOS

Entre septiembre de 2010 y septiembre de 2012 se seleccionaron aquellas enterobacterias, procedentes de muestras clínicas del Hospital Clínico San Carlos (HCSC), que presentaron en el antibiograma un fenotipo compatible con la producción de una carbapenemasa. Se excluyeron del estudio las enterobacterias de los géneros *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Providencia* spp.

La identificación y sensibilidad de las cepas se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología Clínica del HCSC mediante los paneles de los sistemas automatizados Wider (Francisco Soria Melguizo) o Vitek 2 (Biomérieux): Wider Gram Negative Panel Rev.2 y Vitek AST-N243, respectivamente. Los antibióticos carbapenémicos y las concentraciones que incluyeron cada sistema fueron diferentes (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de los antibióticos carbapenémicos incluidos en los paneles de cada sistema de detección.

Carbapenémicos	Wider Gram Negative Panel Rev.2 (Concentración: mg/l)	Vitek AST-N243 (Concentración: mg/l)
Imipenem	1, 2, 4, 8	1, 2, 4, 16
Meropenem	2, 4, 8	-
Ertapenem	2, 4	0.5, 1, 6

Se valoró la producción de carbapenemasa en las enterobacterias objeto de nuestro estudio que cumplieron los siguientes criterios:

- CMI > 1 mg/l para imipenem con cualquier valor de CMI para meropenem o ertapenem.
- CMI > 2 mg/l para meropenem con cualquier valor de CMI para ertapenem o imipenem.

- CMI > 2 mg/l (Wider) o > 0,5 mg/l (Vitek) para ertapenem con cualquier valor de CMI para imipenem o meropenem.

Un único aislado por paciente fue incluido en el estudio. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes con la finalidad de obtener información sobre datos demográficos (sexo y edad), servicios implicados y tipo de muestra clínica en la que se aisló el microorganismo en estudio.

2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

2.1 TEST DE HODGE MODIFICADO (THM)

Una vez se observó en el antibiograma la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa se realizó el THM propuesto por *Lee et al.* en la que se usó una cepa control de *E. coli* ATCC 25922 sensible a los carbapenémicos.

Para la realización de esta prueba se preparó una suspensión bacteriana con la cepa control en suero salino (NaCl 0,9%) ajustada al patrón 0,5 de la escala de turbidez de McFarland (equivalente a 10^8 UFC/ml), se diluyó un 1/10 y se inoculó en una placa de agar Mueller-Hinton (MH). A continuación, se colocó un disco de imipenem (10 μ g) en el centro y se realizaron estrías con un asa de siembra desde el centro hacia los extremos de la placa tanto con la cepa control como con las cepas a estudio. Se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Se consideró positivo, es decir, presencia de carbapenemasa, cuando el halo del *E. coli* control ATCC se distorsionó debajo de las estrías realizadas con las cepas a estudio.

Una vez que el THM fue positivo, se evaluó la clase molecular a la que pertenecían dichas enzimas.

2.2 TEST DE SINERGIA CON EDTA

Esta prueba se utilizó para la detección fenotípica de las carbapenemasas de la clase B, es decir, de las MBL.

Cada cepa seleccionada se inoculó en una placa de agar MH con una dilución en suero salino hasta conseguir una turbidez de 0,5 McFarland. A continuación, se colocaron 2 discos de imipenem. Se añadieron 10 μ l de EDTA 0,1M a uno de los discos de imipenem. Se incubó a 37°C durante 24 horas .

Se consideró positivo, es decir, presencia de MBL, cuando el halo del disco de imipenem/EDTA fue al menos 5 mm mayor que el halo del disco de imipenem.

2.3 TEST DE SINERGIA CON PBA Y CON CLOXACILINA

Esta prueba se utilizó para la detección fenotípica de las carbapenemasas de la clase A, diferenciándolas de las AmpC que presentan sinergia con ácido fenilborónico (PBA) pero además con cloxacilina.

Cada cepa seleccionada se inoculó en una placa de agar MH con una dilución en suero salino hasta conseguir una turbidez de 0,5 McFarland. A continuación, se colocaron 3 discos de meropenem (10 μ g). Se añadieron 10 μ l de PBA (40 μ g/ μ l) a uno de los discos y 10 μ l de cloxacilina 100 μ g/ μ l a otro. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

Se consideró positivo, es decir, presencia de carbapenemasa de la clase A cuando el halo del disco de meropenem/PBA fue al menos 5 mm mayor que los halos de los discos de meropenem y meropenem/cloxacilina.

No existen inhibidores específicos de enzimas de la clase D. Se consideró que una carbapenemasa era probablemente de la clase D cuando el THM fue positivo y los test de combinación en disco fueron negativos.

3. METODOS MOLECULARES

3.1 EXTRACCION DEL ADN

La extracción del ADN se realizó mediante el método de lisis con el *buffer* Tritón (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8,3, 1 mM EDTA, 1% Tritón X100). Se recogieron con una asa de siembra 1 ó 2 colonias de cada aislado procedentes de un cultivo puro de 18-24 horas y se resuspendieron en 200 μ l de este buffer. Los tubos se calentaron a 100 °C durante 10 minutos y después, se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm. Los resuspendidos se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA CARBAPENEMASAS

La amplificación de los genes se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las cepas fueron analizadas para los genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, y *bla*_{OXA}. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores y condiciones utilizadas para la amplificación.

Genes	Cebadores	Secuencia de los cebadores	T ^a de hibridación	Tamaño del fragmento	Referencia
VIM	VIM A	5'ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC 3'	52 °C	510 pb	146
	VIM B	5' TGG GCC ATT CAG CCA CAT C 3'			
IMP	IMP A	5'CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG 3'	52 °C	587 pb	146
	IMP B	5' AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT 3'			
KPC	KPC F	5'ATG TCA CTG TAT GGC CGT CT 3'	58 °C	893 pb	31
	KPC R	5'TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC 3'			
OXA	OXA F	5'GCT TGA TGG CCC TCG ATT 3'	57 °C	511 pb	Este estudio
	OXA R	5'AAA CCA TCC GAT GTG GGG CAT 3'			

La amplificación se realizó en el termociclador *Gene Amp® PCR System 9700*

(Applied Biosystems) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

bla_{VIM}

Temperatura	Tiempo	
94 °C	5 minutos	
94 °C	25 segundos	} 30 ciclos
52 °C	40 segundos	
72 °C	50 segundos	
72 °C	6 minutos	

bla_{IMP}

Temperatura	Tiempo	
94 °C	2 minutos	
94 °C	10 segundos	} 30 ciclos
52 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	7 minutos	

*bla*_{KPC}

Temperatura	Tiempo	
94 °C	5 minutos	
94 °C	25 segundos	} 30 ciclos
58 °C	40 segundos	
72 °C	50 segundos	
72 °C	6 minutos	

*bla*_{OXA}

Temperatura	Tiempo	
94 °C	1 minuto	
94 °C	30 segundos	} 30 ciclos
57 °C	30 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	2 minutos	

3.3 AMPLIFICACIÓN DEL INTEGRÓN CLASE I

Los genes que codifican MBL se suelen diseminar en integrones de la clase 1 (figura 6). Para la amplificación del integrón se utilizaron los cebadores 5'CS y 3'CS cuyas secuencias se muestran en la tabla 5.

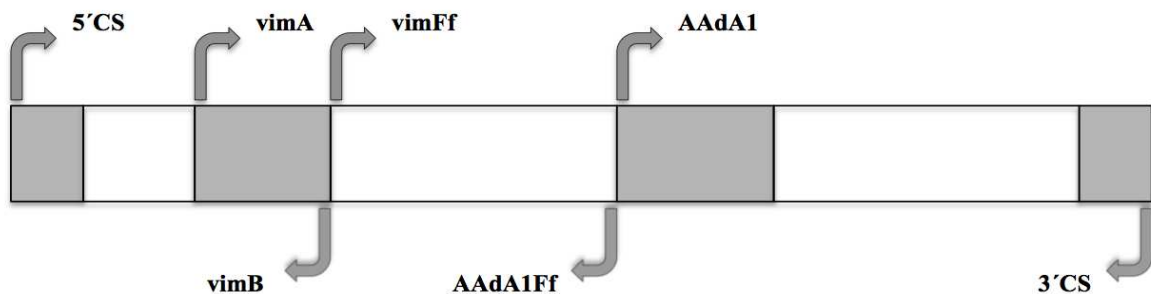


Figura 6. Representación de un integrón de la clase 1.

Debido a la longitud del integrón se utilizó la enzima *Long Expand* necesaria para amplificar fragmentos de gran tamaño. La amplificación se realizó en el termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
94 °C	2 minutos	
94 °C	10 segundos	} 10 ciclos
55 °C	30 segundos	
68 °C	2 minutos	
94 °C	15 segundos	} 15-25 ciclos
55 °C	30 segundos	
68 °C	2 minutos	
68 °C	7 minutos	

Una vez amplificado el integrón, para poder secuenciarlo, primero se realizó una Nested-PCR de las distintas regiones, utilizando como ADN molde una dilución 1/100 del producto amplificado. Para la amplificación se utilizaron los cebadores que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación.

Cebadores	Secuencia de los cebadores
5'CS	5'GGC ATC CAA GCA GCA AG 3'
3'CS	5'AAG CAG ACT TGA CCT GA 3'
VIMB	5' TGG GCC ATT CAG CCA CAT C 3'
VIMFf	5'GAT CTG GCT GAA TGG CCC A 3'
AAdA1Ff	5'CGT ACA AAT GTA GGG CCA GC 3'
AAdA1F	5'GCT GGC CGT ACA TTT GTA CG 3'

La amplificación se realizó en el termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
94 °C	1 minuto	
94 °C	30 segundos	} 30 ciclos
55 °C	30 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	2 minutos	

3.4 DETECCIÓN DE LOS AMPLIFICADOS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los productos obtenidos tras la amplificación se visualizaron mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1.5% en tampón T.A.E. (Tris Acetato 0,4M pH 8,3 y EDTA 0,01M, Sigma-Aldrich Co) 1X con bromuro de etidio. La visualización de los productos amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Se utilizó un marcador de peso molecular con rango de 100-1000 pb (Bio-Rab Laboratorios) para la estimación del tamaño de las bandas obtenidas.

3.5 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos amplificados se secuenciaron mediante el método de Sanger o secuenciación de terminación de la cadena, utilizando el kit comercial BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems).

En primer lugar, se purificaron los productos amplificados mediante dilución. Para ello, se midió la concentración de ADN que había en cada producto de PCR con el espectrómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A continuación se realizó una dilución ajustando la cantidad de ADN necesaria para cada tamaño del fragmento a secuenciar (tabla 6).

Tabla 6. Relación del tamaño de fragmento y la cantidad de ADN necesaria.

Tamaño del fragmento (pb)	Cantidad de ADN (ng)
100-200	4
300-600	6-12
700-1500	14-30
1500	40-100

La amplificación para la reacción de secuenciación se realizó en el termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) y las condiciones fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
96 °C	1 minuto	
96 °C	10 segundos	} 25 ciclos
T ^a hibridación	5 segundos	
60 °C	1 minuto	

Una vez finalizada, se realizó un lavado de las secuencias. Por cada muestra (10 μ l) se utilizaron 10 μ l MgCl₂ 2 mM y 20 μ l Etanol 95%, y a continuación, para que precipitase el ADN se metieron en la nevera (4 °C) durante al menos 15 minutos.

Posteriormente se realizaron una serie de centrifugados a 14.000 rpm (el primero durante 20 minutos y los 2 siguientes durante 10 minutos). En cada uno, se eliminó el sobrenadante de los tubos y el sedimento que quedaba se resuspendió en 200 μ l etanol 70% frío, a excepción del tercer centrifugado en el que no se volvió a resuspender. Se tuvo que evaporar todo el etanol de manera que no interfiriese después en la lectura de las secuencias.

Las muestras se secuenciaron en un secuenciador ABI PRISM BIO system automático (Perkin-Elmer). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa informático de tratamiento de secuencias Sequence Scanner. Las secuencias obtenidas

fueron contrastadas con la base de datos del NCBI utilizando para ello la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de comparar nuestro fragmento secuenciado con los existentes en esta base de datos.

4. ESTUDIOS DE CLONALIDAD

4.1 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

La técnica de PFGE consiste en la macrorrestricción de ADN con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y su posterior separación mediante la aplicación de campos eléctricos cuya orientación varía periódicamente. De esta manera se consiguen patrones de restricción con los que se pueden establecer una relación epidemiológica.

Una limitación de PFGE es la subjetividad en la interpretación de los patrones de bandas y la ausencia de un sistema normalizado que permita cuantificar uniformemente la distancia genética entre bandas. Todo ello explica que este método no sea utilizado para la comparación epidemiológica entre laboratorios, aunque si es útil para establecer una relación epidemiológica en brotes dentro de un mismo hospital. Por otro lado, con esta técnica no se pueden detectar cambios puntuales en genes ni permite la observación detallada de ciertos elementos genéticos (plásmidos, transposones, secuencias de inserción...).

Para la realización de esta técnica se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación de los bloques

Con cada cepa se realizó una suspensión bacteriana en 1 ml de Carl's *Buffer* (EDTA 50 mM, NaCl 20 mM, Tris 10 mM pH 7.5) hasta alcanzar una turbidez 3 McFarland (equivalente a $2,5 \times 10^9$ UFC/ml), se centrifugó a 14.000 rpm durante 10

minutos y, una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 100 μ l de Carl's *Buffer*. Cada uno, se mezcló con 100 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (BioRad) preparada con Carl's *Buffer*. Los bloques realizados mediante un molde, se dejaron solidificar durante 15 minutos a 4 °C.

- Incubación con Proteinasa K

La proteinasa K es una proteasa que actúa degradando las proteínas. Este paso es necesario para romper las proteínas que existen en las paredes celulares y para inactivar la acción de nucleasas que dañarían el ADN. Los bloques se incubaron en el *buffer* ES (EDTA 0,5 pH 9, sarcosyl 1%) con Proteinasa K (0,5 mg/ml) a 55 °C durante toda la noche.

- Lavado de los bloques

Para la eliminación de la Proteinasa K, que inactivaría la acción de la enzima de restricción utilizada, y los residuos originados en el paso anterior, se realizó una serie de lavados de los bloques con *buffer* TE (Tris 10mM pH 7.5, EDTA 1mM pH 8) a temperatura ambiente con agitación (25 rpm).

- Digestión con la enzima *XbaI*

Para la restricción del ADN se utilizó la enzima *XbaI*. Una vez lavados, la mitad de los bloques se incubaron 30 minutos a 37° C en *buffer* con BSA (100 μ g/ml). A continuación se incorporó la enzima *XbaI* (15U de enzima/ 100 μ l de *buffer*).

- Preparación del gel

El gel para la electroforesis se realizó con 170 ml de agarosa megabase al 1,2% (BioRad) preparada con TBE 0,5x a partir de 10x (Tris 89 mM pH 8.9, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM). Como marcador de peso molecular se utilizó el Lambda ladder PFG Marker (Biolabs)..

- Condiciones de la electroforesis

Pulso inicial: 5s

Pulso final: 40s

Voltage: 6v/cm

Duración: 22 h a 14 °C

- Revelado del gel

El gel fue teñido en 1 litro de bromuro de etidio durante 15 minutos. A continuación se eliminó el bromuro de etidio sobrante en un 1 litro de agua destilada durante 45 minutos. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

- Análisis de los perfiles de restricción

Los perfiles de restricción se analizaron con el software FPQuest versión 4.5 y los dendogramas fueron generados mediante el método UPGMA. Las bandas se analizaron con el coeficiente de Dice; para calcular la distancia de migración de las bandas se usó una optimización del 1,5% y una tolerancia de posición del 1,5%. Los patrones de restricción obtenidos se interpretaron de acuerdo a los criterios de *Tenover et al.*¹⁴⁷ En función del número de diferencias entre dos patrones se clasificó a los aislamientos en:

- **Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño.
- **Genéticamente relacionados.** Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3.
- **Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6.
- **No relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

4.2 TIPIFICACIÓN MULTILOCUS DE SECUENCIA (MLST)

La técnica del MLST está basada en la amplificación y secuenciación de genes constitutivos (*housekeeping*) que codifican enzimas metabólicas. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidas a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables.

A diferencia de la técnica de PFGE, el MLST es una técnica utilizada para establecer comparaciones con otros laboratorios. Sin embargo, es más laboriosa y costosa, ya que por cada cepa, se deben realizar 7 reacciones de amplificación y 14 reacciones de secuenciación. Además, el MLST no está disponible para todas las especies.

El MLST se realizó para *K. pneumoniae* y los 7 genes *housekeeping* analizados fueron los siguientes (tabla 7): *rpoB* (beta-subunidad de la ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucosa isomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor 2 de inicio de la traducción) y *tonB* (transductor de energía periplasmática) (http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Kpneumoniae.html).

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación.

Genes	Cebadores	Secuencia de los cebadores	Tamaño del fragmento
<i>rpoB</i>	rpoB F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAA ATGGCWGAGAACCA 3'*	501 pb
	rpoB R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTC GAAGTTGTAACC 3'	
<i>gapA</i>	gapA F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTATGAAAT ATGACTCCACTCACGG 3'	450 pb
	gapA R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAA GCGGCTTTGATGGCTT 3'	
<i>mdh</i>	mdh F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACCCAAC TCGCTTCAGGTTTCAG 3'	477 pb
	mdh R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTC CCCAGCAGCAG 3'	
<i>pgi</i>	pgi F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAA AACCTGCCTGTACTGCTGGC 3'	432 pb
	pgi R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCAC GCTTTATAGCGGTTAAT 3'	
<i>phoE</i>	phoE F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCTAC CGCAACACCGACTTCTTCGG 3'	420 pb
	phoE R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGA ACTGGTAGGTGAT 3'	
<i>infB</i>	infB F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTG CTGGACTATATTCG 3'	318 pb
	infB R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCA GCTCAAGAACTTC 3'	
<i>tonB</i>	tonB F	5'GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTTTATA CCTCGGTACATCAGGTT 3'	414 pb
	tonB R	5'TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCG GCTGRGCRGAGAG 3'*	

*R: A o T; W: G o A

Este protocolo utiliza cebadores que tienen una secuencia universal, la cual permite que la PCR de todos los genes se realice con la misma temperatura de

hibridación (50 °C) y la secuenciación de los mismos se lleven a cabo usando los mismos cebadores de secuenciación.

La amplificación se realizó en el termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
94 °C	1 minuto	
94 °C	30 segundos	} 30 ciclos
50 °C	30 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	2 minutos	

Una vez que se amplificaron los genes, se secuenciaron con los cebadores de secuenciación:

F: 5'GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA 3'

R: 5'TTGTGAGCGGATAACAATTTC 3'

Las secuencias obtenidas se compararon con los alelos conocidos de cada gen, por lo que se pudieron ver las variaciones existentes en nuestras secuencias con las conocidas. La identificación de cada uno de los 7 alelos genera un perfil alélico que consiste en una secuencia de 7 números. Para ello, se utilizó una base de datos centralizada de MLST de *K. pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). Cada perfil alélico define lo que se conoce como “tipo de secuencia” (ST).

5. MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

5.1 MÉTODO DEL ÉPSILON-TEST (E-TEST)

Las tiras E-test son un método cuantitativo de difusión en agar. Consisten en unas tiras de plástico que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antimicrobiano difunde en el medio.

Este método se utilizó para la comprobación de la CMI de imipenem.

Se preparó una suspensión bacteriana con cada cepa en suero salino con una turbidez 0,5 McFarland y se inoculó en una placa de agar MH. A continuación, se colocó una tira E-test de imipenem. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

Se determina la CMI en el punto de intersección del halo de inhibición del crecimiento con la tira.

5.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

En este método de dilución, el agente antimicrobiano se incorpora al medio de agar; de esta forma, cada placa tiene una concentración diferente del agente. Los inóculos pueden aplicarse rápida y simultáneamente a la superficie del agar usando un aparato replicador del inóculo capaz de transferir 36 inóculos a cada placa (replicador de Steers).

Esta técnica se utilizó para la determinación de las CMI de las cepas aisladas a los carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem) así como a fosfomicina,

tigeciclina, colistina, amikacina, gentamicina, tobramicina y plazomicina siguiendo los métodos y criterios establecidos por el CLSI.

Para la realización de esta técnica se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación de las soluciones madre

Cada laboratorio debe normalizar sus soluciones antimicrobianas en función de los ensayos de los lotes de polvos antimicrobianos que se están usando para preparar las soluciones madre. Para ello, se calculó el peso de imipenem, meropenem, ertapenem, fosfomicina, tigeciclina, colistina, amikacina, gentamicina, tobramicina y plazomicina utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) / \text{Potencia } (\mu\text{g/mg})$$

- Preparación de las placas

Se prepararon diluciones seriadas 10x de los distintos antimicrobianos. Se utilizó como medio de cultivo MH agar en una proporción 9:1 (9 partes de agar derretido por una parte de solución antimicrobiana).

- Preparación e inoculación de las cepas

Se preparó una suspensión bacteriana con cada cepa en suero salino con una turbidez 0,5 McFarland. Para la inoculación se utilizó un replicador de Steers.

- Incubación y determinación de la CMI

Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se definió la CMI como la menor concentración del antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible para cada cepa y antimicrobiano.

Las concentraciones críticas empleadas para definir las categorías de sensibilidad fueron las recomendadas por el CLSI 2011¹⁴⁸ y el EUCAST 2013¹⁴⁹ para enterobacterias (tabla 8).

Se utilizaron como cepas control: *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213.

Tabla 8. Puntos de corte de los antimicrobianos estudiados.

Antimicrobianos	Concentraciones de antimicrobianos (mg/l)					
	CLSI			EUCAST		
	S	I	R	S	I	R
Amoxicilina/clavulánico	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16			
Piperacilina/tazobactam	≤ 16/4	32/4	≥ 128/4			
Cefoxitina	≤ 8	16	≥ 32			
Cefotaxima	≤ 1	2	≥ 4			
Ceftazidima	≤ 4	8	≥ 16			
Cefepime	≤ 8	16	≥ 32			
Aztreonam	≤ 4	8	≥ 16			
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 - 8	> 8
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 - 8	> 8
Ertapenem	≤ 0,25	0,5	≥ 1	≤ 0,5	1	> 1
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4			
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16			
Tobramicina	≤ 4	8	≥ 16			
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64			
Fosfomicina	≤ 64	128	≥ 256	≤ 32	-	> 32
Tigeciclina	-	-	-	≤ 1	2	> 2
Colistina	-	-	-	≤ 2	-	> 2

En nuestro estudio denominaremos resistentes a los aislados “no sensibles”, es decir incluiremos a los intermedios. Esta categoría se mencionará en los casos en que sea relevante.

5.3 CURVAS DE LETALIDAD

Las curvas de letalidad se utilizaron para el estudio de la actividad *in vitro* de algunos antimicrobianos solos y en combinación durante un periodo de tiempo determinado.

Con este método se estudió la actividad de plazomicina, meropenem, fosfomicina, colistina, tigeciclina así como de las combinaciones plazomicina con los 4 antimicrobianos.

Las concentraciones de meropenem, fosfomicina, colistina y tigeciclina corresponden a las concentraciones en estado estacionario (C_{ss}) en suero obtenidas con las dosis habituales para el tratamiento de las infecciones. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

- Plazomicina: CMI y ½ CMI.
- Meropenem: 10 mg/l ¹⁵⁰.
- Fosfomicina: 100 mg/l ¹⁵¹.
- Colistina: 5 mg/l ¹⁵².
- Tigeciclina: 0,125 mg/l ¹⁵³.

Para la realización de esta técnica se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación del inóculo

Se inoculó una colonia de la cepa a estudio en 5 ml de MHB y se incubó a 37°C durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se realizó una dilución 1:5. De esta dilución, se añadieron 100 µl a 10 ml de los tubos controles o con antimicrobianos (figura 7). Se partió de una concentración de 5×10^5 UFC/ml.

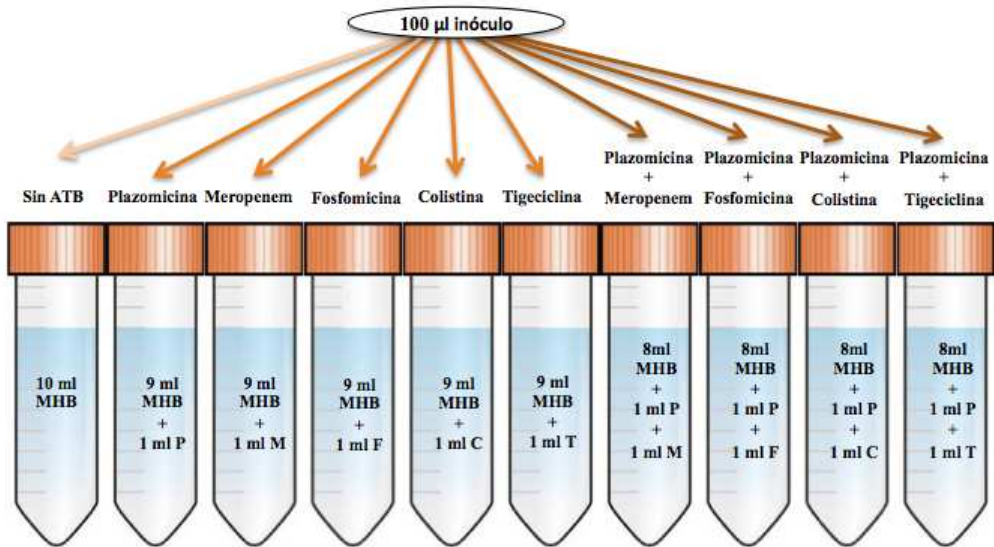


Figura 7. Esquema de la inoculación de la dilución de la cepa a estudio en los tubos control o con antimicrobianos.

- Plaqueo de cada tubo

Dependiendo de la turbidez de los tubos, se sembraron distintas diluciones de cada uno para poder contar el número de bacterias viables. El esquema de las diluciones se puede observar en la figura 8. Se plaqueó a las 0h, 4h, 8h y 24h. Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

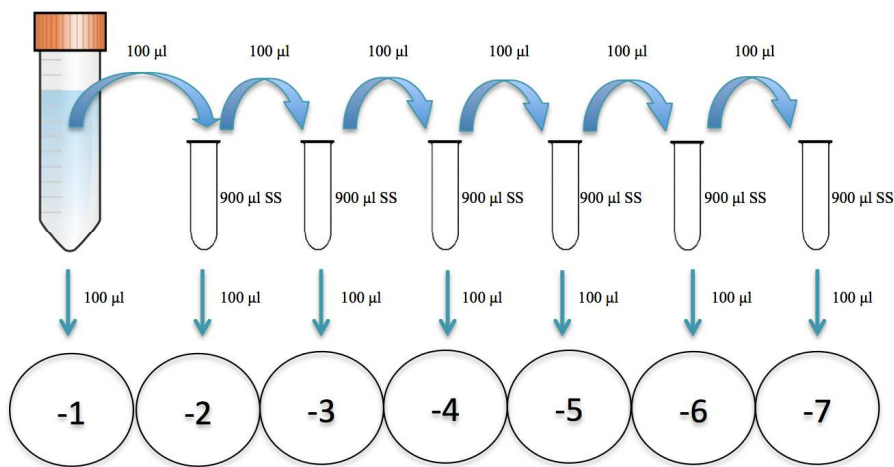


Figura 8. Esquema de dilución de cada tubo.

- Interpretación de resultados (figura 9) ^{154,155}
 - **Sinergia:** Es definida como la disminución de $\geq 2 \log_{10}$ de UFC/ml entre la combinación y el antimicrobiano más activo en solitario a cada tiempo, con el número de microorganismos supervivientes en presencia de la combinación $\geq 2 \log_{10}$ por debajo del número de microorganismos en el inóculo inicial.
 - **Antagonismo:** Es definido como el incremento de $\geq 2 \log_{10}$ de UFC/ml entre la combinación y el antimicrobiano más activo en solitario.
 - **Indiferencia:** La actividad de la combinación no difiere de la actividad del más efectivo en solitario.

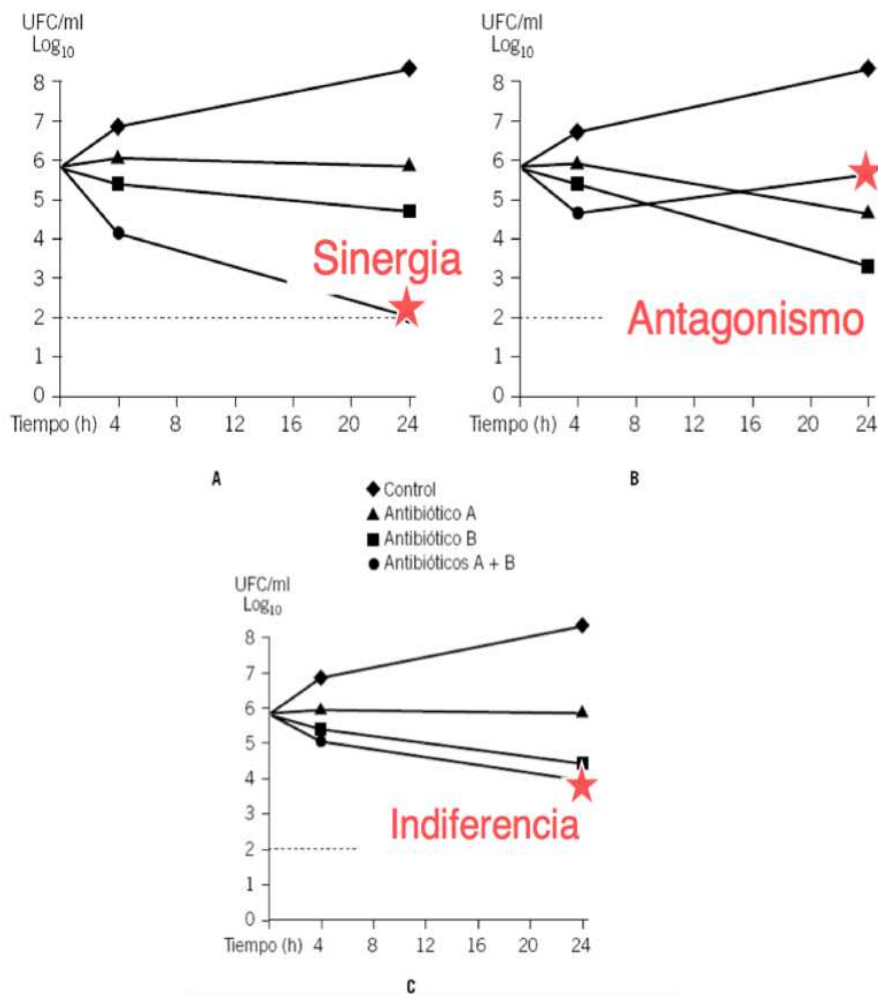


Figura 9. Representación gráfica de la actividad que puede presentar un antimicrobiano.

5.4 TÉCNICA DEL TABLERO DE AJEDREZ (CHECKERBOARD)

Es un método de microdilución en caldo que se utiliza para evaluar la actividad *in vitro* de distintas concentraciones de dos antimicrobianos en combinación en un tiempo fijo.

Con este método se estudió la actividad de las combinaciones de plazomicina con fosfomicina, colistina, tigeciclina y meropenem.

Para la realización de esta técnica se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación de las placas

Se prepararon 7 diluciones seriadas del antimicrobiano A:

- Plazomicina: 0,015 – 1 mg/l

Y 11 diluciones seriadas de los antimicrobianos B:

- Fosfomicina: 1 – 1024 mg/l.
- Colistina: 0,5 – 512 mg/l.
- Tigeciclina: 0,015 – 16 mg/l.
- Meropenem: 0,5 – 512 mg/l.

A cada pocillo se añadió 50 µl del antimicrobiano A y 50 µl del antimicrobiano B de tal manera que la concentración del antimicrobiano A aumenta de abajo hacia arriba (G-A) y la concentración del antimicrobiano B aumenta de derecha a izquierda (11-1), tal y como se muestra en la figura 10. En la columna 12 se añadieron 100 µl de las concentraciones del antimicrobiano A y en la fila H, las del antimicrobiano B. De esta manera se determinaron las CMI por microdilución de cada antimicrobiano a estudio solos y en combinación.

