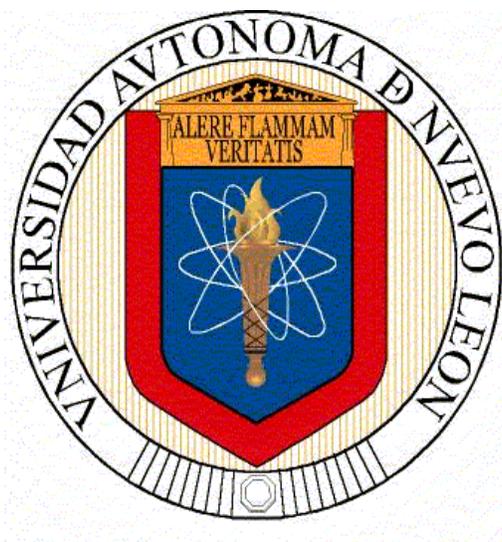


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE HOSPITALARIO DE
ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS**

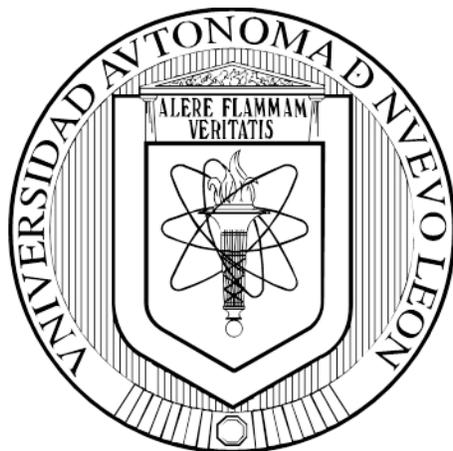
POR

M.C. PAOLA BOCANEGRA IBARIAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE HOSPITALARIO DE
ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS**

POR

M.C. PAOLA BOCANEGRA IBARIAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGÍA**

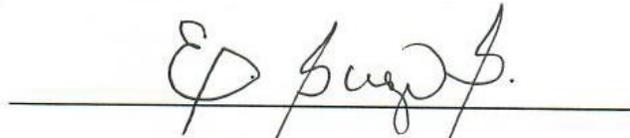
FEBRERO, 2017

**CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE HOSPITALARIO DE ENTEROBACTERIAS
RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS**

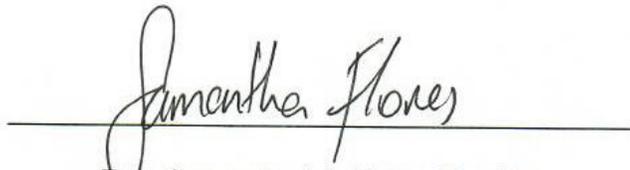
Comité de tesis



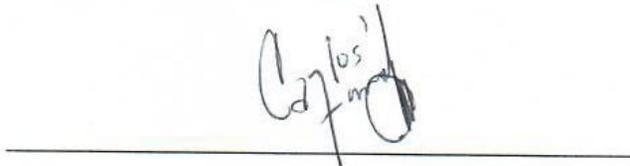
**Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente**



**Dra. Elvira Garza González
Secretario**



**Dra. Samantha M. Flores Treviño
Vocal**



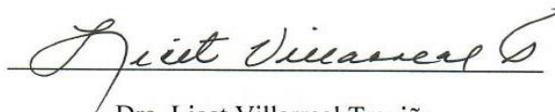
**Dr. Carlos E. Hernández Luna
Vocal**



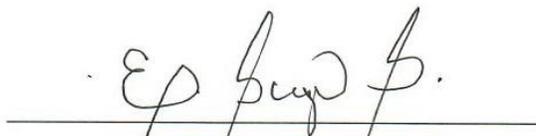
**Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal**

**CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE HOSPITALARIO DE ENTEROBACTERIAS
RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS**

Dirección de tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño
Director



Dra. Elvira Garza González
Director externo

“CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE HOSPITALARIO DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS”

Presentado por:

M. C. Paola Bocanegra Ibarias

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño; en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” bajo la asesoría de la Dra. Elvira Garza González y en el Departamento de Diagnóstico Epidemiológico del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos a cargo del Dr. Jesús Silva Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado. Al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y en el Departamento de Diagnóstico Epidemiológico del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

Quiero agradecer a mis asesoras de tesis, la *Dra. Licet Villarreal Treviño* y la *Dra. Elvira Garza González* por todo su apoyo, la confianza que depositaron en mí y por lo mucho que me han enseñado a nivel profesional y personal durante este proyecto. Esta travesía no ha sido sencilla, pero les agradezco enormemente por toda la paciencia y la excelente disposición que han tenido para ayudarme en cada uno de los pasos y para siempre brindarme excelentes oportunidades para mi crecimiento profesional, ambas son excelentes seres humanos e investigadoras y estoy muy agradecida por haber tenido la oportunidad de trabajar con ustedes.