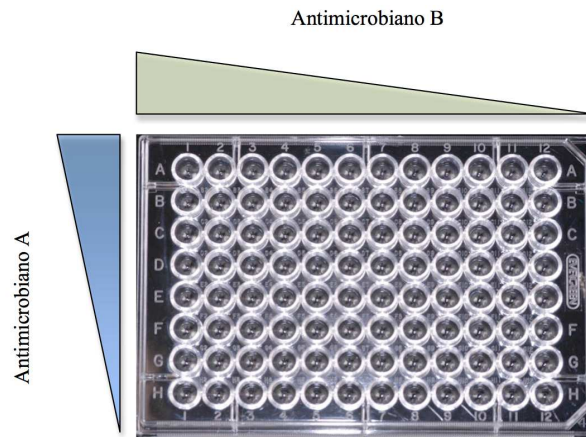


Figura 10. Representación de la preparación de las placas.

- Inoculación e incubación de las placas

Se preparó una suspensión bacteriana con cada cepa en suero salino con una turbidez 0,5 McFarland. A continuación se realizó una dilución 1:100. Se inocularon 10 μ l de esta dilución en cada pocillo con una pipeta multicanal. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

- Lectura de los resultados ¹⁵⁶

Las interacciones *in vitro* son calculadas algebraicamente e interpretadas como sinérgicas, antagónicas o indiferentes. Para ello, se calculó la concentración inhibitoria fraccionada total (FIC_T) en los pocillos sin crecimiento consecutivos a los pocillos con crecimiento. FIC_T es la suma de FIC_A (CMI_{AB} / CMI_A) más FIC_B (CMI_{BA} / CMI_B). En base a esto, se consideró que cada combinación de concentraciones de cada antimicrobiano presentaba un:

- **Efecto sinérgico** si $FIC \leq 0,5$.
- **Efecto parcialmente sinérgico** si $FIC > 0,5$ y < 1 .
- **Efecto antagónico** si $FIC > 4$.
- **Efecto indiferente** si $FIC \geq 1$ y ≤ 4 .

En nuestro estudio denominaremos sinérgicos a los aislados sinérgicos y a los parcialmente sinérgicos. Esta categoría se mencionará en los casos en que sea relevante.

También se puede determinar la actividad mediante la representación de isobologramas, en la que se enfrenta los valores de FIC_A contra los valores de FIC_B (figura 11) La línea recta entre los ejes X e Y representó el efecto aditivo entre ambos antimicrobianos. La combinación fue sinérgica si el isoblograma fue cóncavo (por debajo de la línea de aditividad) y antagonista, si fue convexo (por arriba de la línea de aditividad).

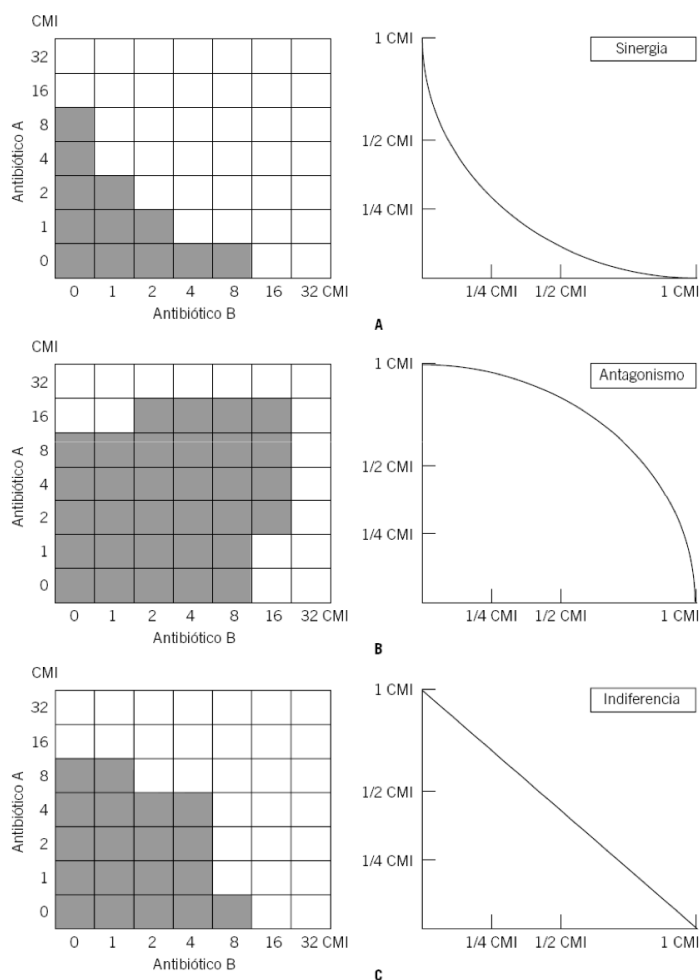


Figura 11. Representación de isobologramas.

6. VALORACION DE OTROS METODOS DE DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS

6.1 TEST BIOQUIMICO CARBA NP TEST II (CNP)

Es un test colorimétrico desarrollado por *Nordmann et al.* que está basado en la detección de la hidrólisis del anillo β -lactámico del imipenem.

Este test se utilizó para detectar la actividad carbapenemasa de los 123 aislados del estudio. Para ello, se inoculó un asa de 10 μ l de cada cepa crecida en agar sangre en 200 μ l de buffer de lisis Tris-HCl (B-PER II bacterial protein extraction reagent). Se agitaron con vortex durante 1 minuto y se dejaron incubando a temperatura ambiente al menos durante 30 minutos. Las suspensiones bacterianas obtenidas se centrifugaron a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se mezclaron 30 μ l de sobrenadante con 100 μ l de las tres soluciones:

- Solución rojo fenol diluida + 0,1mM ZnSO₄
- Solución rojo fenol diluida + 0,1mM ZnSO₄ + 3 mg/ml imipenem monohidrato
- Solución rojo fenol diluida + 0,1mM ZnSO₄ + 3 mg/ml imipenem-cilastatina

El pH de las soluciones fueron ajustadas a 7,8. Se incubaron a 37 °C como máximo 2 horas. En presencia de carbapenemasa, el imipenem se hidrolizó y se transformó en su forma carboxílica, con un descenso del pH que conllevó a un cambio de color de la solución rojo fenol (de rojo a naranja-amarillo).

6.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Es una técnica que permite identificar distintas moléculas según sus propiedades de masa/carga. El funcionamiento es el siguiente (figura 12):

- Las moléculas se cocrystalizan con una matriz determinada y se convierten en iones mediante la acción de una luz láser.
- Posteriormente, en un analizador de tiempo de vuelo los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico.
- Los iones pequeños y con menor carga llegan antes que los grandes y con mayor carga. Se mide el tiempo que tardan los iones en llegar al detector.

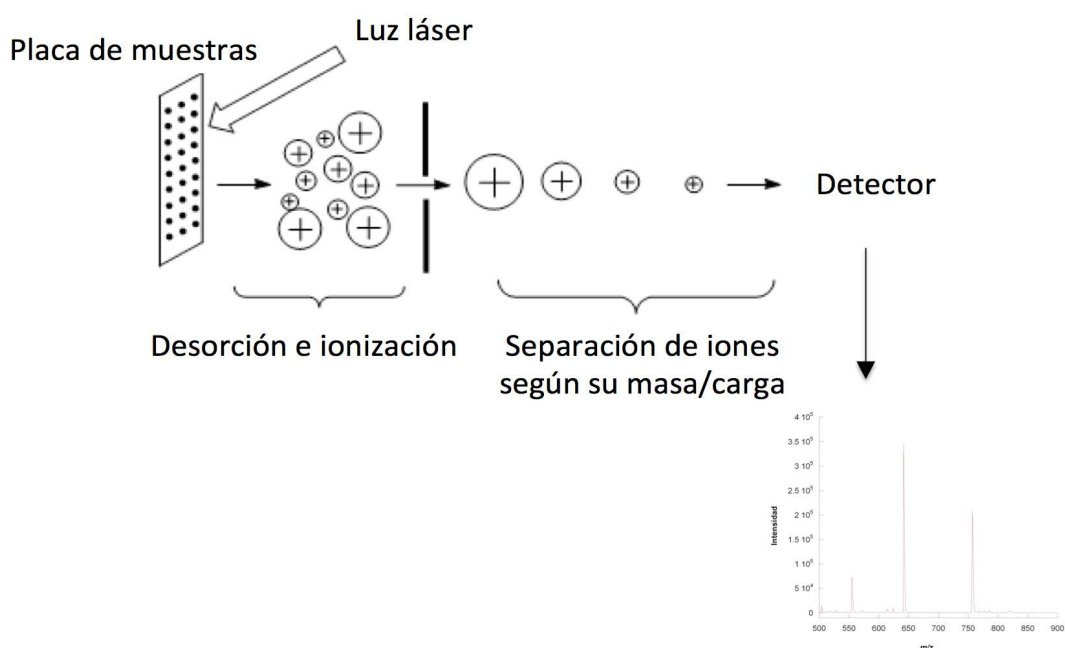


Figura 12. Esquema del funcionamiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Con esta técnica se detectó la actividad carbapenemasa de 11 aislados estudiados, cuyas características se detallan en el apartado de resultados. Se utilizaron

imipenem-cilastatina 1 mg/ml y ertapenem 1 mg/ml. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana de 3 McFarland en 1 ml de NaCl 0,46% a partir de un pase fresco en medio de cultivo agar MH de cada uno de los aislados. A continuación se centrifugaron 500 μ l de cada suspensión durante 2 minutos a 14.000 rpm y se resuspendió el precipitado en 30 μ l del mismo solvente y del solvente con imipenem-cilastatina 1mg/ml o en ertapenem 1 mg/ml. Los tiempos establecidos para el análisis fueron tiempo cero y transcurrida 1 hora de incubación a 35 °C.

Para la determinación del espectro de masas se centrifugaron los 30 μ l de cada preparado durante 2 minutos a 14.000 rpm y se depositó 1 μ l de sobrenadante así como de los controles (muestras sin microorganismo y sin antimicrobiano) en cada pocillo de la placa de lectura. Una vez la muestra se hubo secado se añadió 1 μ l de la matriz orgánica (solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinnámico en 50% acetonitrilo/ 2,5% ácido trifluoroacético) y se realizó la lectura.

Para poder determinar la actividad carbapenemasa de las cepas, se tuvo en cuenta la intensidad de ciertos picos según el carbapenémico. Los picos utilizados en el caso del imipenem-cilastatina fueron el de 359 Da (cilastatina) y el de 489 Da (aducto imipenem-matriz). Se utilizó el pico de 359 Da para normalizar los espectros¹⁵⁷. En el caso del ertapenem se utilizaron los picos de 450 Da (ertapenem sin sodio hidrolizado y decarboxilado), 476 Da (ertapenem sin sodio), 498 Da (ertapenem con 1 ión de sodio) y 521 (ertapenem con 2 iones de sodio) porque son los picos descritos en la bibliografía^{158,159}. Como no hubo ningún pico interno conocido para poder normalizar los espectros, se utilizó el pico de 212 Da porque se observó que estaba en todos los espectros y su intensidad se mantenía constante en todos ellos.

RESULTADOS

1. AISLADOS CLÍNICOS

Entre septiembre de 2010 y septiembre de 2012 se obtuvieron un total de 123 aislados de enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro con una CMI elevada para carbapenémicos (ver Material y Métodos) en las cuales el THM fue positivo. De los 123 aislados, 79 fueron *K. pneumoniae* (64,2%), 13 *K. oxytoca* (10,6%), 12 *E. cloacae* (9,8%), 4 *E. asburiae* (3,2%), 1 *E. aerogenes* (0,8%) y 14 *S. marcescens* (11,4%).

Los 123 aislados se aislaron de 121 pacientes, de los cuales el 58% fueron hombres. El rango de edad de los pacientes osciló entre 0 y 98 años, con una media de edad de 65,4 años. El grupo de edad formado por los pacientes mayores de 65 años fue el grupo en el cual hubo más aislamientos de EPC (60%) (figura 13).

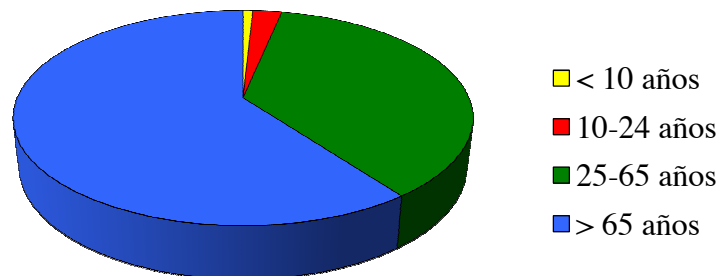


Figura 13. Grupos de edad de los pacientes en los que se aislaron EPC.

Los tipos de muestras en los que se aislaron estas cepas se representan en la figura 14. La muestra mayoritaria fue la orina (39,8%), seguida de las secreciones bronquiales (24,4%) y los exudados/pus (11,4%). Cabe destacar que el 50% de las

cepas de *S. marcescens* se aislaron de orinas mientras que el 50% de los *E. cloacae* se obtuvieron de secreciones bronquiales.

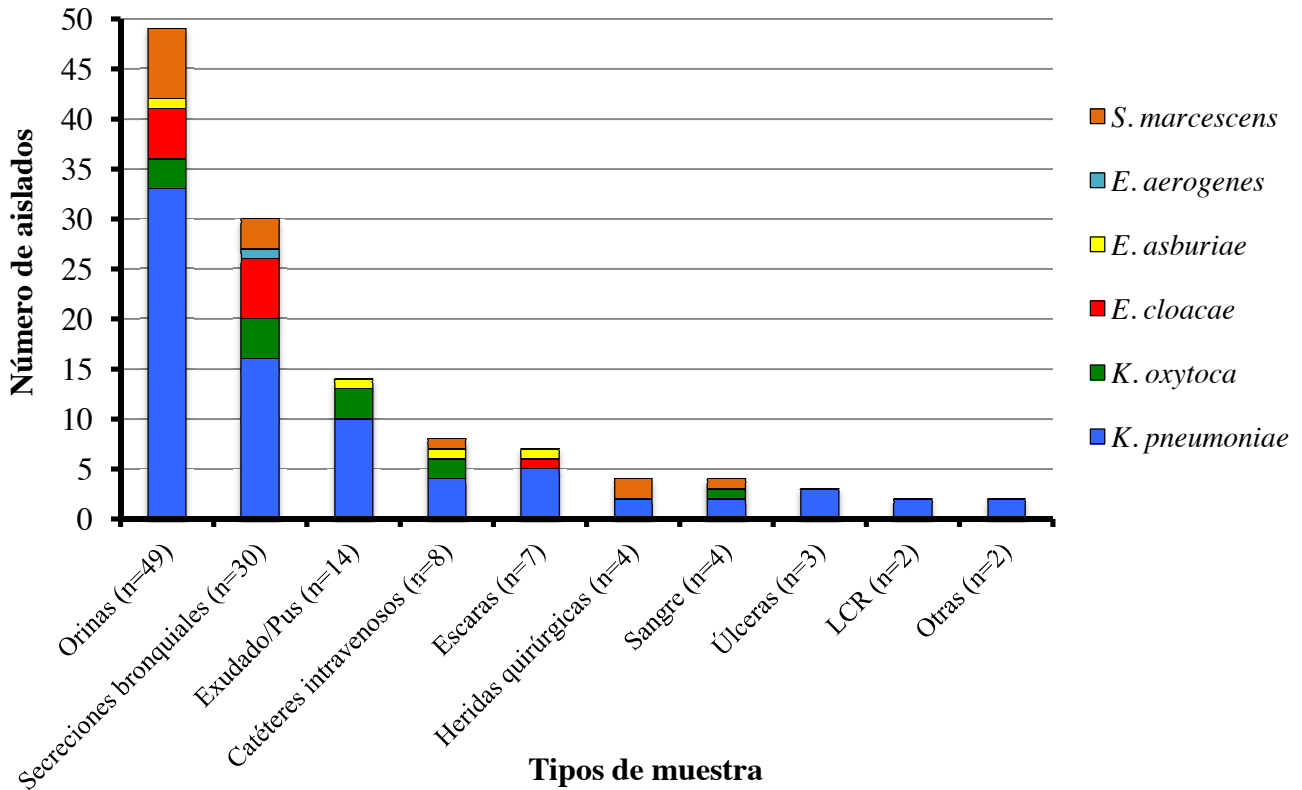


Figura 14. Distribución de las EPC según el tipo de muestra en las que fueron aisladas.

Los servicios en los que se detectaron las EPC se representan en la figura 15. El servicio en el cual se aisló la mayoría de estas cepas fue la UCI (34,9%). En este servicio, se aislaron 10 de las 14 cepas de *S. marcescens* (71,4%) y 6 de las 13 cepas de *K. oxytoca* (46,1%). En los servicios de cirugía se aislaron 22 cepas (17,9%), de las cuales 14 procedían del servicio de neurocirugía. La mayor parte de aislados de *E. cloacae* se obtuvo en la áreas médicas (58,3%).

De los 8 aislados obtenidos de pacientes de las consultas externas, 4 de ellos procedían de pacientes que estaban en la consulta de trasplante. Todos los pacientes

extrahospitalarios (consultas externas, urgencias y centros de salud) en los que se aislaron estas cepas estuvieron previamente hospitalizados.

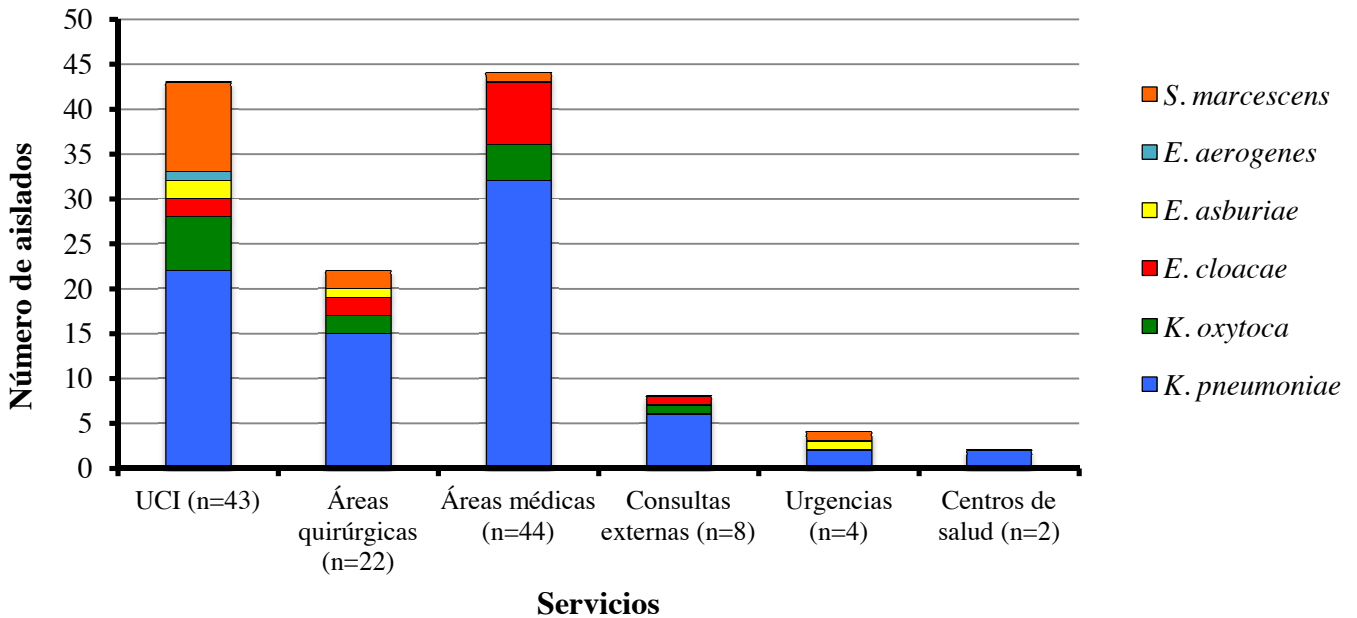


Figura 15. Distribución de las EPC según los servicios en las que fueron aisladas.

2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

2.1 TEST DE HODGE MODIFICADO

Entre septiembre 2010 y septiembre 2012 se aislaron 123 enterobacterias con el THM positivo (figura 16).

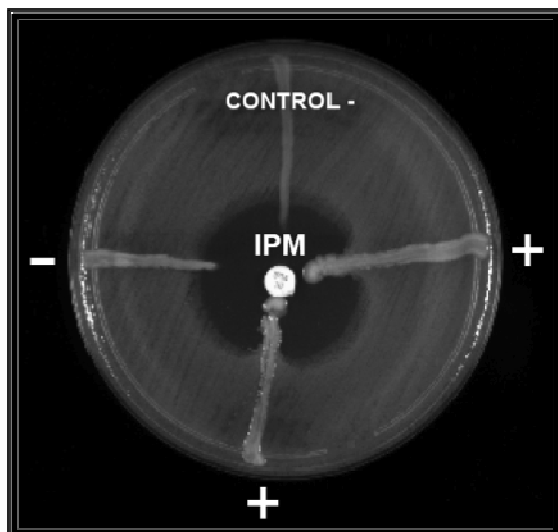


Figura 16. Test de Hodge modificado. Los aislados considerados positivos (+) distorsionan el halo en presencia del imipenem (IPM) mientras que las cepas consideradas negativas (-) no lo distorsionan.

2.2 TEST DE SINERGIA CON EDTA Y TEST DE SINERGIA CON PBA Y CON CLOXACILINA

El test de sinergia con EDTA (figura 17) fue positivo para 102 aislados, por lo tanto, un 82,9% de los aislados presentaron un fenotipo compatible con una MBL. El test de sinergia con PBA y con cloxacilina (figura 18) fue positivo para 19 aislados, por lo tanto un 15,5% presentaron un fenotipo compatible con una carbapenemasa de la clase A. Los 2 aislados restantes tuvieron ambos test negativos. Por lo que un 1,6% presentaron un fenotipo compatible con una carbapenemasa de la clase D.

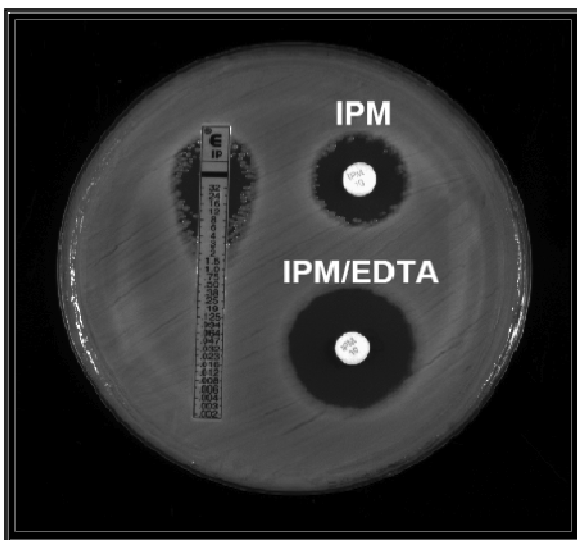


Figura 17. Test de sinergia con EDTA. El halo del disco de imipenem/EDTA es 5 mm mayor que el halo del disco de imipenem (IPM). En la imagen también se puede observar el fenómeno de heterorresistencia al imipenem.

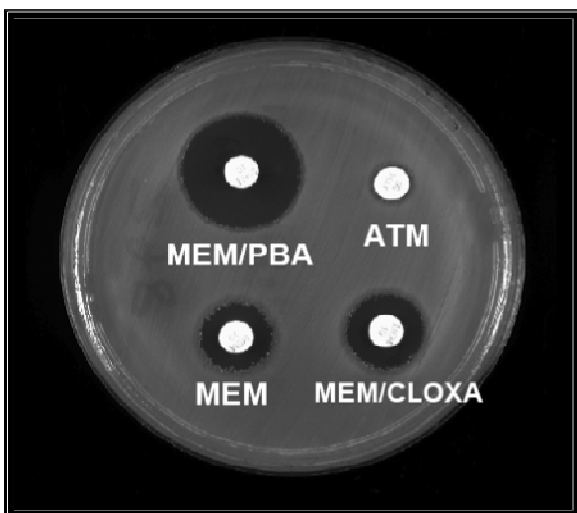


Figura 18. Test de sinergia con EDTA. Test de sinergia con PBA y con cloxacilina. El halo del disco de meropenem/PBA es 5 mm mayor que el halo de meropenem (MEM) y que el halo de meropenem/cloxacilina. En la imagen se observa una total resistencia al aztreonan (ATM).

3. MÉTODOS MOLECULARES

3.1 GENES QUE CODIFICAN PARA CARBAPENEMASAS

Los aislados fueron analizados mediante PCR para 3 grupos de MBL (VIM, IMP, NDM), 1 grupo de la clase A (KPC) y 1 grupo de la clase D (OXA). De los 123 aislados, 101 presentaron *bla*_{VIM} (82,1%), 1 *bla*_{IMP} (0,8%), 19 *bla*_{KPC} (15,5%) y 2 *bla*_{OXA} (1,6%). Los resultados se confirmaron mediante secuenciación, por la cual se obtuvo el tipo de cada enzima: *bla*_{VIM-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-22} y *bla*_{OXA-48} (figura 19). La distribución de cada enzima según la especie fue la siguiente (figura 20):

***bla*_{VIM-1}**: 62 *K. pneumoniae*, 12 *K. oxytoca*, 9 *E. cloacae*, 4 *E. asburiae*, 14 *S. marcescens*.

***bla*_{KPC-2}**: 14 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 3 *E. cloacae*, 1 *E. aerogenes*.

***bla*_{IMP-22}**: 1 *K. pneumoniae*.

***bla*_{OXA-48}**: 2 *K. pneumoniae*.

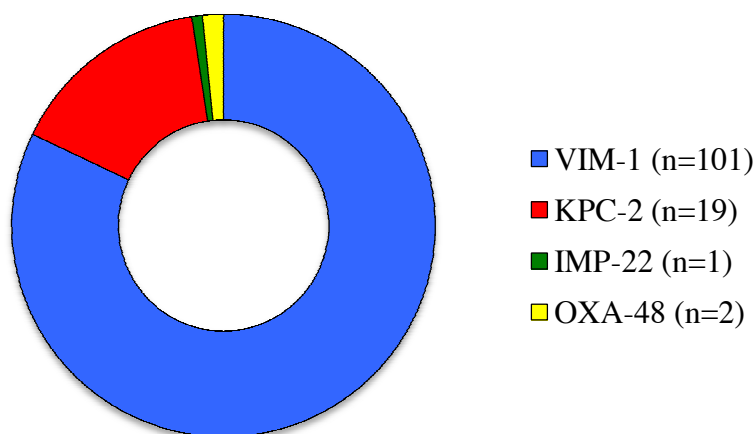
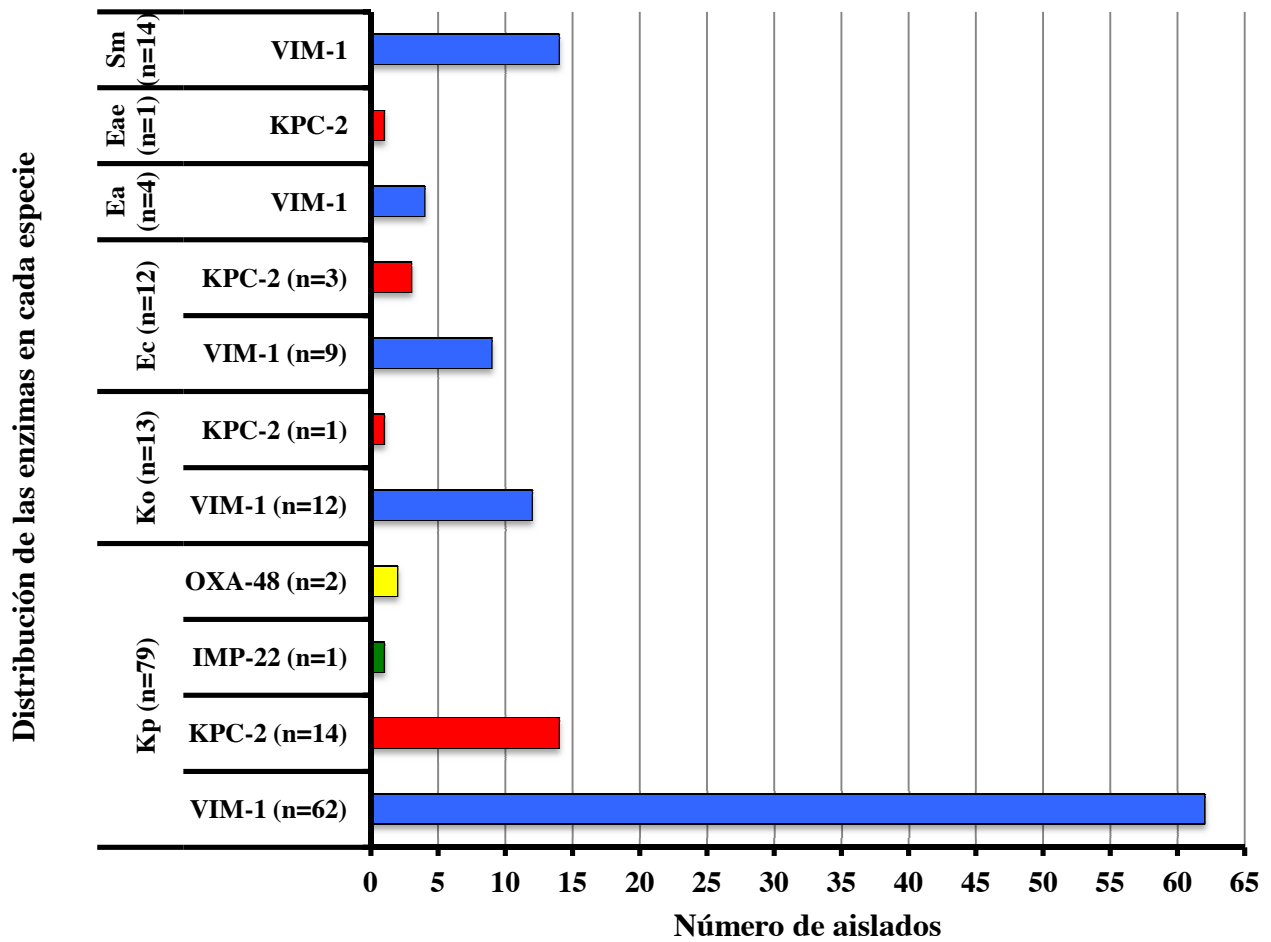


Figura 19. Tipos de carbapenemasas aislados.



Kp: *K. pneumoniae*; *Ko*: *K. oxytoca*; *Ec*: *E. cloacae*; *Ea*: *E. asburiae*; *Eae*: *E. aerogenes*; *Sm*: *S. marcescens*

Figura 20. Distribución de las EPC según la especie y el tipo de enzima.

En la tabla 9 se representa la distribución de las enzimas según la especie en los 2 periodos de recogida: primer periodo (septiembre 2010- septiembre 2011) y segundo periodo (septiembre 2011- septiembre 2012). En el segundo periodo se aislaron 5 EPC más que en el primero. En esta segunda parte de la recogida, hubo más aislados de *K. pneumoniae* (51,9%), *E. cloacae* (75%), y *S. marcescens* (64,3%). Sin embargo, disminuyó el número de aislados de *K. oxytoca* (15,4%). En cuanto a las enzimas, la mayor parte de enzimas VIM-1 se obtuvo en el primer periodo (52,5%) mientras que la

mayoría de KPC-2 se obtuvo en el segundo periodo (73,7%) (figura 21). La única IMP-22 se aisló en la primera parte y las 2 enzimas OXA-48 se aislaron en la segunda.

Tabla 9. Distribución de las enzimas de cada especie en los 2 periodos de recogida.

a)

EPC	2010-2011				
	Número de aislados (%)				
	TOTAL	VIM-1	IMP-22	KPC-2	OXA-48
<i>K. pneumoniae</i> (n=79)	38 (48,1)	33	1	4	0
<i>K. oxytoca</i> (n=13)	11 (84,6)	11	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (n=12)	3 (25)	0	0	1	0
<i>E. asburiae</i> (n=4)	2 (50)	2	0	0	0
<i>E. aerogenes</i> (n=1)	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i> (n=14)	5 (35,7)	5	0	0	0

b)

EPC	2011-2012				
	Número de aislados (%)				
	TOTAL	VIM-1	IMP-22	KPC-2	OXA-48
<i>K. pneumoniae</i> (n=79)	41 (51,9)	29	0	10	2
<i>K. oxytoca</i> (n=13)	2 (15,4)	1	0	1	0
<i>E. cloacae</i> (n=12)	9 (75)	7	0	2	0
<i>E. asburiae</i> (n=4)	2 (50)	2	0	0	0
<i>E. aerogenes</i> (n=1)	1 (100)	0	0	1	0
<i>S. marcescens</i> (n=14)	9 (64,3)	9	0	0	0

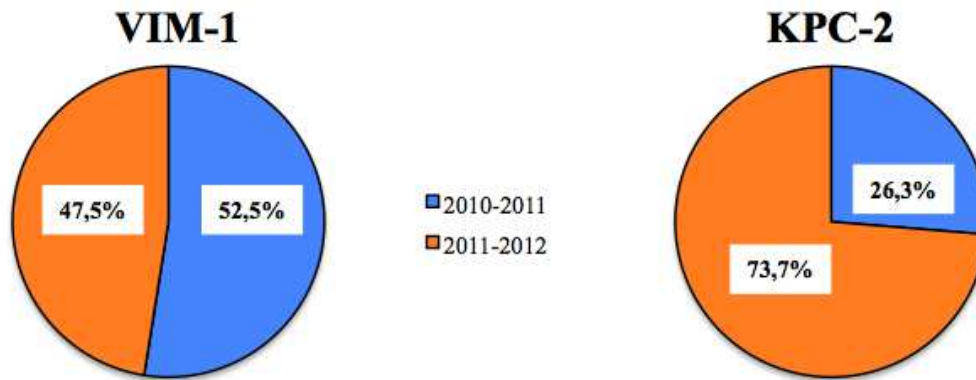
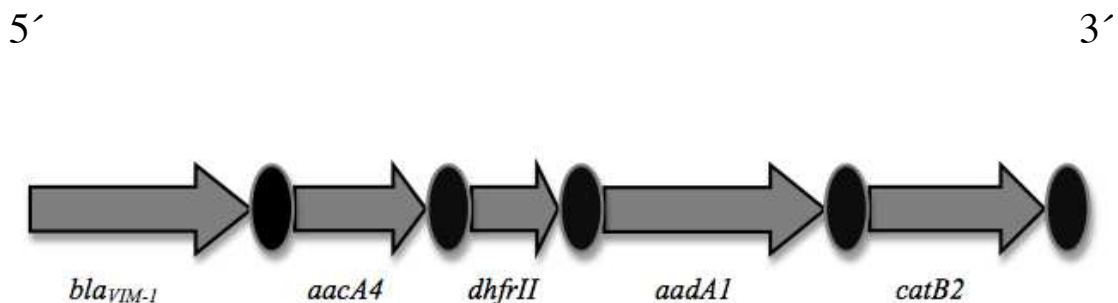


Figura 21. Porcentaje de las enzima VIM-1 y KPC-2 en los dos periodos de recogida.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL INTEGRON CLASE I

Se caracterizó el entorno genético de los genes *bla_{VIM-1}* en 7 aislados de *K. pneumoniae* (5 de los cuales pertenecían al clon mayoritario ST11) y en 4 aislados de *K. oxytoca*. Se identificó un *gene cassette* con un tamaño de 4 kb aproximadamente y que estaba formado por los genes *bla_{VIM-1}*, *aacA4*, *dhfrII*, *aadA1* y *catB2* (figura 22).



bla_{VIM-1}: β-lactamasa VIM-1.

aacA4: aminoglucósido 6'N acetiltransferasa. Confiere resistencia a amikacina, kanamicina y tobramicina.

dhfrII: dihidrofolato reductasa. Confiere resistencia a trimetroprim.

aadA1: aminoglucósido 3'O adeniltransferasa. Confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina.

catB2: cloranfenicol acetiltransferasa. Confiere resistencia a cloranfenicol.

Figura 22. Representación del *gene cassette*.

4. ESTUDIOS DE CLONALIDAD

4.1 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO

Todos los aislados, excepto la cepa de *E. aerogenes*, fueron analizados por PFGE. Entre los 79 aislados de *K. pneumoniae* se identificaron 5 *clusters*, de los cuales 2 fueron mayoritarios (figura 23): el *Cluster A* con 54 aislados y el *Cluster B* con 13 aislados. De acuerdo a las pequeñas diferencias en el patrón de bandas, el *Cluster A* se pudo dividir en 5 subtipos (A1-A5) en los cuales los aislados de los subtipos A1, A2, A3 y A4 fueron productores de la enzima VIM-1 y el aislado del subtipo A5 lo fue de KPC-2. Los 13 aislados del *Cluster B* fueron productores de la enzima KPC-2. Los 2 aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 formaron un mismo *cluster* (*Cluster D*), mientras que la cepa productora de IMP-22 tuvo un patrón de bandas único. El resto de aislados productores de VIM-1 se pudieron agrupar en 2 *cluster* (con 2 aislados y 3 aislados) y en 4 pulsotipos únicos.

Entre los 13 aislados de *K. oxytoca* se observó una gran variabilidad genética con 7 pulsotipos diferentes (figura 24). Esta variabilidad también se ha detectado entre los 16 aislados de *Enterobacter* spp analizados (figuras 25-26). Los 14 aislados de *S. marcescens* se agruparon en 3 *clusters* y un único pulsotipo distinto (figura 27).

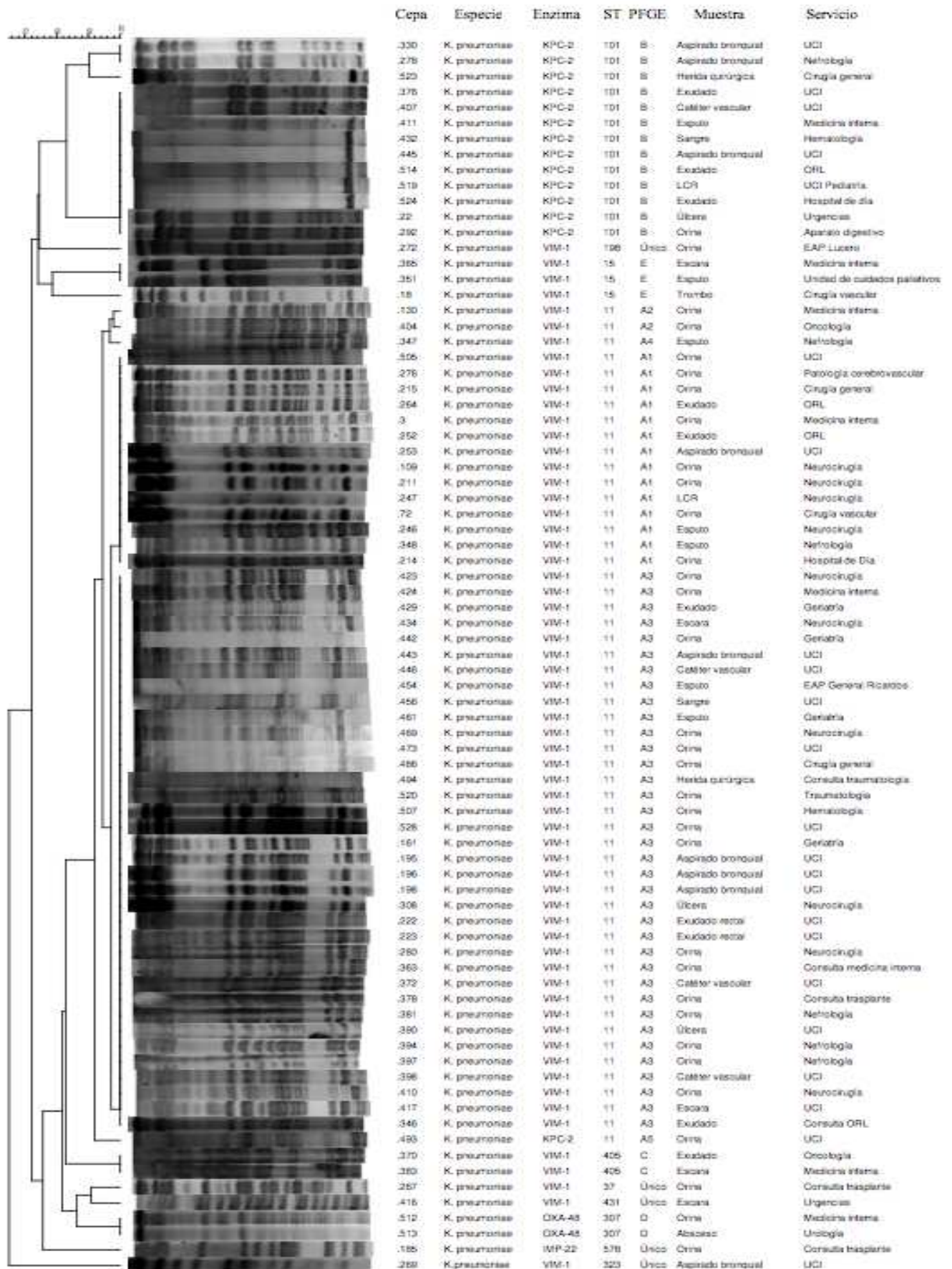


Figura 23. Pulsotipos de los 79 aislados de *K. pneumoniae*.

RESULTADOS

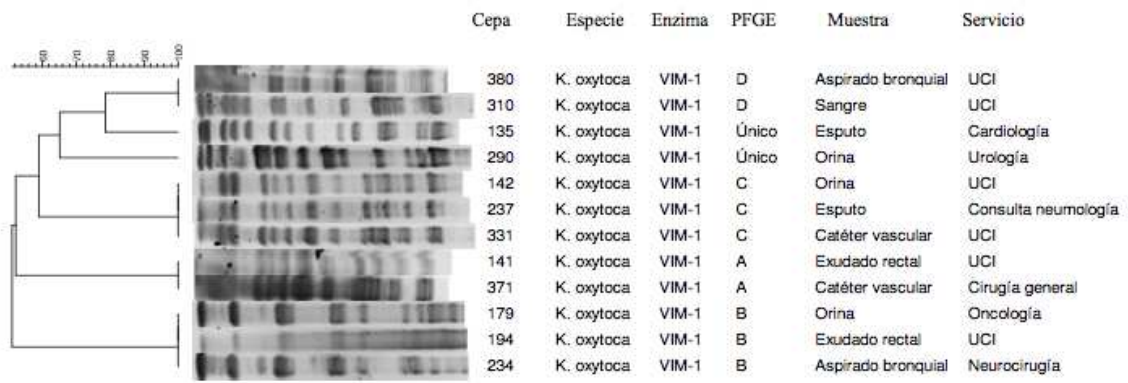


Figura 24. Pulsotipos de 12 aislados de *K. oxytoca*.

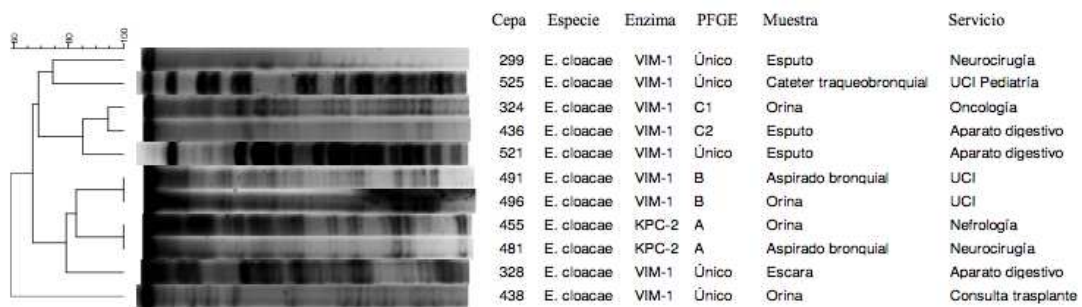


Figura 25. Pulsotipos de 11 aislados de *E. cloacae*.

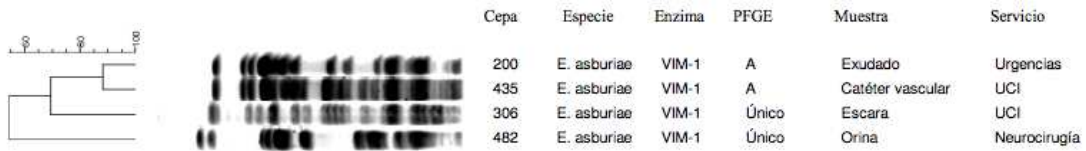


Figura 26. Pulsotipos de 4 aislados de *E. asburiae*.

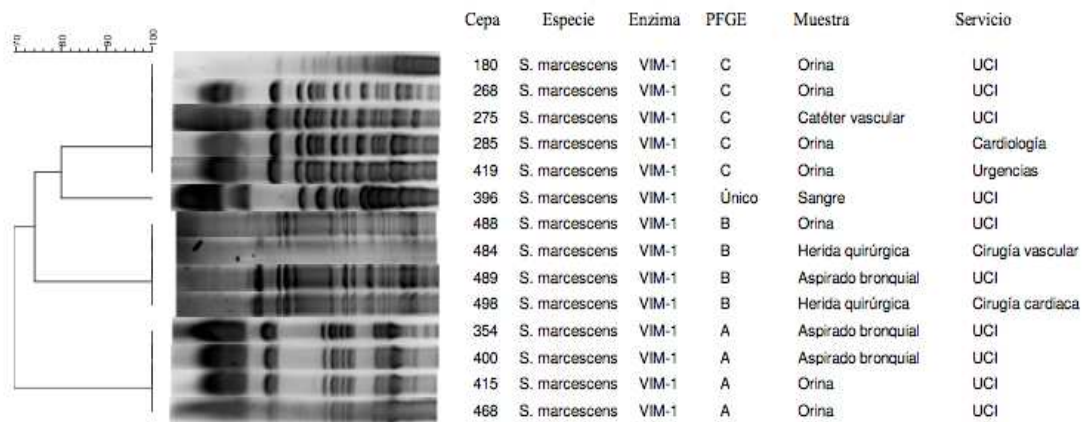


Figura 27. Pulsotipos de 14 aislados de *S. marcescens*.

4.2 TIPIFICACIÓN MULTILOCUS DE SECUENCIA

Se analizó mediante MLST una muestra representativa de aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes a los diferentes pulsotipos encontrados. Se identificaron 10 STs distintos, de los cuales 2 STs fueron los predominantes: el ST11 con 54 aislamientos (68%) y el ST101 con 13 aislamientos (16%). Ver figura 28. Todos los aislados del *Cluster A* pertenecieron al ST11 y los aislados del *Cluster B* al ST101. Las 62 cepas de *K. pneumoniae* productoras de VIM-1 se distribuyeron en 7 STs (ST11, ST15, ST405, ST198, ST323, ST37 y ST431), la cepa productora de IMP-22 en 1 ST (ST578), las 14 cepas productoras de KPC-2 en 2 STs (ST101 y ST11) y las 2 cepas productoras de OXA-48 en 1 ST (ST307).

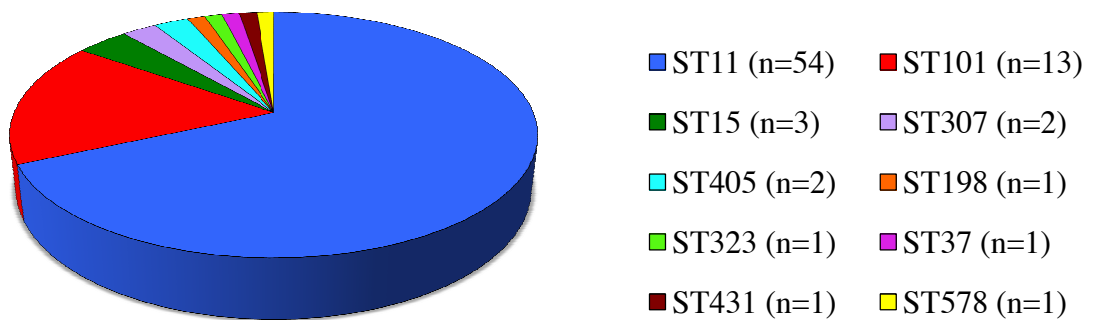


Figura 28. STs de los aislamientos de *K. pneumoniae*.

En la figura 29 se muestran los grupos clonales identificados mediante PFGE y MLST de los aislados de *K. pneumoniae*.

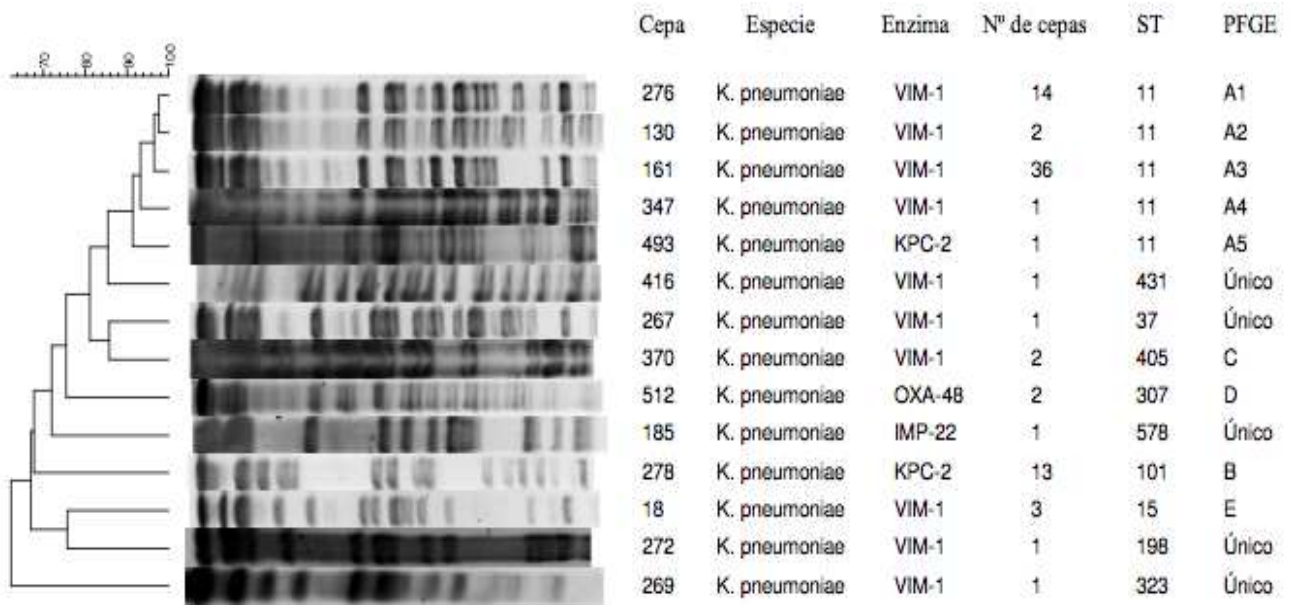


Figura 29. Resumen de los grupos clonales encontrados entre los 79 aislados de *K. pneumoniae*.

Al comparar el número de aislamientos de *K. pneumoniae* con un determinado ST según el periodo de recogida (septiembre 2010-septiembre 2011 y septiembre 2011-septiembre 2012) (tabla 10) se pudo observar que en ambos periodos se aisló aproximadamente el mismo número de *K. pneumoniae* con el ST11. En el caso del ST101 hubo una gran diferencia ya que en el segundo periodo se aislaron 9 cepas, 5 aislados más que en el primero. Respecto a los demás ST, 5 aparecieron en el primer periodo (ST15, ST198, ST323, ST37, ST578) y 2 en el segundo (ST307 y ST431). El ST405 se mantuvo constante debido a que se aisló una cepa en cada periodo. El 53,2% de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de VIM-1 se aisló en la primera parte y el 71,4% de las cepas productoras de KPC-2 en la segunda. La única cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC-2 del ST11 se aisló en la segunda parte del estudio.

Tabla 10. Distribución de los STs de los aislados de *K. pneumoniae* según el periodo de aislamiento.

a)

ST	2010-2011				
	Número de aislados (%)				
	TOTAL (n=38)	VIM-1 (n=33)	IMP-22 (n=1)	KPC-2 (n=4)	OXA-48 (n=0)
ST11 (n=54)	26 (48,2)	26	0	0	0
ST101 (n=13)	4 (30,8)	0	0	4	0
ST15 (n=3)	3 (100)	3	0	0	0
ST307 (n=2)	-	-	-	-	-
ST405 (n=2)	1 (50)	1	0	0	0
ST198 (n=1)	1 (100)	1	0	0	0
ST323 (n=1)	1 (100)	1	0	0	0
ST37 (n=1)	1 (100)	1	0	0	0
ST431 (n=1)	-	-	-	-	-
ST578 (n=1)	1 (100)	0	1	0	0

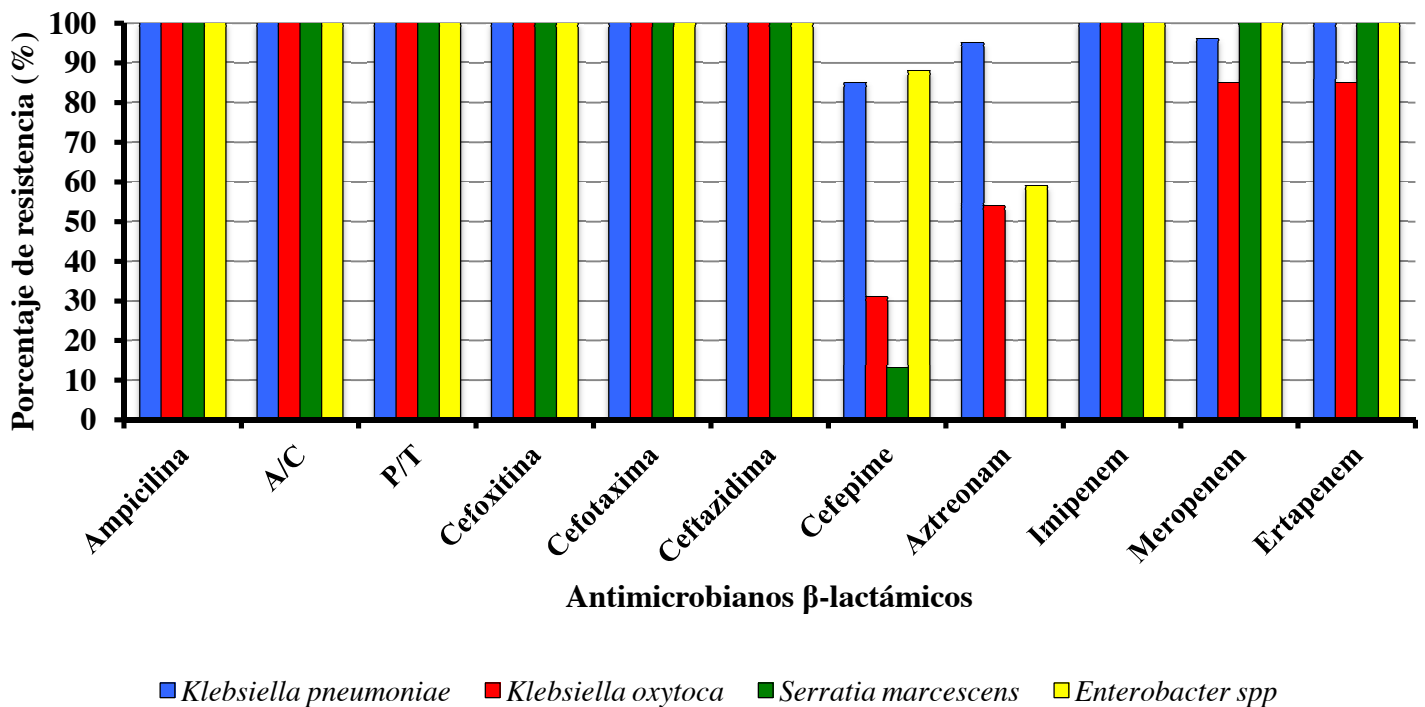
b)

ST	2011-2012				
	Número de aislados (%)				
	TOTAL (n=41)	VIM-1 (n=29)	IMP-22 (n=0)	KPC-2 (n=10)	OXA-48 (n=2)
ST11 (n=54)	28 (51,8)	27	0	1	0
ST101 (n=13)	9 (69,2)	0	0	9	0
ST15 (n=3)	-	-	-	-	-
ST307 (n=2)	2 (100)	0	0	0	2
ST405 (n=2)	1 (50)	1	0	0	0
ST198 (n=1)	-	-	-	-	-
ST323 (n=1)	-	-	-	-	-
ST37 (n=1)	-	-	-	-	-
ST431 (n=1)	1 (100)	1	0	0	0
ST578 (n=1)	-	-	-	-	-

5. MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

5.1 ANTIMICROBIANOS β -LACTÁMICOS

Al aplicar los puntos de corte del CLSI, todos los aislados fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima. Sin embargo, presentaron resistencia variable a cefepime y aztreonam (figura 30). Ningún aislado de *S. marcescens* fue resistente a aztreonam y fue la especie con menor tasa de resistencia a cefepime (13%). Dentro de la especie *K. pneumoniae*, el 100% de los aislados productores de KPC-2 fue resistente a aztreonam mientras que los productores de MBL lo fue en un 95%.



A/C: Amoxicilina/ácido clavulánico; P/T: Piperacilina/tazobactam.

Figura 30. Porcentaje de resistencia a los β -lactámicos según la especie.

En cuanto a los carbapenémicos, todos los aislados fueron resistentes a imipenem. El carbapenémico más activo fue meropenem (4,1% sensibles), siendo un 4% de los aislados de *K. pneumoniae* y un 15% de los aislados de *K. oxytoca* sensibles. Todos los aislados presentaron resistencia a ertapenem, excepto los de *K. oxytoca* en la cual hubo un 15% de sensibles.

En la tabla 11 están recogidos los datos de resistencia a los carbapenémicos diferenciados por especies y por enzimas. El 65% de los aislados resistentes a imipenem y el 71,2% de los resistentes a meropenem presentaron una CMI de 2-8 mg/l, mientras que el 70,2% de los resistentes a ertapenem tuvieron una CMI de 0,5-8 mg/l. La especie con mayor porcentaje de aislados con una CMI de 2-8 mg/l de imipenem fue *K. oxytoca* (92,3%). La especie *S. marcescens* fue la que mayor porcentaje de aislados con una CMI de 2-8 mg/l de meropenem presentó (78,6%), además de que el 100% de los mismos presentó una CMI de 0,5-8 mg/l de ertapenem.

Entre las cepas productoras de enzimas VIM-1, hubo un 100% de resistencia a imipenem, un 96,1% de resistencia a meropenem y un 97,1% de resistencia a ertapenem. El 81,8% de los aislados de VIM-1 resistentes a ertapenem tuvieron una CMI de 0,5-8 mg/l, seguidos por el 73,5% de los resistentes a meropenem con una CMI de 2-8 mg/l. El 100% de las cepas productoras de KPC-2 fueron resistentes a los 3 carbapenémicos, así como la única cepa productora de IMP-22. Los dos aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 presentaron resistencia a imipenem y ertapenem, con una CMI de 2 y 4 mg/l, respectivamente.

Tabla 11. Distribución de aislados resistentes a los 3 carbapenémicos de cada especie y de cada carbapenemasa caracterizada.

EPC / Enzimas	Número de aislados resistentes (%)								
	Imipenem			Meropenem			Ertapenem		
	Total	2-8 mg/l	> 8 mg/l	Total	2-8 mg/l	> 8 mg/l	Total	0,5-8 mg/l	> 8 mg/l
Total (n=123)	123 (100)	80 (65)	43 (35)	118 (95,9)	84 (71,2)	34 (28,8)	121 (98,4)	85 (70,2)	36 (29,8)
<i>K. pneumoniae</i> (n=79)	79 (100)	57 (72,1)	22 (17,9)	76 (96,2)	55 (72,4)	21 (27,6)	79 (100)	49 (62)	30 (38)
<i>K. oxytoca</i> (n=13)	13 (100)	12 (92,3)	1 (7,7)	11 (84,6)	7 (63,6)	4 (36,4)	11 (84,6)	10 (90,9)	1 (9,1)
<i>S. marcescens</i> (n=14)	14 (100)	1 (7,1)	13 (92,9)	14 (100)	11 (78,6)	3 (21,4)	14 (100)	14 (100)	0
<i>Enterobacter spp.</i> (n=17)	17 (100)	10 (58,8)	7 (41,2)	17 (100)	11 (64,7)	6 (35,3)	17 (100)	12 (70,6)	5 (29,4)
VIM-1 (n=102)	102 (100)	67 (65,7)	35 (34,3)	98 (96,1)	72 (73,5)	26 (26,5)	99 (97,1)	81 (81,8)	18 (18,2)
IMP-22 (n=1)	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)	0	1 (100)
KPC-2 (n=19)	19 (100)	11 (57,9)	8 (42,1)	19 (100)	12 (63,2)	7 (36,8)	19 (100)	2 (10,5)	17 (89,5)
OXA-48 (n=2)	2 (100)	2 (100)	0	0	0	0	2 (100)	2 (100)	0

5.1.1 DIFERENCIAS EN LOS PUNTOS DE CORTE PROPUESTOS POR EL CLSI Y POR EL EUCAST PARA LOS CARBAPENÉMICOS

Teniendo en cuenta que los puntos de corte propuestos por el CLSI y por el EUCAST pueden ser diferentes para un mismo antibiótico, en la figura 31 se representa el porcentaje de resistencia de los 123 aislados a los carbapenémicos.

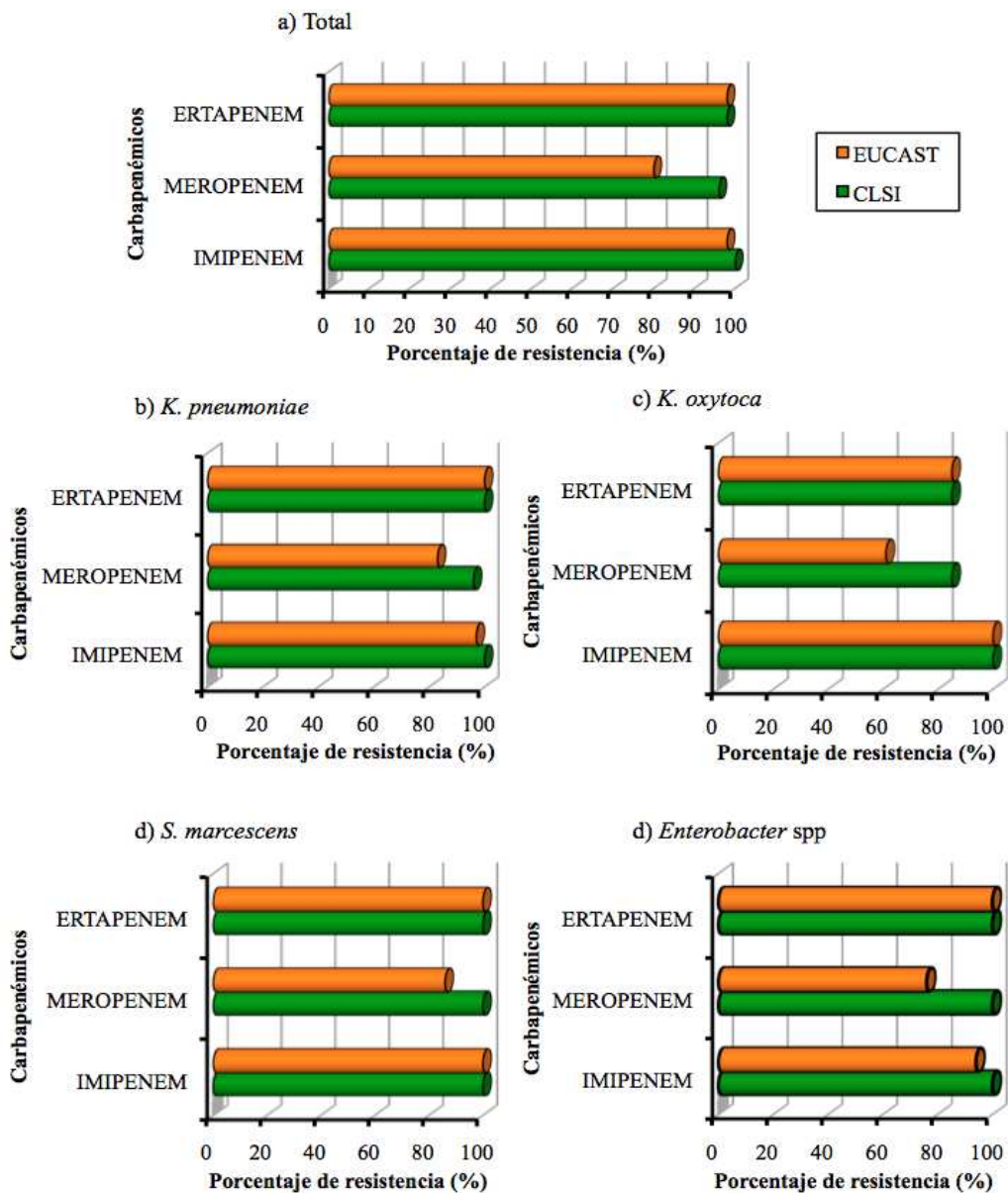


Figura 31. Porcentaje de resistencia de las EPC a los carbapenémicos según el punto de corte propuesto por CLSI o por el EUCAST.