A mi comité de tesis integrado por la *Dra. Samantha Flores Treviño*, el *Dr. Carlos Hernández Luna* y el *Dr. Juan F. Contreras Cordero* por aceptar ser parte de este proyecto, dedicar su tiempo, aportar experiencia y por todo su apoyo durante estos tres años.

A la *Dra. Rayo Morfín Otero* y el *Dr. Eduardo Rodríguez Noriega* por el apoyo brindado en cada paso y confiar en mí para llevar a cabo este trabajo, por su cordialidad y su excelente calidad como investigadores y seres humanos.

A el *Dr. Jesús Silva Sánchez*, el *Dr. Humberto Barrios Camacho* y el *Dr. Ulises Garza Ramos* por todo el tiempo, dedicación, enseñanzas y apoyo que me brindaron durante mi preparación académica.

A *Lucy Acevedo*, *Teresa Rojas* y *Alejandro Sánchez* por sus enseñanzas y toda la ayuda que me prestaron durante los experimentos que llevé a cabo, pero especialmente por hacer un gran ambiente de trabajo.

A toda mi familia que siempre ha estado para apoyarme sin importar las adversidades. Gracias por su apoyo incondicional, especialmente a mis padres *Ma. Lourdes Ibarias Cruz* y *Julio César Bocanegra Oropeza*, así como a mis tíos *Roberto Alonso Ibarias Cruz* y *Griselda Ibarias Cruz* por toda la confianza que tienen en mí, por sus enseñanzas de vida, porque siempre logran ver lo mejor en mí y nunca me dejan rendirme, por alegrarse por cada uno de mis logros y compartirlos conmigo. Por enseñarme como ser una mejor persona y a comprender que con decisión y dedicación todo es posible. Muchísimas gracias por estar tan presentes en mi vida a pesar de la distancia y por siempre demostrarme lo mucho que me aman, igual que yo lo hago.

A mis *roomies* para toda la vida *Claudia Álvarez Bazaldúa* y *Selene Álvarez Estrada* porque sin importar la distancia física siempre sé que puedo contar con ustedes y con sus palabras de ánimos.

A mis queridas amigas *Irene Rodríguez Valencia*, *Corazón Martínez Mejía* y *Sayde Mireles Ibarra* por su valiosa amistad, por toda la paciencia y el apoyo que siempre has tenido conmigo, gracias por estar presentes en momentos complicados y por siempre demostrarme lo mucho que me quieren.

Gracias a *Angel Merino Mascorro*, *Mariel Oyervides Muñoz* y *Kame Galán Huerta* por los buenos momentos que hemos pasado, la paciencia y los consejos de vida que me han brindado en su particular y peculiar manera de ver las cosas.

A mis compañeros y amigos *Samantha Flores Treviño*, *Soraya Mendoza Olazarán*, *Perla López Salas* y *Néstor Casillas Vega* por todas las enseñanzas a nivel profesional y personal que me han brindado y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A todos mis compañeros en los distintos laboratorios que tuve la fortuna de conocer en este tiempo y en especial a *Adrián Martínez Meléndez*, *Jessica Gutiérrez Ferman*, *Abril Herrera Heredia*, *Stephania Domínguez*, *Andrea Diego*, *Jeannet Olguín Rodríguez*, *Emmanuel Hernández Rodríguez*, hicieron muy llevadero el trabajo en el laboratorio y siempre se han portado de maravilla conmigo y por todo el momento que tuvimos la fortuna de compartir dentro y fuera del laboratorio.

Thank you to *Nicolas Kieffer*, *Deniz Güneşer*, *Marc Blouin* and *Valerie Denervaud* to made of my stay in Switzerland so special. There are memories of my time there with you than I will treasure forever.