Observamos que el porcentaje de resistencia difiere para meropenem, siendo éste mayor con el punto de corte propuesto por el CLSI (96% CLSI y 80% EUCAST). Las especies con mayor diferencia en los porcentajes de resistencia a este antimicrobiano fueron *K. oxytoca* (85% CLSI y 61% EUCAST) y *Enterobacter* spp. (100% CLSI y 76% EUCAST). En el caso del imipenem, la diferencia del porcentaje de resistencia aplicando ambos puntos de corte fue menor (100% CLSI y 98% EUCAST). La especie más afectada fue *Enterobacter* spp. (100% CLSI y 94% EUCAST). El porcentaje de resistencia a ertapenem fue el mismo con los dos puntos de corte (98%).

5.2 ANTIMICROBIANOS NO β -LACTÁMICOS

Los resultados de resistencia a fosfomicina, tigeciclina, colistina, amikacina, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino de las EPC se representan en la figura 32, así como su evolución en el tiempo. Los puntos de corte utilizados fueron los del CLSI para amikacina, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino y los del EUCAST para fosfomicina, tigeciclina y colistina. Se observaron porcentajes elevados de resistencia a todos los antibióticos ensayados. Los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia fueron ciprofloxacino (87%), tobramicina (61%) y gentamicina (37,4%). Los antibióticos más activos fueron amikacina con 17,1% de resistencia (16% intermedias) y fosfomicina con 19,5%.

Cabe destacar el elevado porcentaje de resistencia a tigeciclina, un 36,6% (16% intermedias) y a colistina, 24,8%, en este caso sin incluir las cepas de *S. marcescens* que se consideran intrínsecamente resistentes a colistina.

Dos aislados de *K. pneumoniae* fueron resistentes a todos los antimicrobianos testados y 4 fueron resistentes a todos excepto a fosfomicina.

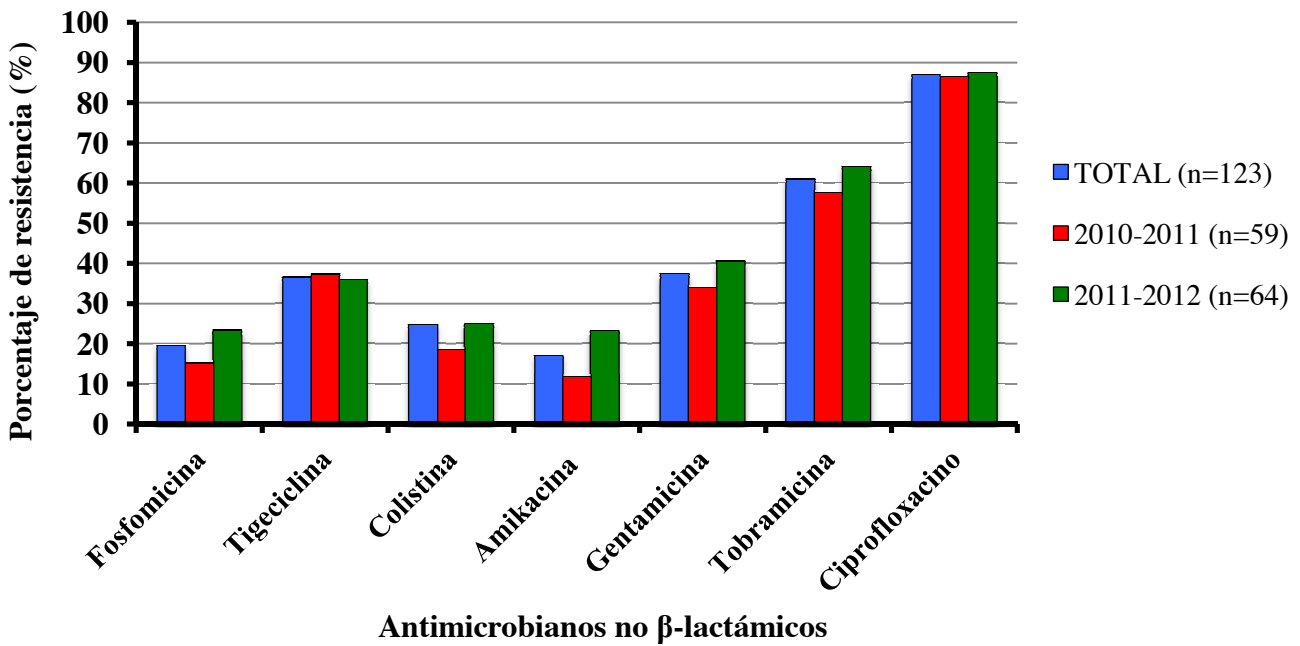


Figura 32. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de las EPC y su evolución en el tiempo.

Con respecto a su evolución en el tiempo, la resistencia a tigeciclina y ciprofloxacino se mantuvo constante en ambos periodos de recogida, aproximadamente el 37% y 87%, respectivamente. La resistencia aumentó en el segundo año para los demás. El antimicrobiano más afectado fue la amikacina, que pasó de un 11,9% a un 23,3%; en cambio, la colistina fue el menos afectado (de un 18,6% a un 25%), seguido por la tobramicina (de un 57,6% a un 64,1%).

En la figura 33 y tabla 12 se muestran la resistencia de las distintas especies. Los aislados de *K. pneumoniae* fueron muy resistentes a ciprofloxacino y tobramicina con 92,4% y 75,9% de resistencia respectivamente. Esta especie fue la que presentó el mayor porcentaje de resistencia a tigeciclina con un 45,6% (19% intermedias).

No hubo ningún aislado de *K. oxytoca* resistente a amikacina. Esta especie presentó los valores más bajos de resistencia a tigeciclina (15,5%), colistina (7,7%) y tobramicina (15,4%).

La especie *S. marcescens*, no tuvo ningún aislado resistente a fosfomicina ni amikacina. Presentó un 42,9% de resistencia a ciprofloxacino, siendo este el menor porcentaje a este antimicrobiano obtenido por especies.

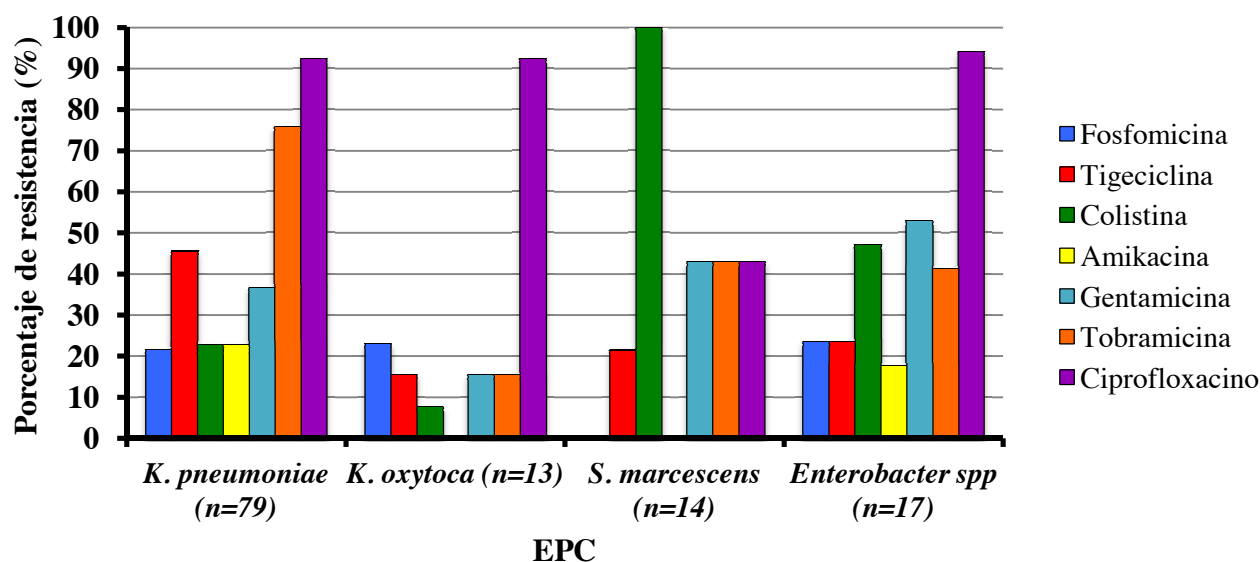
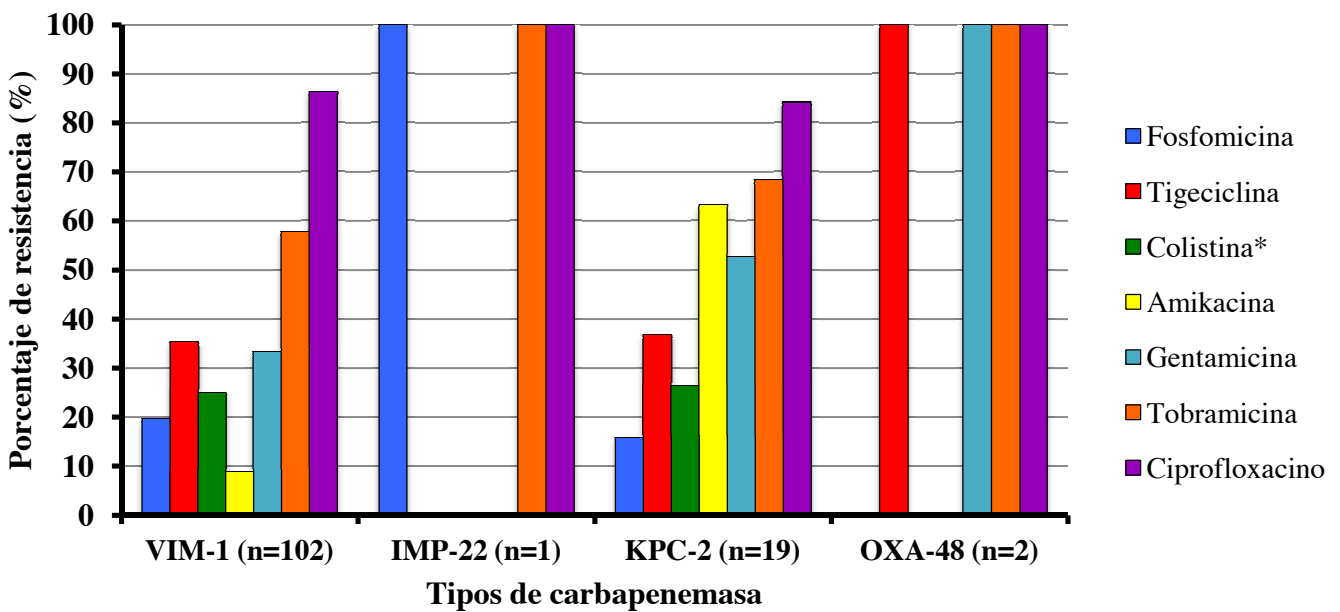


Figura 33. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens* y *Enterobacter spp*.

Tabla 12. Distribución de los aislados resistentes a los antimicrobianos no β -lactámicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens* y *Enterobacter spp*.

Antimicrobianos no β -lactámicos	Número de aislados resistentes (%)				
	Total (n=123)	<i>K. pneumoniae</i> (n=79)	<i>K. oxytoca</i> (n=13)	<i>S. marcescens</i> (n=14)	<i>Enterobacter spp.</i> (n=17)
Fosfomicina	24 (19,5)	17 (21,5)	3 (23)	0	4 (23,5)
Tigeciclina	45 (36,6)	36 (45,6)	2 (15,4)	3 (21,4)	4 (23,5)
Colistina	27/109 (24,8)	18 (22,8)	1 (7,7)	14 (100)	8 (47,1)
Amikacina	21 (17,1)	18 (22,8)	0	0	3 (17,6)
Gentamicina	46 (37,4)	29 (36,7)	2 (15,4)	6 (42,9)	9 (52,9)
Tobramicina	75 (61)	60 (75,9)	2 (15,4)	6 (42,9)	7 (41,2)
Ciprofloxacino	107 (87)	73 (92,4)	12 (92,3)	6 (42,9)	16 (94,1)

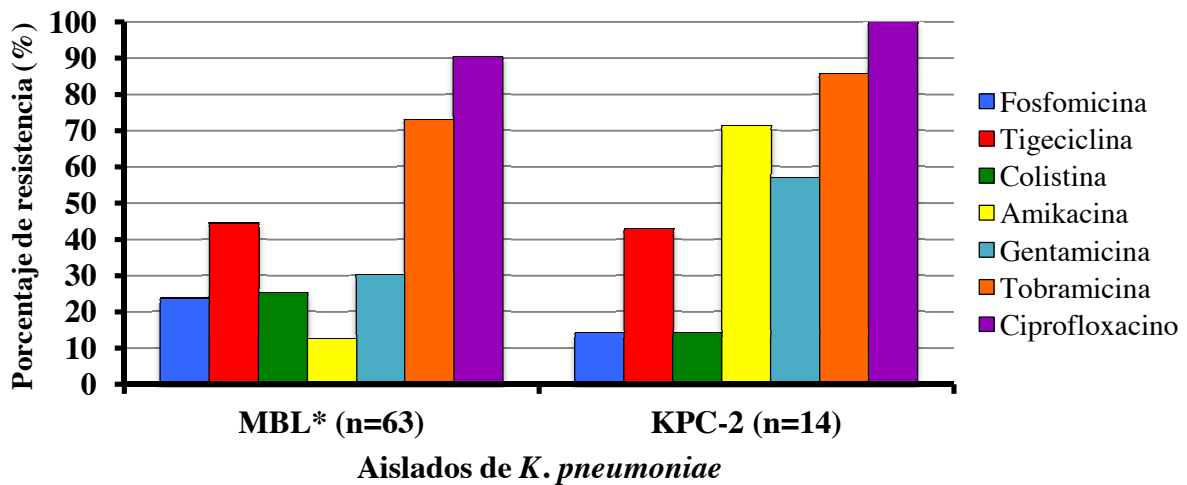
En la figura 34 se pueden ver los porcentajes de resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos distribuidos por el tipo de carbapenemasa caracterizada. Entre las enzimas VIM-1 y KPC-2 apenas hubo diferencias entre los porcentajes de resistencia a estos antimicrobianos, excepto amikacina (8,8% VIM-1 y 63% KPC-2), gentamicina (33,3% VIM-1 y 52,6% KPC-2) y tobramicina (57,8% VIM-1 y 68,4% KPC-2). El único aislado productor de IMP-22 presentó resistencia a fosfomicina, tobramicina y ciprofloxacino. Los 2 aislados productores de OXA-48 no presentaron resistencia a fosfomicina, colistina y amikacina.



*Porcentaje calculado sin tener en cuenta los 14 aislados de *S. marcescens* productores de VIM-1.

Figura 34. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos distribuidos por el tipo de carbapenemasa

En la figura 35 se muestran los porcentajes de resistencia de *K.pneumoniae* de acuerdo a los tipos de carbapenemasa MBL y KPC-2. Se observaron diferencias significativas en los porcentajes de resistencia. La resistencia a amikacina y gentamicina fue mayor en las cepas productoras de KPC mientras que las cepas productoras de MBL fueron más resistentes a fosfomicina y colistina.



* VIM-1 (n=62) e IMP-22 (n=1).

Figura 35. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de los aislados de *K. pneumoniae* productores de MBL y de KPC-2.

En la figura 36 se observan los porcentajes de resistencia por especies y diferenciando los dos periodos de estudio. Las 2 especies que tuvieron un incremento en el porcentaje de la resistencia a todos los antimicrobianos (en mayor o menor medida) fueron *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. Los aislados de *K. oxytoca* aumentaron su porcentaje de resistencia a fosfomicina y gentamicina y lo disminuyeron en el resto, no encontrándose ningún aislado resistente a tigeciclina, colistina y tobramicina. La especie *S. marcescens* disminuyó su porcentaje a tigeciclina y tobramicina. Sin embargo, en el segundo periodo se obtuvieron los aislados resistentes a gentamicina y ciprofloxacino.

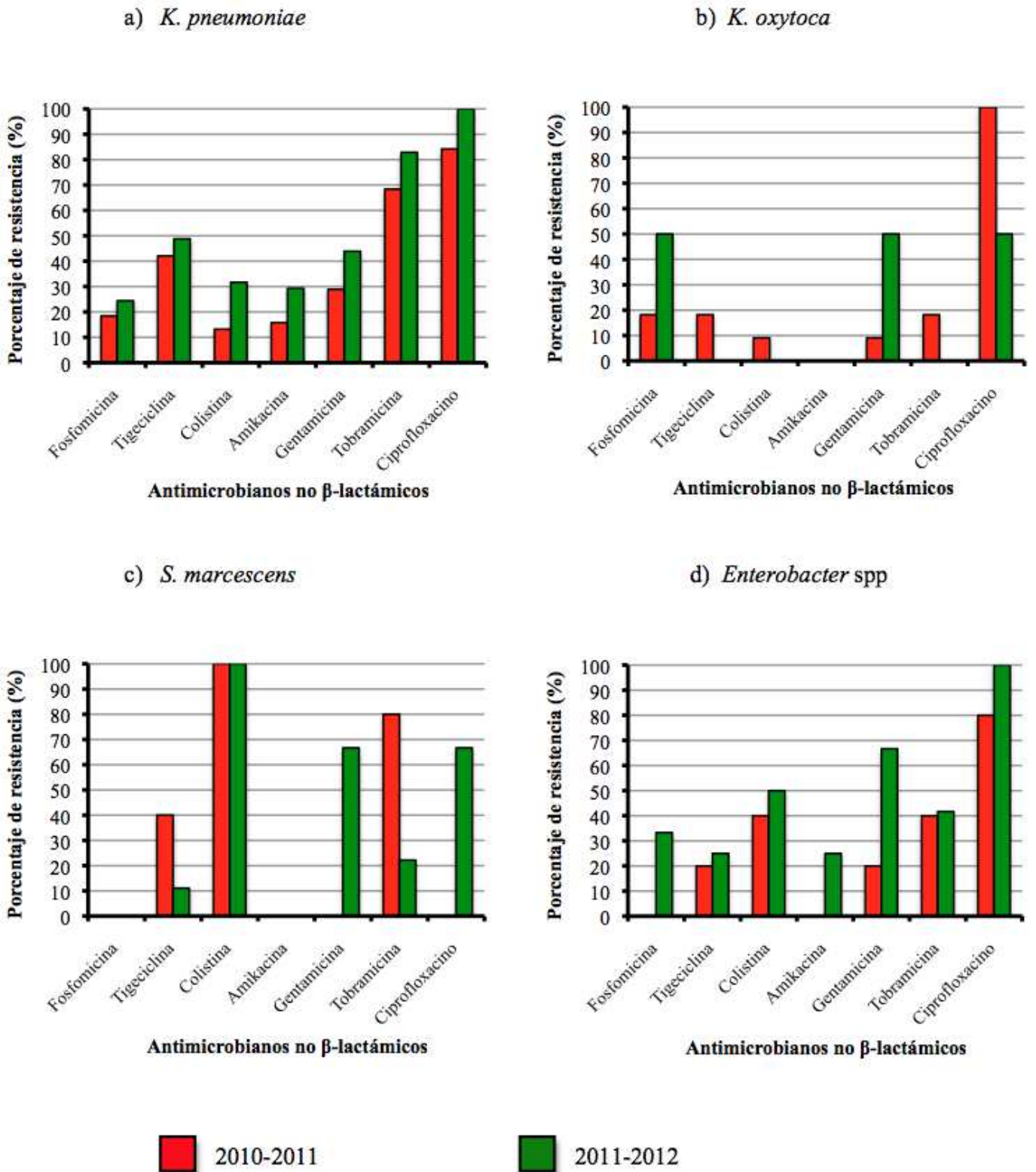


Figura 36. Evolución en los porcentajes de resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens* y *Enterobacter* spp.

5.2.1 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS NO β -LACTÁMICOS DE LOS AISLADOS DE *K. pneumoniae* DE CADA ST

En la tabla 13 se expone la resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de los aislados de *K. pneumoniae* de cada ST. Al comparar los aislados de los 2 STs mayoritarios (ST11 y ST101), el mayor porcentaje de resistencia a fosfomicina (25,9%) y colistina (27,8%) se observó en los aislados del ST11. En cambio, los aislados del ST101 presentaron el mayor porcentaje de resistencia a amikacina (69,2%), gentamicina (100%), tobramicina (84,6%) y ciprofloxacino (100%). Entre los aminoglucósidos hubo una gran diferencia en la diversidad de los STs que presentaron resistencia, ya que amikacina fue el antimicrobiano con menos STs distintos implicados (2 STs) y tobramicina con más (8 STs).

Si se comparan los 2 periodos de aislamiento (tabla 14), la resistencia total de los aislados de *K. pneumoniae* aumentó en el segundo periodo. Este incremento de la resistencia no supuso un aumento en la diversidad de STs, de hecho, disminuyó en la mayor parte de los antimicrobianos, excepto en colistina y amikacina que en ambos periodos hubo 2 STs. El ST11 aumentó su porcentaje de resistencia a todos los antimicrobianos con excepción de tigeciclina, que disminuyó (de un 50% pasó a un 42,9%). El ST101, en el segundo periodo (al contrario que en el primero) presentó resistencia a fosfomicina, tigeciclina y colistina.

Tabla 13. Distribución de la resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de cada STs de los aislados de *K. pneumoniae*.

ST	Carbapenemasa	Número de aislados resistentes (%)						
		Fosfomicina	Tigeciclina	Colistina	Amikacina	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino
ST11 (n=54)	VIM-1 (n=53)/KPC-2 (n=1)	14 (25,9)	25 (46,3)	15 (27,8)	9 (16,7)	10 (18,5)	41 (75,9)	50 (92,6)
ST101 (n=13)	KPC-2	1 (7,7)	6 (46,1)	2 (15,4)	9 (69,2)	13 (100)	11 (84,6)	13 (100)
ST405 (n=2)	VIM-1	0	0	0	0	2 (100)	2 (100)	2 (100)
ST307 (n=2)	OXA-48	0	2 (100)	0	0	2 (100)	2 (100)	2 (100)
ST15 (n=3)	VIM-1	1 (100)	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0	0	3 (100)
ST198 (n=1)	VIM-1	0	1 (100)	0	0	1 (100)	1 (100)	0
ST37 (n=1)	VIM-1	0	1 (100)	0	0	0	0	0
ST323 (n=1)	VIM-1	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)
ST578 (n=1)	IMP-22	1 (100)	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)
ST431 (n=1)	VIM-1	0	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)

Tabla 14. Distribución de la resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos de cada ST de los aislados de *K. pneumoniae* según el periodo de aislamiento.

a)

ST	Carbapenemasa	2010-2011						
		Número de aislados resistentes (%)						
		Fosfomicina	Tigeciclina	Colistina	Amikacina	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino
ST11 (n=26)	VIM-1	5 (19,2)	13 (50)	4 (15,4)	2 (7,7)	4 (15,4)	18 (69,2)	22 (84,6)
ST101 (n=4)	KPC-2	0	0	0	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)
ST405 (n=1)	VIM-1	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)
ST307 (n=0)	OXA-48	-	-	-	-	-	-	-
ST15 (n=3)	VIM-1	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0	0	3 (100)
ST198 (n=1)	VIM-1	0	1 (100)	0	0	1 (100)	1 (100)	0
ST37 (n=1)	VIM-1	0	1 (100)	0	0	0	0	0
ST323 (n=1)	VIM-1	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)
ST578 (n=1)	IMP-22	1 (100)	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)
ST431 (n=0)	VIM-1	-	-	-	-	-	-	-

b)

ST	Carbapenemasa	2011-2012						
		Número de aislados resistentes (%)						
		Fosfomicina	Tigeciclina	Colistina	Amikacina	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino
ST11 (n=28)	VIM-1 (n=27)/KPC-2 (n=1)	9 (32,1)	12 (42,9)	11 (39,3)	4 (14,3)	6 (21,4)	23 (82,1)	28 (100)
ST101 (n=9)	KPC-2	1 (11,1)	6 (66,7)	2 (22,2)	8 (88,9)	9 (100)	7 (77,8)	9 (100)
ST405 (n=1)	VIM-1	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)
ST307 (n=2)	OXA-48	0	2 (100)	0	0	2 (100)	2 (100)	2 (100)
ST15 (n=0)	VIM-1	-	-	-	-	-	-	-
ST198 (n=0)	VIM-1	-	-	-	-	-	-	-
ST37 (n=0)	VIM-1	-	-	-	-	-	-	-
ST323 (n=0)	VIM-1	-	-	-	-	-	-	-
ST578 (n=0)	IMP-22	-	-	-	-	-	-	-
ST431 (n=1)	VIM-1	0	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)

5.3 ACTIVIDAD *IN VITRO* DE PLAZOMICINA

La actividad *in vitro* de plazomicina se comparó con la de amikacina, gentamicina y tobramicina frente a las 123 EPC. El número y porcentaje acumulado de cepas inhibidas en cada valor de CMI, la CMI₅₀, CMI₉₀ y rango de acuerdo a la especie y tipo de carbapenemasa se muestran en la tabla 15. Las CMI de plazomicina fue de ≤ 2 mg/l frente a prácticamente el 99% de todos los aislamientos. Todas las cepas de *K. pneumoniae* fueron inhibidas por ≤ 1 mg/l de plazomicina, independientemente del tipo de carbapenemasa. Sólo dos aislados de *S. marcescens* mostraron valores de CMI de plazomicina de 4 mg/l.

De acuerdo con el valor de la CMI₉₀, plazomicina fue cuatro veces más activa que amikacina, seis veces más activa que tobramicina y ocho veces más activa que gentamicina frente a las EPC.

Como vemos en la tabla 15, las EPC presentaron, en conjunto, un intervalo de CMIs a plazomicina desde $\leq 0,125 - 4$ mg/l, con una CMI₅₀ de 0,25 y una CMI₉₀ de 1 mg/l, siendo estos datos significativamente más bajos que los de gentamicina, tobramicina y amikacina que también aparecen en la tabla. Al separar las CMI por especies el valor más alto, de 4 mg/l, sólo lo presentaron 2 aislados de *S. marcescens*.

Tabla 15. Distribución de CMIs, intervalo, CMI₅₀ y CMI₉₀ de gentamicina, tobramicina, amikacina y plazomicina en relación a la especie y tipo de carbapenemasa (página siguiente)

Antimicrobiano/ Carbapenemasa/ Especie	Número de aislados con la CMI (mg/l) indicada (n° acumulado)											Intervalo (mg/l)	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	
	≤0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128				≥256
GENTAMICINA															
TOTAL (123)			1 (1)	27 (28)	43 (71)	6 (77)	8 (85)	1 (86)	6 (92)	8 (100)	17	6 (123)	0,5 - ≥256	2	128
<i>K. pneumoniae</i> (79)			1 (1)	19 (20)	28 (48)	2 (50)	1 (51)		3 (54)	4 (58)	17 (75)	4 (79)	0,5 - ≥256	2	128
MBL (63)			1(1)	16 (17)	25 (42)	2 (44)	1 (45)		2 (47)	3 (50)	12 (62)	1 (63)	0,5 - ≥256	2	128
KPC-2 (14)				3 (3)	3 (6)						5 (11)	3 (14)	1 - ≥256	128	≥256
OXA-48 (2)									1 (1)	1 (2)			32 - 64	32	64
<i>K. oxytoca</i> (13)				3 (3)	8 (11)		1 (12)		1 (13)				1 - 32	2	8
<i>S. marcescens</i> (14)				1 (1)	6 (7)	1 (8)	6 (14)						1 - 8	2	8
<i>Enterobacter</i> spp.(17)				4 (4)	1 (5)	3 (8)		1 (9)	2 (11)	4 (15)		2 (17)	1 - ≥256	16	64
TOBRAMICINA															
TOTAL (123)					5 (5)	43 (48)	23 (71)	29	18	4 (122)	1 (123)		2 - 128	8	32
<i>K. pneumoniae</i> (79)					3 (3)	16 (19)	16 (35)	23 (58)	16 (74)	4 (78)	1 (79)		2 - 128	16	32
MBL (63)					3 (3)	14 (17)	16 (33)	20 (53)	8 (61)	1 (62)	1 (63)		2 - 128	8	32
KPC-2 (14)						2 (2)		1 (3)	8 (11)	3 (14)			4 - 64	32	64
OXA-48 (2)								2 (2)					16	16	16
<i>K. oxytoca</i> (13)					2 (2)	9 (11)		2 (13)					2 - 16	4	16
<i>S. marcescens</i> (14)						8 (8)	4 (12)		2 (14)				4 - 32	4	32
<i>Enterobacter</i> spp.(17)						10 (10)	3 (13)	4 (17)					4 - 16	4	16
AMIKACINA															
TOTAL (123)				1 (1)	36 (37)	21 (58)	29 (87)	15	20	1 (123)			1 - 64	8	32
<i>K. pneumoniae</i> (79)				1 (1)	16 (17)	5 (22)	25 (47)	14 (61)	17 (78)	1 (79)			1 - 64	8	32
MBL (63)				1 (1)	16 (17)	3 (20)	23 (43)	12 (55)	8 (63)				1 - 32	8	32
KPC-2 (14)							2 (2)	2 (4)	9 (13)	1 (14)			8 - 64	32	32
OXA-48 (2)						2 (2)							4	4	4
<i>K. oxytoca</i> (13)					9 (9)	3 (12)	1 (13)						2 - 8	2	4
<i>S. marcescens</i> (14)					1 (1)	9 (10)	2 (12)	2 (14)					2 - 16	4	16
<i>Enterobacter</i> spp.(17)					9 (10)	4 (13)	1 (14)		3 (17)				2 - 32	2	32
PLAZOMICINA															
TOTAL (123)	9 (9)	79 (88)	21	11	1 (121)	2 (123)							≤0,125 - 4	0,25	1
<i>K. pneumoniae</i> (79)	7 (7)	58 (65)	11 (76)	3 (79)									≤0,125 - 1	0,25	0,5
MBL (63)	1 (1)	49 (50)	11 (61)	2 (63)									≤0,125 - 1	0,25	0,5
KPC-2 (14)	6 (6)	7 (13)		1 (14)									≤0,125 - 1	0,25	0,25
OXA-48 (2)			2 (2)										0,5	0,5	0,5
<i>K. oxytoca</i> (13)		6 (6)	7 (13)										≤0,25 - 0,5	0,5	0,5
<i>S. marcescens</i> (14)		1 (1)	2 (3)	8 (11)	1 (12)	2 (14)							0,25 - 4	1	4
<i>Enterobacter</i> spp.(17)	2 (2)	14 (16)	1 (17)										≤0,125 - 0,5	0,25	0,25

5.3.1 ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LAS COMBINACIONES DE PLAZOMICINA CON 4 ANTIMICROBIANOS

- **TABLERO DE AJEDREZ**

Se estudió el efecto sinérgico de las combinaciones plazomicina con fosfomicina, colistina tigeclina y meropenem de 6 aislados mediante la técnica del tablero de ajedrez. Las características de los aislados seleccionados se representan en la tabla 16. Todos los aislados presentaron una CMI ≤ 1 mg/l a plazomicina. La mitad de los aislados presentaron resistencia a 3 de los 4 antimicrobianos seleccionados para evaluar el efecto sinérgico con la plazomicina, mientras que 2 de los 6 aislados fueron resistentes a los 4 antimicrobianos.

Tabla 16. Características de los aislados seleccionados para evaluar el efecto sinérgico de la plazomicina con fosfomicina, colistina, tigeclina y meropenem.

Cepa	Carbapenemasa	ST	CMI (mg/l)				
			Plazomicina	Fosfomicina	Colistina	Tigeclina	Meropenem
365	VIM-1	15	1	128	>16	1	128
432	KPC-2	101	0,25	32	>16	2	128
434	VIM-1	11	0,5	>256	8	0,5	128
446	VIM-1	11	0,5	256	>16	2	>128
514	KPC-1	101	1	16	0,5	4	4
528	VIM-1	11	0,25	256	>16	2	>128

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos para cada aislado y cada antimicrobiano.

Tabla 17. Actividad obtenida de la combinación de plazomicina con fosfomicina, colistina, tigeciclina y meropenem para cada aislado.

Cepa	Antimicrobiano	Valor del menor ΣFIC	Interpretación
365	Fosfomicina	1	Indiferencia
	Colistina	0,8	Sinergia parcial
	Tigeciclina	0,6	Sinergia parcial
	Meropenem	1	Indiferencia
432	Fosfomicina	0,6	Sinergia parcial
	Colistina	0,7	Sinergia parcial
	Tigeciclina	1,1	Indiferencia
	Meropenem	1	Indiferencia
434	Fosfomicina	0,5	Sinergia
	Colistina	0,3	Sinergia
	Tigeciclina	1	Indiferencia
	Meropenem	0,5	Sinergia
446	Fosfomicina	0,3	Sinergia
	Colistina	0,3	Sinergia
	Tigeciclina	0,8	Sinergia parcial
	Meropenem	0,5	Sinergia
514	Fosfomicina	0,5	Sinergia
	Colistina	1,1	Indiferencia
	Tigeciclina	0,7	Sinergia parcial
	Meropenem	0,7	Sinergia parcial
528	Fosfomicina	0,5	Sinergia
	Colistina	0,4	Sinergia
	Tigeciclina	0,7	Sinergia parcial
	Meropenem	0,6	Sinergia parcial

El 83% de los aislados seleccionados presentó un efecto sinérgico con las combinaciones de plazomicina-fosfomicina (1 cepa: sinergia parcial y 4 cepas: sinergia) y plazomicina-colistina (2 cepas: sinergia parcial y 3 cepas: sinergia), mientras que el 67% lo presentó con plazomicina-tigeciclina (4 cepas: sinergia parcial) y plazomicina-meropenem (2 cepas: sinergia parcial y 2 cepas: sinergia). Esta sinergia se alcanzó con concentraciones de los antimicrobianos menores o iguales que las C_{ss} respectivas en un 78% de los casos (tabla 18). La tigeciclina fue el antimicrobiano que presentó sinergia parcial con concentraciones superiores a la C_{ss} en 3 de los 4 aislados con sinergia.

Además, el rango de diluciones en el cual se detectó este sinergismo fue estrecho en el 100% de los aislados con la combinación plazomicina-tigeciclina.

El 100% de los aislados sensibles a colistina y el 50% de los aislados sensibles a tigeciclina presentaron un efecto de indiferencia con la combinación plazomicina-colistina y plazomicina-tigeciclina, respectivamente. Entre los aislados resistentes, el efecto sinérgico fue mayor que el efecto indiferente (el 75% de sinergia con fosfomicina, el 100% con colistina, el 75% con tigeciclina y el 67% con meropenem).

Tabla 18. Distribución de los aislados según la actividad de los siguientes antimicrobianos combinados con la plazomicina así como las características de la actividad sinérgica.

Antimicrobiano	Interpretación	Número de aislados (%)					
		Total	Sensibles	Resistentes	≤ C _{ss}	A	E
Fosfomicina	Sinergia	5/6 (83)	2/2 (100)	3/4 (75)	5/5	3/5 (60)	2/5 (40)
	Indiferencia	1/6 (17)	0/2 (0)	1/4 (25)			
Colistina	Sinergia	5/6 (83)	0/1 (0)	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	2/5 (40)
	Indiferencia	1/6 (17)	1/1 (100)	0/5 (0)			
Tigeciclina	Sinergia	4/6 (67)	1/2 (50)	3/4 (75)	1/4 (25)	0/4 (0)	4/4(100)
	Indiferencia	2/6 (33)	1/2 (50)	1/4 (25)			
Meropenem	Sinergia	4/6 (67)	0 (0)	4/6 (67)	4/4	2/4 (50)	2/4 (50)
	Indiferencia	2/6 (33)	0 (0)	2/6 (33)			

≤ C_{ss}: Concentración steady state (C_{ss} fosfomicina: 100 mg/l, C_{ss} colistina: 5 mg/l, C_{ss} tigeciclina: 0,125 mg/l, C_{ss} meropenem: 10 mg/l). Distribución de los aislados que presentaron sinergia en concentraciones de antimicrobiano menor o igual a la C_{ss} del mismo antimicrobiano alcanzada en plasma; **A**: Amplia ventana de diluciones. Distribución de los aislados que presentaron sinergia en más de 6 diluciones; **E**: Estrecha ventana de diluciones. Distribución de los aislados que presentaron sinergia en menos de 6 diluciones.

En las figuras 37 y 38 se representan ejemplos del efecto sinérgico e indiferente con la combinación de la plazomicina con los 4 antimicrobianos.

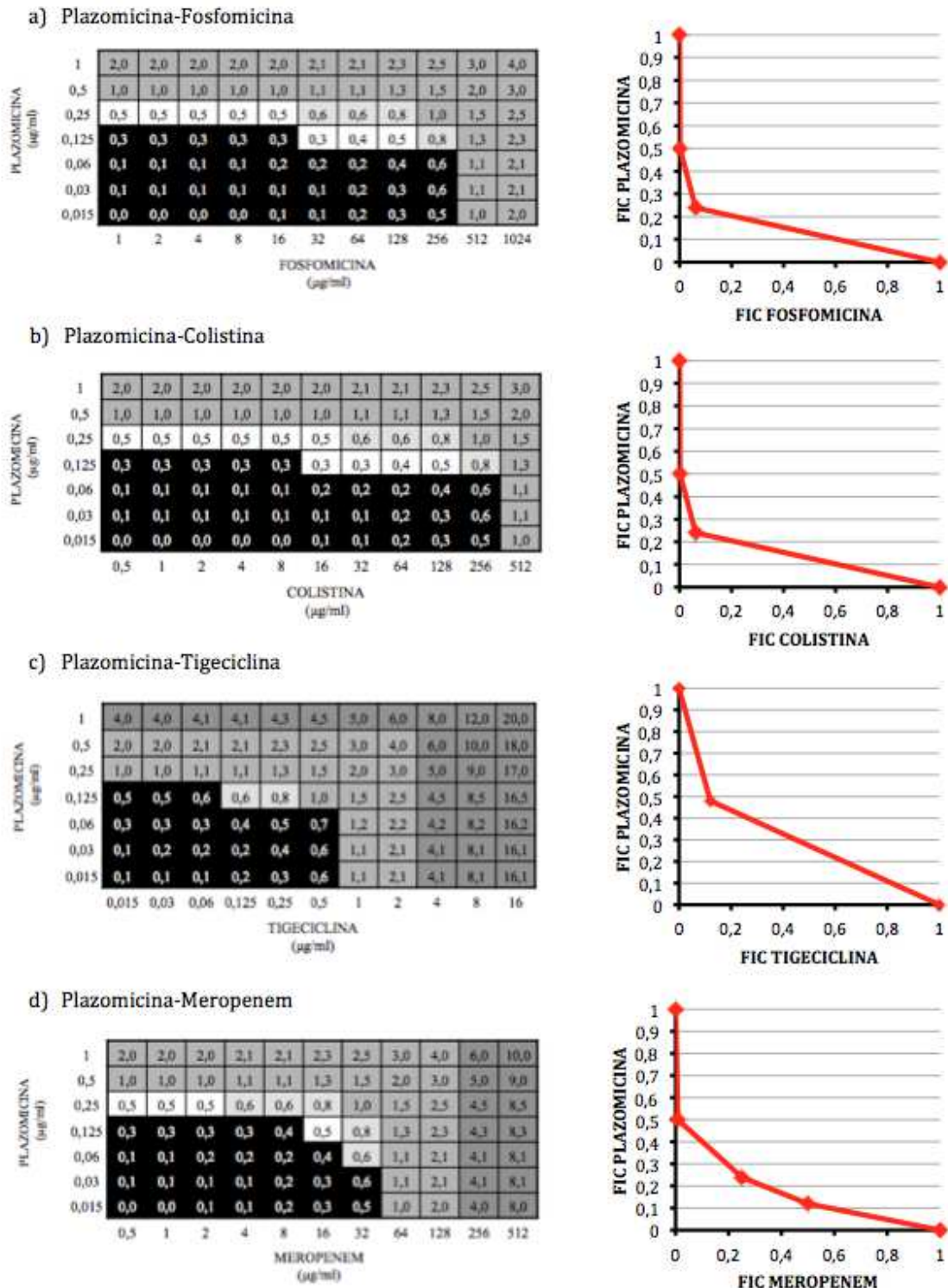


Figura 37. Ejemplos de la actividad sinérgica para cada combinación.

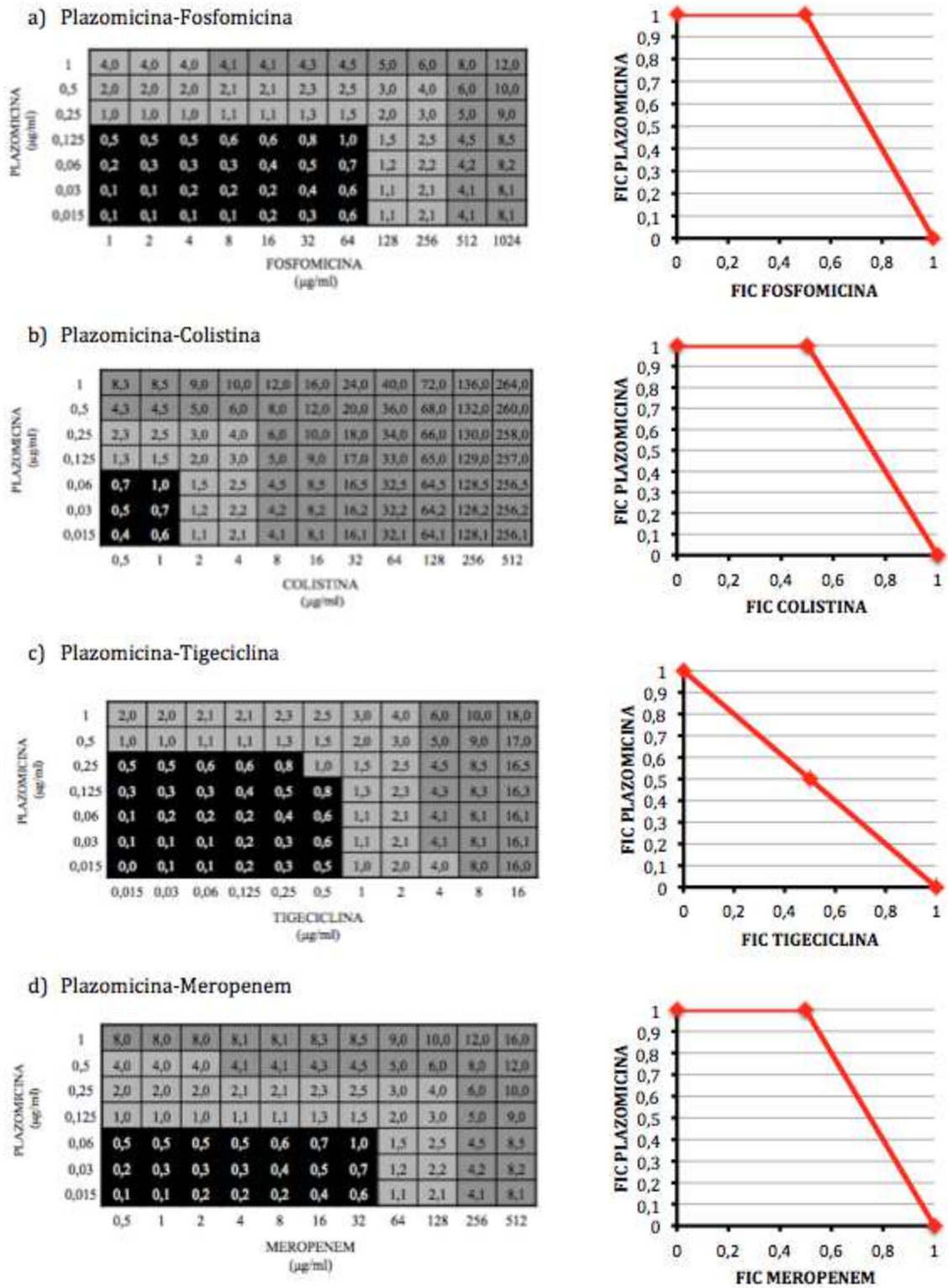


Figura 38. Ejemplos de actividad indiferente para cada combinación.

• **CURVAS DE LETALIDAD**

Se realizaron curvas de letalidad a 2 aislados (365 y 446), cuyas características se muestran en la tabla 16, para valorar la actividad de la plazomicina con fosfomicina, colistina, tigeciclina y meropenem a lo largo de un periodo de 24 horas.

En primer lugar, se valoró la actividad de la plazomicina a diferentes concentraciones: 2x CMI, 1x CMI y 0,5x CMI. En ambas cepas, la actividad de la plazomicina fue bactericida con una concentración de 2x CMI. Con una concentración de 1x CMI hubo efecto bactericida a las 6h, con un recrecimiento de la población a las 24h. No presentó efecto bactericida cuando la concentración ensayada fue de 0,5x CMI. (tabla 19 y figura 39). En la tabla se muestran los cambios en las concentraciones en log₁₀ UFC/ml a las 3h, 6h y 24 h comparadas con el inóculo inicial a tiempo 0h. El efecto bactericida (reducción de ≥ 3 log₁₀ en las UFC/ml) está marcado en gris

Tabla 19. Resultados de las concentraciones bacterianas de cada cepa a los tiempos 0h, 3h, 6h, y 24h.

Cepa	Antimicrobianos	Concentración (Log ₁₀ UFC/ml)				Δ Log ₁₀ UFC/ml		
		0h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
365	PLA 2x CMI	6	2,3	1,7	1,6	-3,7	-4,3	-4,4
	PLA 1x CMI	5,8	6,1	2,7	6,3	0,3	-3,1	0,5
	PLA 0.5x CMI	5,9	6,5	6,3	7,8	0,6	0,4	1,9
446	PLA 2x CMI	6,2	2	1	0,9	-4,2	-5,2	-5,3
	PLA 1x CMI	5,9	4,8	1,7	6	-1,1	-4,2	0,1
	PLA 0,5x CMI	5,8	5,6	6,9	7	-0,2	1,1	1,2

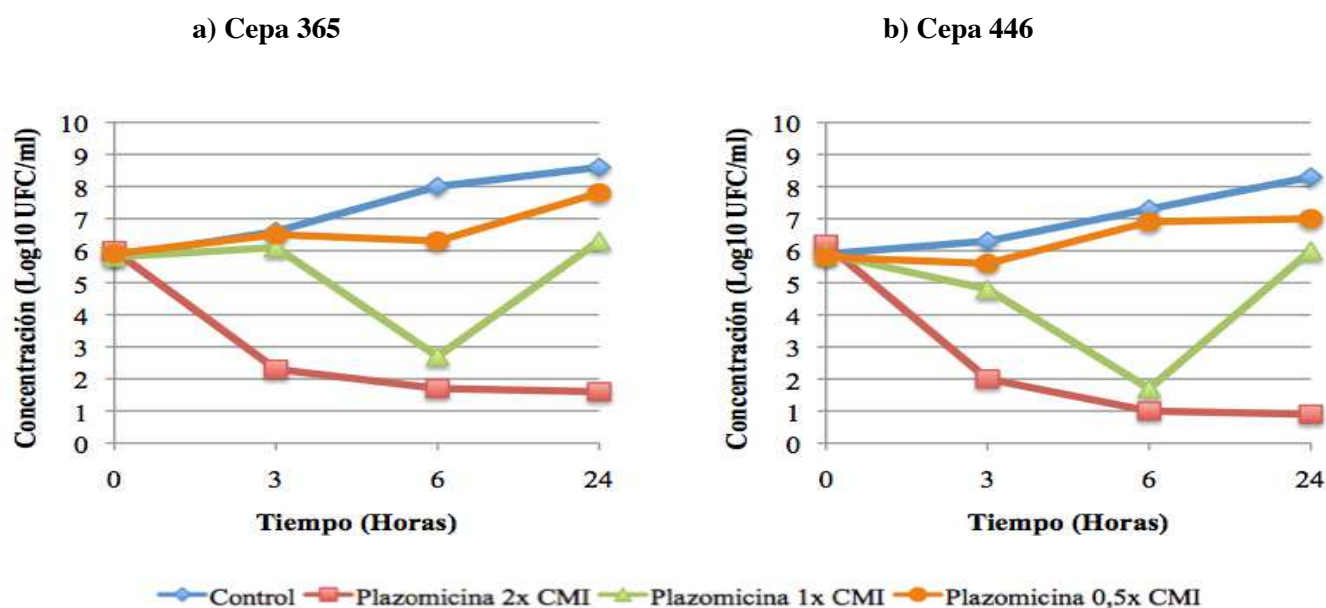


Figura 39. Representación de la actividad de la plazomicina a diferentes concentraciones.

A continuación, se estudió la actividad de la plazomicina, fosfomicina, colistina, tigeciclina y meropenem así como de las combinaciones de plazomicina con cada uno de ellos. La plazomicina se valoró a dos concentraciones: 1x CMI y 0,5 CMI. En la tabla, al igual que la tabla anterior, se muestran los cambios en las concentraciones en log₁₀ UFC/ml a las 3h, 6h y 24 h comparadas con el inóculo inicial a tiempo 0h. El efecto bactericida (reducción de ≥ 3 log₁₀ en las UFC/ml) está marcado en gris.

La combinación de plazomicina con cualquiera de las 2 concentraciones y fosfomicina presentó efecto bactericida a las 24h en ambas cepas. Sin embargo, no hubo efecto bactericida con ninguna combinación de plazomicina y tigeciclina a ningún tiempo. La combinación plazomicina-meropenem y plazomicina-colistina fue bactericida en todos los tiempos en la cepa 365, aunque no ocurrió lo mismo en la cepa 446, que solamente existió dicho efecto a las 6h y 24h cuando la concentración de plazomicina fue 1x CMI (tabla 20).

Tabla 20. Resultados de las concentraciones bacterianas de cada cepa a los tiempos 0h, 3h, 6h, y 24h.

Cepa	Antimicrobianos	Concentración				ΔLog_{10}		
		0h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
365	PLA 1x CMI	5,8	6,1	2,7	6,3	0,3	-3,1	0,5
	PLA 0.5x CMI	5,9	6,5	6,3	7,8	0,6	0,4	1,9
	FOS	6,2	4,1	5	9,4	-2,1	-1,2	3,2
	COL	5,3	4	4	8,3	-1,3	-1,3	3
	TIG	5,8	7	8,5	9	1,2	2,7	3,2
	MER	5,8	6	5,9	8,4	0,2	0,1	2,6
	PLA 1x CMI + FOS	5,6	3	0,9	2	-2,6	-4,7	-3,6
	PLA 1x CMI + COL	5,6	0,9	0,9	1	-4,7	-4,7	-4,6
	PLA 1x CMI + TIG	5,8	3,9	3,9	3	-1,9	-1,9	-2,8
	PLA 1x CMI + MER	5,3	1,8	0,9	0,9	-3,5	-4,4	-4,4
	PLA 0,5x CMI + FOS	5,9	1,3	0,9	2,2	-4,6	-5	-3,7
	PLA 0,5x CMI + COL	5,4	0,9	0,9	0,9	-4,5	-4,5	-4,5
	PLA 0,5x CMI + TIG	5,8	6,8	8,3	7,5	1	2,5	1,7
	PLA 0,5x CMI + MER	5,7	1,3	1,4	0,9	-4,4	-4,3	-4,8
446	PLA 1x CMI	5,9	4,8	1,7	6	-1,1	-4,2	0,1
	PLA 0,5x CMI	5,8	5,6	6,9	7	-0,2	1,1	1,2
	FOS	5,9	5	6	7	-0,9	0,1	1,1
	COL	5,9	6,6	8,1	8,4	0,7	2,2	2,5
	TIG	5	7,3	8,3	9	2,3	3,3	4
	MER	6,1	6,7	7,3	7,4	0,6	1,2	1,3
	PLA 1x CMI + FOS	5,7	3,8	1,1	1,3	-1,9	-4,6	-4,4
	PLA 1x CMI + COL	5,9	4,8	1,8	1,2	-1,1	-4,1	-4,7
	PLA 1x CMI + TIG	5,6	3,3	3,9	7,6	-2,3	-1,7	2
	PLA 1x CMI + MER	5,3	5,7	1,6	0,9	0,4	-3,7	-4,4
	PLA 0,5x CMI + FOS	5,6	4,9	1,6	0,9	-0,7	-4	-4,7
	PLA 0,5x CMI + COL	5,8	5,8	4,6	7,6	0	-1,2	1,8
	PLA 0,5x CMI + TIG	6,1	6	4,2	8,2	-0,1	-1,9	2,1
	PLA 0,5x CMI + MER	5,9	3	1,9	6	-2,9	-4	0,1

PLA: Plazomicina; FOS: Fosfomicina; COL: Colistina; TIG: Tigeciclina; MER: Meropenem.

La actividad sinérgica se observó para todas las combinaciones de plazomicina y fosfomicina a las 24h en ambas cepas. En la cepa 365 hubo sinergia con todas las combinaciones a las 24h, excepto con la combinación plazomicina 0,5x CMI y

tigeciclina. Sin embargo, en la cepa 446 no hubo sinergia a las 24 h con ninguna combinación plazomicina-tigeciclina ni con la concentración de plazomicina 0,5x CMI cuando se combinó con colistina y meropenem. A las 3h, en la cepa 365 hubo efecto sinérgico con la mayoría de las combinaciones mientras que en la cepa 446 solamente lo presentó con la combinación de plazomicina 0,5x CMI y meropenem. Señalar que las combinaciones de plazomicina 0,5x CMI con colistina, tigeciclina y meropenem fueron sinérgicas a las 6h en la cepa 446, pero no a las 24h (tabla 21).

El efecto bactericida y el efecto sinérgico a las 24 horas fueron encontrados en todas aquellas combinaciones sinérgicas con 1 excepción: plazomicina 1x CMI y tigeciclina en la cepa 365 (con sinergia y sin efecto bactericida).

En la tabla 21 se muestran los cambios en las concentraciones en \log_{10} UFC/ml de las diferentes combinaciones a las 3h, 6h y 24 h comparadas con la concentración en \log_{10} UFC/ml del antimicrobiano más activo de cada combinación en cada tiempo. El efecto sinérgico (reducción de $\geq 2 \log_{10}$ en las UFC/ml) está marcado en gris.

Tabla 21. Resultados del efecto sinérgico a las 3h, 6h y 24.

Cepa	Combinación de antimicrobianos	Resultados		
		3h	6h	24h
365	PLA 1x CMI + FOS	-1,1	-1,8	-4,3
	PLA 1x CMI + COL	-3,1	-1,8	-5,3
	PLA 1x CMI + TIG	-2,2	1,2	-3,3
	PLA 1x CMI + MER	-4,2	-1,8	-5,4
	PLA 0,5x CMI + FOS	-2,8	-4,1	-5,6
	PLA 0,5x CMI + COL	-3,1	-3,1	-6,9
	PLA 0,5x CMI + TIG	0,3	2	-0,3
	PLA 0,5x CMI + MER	-4,7	-4,5	-6,9
446	PLA 1x CMI + FOS	-1	-0,6	-4,7
	PLA 1x CMI + COL	0	0,1	-4,8
	PLA 1x CMI + TIG	-1,5	2,2	1,6
	PLA 1x CMI + MER	0,9	-0,1	-5,1
	PLA 0,5x CMI + FOS	-0,1	-4,4	-6,1
	PLA 0,5x CMI + COL	0,2	-2,3	0,6
	PLA 0,5x CMI + TIG	0,5	-1,2	-0,2
	PLA 0,5x CMI + MER	-2,6	-5	-1

PLA: Plazomicina; **FOS:** Fosfomicina; **COL:** Colistina; **TIG:** Tigeciclina; **MER:** Meropenem

En las figuras 40-43 se representan las actividades de la plazomicina 1x CMI y 0,5x CMI, fosfomicina, colistina, tigeciclina y meropenem así como las de la combinación de plazomicina con cada uno de ellos.

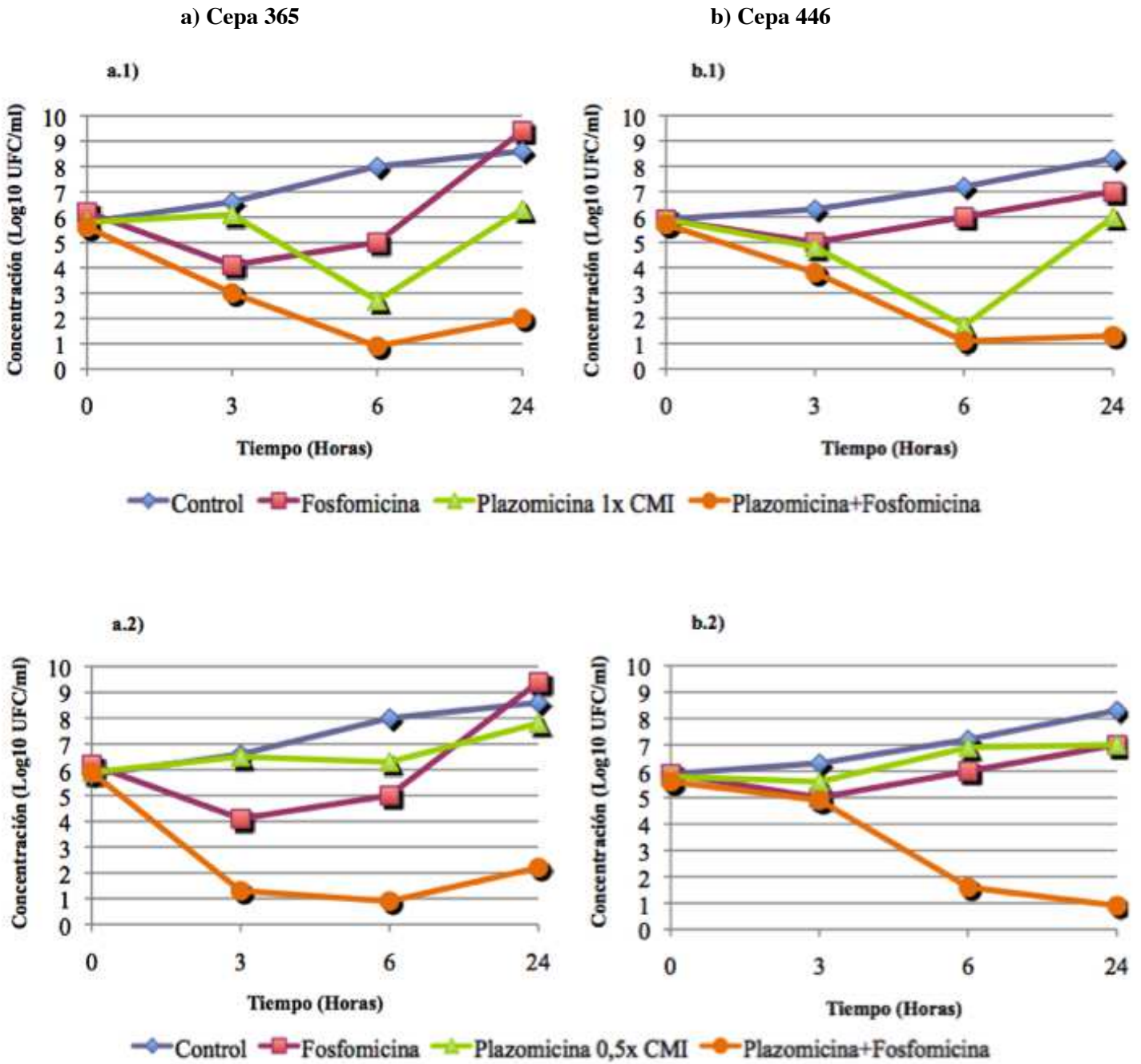


Figura 40. Representación de las actividades de la plazomicina 1x CMI y 0,5x CMI, fosfomicina y las combinaciones de plazomicina con fosfomicina.

a) Cepa 365

b) Cepa 446

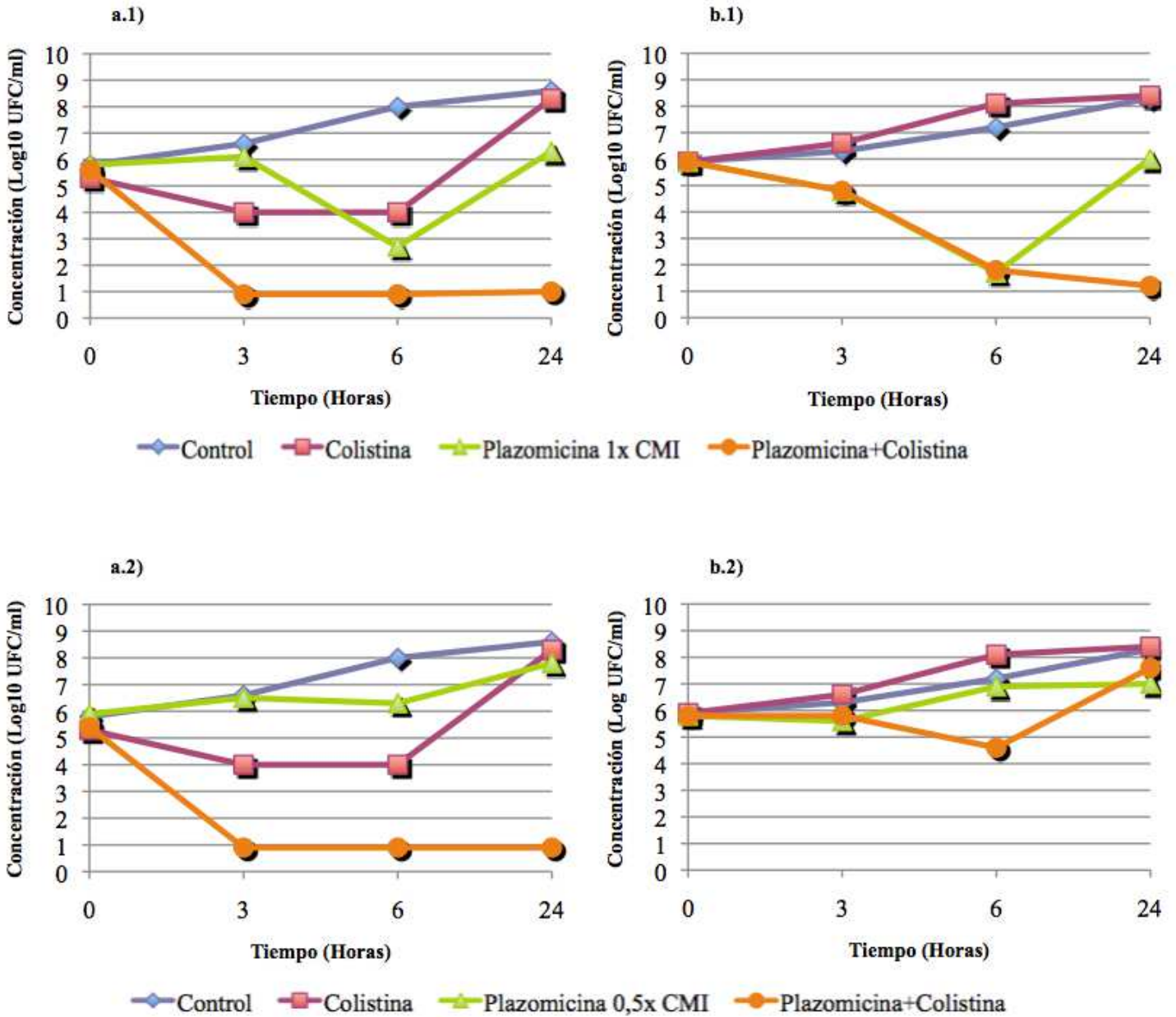


Figura 41. Representación de las actividades de la plazomicina 1x CMI y 0,5x CMI, colistina y las combinaciones de plazomicina con colistina.