DEDICATORIA

A mi mamá, la persona que más admiro y que me ha enseñado que no importan las adversidades que se nos presenten uno debe poner siempre la vista en el objetivo y continuar hasta conseguirlo y a mi segunda mamá, mi tía Magdalena, que siempre sin importar el tiempo y las distancia me demostró lo mucho que me quería y lo orgullosa que estaba de mí.

Las quiero mucho y gracias por siempre apostar por mí.

ÍNDICE

Sección	Página
COMITÉ DE TESIS	I
DIRECCIÓN DE TESIS	II
LUGAR DE TRABAJO	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades de la familia Enterobacteriaceae	3
2.1.1. Género <i>Klebsiella</i> : generalidades y patologías	3
2.1.2. Género <i>Escherichia</i> : generalidades y patologías	5
2.1.3. Género <i>Enterobacter</i> : generalidades y patologías	6
2.1.4. Género <i>Providencia</i> : generalidades y patologías	6
2.1.5. Género <i>Citrobacter</i> : generalidades y patologías	7
2.2. Resistencia a antimicrobianos	7
2.2.1. Propagación de resistencia por regiones móviles	8
2.2.2. Mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos	9
2.2.2.1. Betalactamasas Clase A	10
2.2.2.2. Betalactamasas Clase B	11
2.2.2.3. Betalactamasas Clase D	12
2.3. Diseminación de enterobacterias resistentes a carbapenémicos	12
2.4. Factores de virulencia en <i>K. pneumoniae</i>	14
2.4.1. Cápsula	14
2.4.2. Lipopolisacáridos	15
2.4.3. Fimbrias	16
2.4.4. Sideróforos	17
2.4.5. Formación de biopelícula	18

3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS DEL TRABAJO	22
5.1. General	22
5.2. Específicos	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1. Estrategia general	23
6.2. Identificación del brote hospitalario	23
6.3. Aislamientos clínicos	24
6.4. Identificación	24
6.5. Determinación de la producción de carbapenemasas	24
6.6. Detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos	25
6.6.1. Obtención de ADN por lisis térmica	25
6.6.2. Detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos	26
6.7. Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos	27
6.7.1. Preparación del inóculo	27
6.7.2. Preparación de placas	28
6.7.3. Clasificación de los aislamientos	29
6.8. Identificación y caracterización del plásmido portador de resistencia a carbapenémicos	30
6.8.1. Obtención del patrón electroforético de plásmidos	30
6.8.2. Conjugación bacteriana	31
6.8.3. Transformación mediante electroporación	32
6.8.4. Hibridación	33
6.8.4.1. Transferencia mediante <i>Southern blot</i>	33
6.8.4.2. Hibridación con sondas quimioluminiscentes	34
6.8.5. Digestión enzimática	35
6.8.6. Determinación del grupo de incompatibilidad	36

6.9. Detección de clonas	36
6.9.1. Electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP)	36
6.9.2. Análisis mediante tipificación multilocus de secuencias	38
6.10. Determinación de factores de virulencia	40
6.10.1. Determinación de viscosidad	40
6.10.2. Determinación de serotipos capsulares	40
6.10.3. Determinación de genes que codifican para factores de virulencia	41
6.10.4. Determinación de producción de biopelícula	41
7. RESULTADOS	43
7.1. Identificación y origen de los aislamientos	43
7.2. Identificación de carbapenemasas	44
7.3. Información clínica	45
7.4. Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos	46
7.5. Identificación de plásmidos	47
7.6. Caracterización de plásmidos portadores de carbapenemasas	48
7.7. Diversidad clonal	50
7.8. Factores de virulencia	52
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	61
10. PERSPECTIVAS	62
11. BIBLIOGRAFÍA	63
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	68
13. ANEXOS	69
I. Pruebas fenotípicas de identificación a nivel género	69
II. Recopilación de resultados por aislamiento	71
III. Preparación de reactivos	78
IV. Premio José Ruiloba	81
V. Artículo	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de especies del género <i>Klebsiella</i> por distintos sistemas de taxonomía	4
2. Interpretación de la prueba de CarbaNP	25
3. Iniciadores de genes asociados a resistencia a carbapenémicos	27
4. Puntos de corte empleados para los antibióticos analizados	29
5. Iniciadores para determinación de grupos de incompatibilidad	35
6. Iniciadores empleados para MLST	38-39
7. Iniciadores de genes que codifican para factores de virulencia en <i>K. pneumoniae</i>	41
8. Antibióticos utilizados previo a cultivo bacteriano positivo	46
9. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> NDM-1	47
10. Distribución de factores de virulencia en aislamientos resistentes y susceptibles a carbapenémicos	53
11. Producción de biopelícula en aislamientos resistentes y susceptibles a carbapenémicos	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismo de acción de las betalactamasas	10
2. Distribución mundial de carbapenemasas en enterobacterias	13
3. Esquema de principales mecanismos de resistencia en <i>K. pneumoniae</i> con un fenotipo clásico e hipervirulento	14
4. Esquema de distribución de antibióticos y concentraciones empleadas en la placa de microtitulación	28
5. Esquema de transferencia mediante <i>Southern blot</i>	34
6. Área hospitalaria de procedencia de los distintos aislamientos	43
7. Distribución temporal de los aislamientos resistentes a carbapenémicos	45
8. Perfil de plásmidos e hibridación de aislamientos resistentes a carbapenémicos con patrón de plásmidos representativo	48
9. Patrón de restricción con la enzima <i>HinIII</i>	49
10. Dendograma de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos	51
11. Distribución temporal de clonas de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos	52

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
g	Gramos
h	Horas
kb	Kilobases
L	Litros
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Concentración milimolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
pMol	Concentración en picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
UV	Ultravioleta
v	Voltios
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

Objetivos: Realizar la caracterización microbiológica y molecular de un brote hospitalario de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) en un hospital de tercer nivel en Jalisco, México. **Material y Métodos:** De septiembre del 2014 a julio del 2015, se colectaron todos los aislados clínicos ERC en el Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde” en Guadalajara, Jalisco. Se les determinó la susceptibilidad a antibióticos, la producción de carbapenemasas y se investigaron los genes que codifican para las enzimas KPC, NDM, IMP, VIM y OXA-48 y los perfiles plasmídicos. Se determinó la capacidad de los aislamientos de transferir la resistencia a carbapenémicos mediante ensayos de conjugación y *Southern-blot*; la relación clonal mediante electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP) y se realizó la tipificación de secuencias multi locus (MLST). Se determinaron la producción de biopelícula y la presencia de 14 genes de virulencia en aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes y susceptibles a carbapenémicos. **Resultados:** Se detectaron 52 aislamientos resistentes a carbapenémicos: *Klebsiella pneumoniae* (n = 46), *Enterobacter cloacae* (n = 3), *Escherichia coli* (n = 1), *Providencia rettgeri* (n = 1) y *Citrobacter freundii* (n = 1). El gen detectado en mayor frecuencia fue NDM-1 (92.3%), seguido de VIM (4%), IMP (2%) y KPC (2%). El gen NDM-1 se detectó en plásmidos de 130 a 170 kb en *K. pneumoniae* (90%), *E. cloacae* (6%), *E. coli* (2%) y *P. rettgeri* (2%); y se detectó en diferentes fragmentos de restricción. La clona predominante (clona A) de *K. pneumoniae* incluyó 28/48 (60%) aislamientos. Se detectaron *K. pneumoniae* ST307, ST309, ST392, ST846, ST2399 y ST2400, así como *E. cloacae* ST182 y *E. coli* ST10. Los genes *fimA* y *uge* fueron detectados con más frecuencia en cepas de *K. pneumoniae* susceptibles a carbapenémicos ($p = <0.001$) y la producción de biopelícula se detectó con más frecuencia en aislamientos resistentes a carbapenémicos ($p = <0.05$). **Conclusiones:** En el estudio del brote hospitalario por ERC en el “Hospital Civil de Guadalajara” en Jalisco, México se detectaron cuatro especies de enterobacterias portadoras del gen NDM-1. El brote se propagó por transferencia horizontal del plásmido portador del gen NDM-1, y por transmisión de cepas portadoras del gen. La presencia de plásmidos de distinto tamaño como portadores del gen NDM-1, así como la presencia de este gen en diferentes fragmentos plasmídicos sugieren un rearrreglo de los plásmidos portadores. La presencia de los genes VIM, KPC e IMP se consideró como un evento esporádico.

ABSTRACT

Objectives: To characterize the microbiological and molecular data of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in a tertiary-care hospital in Mexico.