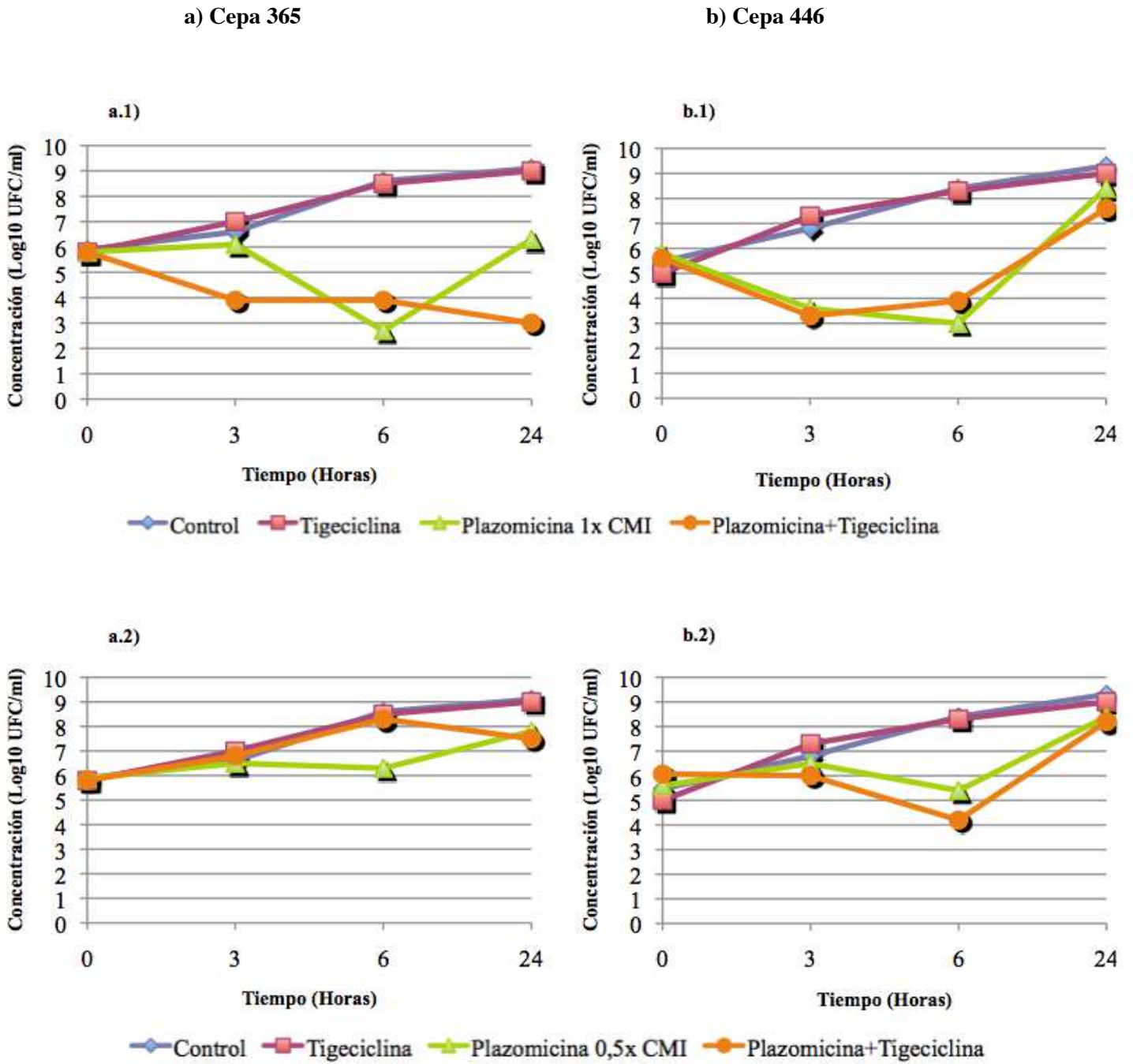


Figura 42. Representación de las actividades de la plazomicina 1x CMI y 0,5x CMI, tigeciclina y las combinaciones de plazomicina con tigeciclina.

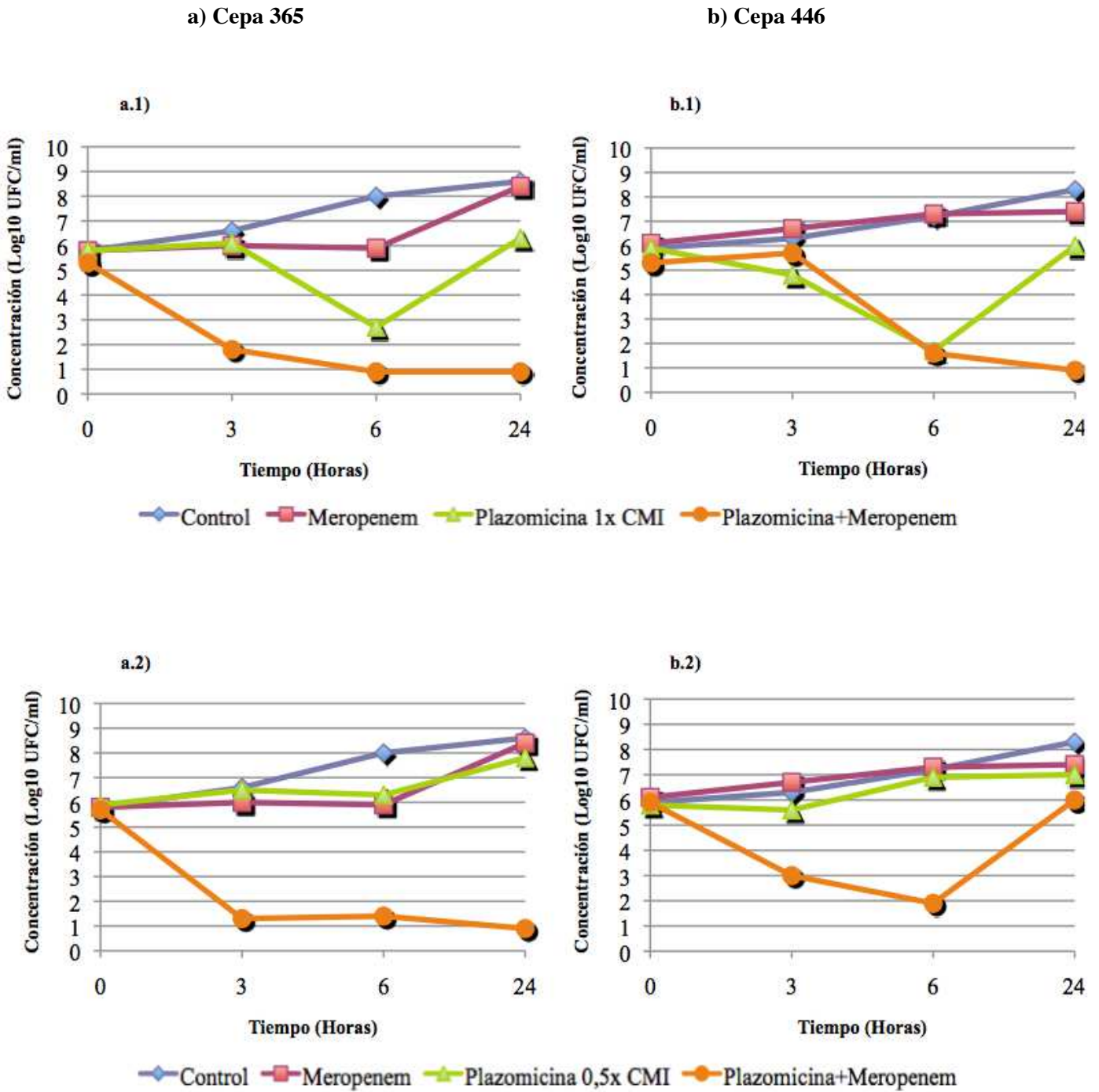


Figura 43. Representación de las actividades de la plazomicina 1x CMI y 0,5x CMI, meropenem y las combinaciones de plazomicina con meropenem.

6. VALORACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS

6.1 TEST BIOQUÍMICO CARBA NP TEST II

Los 123 aislados fueron analizados con el CNP utilizando imipenem monohidrato. Además, 72 se probaron también con imipenem-cilastatina (figura 44). Utilizando el imipenem monohidrato el 99,2% (122/123) de los aislados dieron positivo, detectando la producción de carbapenemasa, mientras que con imipenem-cilastatina fueron detectados el 97,2% (70/72) .

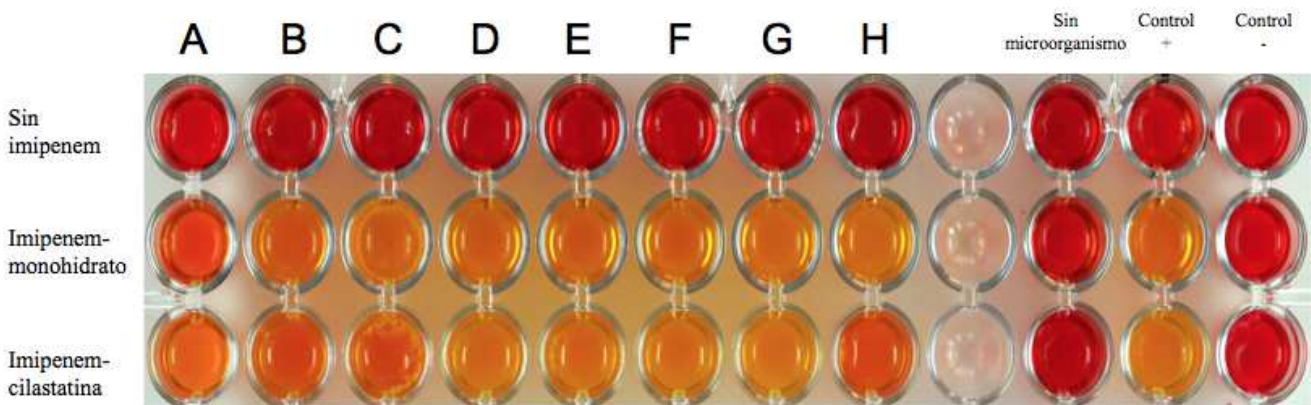


Figura 44. Resultados del CNP de 8 aislados

En la tabla 22, se exponen los aislados que presentaron un color amarillo-anaranjado, que si bien resulta ser un resultado positivo, dificulta la interpretación. De los 123 aislados testados con imipenem monohidrato, se obtuvieron 6 aislados con este color (4,9% de los resultados positivos). En cambio, de los 72 aislados testados con imipenem-cilastatina se obtuvieron un total de 11 (15,7% de los positivos). La especie más afectada fue *K. pneumoniae* en ambos casos (83,3% con imipenem monohidrato y 63,6% con imipenem-cilastatina). El ST mayoritario fue el ST11. Además, también hubo 2 *S. marcescens*, 1 *E. asburiae* y 1 *E. cloacae*. El único aislado productor de

KPC-2 que sólo presentó este color fue con el imipenem-cilastatina, mientras que los dos aislados productores de OXA-48 lo tuvieron con las dos formas de imipenem. Las cepas productoras de VIM-1 fueron más variables.

Tabla 22. Especies que tuvieron un color amarillo-anaranjado utilizando imipenem-monohidrato y/o imipenem-cilastatina.

Cepa	Especie	Carbapenemasa	ST	Resultados del Carba NP test	
				Imipenem monohidrato	Imipenem-cilastatina
72	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo-anaranjado	Amarillo-anaranjado
372	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo-anaranjado	Amarillo-anaranjado
396	<i>S. marcescens</i>	VIM-1		Amarillo-anaranjado	Amarillo-anaranjado
404	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo-anaranjado	Rojo
417	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo	Amarillo-anaranjado
419	<i>S. marcescens</i>	VIM-1		Amarillo	Amarillo-anaranjado
482	<i>E. asburiae</i>	VIM-1		Amarillo	Amarillo-anaranjado
505	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo	Amarillo-anaranjado
512	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	ST307	Amarillo-anaranjado	Amarillo-anaranjado
513	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	ST307	Amarillo-anaranjado	Amarillo-anaranjado
523	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	ST101	Amarillo	Amarillo-anaranjado
525	<i>E. cloacae</i>	VIM-1		Amarillo	Amarillo-anaranjado

En la tabla 23 se exponen los aislados que no fueron detectados por este método al utilizar imipenem monohidrato y/o imipenem-cilastatina. Los aislados que no se pudieron detectar fueron 3 en el caso de imipenem-cilastatina (2 *K. pneumoniae* y 1 *E. asburiae*) y 1 en el caso de imipenem monohidrato (*E. asburiae*).

Tabla 23. Especies que tuvieron un color rojo utilizando imipenem-monohidrato y/o imipenem-cilastatina.

Cepa	Especie	Carbapenemasa	ST	Resultados del Carba NP test	
				Imipenem monohidrato	Imipenem-cilastatina
404	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo-anaranjado	Rojo
435	<i>E. asburiae</i>	VIM-1		Rojo	Rojo
473	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	ST11	Amarillo	Rojo

6.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Se estudió la capacidad de detección de la actividad carbapenemasa mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF de 11 cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas. Las características de los aislados se representan en la tabla 24. Los aislados seleccionados fueron productores de distintos tipos de carbapenemasas y pertenecieron a distintos ST.

Tabla 24. Características de 11 cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas seleccionadas para evaluar la detección de las carbapenemasas mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Cepa	Especie	Carbapenemasa	ST
109	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	11
185	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-22	578
267	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	37
269	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	323
272	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	198
365	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	15
370	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	405
376	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	101
416	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	431
493	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	11
512	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	307

Se obtuvo un 100% de detección de la actividad carbapenemasa, ya que se detectó un aumento de la hidrólisis del imipenem-cilastatina o del ertapenem a tiempo 1 hora en todas las cepas estudiadas. Sin embargo, el porcentaje de degradación de cada antimicrobiano varió según la cepa (figura 45 y 46). Las cepas con un mayor porcentaje de degradación del imipenem-cilastatina a tiempo 1h fueron la 185 (99%; IMP-22 ST578), la 376 (99,5%; KPC-2 ST101) y la 493 (99,5%; KPC-2 ST11). En el caso del ertapenem, el pico de 450 Da aumentó con el paso del tiempo y el de 476, 498 y 521 Da disminuyeron. Teniendo en cuenta la media de los valores de los 3 picos que

disminuyeron, las cepas con un mayor porcentaje de degradación a tiempo 1h fueron la 109 (95,2%; VIM-1 ST11), la 370 (79,6%; VIM-1 ST405) y la 376 (82,3%; KPC-2 ST 101).

La rapidez en empezar a degradar ambos carbapenémicos también varió según la cepa, ya que sólo con la preparación e inoculación de los aislados a tiempo 0h, se pudo observar diferencias entre ellas. Con el imipenem-cilastatina, las cepas con mayor degradación fueron la 269 (42%; VIM-1 ST323), la 493 (60,3%; KPC-2 ST11) y la 512 (55,9%; OXA-48 ST307), mientras que con el ertapenem, fueron la 272 (26,8%; VIM-1 ST198), la 376 (32,3%; KPC-2 ST101) y la 493 (23,7%; KPC-2 ST11).

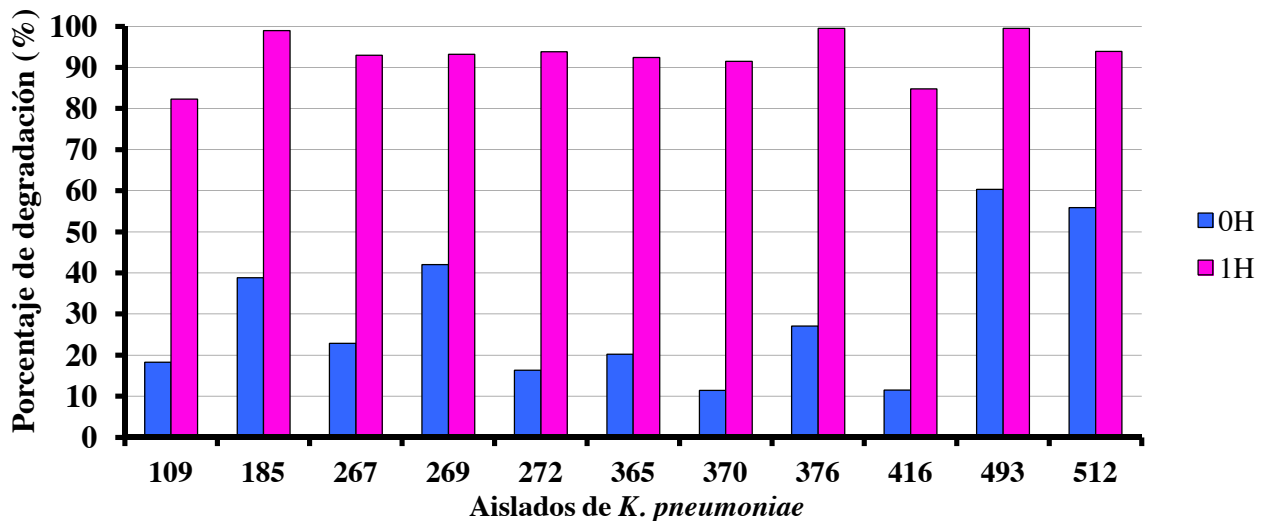


Figura 45. Porcentaje de degradación del imipenem-cilastatina calculado con el valor del pico 489 Da a tiempo 0h y 1h.

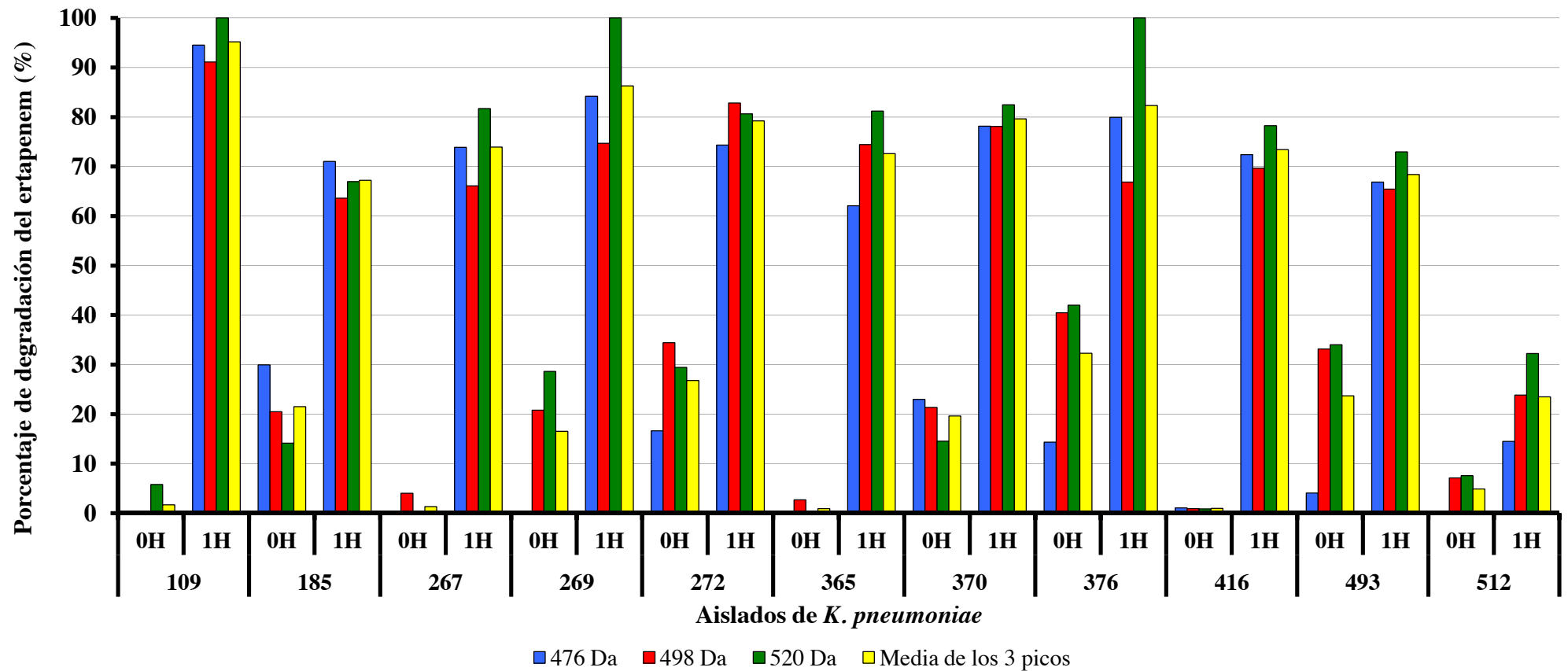
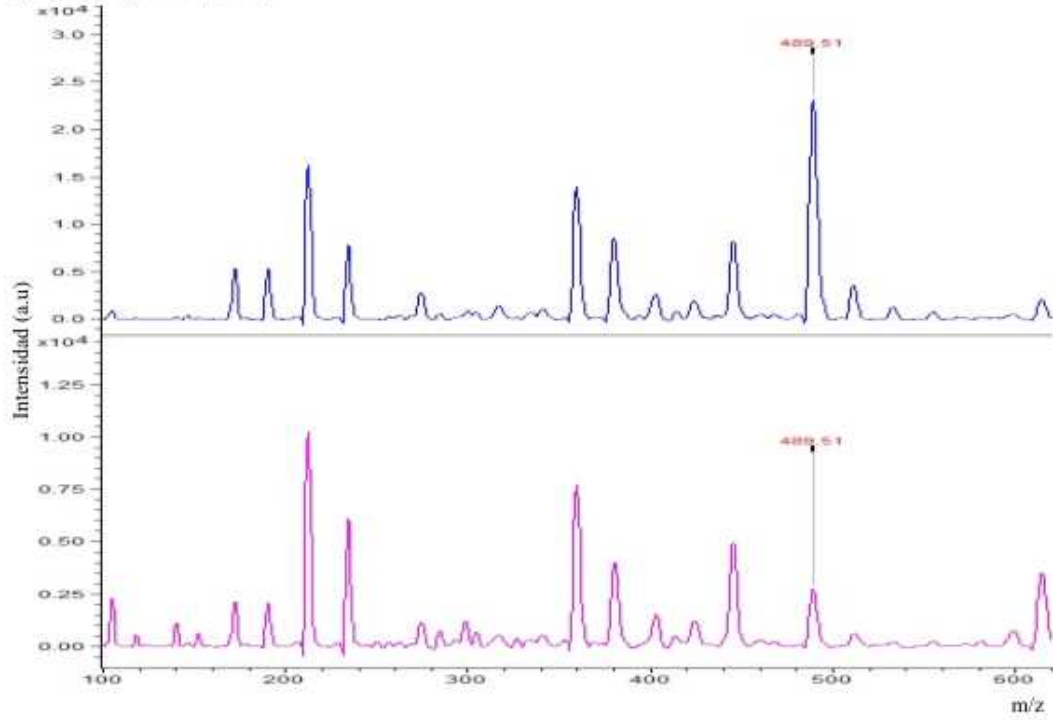


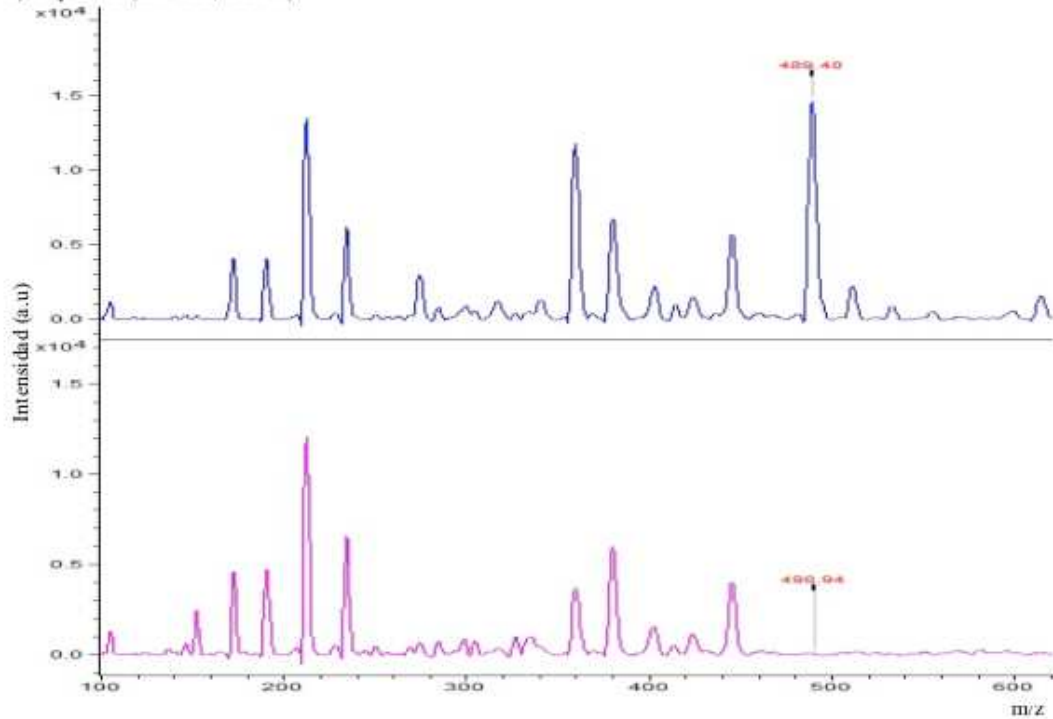
Figura 46. Porcentaje de degradación del ertapenem calculado con los valores de los picos 476 Da, 498 Da, 520 Da y la media de los 3 picos a tiempo 0h y 1h.

En las figuras 47 y 48 se representan ejemplos de la actividad de los diferentes tipos de carbapenemasa utilizando el imipenem-cilastatina y el ertapenem.

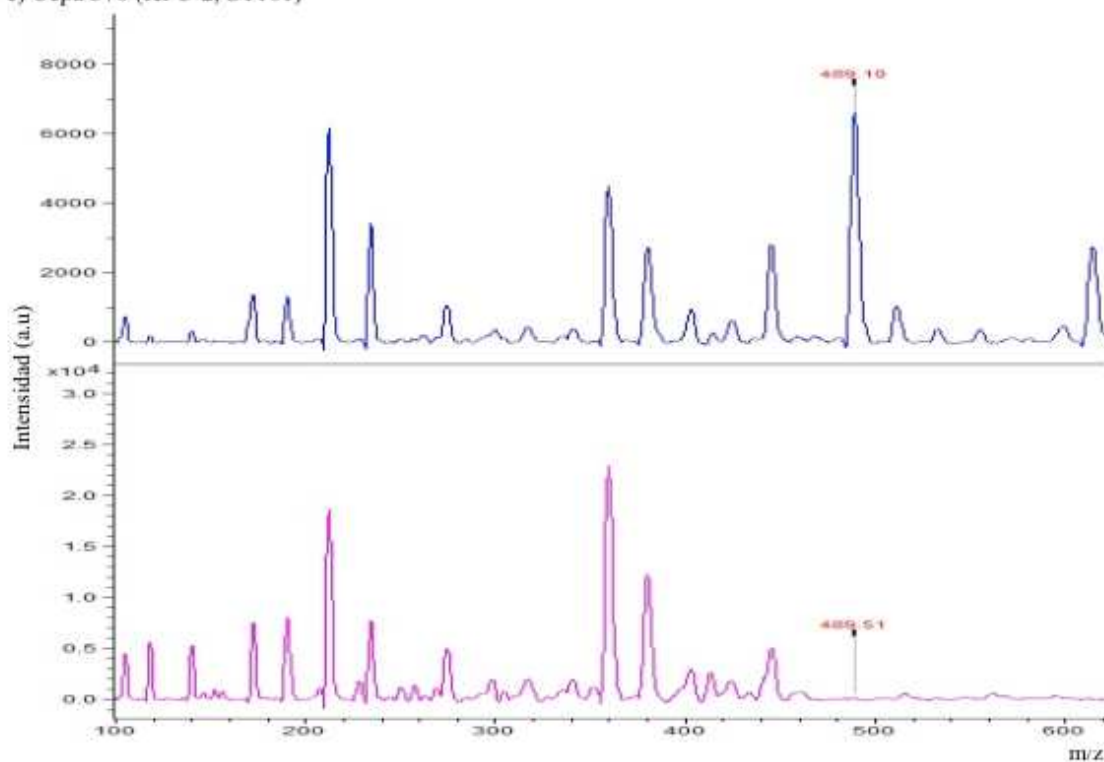
a) Cepa 109 (VIM-1, ST11)



b) Cepa 185 (IMP-22, ST578)



c) Cepa 376 (KPC-2, ST101)



d) Cepa 512 (OXA-48, ST307)

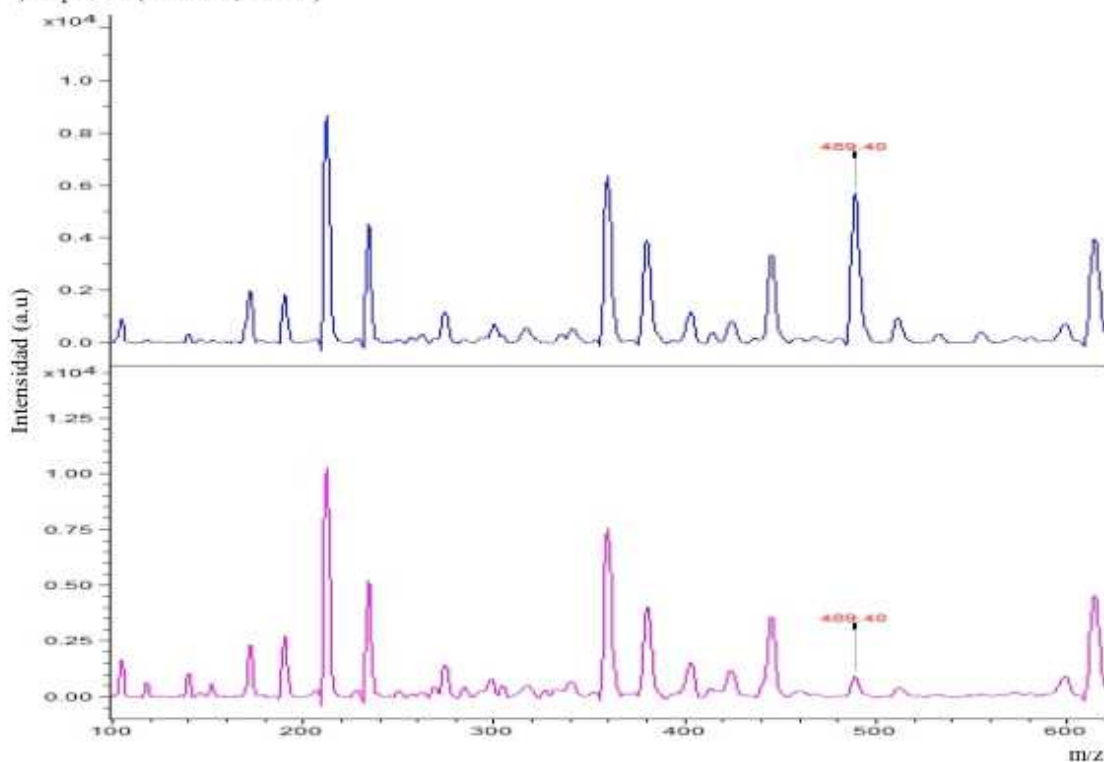
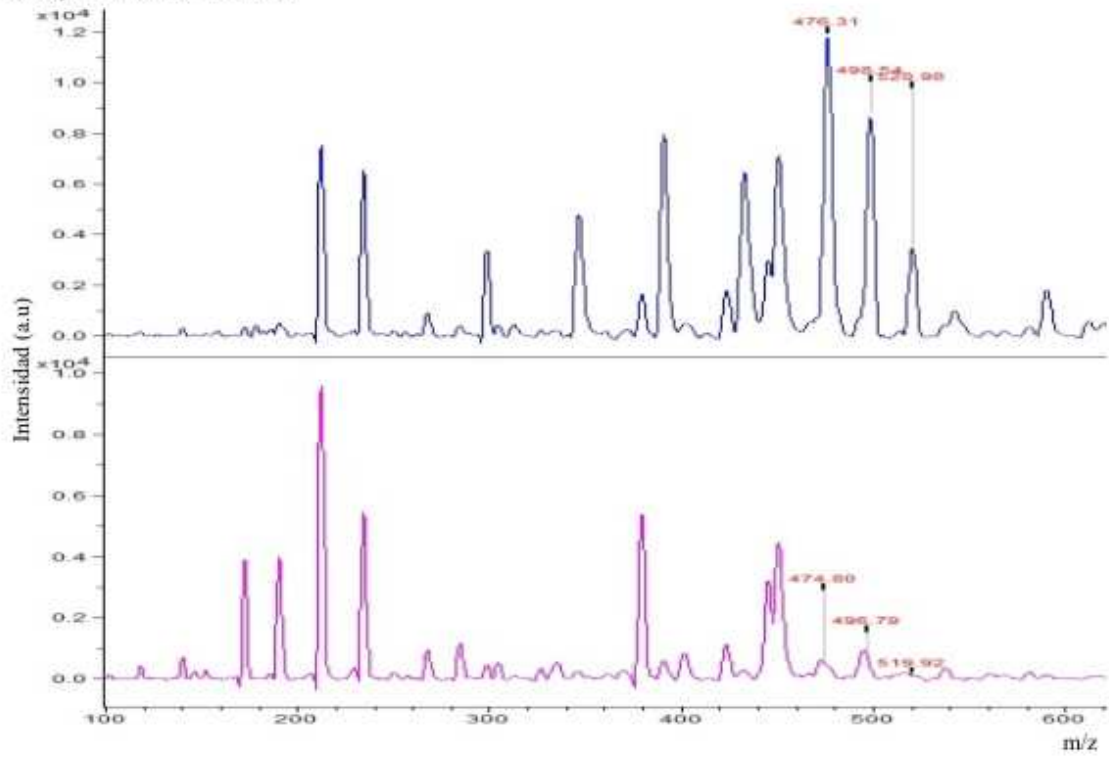
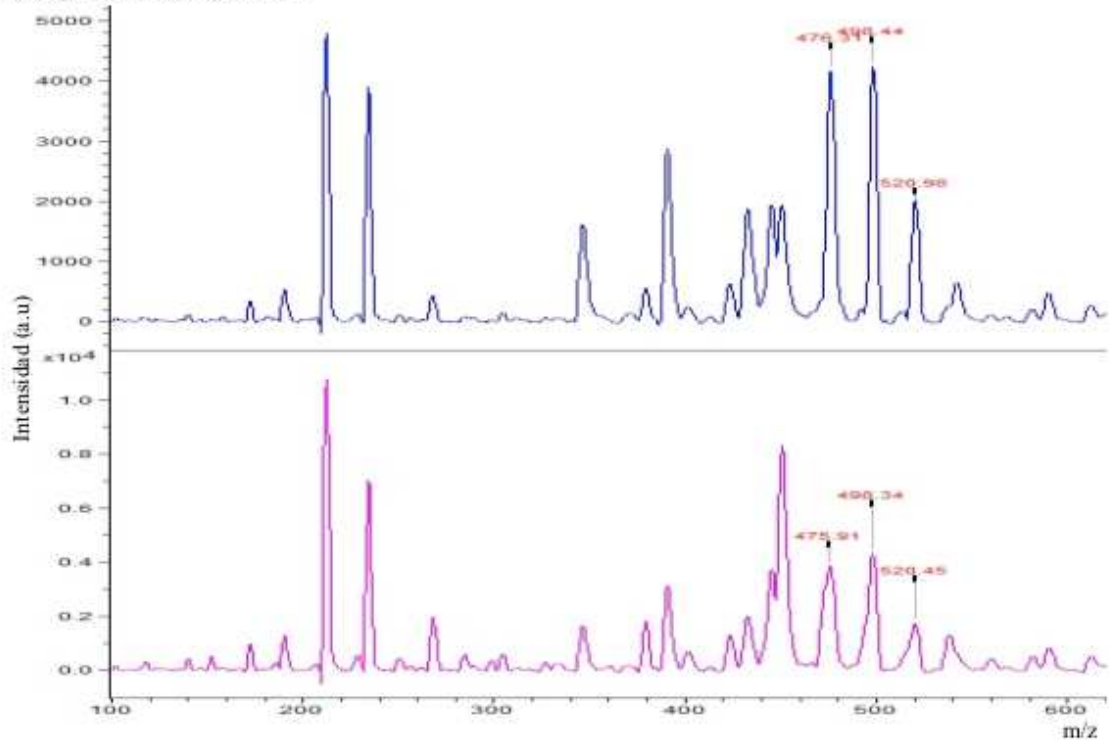


Figura 47. Ejemplos de la actividad de los diferentes tipos de carbapenemasa utilizando el imipenem-cilastatina.

a) Cepa 109 (VIM-1, ST11)



b) Cepa 185 (IMP-22, ST578)



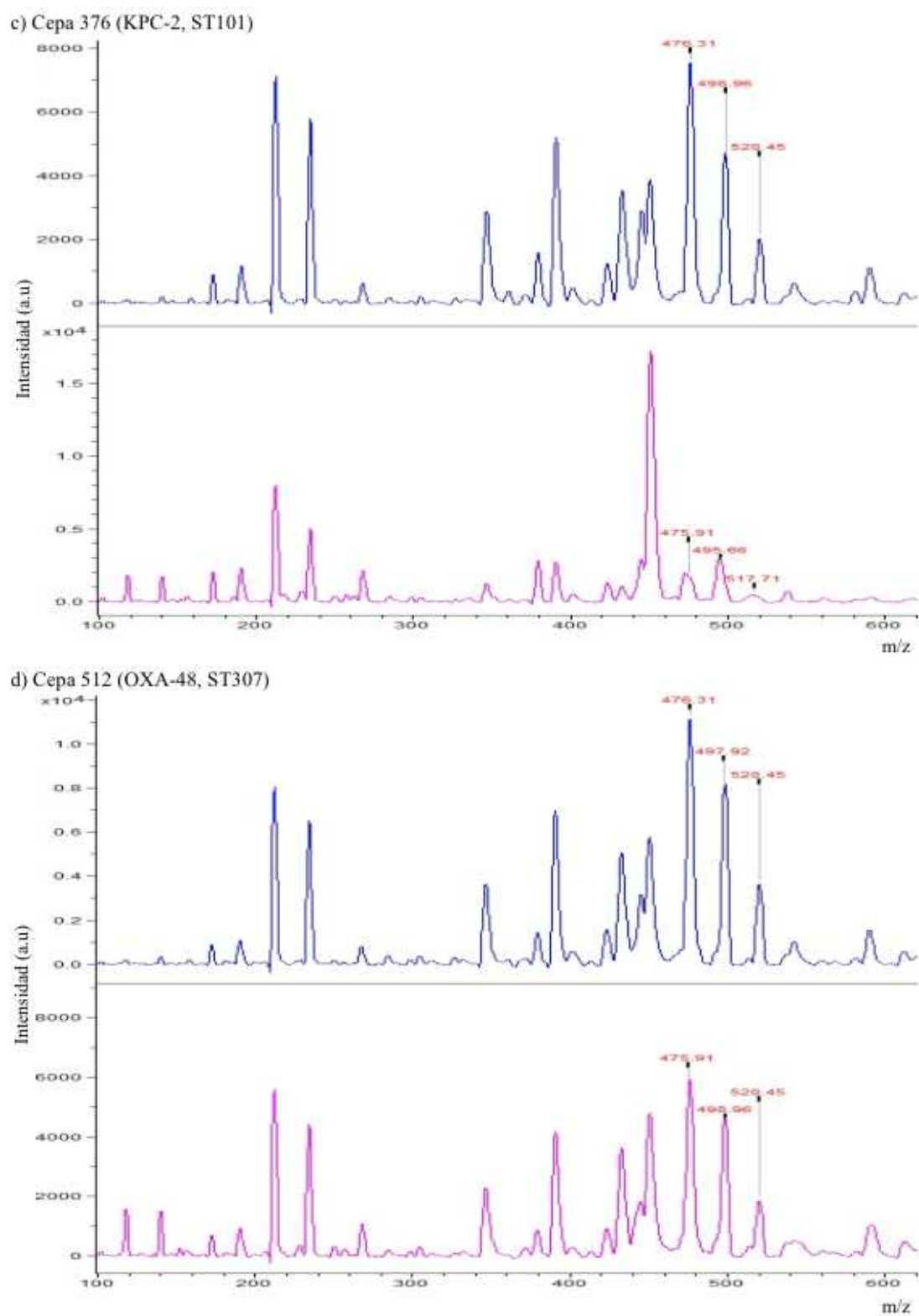


Figura 48. Ejemplos de la actividad de los diferentes tipos de carbapenemasa utilizando el ertapenem.

DISCUSIÓN

En los 10 últimos años, se ha incrementado la prevalencia de EPC, convirtiéndose en un problema clínico y de salud pública, de difícil control y tratamiento.

Como se pudo comprobar en nuestro estudio, el grupo de edad con más aislamientos de EPC fue el formado por los pacientes mayores de 65 años (60%), pacientes que debido a la edad son más propensos a tener enfermedades y complicaciones. Cabe señalar que el 88,6% de los aislados fueron de pacientes ingresados en el hospital, de los cuales, un 39,5% estuvieron ingresados en la UCI, poniendo de manifiesto que este tipo de infecciones está relacionado con pacientes debilitados y/o inmunodeprimidos. Estos datos coinciden con los publicados en la literatura, cuyos factores de riesgo para la adquisición de EPC son la estancia en UCI, la administración de antibioterapia de amplio espectro de forma prolongada, la cirugía, los procedimientos instrumentales invasivos y la inmunosupresión¹⁰⁹.

En nuestro trabajo, los tipos de muestra mayoritarios fueron la orina (39,8%), las secreciones bronquiales (24,4%) y las muestras relacionadas con infecciones intraabdominales y de piel y partes blandas (20,4%: exudados/pus, escaras, heridas quirúrgicas). En general, no existen diferencias en los tipos de infección causadas por EPC de las de otras enterobacterias más sensibles, por lo que las infecciones más comunes en las que están implicadas son las infecciones del tracto urinario, las infecciones intraabdominales, bacteriemias, neumonías (asociadas o no a ventilación mecánica) e infecciones de piel y partes blandas.

La prevalencia de EPC en nuestro estudio fue de un 1,7%. Esta cifra fue superior a la publicada por *Miró et al.*, 0,04%, en cuyo estudio participaron 35 hospitales españoles¹¹³. Al igual que en estudios previos^{112,113}, en esta tesis se pudo observar que la especie más frecuente fue *K. pneumoniae* con un 62,4%. Por otro lado,

la especie *E. cloacae* fue la cuarta especie implicada (9,8%), por detrás de *S. marcescens* (11,4%) y *K. oxytoca* (10,6%). Estos datos difieren de otros trabajos, en los que se puede considerar que la especie *E. cloacae* es la segunda EPC en España ^{108,110,112,160}. Al contrario que en nuestro estudio, solamente existe una única publicación de *S. marcescens* productora de carbapenemasa en España con un único aislado ¹¹².

En cuanto a la clase de carbapenemasa, el 82,9% de los aislados fueron productores de MBL, de las cuales, el 82,1% fue VIM-1 y el 0,8% IMP-22. El 15,5% de los aislados fueron productores de KPC-2 y el resto, el 1,6%, de OXA-48. En el estudio llevado a cabo por *Miró et al.* también encontraron que la enzima VIM-1 fue la carbapenemasa más frecuente ¹¹³. Sin embargo, en el estudio de *Oteo et al.* la enzima predominante fue del grupo OXA-48 (68,8%), mientras que un 25,3% correspondió a la enzima VIM-1, un 3,4% a la enzima KPC-2, un 2,1% al grupo IMP y un 0,4% a NDM ¹¹². Desde el primer comunicado de EPC en España en el 2005 por *Tortola et al.* ¹⁰⁷ se fueron describiendo sucesivos brotes de enterobacterias productoras de VIM-1 por los hospitales españoles ^{108-110,160}. En el 2009 tuvo lugar el primer brote de OXA-48 en Barcelona ¹¹⁸ y a partir de este momento se fueron comunicando otros brotes por esta enzima por toda España ^{119,161}. Aunque en los años de nuestro estudio la OXA-48 estuvo diseminada por el país, en nuestro hospital solamente aislamos 2 cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48. Desde la aparición de la enzima KPC en el 2010 ^{116,117}, la prevalencia de esta carbapenemasa continua siendo baja. Actualmente, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 y VIM-1 son las responsables de la mayor parte de las infecciones por EPC en España ¹⁶².

A nivel europeo, las EPC están ampliamente distribuidas. Las enzimas más prevalentes son las KPC, alcanzando una situación endémica en Italia y Grecia, y las

VIM, constituyendo un problema en Grecia, Italia y Hungría. Los casos de OXA-48 están aumentando en Europa y es la carbapenemasa más detectada en Bélgica, Francia y Malta. Los actuales comunicados de NDM en los países europeos indican que la prevalencia de estas enzimas sigue siendo baja si lo comparamos con otras carbapenemasas. Reino Unido e Italia son los 2 países que más casos de NDM comunican.

En el entorno genético del gen *bla_{VIM-1}* caracterizado en 11 aislados (7 *K. pneumoniae* y 4 *K. oxytoca*) se identificó un gene cassette formado por los genes *bla_{VIM-1}*, *aacA4*, *dhfrII*, *aadA1* y *catB2* (de 5' a 3'), coincidiendo con los datos de otros estudios en España^{107,163}.

Los resultados de la PFGE entre los aislados de este estudio demostró una alta diversidad clonal. Aunque entre los aislados de *K. pneumoniae* se identificaron 5 clusters y 5 pulsotipos únicos, el 85% de los aislados se pudieron agrupar en 2 clones mayoritarios: el *Cluster A* con 54 aislados, de los cuales 53 fueron productores de VIM-1 y 1 de KPC-2, y el *Cluster B* con 13 aislados, todos productores de KPC-2.

Se identificaron 10 ST distintos implicados en la diseminación de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas. El ST más común fue el ST11, seguido por el ST101. El ST11 estuvo principalmente unido a la producción de VIM-1, mientras que el ST101 lo estuvo a KPC-2. En la actualidad el ST11, una variante de un único locus (SLV) de ST258, está ampliamente diseminado entre los aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa^{97,164-166}. El ST101 es un clon emergente que ha sido identificado dentro de brotes y en casos esporádicos de aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 en algunos países del Mediterráneo¹¹⁸. En un estudio llevado a cabo en España se identificaron 6 clones de *K. pneumoniae* productores de KPC, de los cuales ninguno fue el ST101, aunque si encontraron el

ST11¹⁶⁷. En otros estudios, el ST101 si que estuvo relacionado con los aislados productores de KPC-2^{112,168}. Tres de los aislados productores de VIM-1 fueron debidos al clon ST15, también descrito en otros estudios^{109,112}. Sin embargo, el ST405 descrito entre productores de OXA-48¹¹⁹, en nuestro trabajo estuvo relacionado con VIM-1. El ST307 fue el responsable de la producción de OXA-48.

En nuestro estudio hubo una gran variabilidad genética entre los aislados de *K. oxytoca*, *E. cloacae* y *S. marcescens*, siendo está última la especie con menor diversidad, ya que los 14 aislados fueron agrupados en 3 clusters y un único pulsotipo distinto. Estos resultados sugieren que existe una expansión clonal y una transmisión horizontal de elementos de resistencia entre las EPC en nuestro hospital. En trabajos previos, en los que se realizaron análisis clonales entre aislados de *K. oxytoca* y *S. marcescens* productores de carbapenemasas se pudieron observar como su diseminación en algunos casos fue debido a un mismo clon¹⁶⁹⁻¹⁷² y en otros, a varios clones^{173,174}. En cambio, entre los aislados de *E. cloacae*, la dispersión parece ser debida a varios clones.

Todos los aislados de nuestro estudio fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima. El cefepime y el aztreonam presentaron una resistencia variable, siendo la especie *S. marcescens* la que presentó menor resistencia a ambos. Los aislados productores de KPC-2 fueron 100% resistentes a aztreonam. Un 95% de los aislados de *K. pneumoniae* productores de MBL presentaron resistencia a este antimicrobiano, sugiriendo la coproducción de enzimas BLEE y/o enzimas AmpC plasmídicas.

De los tres carbapenémicos estudiados, el más activo fue el meropenem y el menos fue el imipenem, ya que todos los aislados presentaron resistencia. Los aislados

productores de VIM-1 fueron los que presentaron cierta sensibilidad a meropenem y ertapenem, con un 3,9% y un 2,9% aislados sensibles respectivamente.

Existen datos clínicos que indican que los carbapenémicos pueden tener alguna utilidad en el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas. A pesar de ser productoras de carbapenemasas (especialmente VIM e IMP), las especies de *Klebsiella* spp. pueden presentar bajas CMI a los carbapenémicos¹⁷⁵. Varios estudios proponen que las infecciones por EPC pueden ser tratadas con un carbapenémico si la CMI es ≤ 8 mg/l, en regímenes de altas dosis en perfusión continua, preferiblemente en combinación con otro antimicrobiano^{44,176}. Por ello, en este estudio calculamos el porcentaje de aislados (con respecto a los resistentes) que presentaron un rango de CMI de 2-8 mg/l en el caso de imipenem y meropenem y de 0,5-8 mg/l en el caso de ertapenem. Los 3 carbapenémicos presentaron un elevado porcentaje de aislados con dichas CMI ($\geq 65\%$). Por especies, los aislados de *K. oxytoca* fueron los que presentaron el mayor porcentaje de CMI de 2-8 mg/l a imipenem (92,3%) mientras que los de *S. marcescens* las presentaron a meropenem (78,6%) y ertapenem (100%). Por enzimas, las cepas productoras de KPC-2 e IMP-22 no presentaron CMI en ese intervalo, mientras que los productores de VIM-1 tuvieron un 81,8% de aislados de ertapenem, un 73,5% de meropenem y un 65,7% de imipenem. Estos datos indicaron que en un elevado porcentaje de estas EPC podría haberse utilizado algún carbapenémico en el tratamiento de las infecciones por estas cepas, a pesar de estar consideradas resistentes a los mismos.

Según se utilice los puntos de corte del CLSI o del EUCAST, los porcentajes de resistencia pueden variar debido a que no son exactamente iguales. Esto es importante porque en el momento de identificar las EPC, las cepas consideradas resistentes a algún carbapenémico aplicando uno de los puntos de corte pueden ser sensibles con el otro.

En nuestro estudio aplicamos los puntos de corte propuestos por el CLSI y los comparamos con los propuestos con el EUCAST. El porcentaje de resistencia a imipenem y meropenem fue mayor con los puntos de corte del CLSI. El meropenem fue el carbapenémico que presentó mayor diferencia, siendo las especies de *K. oxytoca* y *Enterobacter* spp las más afectadas. No hubo diferencias en el caso del ertapenem. En los hospitales griegos se ha estimado que entre un 10% y un 15% de EPC son resistentes a los carbapenémicos aplicando los puntos de corte del CLSI y sensibles aplicando los del EUCAST ⁴⁴.

En la actualidad, no existen antibióticos comercializados con buena actividad frente a las EPC. Las decisiones clínicas sobre el tratamiento están basadas en la actividad *in vitro* de ciertos antimicrobianos, clasificados en la categoría de sensibles, intermedios o resistentes. Sin embargo, el tratamiento con antimicrobianos considerados sensibles *in vitro* no predice necesariamente un éxito terapéutico; de hecho, existen varios estudios en los cuales no se encontraron diferencias en la mortalidad de pacientes que recibieron o no tratamientos con antibióticos que presentaron actividad *in vitro* en contra de EPC ¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

Con frecuencia las EPC presentan resistencias a otras familias de antimicrobianos, pudiendo aislarse cepas panresistentes, frente a las cuales no hay una alternativa óptima de tratamiento. Muchas de las EPC solo son sensibles *in vitro* a colistina, tigeciclina, fosfomicina o amikacina ^{44,109,130,181-183}. Por ello, estudiamos la actividad *in vitro* de estos antimicrobianos, además de gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino.

Los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos y a las quinolonas son comunes en las EPC ^{69,184,185}, por lo que como era de esperar, hubo un elevado porcentaje de resistencia a ciprofloxacino, tobramicina y gentamicina. La especie

K. pneumoniae presentó elevada resistencia a ciprofloxacino y tobramicina. Los antimicrobianos más activos fueron la amikacina (82,9% de sensibilidad) y la fosfomicina (80,5% de sensibilidad). No hubo ningún aislado de *S. marcescens* resistente a estos 2 antimicrobianos y ningún aislado de *K. oxytoca* resistente a la amikacina. Existen varios trabajos en los que la gentamicina se considera el aminoglucósido más activo frente a las EPC (VIM y KPC), debido a la presencia concomitante del gen *aac(6′)-I* que confiere resistencia a amikacina, tobramicina y netilmicina con genes carbapenemasa^{175,186}. A pesar de ello, en nuestro estudio el aminoglucósido más activo fue la amikacina con un 17,1% de resistencia (16% de aislados intermedios) frente a un 37,4% de resistencia a la gentamicina. La mejor actividad de amikacina frente a gentamicina se puede observar también en el estudio de EPC llevado a cabo por *Castanheira et al.*¹³¹. En contraste, las enterobacterias productoras de NDM exhiben pan-resistencia a todos los aminoglucósidos debido a la producción de ribosoma metilasas.

La fosfomicina, un derivado del ácido fosfónico que inhibe la biosíntesis de la pared celular en un paso anterior que los β -lactámicos, presenta una actividad *in vitro* variable en contra de las EPC, ya que existen estudios con un 94,9% de sensibilidad y otros con un 54%^{186,187}, aunque en ocasiones puede llegar a ser el único antimicrobiano activo. Desafortunadamente, existen pocos datos clínicos de infecciones por EPC tratadas con fosfomicina. Además, cuando se usa en monoterapia existe el riesgo de resistencia, excepto en el tratamiento de UTIs no complicadas.

La tigeciclina y colistina se consideran una de las últimas opciones para el tratamiento de infecciones graves causadas por EPC. La tigeciclina, una gliciliciclina con actividad bacteriostática, tiempo-dependiente, posee buena actividad en contra de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, excluyendo las intrínsecamente

resistentes (*Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp.). Sin embargo, no se recomienda el tratamiento de bacteriemias, infecciones respiratorias, infecciones urinarias u otras infecciones graves con tigeciclina. Actualmente, el incremento de patógenos MDR ha aumentado el uso de colistina, a pesar de que en el pasado, las polimixinas fueron poco utilizadas debido a su nefrotoxicidad y neurotoxicidad.

En nuestro trabajo llama la atención la elevada resistencia a tigeciclina (36,6%) y colistina (24,8%) entre los aislados. La especie más afectada fueron *K. pneumoniae* en el caso de tigeciclina (45,6% de resistencia) y *Enterobacter* spp. en el caso de colistina (47,1% de resistencia), sin tener en cuenta la especie *S. marcescens* que son intrínsecamente resistentes a la colistina, contrariamente a los datos publicados en los cuales la resistencia a colistina ha sido más frecuente en *K. pneumoniae* que en *Enterobacter* spp¹⁸⁸. Si comparamos nuestros datos con otros trabajos, podemos observar que nuestros aislados fueron más resistentes a colistina y menos a tigeciclina^{183,186,189}. El incremento del uso de colistina está asociado con la aparición de aislados heterorresistentes, debido a la alteración en la estructura del lipopolisacárido¹⁹⁰. El desarrollo de resistencia durante la terapia puede estar relacionada con la presencia de subpoblaciones heterorresistentes¹⁹¹, ya que son cepas aparentemente sensibles a colistina con una pequeña subpoblación que presentan resistencia a la misma. Esto hace que puedan existir fracasos terapéuticos en cepas teóricamente sensibles, además de que con el uso de este antimicrobiano se podrían seleccionar cepas resistentes. Existen estudios que demuestran que la resistencia a la colistina se desarrolla con más frecuencia en aislados de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos que en *A. baumannii* o *P. aeruginosa* multirresistentes^{192,193}.

La resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos no se mantuvo constante en los 2 periodos del estudio, aumentando en la segunda parte del mismo. El

antimicrobiano más afectado fue amikacina. Los únicos que mantuvieron una resistencia constante fueron ciprofloxacino y tigeciclina. Por especies, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp fueron las que tuvieron un incremento de resistencia a todos los antimicrobianos.

Según el tipo de carbapenemasa VIM-1 o KPC-2, se encontraron diferencias entre el porcentaje de resistencia a amikacina, gentamicina y tobramicina, siendo mayor entre los aislados productores de KPC-2. Dentro de la especie *K. pneumoniae* la resistencia a amikacina y gentamicina fue mayor entre los productores de KPC-2, asociado al ST101, y la resistencia a fosfomicina y colistina mayor entre los de MBL, asociado al ST11. La resistencia a la amikacina estuvo ligada a 2 STs, mientras que la resistencia a la tobramicina estuvo repartida entre 8 STs. A pesar de que en la segunda parte del estudio aumentó la resistencia a los antimicrobianos no β -lactámicos en esta especie hubo una disminución en la diversidad de STs, sugiriendo que la resistencia a los mismos estuvo unida a ciertos clones.

Actualmente, existen numerosos estudios que demuestran que los aislados de EPC resistentes a este tipo de antimicrobianos están aumentando, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar antimicrobianos con actividad frente a este tipo de cepas. Uno de los antimicrobianos que está en desarrollo capaz de actuar en contra de microorganismos multirresistentes es la plazomicina (ACHN-490), un nuevo aminoglucósido ¹³⁹. El 99% de todos nuestros aislamientos presentó una CMI de plazomicina de ≤ 2 mg/l con una CMI₅₀ y una CMI₉₀ de 0,25 y 1 mg/l, respectivamente, concentraciones a las cuales los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos predicen que la probabilidad de lograr adecuados niveles en plasma es de >98% de probabilidad ¹⁹⁴. En varios estudios, en los que se testó la actividad de plazomicina, se obtuvieron CMI₉₀ de entre 0,5 y 2 mg/l ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Si analizamos nuestros

datos por especies, los aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 y los de *Enterobacter* spp tuvieron la menor CMI₉₀ (0,25 mg/l) y los aislados de *S. marcescens* tuvieron la mayor CMI₉₀ (4 mg/l). Comparado con los aminoglucósidos amikacina, gentamicina y tobramicina demostró ser más activa. Aunque las CMI de plazomicina no parecen estar relacionadas con las enzimas modificadoras de aminoglucósidos más comunes¹⁹⁶, si que se ha visto que éstas son muy elevadas con las 16S rRNA metiltransferasas presentes en las cepas productoras de la enzima NDM¹⁹⁸. En un estudio reciente, las CMI de plazomicina fueron más elevadas en las cepas resistentes a gentamicina que en las cepas sensibles, sugiriendo una posible relación entre estos dos aminoglucósidos¹⁹⁷.

El tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes puede resultar muy complicado. Por ello surge la necesidad de combinar antimicrobianos por dos posibles ventajas: el efecto sinérgico y la prevención de resistencias. Sin embargo, la experiencia clínica en el tratamiento de este tipo de infecciones es muy limitada. En el presente trabajo estudiamos la actividad *in vitro* de las combinaciones de plazomicina con fosfomicina, colistina, tigeciclina y meropenem, antimicrobianos con alguna actividad en infecciones por EPC.

Los resultados del tablero de ajedrez demostraron que las combinaciones más sinérgicas fueron las de plazomicina-fosfomicina y plazomicina-colistina. La combinación menos eficaz fue la de plazomicina-tigeciclina con un 75% de los casos con sinergia parcial alcanzada con dosis superiores a la C_{ss}, por lo que no tendría utilidad en el caso de utilizarse *in vivo*. Un dato importante fue que las combinaciones de plazomicina con alguno de los cuatro antimicrobianos presentaron sinergia en la mayor parte de las cepas resistentes al antimicrobiano correspondiente, indicando la

utilidad de poder utilizar este tipo de combinaciones en las infecciones por cepas resistentes.

En nuestro estudio, con una concentración de plazomicina de 2x CMI hubo efecto bactericida a todos los tiempos estudiados mientras que con una concentración 0,5x CMI no lo presentó en ningún momento. Con una concentración de 1x CMI hubo efecto bactericida pero con un recrecimiento a las 24h.

Se realizaron curvas de letalidad con las combinaciones de plazomicina 0,5x CMI y 1x CMI con los cuatro antimicrobianos a dos cepas seleccionadas. La combinación con fosfomicina resultó ser bactericida y sinérgica con ambas concentraciones de plazomicina a las 24 horas. La combinación con tigeciclina no presentó efecto bactericida y el efecto sinérgico solamente fue con 1x CMI de plazomicina a las 24 horas en una de las dos cepas. Con las otras combinaciones, se pudieron ver mejores resultados cuando se utilizó 1x CMI de plazomicina que 0,5x CMI.

Estos datos demuestran la actividad sinérgica y bactericida de las combinaciones de la plazomicina con fosfomicina, colistina y meropenem, por lo que se deberían de realizar más estudios para la evaluar sus posibles usos en el tratamiento de las infecciones por EPC.