Methods: From September 2014 to July 2015, fifty-two clinical isolates of CRE were collected in the Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde" in Jalisco, Mexico. Antimicrobial susceptibility, carbapenemase production and KPC, NDM, IMP, VIM and OXA-48 genes were screened. Horizontal transfer of imipenem resistance and plasmid profiles were analyzed. Clonal diversity was performed by pulsed gel electrophoresis (PFGE) and MLST. Biofilm production and the presence of virulence genes *K1*, *K2*, *entB*, *iroB*, *irp2*, *iucA*, *fimA*, *fimB*, *mgrkA*, *mgrkD*, *uge*, *urea*, *rmpA* y *rmpA2* were analyzed.

Results: Carbapenemase genes NDM-1 (92.3%), VIM (4%), IMP (2%) and KPC (2%) were detected. The NDM-1 gene was detected in four species: *K. pneumoniae* (90%), *E. cloacae* (6%), *E. coli* (2%) and *P. rettgeri* (2%). NDM-1 was detected on different plasmids from 138 to 162 kb. The transfer of plasmids was obtained in eight transconjugants. One restriction pattern was detected, and the NDM-1 was detected in different restriction fragments. A majority of *K. pneumoniae* isolates (60%, 28/48) were type clone A, and several sequence types were identified: *K. pneumoniae* ST307, ST309, ST392, ST846, ST2399, and ST2400; *E. cloacae* ST182 and *E. coli* ST10. The presence of *fimA* and *uge* genes was found to be associated with carbapenem-susceptible isolates ($P = <0.001$). Biofilm production was also found to be associated with carbapenem-resistance ($P = <0.05$).

Conclusions: Four Enterobacteriaceae species harbouring the NDM-1 gene were detected in a nosocomial outbreak in the Hospital Civil de Guadalajara in Jalisco, Mexico; horizontal transfer and strain transmission were demonstrated through the NDM-1 gene. Given the variation in the size of the plasmid harbouring NDM-1, complex rearrangements must also be occurring. The presence of KPC, VIM and IMP genes was sporadic.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones asociadas a la atención de la salud relacionadas con enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) son de gran importancia por la facilidad de esta Familia de diseminarse en el ambiente hospitalario; se presentan como brotes y el tratamiento es complicado debido a los pocos antibióticos disponibles para estos fenotipos (Jean *et al.* 2015).

Las especies que conforman a la familia *Enterobacteriaceae* son patógenos oportunistas que pueden ser endémicos en el ambiente hospitalario y se asocian a infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) a nivel mundial.

La organización mundial de la salud (OMS) reconoce a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* como dos de los principales patógenos farmacorresistentes causantes de IAAS (Weiner *et al.* 2016). *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. ocupan el primer, tercer y octavo lugar, respectivamente, de incidencia en IAAS según lo reportado por el *National Healthcare Safety Network* (NHSN) en el 2016.

Se han reportado varios mecanismos relacionados con la resistencia a carbapenémicos en enterobacterias, pero el de mayor importancia clínica es la producción de carbapenemasas. Estas enzimas son un tipo de betalactamasas que actúan hidrolizando el anillo betalactámico de estos antibióticos provocando su inactivación

Las carbapenemasas reportadas en las enterobacterias corresponden principalmente a la de tipo KPC de la clase A de Ambler; las de tipo IMP, NDM y VIM de la clase B o metalobetalactamasas y la de tipo OXA-48 de la clase D u oxacilinasas. Los genes que codifican para estas enzimas pueden estar presentes integrados al cromosoma o en elementos móviles como plásmidos conjugativos, integrones o transposones, lo cual favorece su diseminación y propagación (Potter *et al.* 2016).

Las especies de la familia *Enterobacteriaceae* presentan numerosos factores de virulencia y persistencia que contribuyen a su patogenicidad. Entre estos factores se encuentran la producción

cápsula, los lipopolisacáridos, los sistemas de obtención de hierro y adhesinas, además la producción de biopelícula y la resistencia al calor (Paczosa y Mecsas 2016).

Los factores de virulencia y persistencia presentes en la familia *Enterobacteriaceae* en conjunto con la resistencia a carbapenémicos pueden favorecer el éxito epidemiológico que estos microorganismos presentan. Existen pocos estudios que correlacionen la presencia de estos factores con la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos (Fuursted *et al.* 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la familia *Enterobacteriaceae*

El nombre de *Enterobacteriaceae* fue propuesto por primera vez por Rahn en 1937 y comprende un grupo grande de especies relacionadas genética y bioquímicamente. Pertenecen al filo Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria y Orden Enterobacteriales (Brenner 2005).