Para evitar la distribución de las EPC es necesario una rápida detección de las mismas por parte del laboratorio, así como un correcto tratamiento antimicrobiano y un adecuado aislamiento de los pacientes infectados y/o colonizados. Una forma rápida de detectar EPC es a través de los métodos fenotípicos, capaces de detectar la producción de carbapenemasas por la hidrólisis de un carbapenémico. Un método ampliamente utilizado es el THM ya que es un método fácil de realizar y barato, aunque presenta

ciertos inconvenientes. A menudo le falta especificidad, ya que hay una gran cantidad de falsos positivos debidos a cepas productoras de enzimas BLEE (CTX-M) o AmpC con una disminución en la permeabilidad. Además es poco sensible en la detección de cepas productoras de NDM. Para mejorar la sensibilidad, *Girlich et al.*¹⁹⁹ incluyeron zinc en los medios de cultivo. *Doyle et al.*²⁰⁰ describieron que el THM presentó un 58% de sensibilidad y 93% de especificidad. Por otro lado, este método requiere un tiempo de incubación de 24-48h y no se puede diferenciar la clase a la que pertenecen las carbapenemasas. A pesar de los problemas que pueda presentar el THM, el CLSI propone este test para la confirmación de aislados productores de carbapenemasas, aunque no debería de ser una confirmación definitiva. La detección fenotípica de cepas productoras de MBL está basada en la inhibición específica de las MBLs por agentes quelantes, como el EDTA. La experiencia de estos métodos en la detección de MBLs está limitada a *K. pneumoniae* y *E. coli*, ya que no han sido sistemáticamente testados en otras especies de enterobacterias. Se debe señalar que la especificidad en la detección de MBL podría verse afectada debido a que los agentes quelantes podrían afectar a otros procesos. La detección fenotípica de cepas productoras de carbapenemasas de clase A está basada en la inhibición del ácido borónico y sus derivados, como el PBA. Como los métodos para la detección de MBLs, la experiencia de estos está limitada a *K. pneumoniae*. En general, los test basados en el ácido borónico muestran una elevada sensibilidad en la detección de KPC. Sin embargo, pueden presentar problemas de especificidad en aquellos aislados con una susceptibilidad disminuida a los carbapenemes debido a una hiperproducción de β -lactamasas AmpC más una pérdida de porinas. Esto se explica porque las enzimas AmpC se inhiben por ácido borónico. La inhibición de la actividad de las cefalosporinasas se consigue mediante el uso de cloxacilina. Combinando el ácido borónico y la cloxacilina se consigue diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas clase A de las cepas productoras de AmpC.

Ninguno de estos test son adecuados para la identificación de cepas productoras de carbapenemasas de clase D. Debido a sus propiedades enzimáticas es complicado desarrollar test fenotípicos específicos para su detección. Una elevada resistencia a la temocilina (CMI > 64 mg/l) y a piperacilina-tazobactam en enterobacterias con una sensibilidad disminuida o resistencia a algún carbapenem puede predecir una producción de OXA-48²⁰¹.

En la actualidad, se están utilizando otros métodos fenotípicos, como son el CNP y la espectrometría de masas MALDI-TOF. En este trabajo quisimos estudiar la capacidad de detección de estos dos métodos con las 123 EPC en el caso del CNP y de 11 aislados de *K. pneumoniae* en el caso del MALDI-TOF.

El CNP es un método basado en la hidrólisis *in vitro* de imipenem por un lisado bacteriano, la cual es detectada por cambios en el valor del pH usando como indicador rojo fenol (del rojo pasa a amarillo/naranja). Además, no requiere de personal entrenado. En nuestro trabajo, el 99,2% de los aislados fueron detectados con el CNP cuando se utilizó el imipenem monohidrato y 69 de 72 aislados (97,2%) cuando se utilizó el imipenem-cilastatina. De los 3 aislados que no fueron detectados utilizando el imipenem-cilastatina, 2 fueron *K. pneumoniae* del ST11 y 1 *E. cloacae*, los tres productores de VIM-1. Estudios previos demostraron que CNP tuvo una especificidad del 100% en la detección de EPC y una sensibilidad del 72,5 al 100%^{202,203}. El CNP es un método fácil de realizar, barato y fácil de interpretar en la mayoría de los casos de aislados productores de KPC y NDM, ya que el color rojo se vuelve amarillo en menos de 30 minutos. El 100% de los aislados productores de KPC-2 de este estudio presentaron el color amarillo en ese tiempo cuando se utilizó el imipenem monohidrato. A veces la interpretación de los resultados con el resto de carbapenemasas puede resultar subjetivo ya que el color resultante es un color amarillo-anaranjado. Para

minimizar esa subjetividad, lo ideal es que el resultado lo interpreten varias personas a doble ciego. Un 15,7% de los positivos con el imipenem-cilastatina resultó tener un color amarillo-anaranjado que podría dificultar la interpretación, un porcentaje superior al del imipenem monohidrato (4,9% de los positivos). La especie más afectada fue *K. pneumoniae* con el ST11. La enzima VIM-1 fue la carbapenemasa predominante. La principal limitación de este método es la reducida habilidad para la detección de cepas productoras de OXA-48. En nuestro estudio, los 2 aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 presentaron un color amarillo-anaranjado con ambas formas de imipenem, poniendo de manifiesto la débil capacidad hidrolítica de estas enzimas.

La espectrometría de masas MALDI-TOF ha sido recientemente introducida en muchos laboratorios de microbiología para la identificación en rutina de bacterias y hongos. Con esta técnica se acorta el proceso de identificación unas 24 horas^{204,205}. Otra de las aplicaciones de esta técnica es la de poder detectar ciertos mecanismos de resistencia, entre ellos las enzimas carbapenemasas²⁰⁶. Tiene una excelente especificidad y sensibilidad. Existen diversos estudios en los que se han utilizado imipenem, meropenem y ertapenem^{127,157,158}. Sin embargo, parece ser que la visualización de la degradación del meropenem mediante el MALDI-TOF es problemática, ya que se produce una unión de las moléculas a los componentes del lisado celular²⁰⁷. Por ello, en nuestro estudio utilizamos el imipenem-cilastatina y el ertapenem. Con este método se obtuvo un 100% de sensibilidad en la detección de la actividad carbapenemasa, aunque el porcentaje de degradación y la rapidez en empezar a degradar cada antimicrobiano varió según la cepa. Los 2 aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 y el único aislado productor de IMP-22 fueron los que mayor porcentaje de degradación del imipenem-cilastatina tuvieron; sin embargo, con el ertapenem fueron 2 productores de VIM-1 de diferente ST y uno de los aislados

productor de KPC-2. Teniendo en cuenta nuestros datos, todas las cepas degradaron más el imipenem-cilastatina que el ertapenem, excepto uno de los aislados productor de VIM-1 perteneciente al ST11.

Una de las ventajas de utilizar el imipenem-cilastatina fue que la cilastatina, al no degradarse, se pudo utilizar como marcador interno para poder normalizar los espectros. En el caso del ertapenem, no tuvimos ningún marcador interno, con lo que observando los espectros vimos que el pico de 212 Da estaba en todos ellos con una intensidad constante. Por otro lado, los datos calculados correspondieron a la media de los 3 picos; sin embargo, en la figura 46 se han representado también los otros por separado, en la cual se pudo observar como el pico de 520 Da se correlacionó bastante bien con la media de los 3 picos. Esto sugiere que podría utilizarse este pico en lugar de la media de los 3 para calcular la degradación del ertapenem.

Tanto el CNP como el MALDI-TOF son una buena alternativa para la detección rápida de EPC en el laboratorio de microbiología. La principal ventaja del MALDI-TOF con respecto al CNP es la mayor sensibilidad en la detección de enzimas OXA-48. Sin embargo, se requiere más tiempo de incubación (4 horas versus 2 horas), mayor procesamiento y mayor interpretación de los resultados que el CNP²⁰⁸. Recientemente, ambos métodos fueron utilizados para la detección de cepas productoras de carbapenemasas en sangre^{209,210}. Utilizando el CNP se obtuvo un 100% de sensibilidad en la detección de KPC, IMP, VIM y NDM y un 91,3% en enzimas tipo OXA-48, mientras que con el MALDI-TOF se obtuvo un 72,4% de sensibilidad. Debido a que el éxito del tratamiento de la bacteriemia depende de la rápida administración de antimicrobianos adecuados, la rápida detección de EPC en los hemocultivos positivos puede suponer una mejoría en los resultados de los pacientes infectados.

CONCLUSIONES

1. En el periodo de estudio se detectaron un total de 123 EPC de las cuales el 64,2% perteneció a la especie *K. pneumoniae*, lo cual supone una prevalencia del 1,7% con respecto al total de *K. pneumoniae* aisladas en este periodo.
2. La infección urinaria seguida de la infección respiratoria, son las principales patologías en las que se encuentran implicadas las EPC. Los pacientes de mayor edad, los inmunosuprimidos y los pacientes de la UCI fueron los más susceptibles a padecer infecciones por estos microorganismos.
3. Las carbapenemasas que se han identificado fueron las enzimas VIM-1, IMP-22, KPC-2 y OXA-48; siendo VIM-1 la carbapenemasa predominante.
4. Hubo una diversidad clonal entre las distintas especies; dentro de la especie *K. pneumoniae* se identificaron 10 STs diferentes, aunque 2 fueron los mayoritarios: el ST11, relacionado con la carbapenemasa VIM-1 y el ST101, relacionado con la carbapenemasa KPC-2.
5. El carbapenémico que presentó mayor actividad fue meropenem. Todos los aislados fueron resistentes a imipenem. Los tres carbapenémicos tuvieron un elevado porcentaje de aislados con CMI's entre 2-8 mg/l en el caso de imipenem y meropenem y de 0,5-8 mg/l en el caso de ertapenem. En estos casos, en la práctica clínica se podrían utilizar carbapenémicos aunque sólo en determinadas circunstancias y preferiblemente asociados a otros antimicrobianos.

6. Los puntos de corte para los carbapenémicos propuestos por el CLSI fueron más sensibles en la detección de EPC que los del EUCAST. El meropenem fue el carbapenémico que presentó mayores discrepancias.

7. Estos microorganismos fueron, con mucha frecuencia, resistentes a los antimicrobianos no β -lactámicos estudiados. Amikacina y fosfomicina fueron los más activos. Hay que destacar la elevada resistencia a tigeciclina entre los aislados de *K. pneumoniae* y a colistina entre los *Enterobacter* spp.

8. En el conjunto de las cepas, el porcentaje de resistencia a los aminoglucósidos fue mayor en las productoras de la enzima KPC-2 que en las de VIM-1. Entre los aislados de *K. pneumoniae*, la resistencia a fosfomicina y colistina fue mayor para los productores de VIM-1.

9. La plazomicina, un nuevo aminoglucósido en Fase 3, mostró una excelente actividad *in vitro*. El 99% de los aislados presentaron una CMI de plazomicina ≤ 2 mg/l, siendo la CMI₅₀ y la CMI₉₀ de 0,25 y 1 mg/l, respectivamente. Los aislados de *S. marcescens* tuvieron los valores más altos, con una CMI₉₀ de 4 mg/l. Al comparar los valores de las CMIs con los presentados por los otros tres aminoglucósidos estudiados, plazomicina resultó mucho más activa.

10. Cuando se evaluó la actividad de plazomicina en combinación con otros antimicrobianos, observamos que las combinaciones más sinérgicas fueron con fosfomicina y con colistina. La combinación de plazomicina con tigeciclina fue la menos eficaz.

11. El test bioquímico Carba NP y la espectrometría de masas MALDI-TOF, usando imipenem-cilastatina o ertapenem, fueron una buena opción en la detección de la actividad carbapenemasa. La sensibilidad del MALDI-TOF fue del 100% con ambos carbapenémicos. En el caso del ertapenem, el pico de 212 Da fue utilizado como marcador interno. Los datos de este estudio sugieren que el pico de 520 Da se podría utilizar para calcular la degradación del ertapenem.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfäuer MA.** Enterobacteriaceae. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfäuer MA. Microbiología médica. Madrid: Elsevier; 2007.p.323-338.
2. **Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al.** Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2010; **15**(46).
3. **Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al.** Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; **34**(1): 1-14.
4. **Podschun R, Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**(4): 589-603.
5. **Struve C, Krogfelt KA.** Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental microbiology* 2004; **6**(6): 584-90.
6. **Suarez C, Gudiol F.** [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**(2): 116-29.
7. **García Sánchez JE, Fresnadillo Martínez MJ, Arce Arce JJ, García Sánchez E.** Antibióticos betalactámicos. En: García Sánchez JE, López R, Prieto J, editores. Antimicrobianos en Medicina. Barcelona. 1ª ed. Prous Science; 1999. p. 213-249.
8. **Tomasz A.** The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1979; **33**: 113-37.
9. **Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC.** Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005; **8**(5): 525-33.
10. **Poole K.** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001; **4**(5): 500-8.
11. **Walsh C.** Enzymatic destruction or modification of the antibiotic by resistant bacteria. En: Walsh C, ed. Antibiotics Actions, origins, resistance. Washington, D. C.: ASM Press; 2003: 107-24.
12. **Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; **289**(1036): 321-31.

13. **Bush K.** Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. *Rev Infect Dis* 1988; **10**(4): 681-90.
14. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**(6): 1211-33.
15. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; **54**(3): 969-76.
16. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews* 2005; **18**(2): 306-25.
17. **Walsh TR.** Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents* 2010; **36 Suppl 3**: S8-14.
18. **Frere JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O.** Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases? *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**(6): 1051-3.
19. **Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, et al.** Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(3): 660-3.
20. **Garau G, Garcia-Saez I, Bebrone C, et al.** Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(7): 2347-9.
21. **Hall BG, Barlow M.** Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**(6): 1050-1.
22. **Rasmussen BA, Bush K.** Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**(2): 223-32.
23. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *The Lancet infectious diseases* 2011; **11**(5): 381-93.
24. **Livermore DM, Woodford N.** The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006; **14**(9): 413-20.
25. **Nordmann P, Poirel L.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002; **8**(6): 321-31.
26. **Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**(3): 373-83.
27. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2007; **20**(3): 440-58, table of contents.

28. **Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**(1): 147-51.
29. **Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG.** ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; **2**(2): 81-7.
30. **Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG.** Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother* 1995; **36**(3): 585-6.
31. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(4): 1151-61.
32. **Canton R, Akova M, Carmeli Y, et al.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; **18**(5): 413-31.
33. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; **60**(3): 470-82.
34. **Poirel L, Pitout JD, Nordmann P.** Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; **2**(5): 501-12.
35. **Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, et al.** Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(5): 1998-2004.
36. **Shen P, Wei Z, Jiang Y, et al.** Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(10): 4333-8.
37. **Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, et al.** A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991; **276** (Pt 1): 269-70.
38. **Kuwabara S, Abraham EP.** Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem J* 1967; **103**(3): 27C-30C.

39. **Lim HM, Pene JJ, Shaw RW.** Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol* 1988; **170**(6): 2873-8.
40. **Iaconis JP, Sanders CC.** Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**(1): 44-51.
41. **Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S.** Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; **22**(4): 564-70.
42. **Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; **70**(2): 296-316.
43. **Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR.** blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**(7): 2636-8.
44. **Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL.** Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*; **25**(4): 682-707.
45. **Poeylout-Palena AA, Tomatis PE, Karsisiotis AI, Damblon C, Mata EG, Vila AJ.** A minimalistic approach to identify substrate binding features in B1 Metallo-beta-lactamases. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; **17**(18): 5171-4.
46. **Bush K.** Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol*; **13**(5): 558-64.
47. **Walsh TR.** Clinically significant carbapenemases: an update. *Current opinion in infectious diseases* 2008; **21**(4): 367-71.
48. **Poirel L, Nordmann P.** Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(4): 1442-8.
49. **Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**(1): 35-40.
50. **Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N.** Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan

hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**(4): 641-7.

51. **Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H.** OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(12): 5035-8.

52. **Poirel L, Potron A, Nordmann P.** OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012; **67**(7): 1597-606.

53. **Aubert D, Naas T, Heritier C, Poirel L, Nordmann P.** Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J Bacteriol* 2006; **188**(18): 6506-14.

54. **Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**(1): 24-38.

55. **Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H.** Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**(2): 233-8.

56. **Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H.** Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**(7): 723-7.

57. **Zhou H, Yang Q, Yu YS, Wei ZQ, Li LJ.** Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(12): 4054-7.

58. **Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, et al.** Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**(3): 1369-73.

59. **Woodford N, Eastaway AT, Ford M, et al.** Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2010; **48**(8): 2999-3002.

60. **Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(1): 15-22.

61. **Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases: a problem in waiting? *Current opinion in microbiology* 2000; **3**(5): 489-95.

62. **Livermore DM.** Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**(9): 2046-8.
63. **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. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**(6): 1093-8.
64. **Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K.** Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**(3): 563-9.
65. **MacKenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, Amyes SG, Gould IM.** Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1997; **350**(9080): 783.
66. **Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM.** Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**(4): 1297-300.
67. **Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al.** Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**(12): 3881-9.
68. **Bradford PA, Bratu S, Urban C, et al.** Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004; **39**(1): 55-60.
69. **Bratu S, Landman D, Haag R, et al.** Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005; **165**(12): 1430-5.
70. **Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, et al.** Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**(1): 128-32.
71. **Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, et al.** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(12): 4793-9.

72. **Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(10): 4423-4.
73. **Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC.** First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(1): 333-4.
74. **Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al.** *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**(7): 1178-80.
75. **Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, et al.** First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(1): 226-9.
76. **Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y.** Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**(8): 3026-9.
77. **Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ.** Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**(2): 763-5.
78. **Greek system for the surveillance of antimicrobial resistance.** KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *European Surveillance* 2009; **14**: 19218.
79. **Fukigai S, Alba J, Kimura S, et al.** Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **29**(3): 306-10.
80. **Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, et al.** Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (blaKPC-2 plus qnrB4) and a blaIMP-4 gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**(2): 798-9.
81. **Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW.** Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2005; **41**(11): 1549-56.
82. **Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P.** First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**(7): 695-6.

83. **Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R.** Isolation of the first metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev Esp Quimioter* 2008; **21**(2): 123-6.
84. **Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM.** First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(1): 516-9.
85. **Moulds N.M. TKS, Hanson N.D.** IMP-27, a novel metallo-beta-lactamase (MBL) associated with a class II integron identified in an isolate of *Proteus mirabilis*. 51st Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy. Chicago, IL.; 2011.
86. **Ktari S, Arlet G, Mnif B, et al.** Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(12): 4198-201.
87. **Yong D, Choi YS, Roh KH, et al.** Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(5): 1884-6.
88. **Marcano D, Pasteran F, Rapoport M, et al.** First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. *J Infect Dev Ctries* 2008; **2**(3): 241-4.
89. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al.** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-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**(12): 5046-54.
90. **Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N.** Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* 2011; **11**(3): 164.
91. **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? *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**(4): 689-92.
92. **Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **36**(1): 91-3.

93. **Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P.** European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**(12): E24-6.
94. **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. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(3): 1274-8.
95. **Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, et al.** Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**(1): 143-4.
96. **Poirel L, Castanheira M, Carrer A, et al.** OXA-163, an OXA-48-Related Class D β -Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**(6): 2546-51.
97. **Samuelsen O, Naseer U, Tofteland S, et al.** Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**(4): 654-8.
98. **Woodford N, Zhang J, Warner M, et al.** Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**(6): 1261-4.
99. **Baraniak A, Izdebski R, Herda M, et al.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(10): 4565-7.
100. **Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, et al.** Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. *J Clin Microbiol* 2009; **47**(11): 3793-4.
101. **Vatopoulos A.** High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill* 2008; **13**(4).
102. **Levast M, Poirel L, Carrer A, et al.** Transfer of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**(4): 944-5.
103. **Decre D, Birgand G, Geneste D, et al.** Possible importation and subsequent cross-transmission of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2010. *Euro Surveill* 2010; **15**(46).

104. **Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P.** Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(5): 2420-3.
105. **Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P.** Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**(9): 3463-4.
106. **Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, et al.** Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**(4): 2125-8.
107. **Tortola MT, Lavilla S, Miro E, et al.** First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; **49**(8): 3492-4.
108. **Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, 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 : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2007; **45**(9): 1171-8.
109. **Sanchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, et al.** Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother*; **56**(1): 420-7.
110. **Miro E, Segura C, Navarro F, et al.** Spread of plasmids containing the bla(VIM-1) and bla(CTX-M) genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**(4): 661-5.
111. **Oteo J, Hernandez-Almaraz JL, Gil-Anton J, et al.** Outbreak of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*; **29**(12): 1144-6.
112. **Oteo J, Saez D, Bautista V, et al.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**(12): 6344-7.
113. **Miro E, Agüero J, Larrosa MN, et al.** Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; **32**(2): 253-9.

114. **Perez-Llarena FJ, Fernandez A, Zamorano L, et al.** Characterization of a novel IMP-28 metallo-beta-lactamase from a Spanish *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*; **56**(8): 4540-3.
115. **Sole M, Pitart C, Roca I, et al.** First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; **55**(9): 4402-4.
116. **Gomez-Gil MR, Pano-Pardo JR, Romero-Gomez MP, et al.** Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother*; **65**(12): 2695-7.
117. **Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, et al.** Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**(8): 1608-14.
118. **Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F.** First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; **55**(9): 4398-401.
119. **Pano-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, 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. *J Antimicrob Chemother*; **68**(1): 89-96.
120. **Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V.** Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; **18**(5): 432-8.
121. **Woodford N, Dallow JW, Hill RL, et al.** Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **29**(4): 456-9.
122. **Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, et al.** Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *Journal of clinical microbiology* 2010; **48**(7): 2402-6.
123. **Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A.** Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-

carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? *Journal of clinical microbiology* 2011; **49**(2): 697-701.

124. **Tato M, Morosini M, Garcia L, Alberti S, Coque MT, Canton R.** Carbapenem Heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology* 2010; **48**(11): 4089-93.

125. **Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.** Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**(2): 88-91.

126. **Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N.** A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**(4): 552-6.

127. **Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T.** Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; **49**(9): 3222-7.

128. **Nordmann P, Poirel L, Dortet L.** Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**(9): 1503-7.

129. **Ulyashova CE, Khalilova YI, Rubtsova CE, Edelstein CE, Alexandrova Icapital A C, Egorov CA.** Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D. *Acta naturae* 2010; **2**(3): 101-9.

130. **Levy Hara G, Gould I, Endimiani A, et al.** Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: recommendations from an International Working Group. *J Chemother* 2013; **25**(3): 129-40.

131. **Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN.** Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**(2): 570-3.

132. **Toth A, Damjanova I, Puskas E, et al.** Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; **29**(7): 765-9.

133. **Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, et al.** Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect* 2010; **76**(1): 70-3.
134. **Hirsch EB, Tam VH.** Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**(6): 1119-25.
135. **Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al.** Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**(4): 2108-13.
136. **Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M, et al.** Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(5): 1868-73.
137. **Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al.** Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**(12): 1798-803.
138. **Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al.** Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012.
139. **Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, et al.** ACHN-490, a neoglycoside with potent in vitro activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(10): 4504-7.
140. **Aggen JB, Armstrong ES, Goldblum AA, et al.** Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**(11): 4636-42.
141. **Stachyra T, Levasseur P, Pechereau MC, et al.** In vitro activity of the {beta}-lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and *Enterobacteriaceae* expressing KPC carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**(2): 326-9.
142. **Endimiani A, Choudhary Y, Bonomo RA.** In vitro activity of NXL104 in combination with beta-lactams against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(8): 3599-601.

143. **Gijon D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Canton R.** Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *Journal of clinical microbiology* 2012; **50**(5): 1558-63.
144. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Guidance for control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* 2012 CRE Toolkit [document on the Internet]. *Atlanta (GA): CDC* 2012.
145. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer. *Stockholm: ECDC* 2011.
146. **Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH.** Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32**(6): 475-80.
147. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(9): 2233-9.
148. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21th informational supplement document m100-s21. *CLSI, Wayne, PA* 2011; **31**.
149. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2011; **Version 1.3**.
150. **Nicolau DP.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; **47 Suppl 1**: S32-40.
151. **Pfausler B, Spiss H, Dittrich P, Zeitlinger M, Schmutzhard E, Joukhadar C.** Concentrations of fosfomicin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**(5): 848-52.
152. **Li J, Coulthard K, Milne R, et al.** Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**(6): 987-92.
153. **Meagher AK, Ambrose PG, Grasela TH, Ellis-Grosse EJ.** Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile for tigecycline-a new glycylcycline

- antimicrobial agent. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2005; **52**(3): 165-71.
154. **Amsterdam, D.** Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En Lorian V.(ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, MD: 3rd ed. Williams and Wilkins; 1991. p. 61-143.
155. **Pillai SK, Moellering, R C Jr, Eliopoulos, G.** Antimicrobial combinations. En Lorian V.(ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, MD: 3rd ed. Williams and Wilkins; 1991. p.365-440.
156. **Moody, JA.** Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. En: Isenberg, H.D. *Clinical procedures handbook*. Washington, DC: ASM Press; 1992. p. 5.18.1-5.18.28.
157. **Alvarez-Buylla A, Picazo JJ, Culebras E.** Optimized method for *Acinetobacter* species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; **51**(5): 1589-92.
158. **Burckhardt I. ZS.** Using matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; **49**(9): 3321-4.
159. **Johansson A, Ekelof J, Giske CG, Sundqvist M.** The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol* 2014; **14**: 89.
160. **Coelho A, Piedra-Carrasco N, Bartolome R, et al.** Role of IncHI2 plasmids harbouring blaVIM-1, blaCTX-M-9, aac(6')-Ib and qnrA genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. *Int J Antimicrob Agents*; **39**(6): 514-7.
161. **Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, et al.** Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**(2): 317-21.
162. **Oteo J, Calbo E, Rodriguez-Bano J, et al.** [The threat of the carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain: Positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA.]. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2014.
163. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Canton R.** Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and

conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; **54**(1): 320-7.

164. **Cuzon G, Naas T, Truong H, et al.** Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**(9): 1349-56.

165. **Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, et al.** Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(12): 5493-9.

166. **Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y.** ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**(2): 307-12.

167. **Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, et al.** Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**(11): 2487-92.

168. **Mammìna C, Bonura C, Aleo A, et al.** Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **39**(6): 543-5.

169. **Tsakris A, Poulou A, Markou F, et al.** Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(7): 3164-8.

170. **Hoeningl M, Valentin T, Zarfel G, et al.** Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**(4): 2158-61.

171. **Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX.** Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**(6): 2014-8.

172. **Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, et al.** In vivo acquisition of a plasmid-mediated bla(KPC-2) gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 2010; **48**(7): 2546-9.

173. **Nazik H, Aydin S, Albayrak R, et al.** Detection and spread of oxa-48-producing *Klebsiella oxytoca* isolates in Istanbul, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; **45**(1): 123-9.

174. **Mataseje LF, Boyd DA, Delport J, et al.** *Serratia marcescens* harbouring SME-type class A carbapenemases in Canada and the presence of blaSME on a novel genomic island, SmarGI1-1. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**(7): 1825-9.
175. **Psichogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al.** Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**(1): 59-63.
176. **Daikos GL, Markogiannakis A.** Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**(8): 1135-41.
177. **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. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**(12): 1099-106.
178. **Hussein K, Raz-Pasteur A, Finkelstein R, et al.** Impact of carbapenem resistance on the outcome of patients' hospital-acquired bacteraemia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 2013; **83**(4): 307-13.
179. **Neuner EA, Yeh JY, Hall GS, et al.** Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2011; **69**(4): 357-62.
180. **Nguyen M, Eschenauer GA, Bryan M, et al.** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2010; **67**(2): 180-4.
181. **Lee GC, Burgess DS.** Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*; **11**: 32.
182. **Temkin E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y.** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. *Ann N Y Acad Sci* 2014; **1323**(1): 22-42.
183. **Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N.** What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International journal of antimicrobial agents* 2011; **37**(5): 415-9.

184. **Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al.** Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **29**(4): 380-8.
185. **Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**(2): 796-7.
186. **Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al.** An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2010; **50**(3): 364-73.
187. **Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G.** Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**(3): 240-3.
188. **Suh JY, Son JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH.** Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**(1): 560-2.
189. **Marchaim D, Chopra T, Perez F, et al.** Outcomes and genetic relatedness of carbapenem-resistant enterobacteriaceae at Detroit medical center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; **32**(9): 861-71.
190. **Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D.** Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**(4): 946-7.
191. **Poudyal A, Howden BP, Bell JM, et al.** In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**(6): 1311-8.
192. **Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, et al.** Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med* 2008; **36**(3): 807-11.
193. **Samonis G, Matthaiou DK, Kofteridis D, Maraki S, Falagas ME.** In vitro susceptibility to various antibiotics of colistin-resistant gram-negative bacterial isolates

in a general tertiary hospital in Crete, Greece. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2010; **50**(12): 1689-91.

194. **Van Wart AF S.A., BCC, Ambrose P.G., Kostrub C.F., Louie A., Drusano G.L., Bhavnani S.M.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment predicts high efficacy for plazomicin against serious infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Denver, CO; 2013.

195. **Galani I, Souli M, Daikos GL, et al.** Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. *J Chemother*; **24**(4): 191-4.

196. **Landman D, Babu E, Shah N, et al.** Activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from New York City. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**(10): 2123-7.

197. **Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, et al.** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**(8): 4443-51.

198. **Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, et al.** Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother*; **66**(1): 48-53.

199. **Girlich D, Poirel L, Nordmann P.** Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology* 2012; **50**(2): 477-9.

200. **Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD.** Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; **50**(12): 3877-80.

201. **Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, et al.** Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **39**(2): 168-72.

202. **Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P.** Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol* 2014; **63**(Pt 5): 772-6.

203. **Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG.** Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**(9): 4578-80.
204. **Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D.** MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 2010; **5**(11): 1733-54.
205. **Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S.** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; **93**(3): 965-74.
206. **Hrabak J, Chudackova E, Walkova R.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; **26**(1): 103-14.
207. **Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; **50**(3): 927-37.
208. **Knox J, Jadhav S, Seviour D, et al.** Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and the Carba NP Test. *J Clin Microbiol* 2014; **52**(11): 4075-7.
209. **Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P.** Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**(4): 340-4.
210. **Carvalhoes CG, Cayo R, Visconde MF, et al.** Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**(8): 2132-6.

ANEXO



Short Communication

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates

Irene Pena^a, Juan J. Picazo^{a,b}, Carmen Rodríguez-Avial^b, Iciar Rodríguez-Avial^{a,*}^a Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain^b Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2013

Accepted 23 January 2014

Keywords:

Carbapenem

Colistin

Resistance

ST11

ST101

Klebsiella pneumoniae

ABSTRACT

Here we describe the carbapenemase genes, genetic relatedness and antimicrobial susceptibility data of 123 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) clinical isolates recovered from 2010 to 2012, comprising *Klebsiella pneumoniae* ($n = 79$), *Klebsiella oxytoca* ($n = 13$), *Serratia marcescens* ($n = 14$), *Enterobacter cloacae* ($n = 12$), *Enterobacter asburiae* ($n = 4$) and *Enterobacter aerogenes* ($n = 1$). VIM-1 was the most common carbapenemase ($n = 101$) followed by KPC-2 ($n = 19$), OXA-48 ($n = 2$) and IMP-22 ($n = 1$). Among the *K. pneumoniae* isolates, nine sequence types (STs) were identified but two clones were dominant: ST11 (54/79) containing mainly VIM-1-producing isolates; and ST101 (13/79) constituted by KPC-2-producing strains. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed a higher genetic diversity among the remaining Enterobacteriaceae. Amikacin and fosfomycin were the most active agents with 82.9% and 80.5% susceptibility, respectively. Non-susceptibility to tigecycline was detected in 36.5% of strains. Overall, colistin resistance was 24.7% and was as high as 47% in *Enterobacter* spp. An increase in colistin resistance from 13.5% to 31.7% was observed among *K. pneumoniae* isolates during the study period. Resistance was focused on ST11 since 83.3% of colistin-resistant strains belonged to this clone. The high level of colistin resistance observed in this study is worrying with respect to the already limited therapeutic options for infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria.

© 2014 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past 10 years the rate of carbapenem resistance among Enterobacteriaceae, and mostly among *Klebsiella pneumoniae*, has increased considerably worldwide. In the USA, among healthcare-associated infections, the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reported a significant increase in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* from <1% in 2000 to 8% in 2007. In Europe, data from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) database showed that during the year 2011 the rates of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* reached 68.2% in Greece, although with substantial differences from country to country.

The most common mechanism for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae is the production of different types of carbapenemases belonging to three of the four β -lactamase classes (classes A, B and D) [1]. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

(CPE) are still uncommon in Spain, although isolates producing metallo- β -lactamases (MBLs) and, less frequently, KPC or OXA-48 enzymes have been reported [2–4].

Many CPE are highly multiresistant but may remain susceptible to one or more aminoglycosides as well as to tigecycline and/or colistin. However, resistance to these compounds has begun to emerge [5,6].

In 2008, a VIM-1-producing *K. pneumoniae* isolate was identified for the first time in Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain) [7]. Since then sporadic cases have been detected and in 2010, owing to the noted increase in the number of CPE isolates, the current study was initiated. Here we report the carbapenemase genes, clonal relatedness and antimicrobial susceptibility data of CPE isolated over 2 years in a tertiary hospital in Madrid, Spain.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and susceptibility testing

From September 2010 to September 2012, enterobacterial strains with an imipenem minimum inhibitory concentration (MIC)

* Corresponding author. Tel.: +34 913 303 486; fax: +34 913 303 478.
E-mail address: iciaravial@hotmail.com (I. Rodríguez-Avial).