En 1960 se llevó a cabo la clasificación de los géneros que integran esta familia, basado en las características fenotípicas. Posteriormente se clasificaron en base al análisis de la secuencia del gen 16S de RNA ribosomal. En base a esta nueva clasificación, el número de géneros y especies de Enterobacterias aumentó de 12 géneros y 36 especies a 34 géneros, 149 especies y 21 subespecies en el 2006 (Baylis 2006).

La familia *Enterobacteriaceae* recibe su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo de muchos animales además del hombre, aunque también se encuentran en el suelo, el agua y la vegetación (Baylis 2006).

Esta familia está constituida por un grupo grande y heterogéneo de especies Gram negativas, anaerobios facultativos, no formadoras de esporas, que con algunas excepciones reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa a ácido con o sin producción de gas, son oxidasa negativos, producen catalasa y la mayoría son móviles. Mediante microscopía pueden observarse con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0.5 μm de diámetro.

Klebsiella pneumoniae, *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp. son las especies más frecuentemente asociadas a IAAS, con el tercer, cuarto, y décimo lugar, respectivamente (Magill *et al.* 2014).

2.1.1. Género *Klebsiella*: generalidades y patologías

El género *Klebsiella* originalmente estaba subdividido en tres especies en función de las enfermedades causadas: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*; sin embargo con los avances de la taxonomía se han realizado nuevas clasificaciones de las cuales tres sistemas persisten hasta la actualidad: Cowasn, Bascomb y Ørskov (Tabla 1) (Podschun y Ullmann 1998).

Tabla 1. Clasificación de especies del género *Klebsiella* por distintos sistemas de taxonomía

Cowan	Bascomb	Ørskov
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>K. aerogenes</i> ▪ <i>K. edwardsii</i> <ul style="list-style-type: none"> - Subespecie <i>edwardsii</i> - Subespecie <i>atlantae</i> ▪ <i>K. pneumoniae</i> ▪ <i>K. ozaenae</i> ▪ <i>K. rhinoscleromatis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>K. aerogenes/ oxytoca/ edwardsii</i> ▪ <i>K. pneumoniae</i> <ul style="list-style-type: none"> - Sensu estricto - Sensu lato ▪ <i>K. ozaenae</i> ▪ <i>K. rhinoscleromatis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>K. pneumoniae</i> <ul style="list-style-type: none"> - Subespecie <i>pneumoniae</i> - Subespecie <i>ozaenae</i> - Subespecie <i>rhinoscleromatis</i> ▪ <i>K. oxytoca</i> ▪ <i>K. terrigena</i> ▪ <i>K. planticola (K. trevisanii)</i> ▪ <i>K. ornithinolytica</i>

Las especies del género *Klebsiella* son fermentadores de la lactosa, la mayoría produce colonias mucoides en medios sólidos debido a la producción de una cápsula de polisacárido abundante y son inmóviles. Pueden crecer en cianuro de potasio (KCN) utilizar citrato como única fuente de carbono (Podschn y Ullmann 1998).

Las especies de este género son ubicuas en la naturaleza y se presentan comúnmente en dos hábitats *a*) en el medio ambiente (aguas superficiales, aguas residuales, el suelo y en plantas); y *b*) en la superficie de las mucosas de mamíferos como seres humanos, caballos, o cerdos, los cuales se encuentran colonizados por estos microorganismos.

En los seres humanos, *K. pneumoniae* es un saprófito en la nasofaringe y en el tracto gastrointestinal. La tasa de detección en heces va del 5 al 38%, mientras que la tasa en la nasofaringe va del 1 al 6%. Dado que las bacterias Gram-negativas no encuentran buenas condiciones de crecimiento en la piel humana, *K. pneumoniae* rara vez se encuentran allí y se considera simplemente como microbiota transitoria (Podschn y Ullmann 1998).

K. pneumoniae es agente causal de infecciones del tracto urinario y neumonía en personas sanas, sin embargo, la mayoría de las infecciones por este microorganismo se adquieren en el ambiente hospitalario u ocurren en pacientes debilitados por enfermedades subyacentes. Una excepción importante es la formación de abscesos hepáticos en personas inmunocompetentes (Asensio *et al.* 2000; Pollack *et al.* 1972).

La presentación clásica de la neumonía por *K. pneumoniae* es una neumonía típica en la cual, hay bronconeumonía o una bronquitis, con frecuencia adquirida en el hospital, y llega a representar del 7 al 8% de las neumonías asociadas al cuidado de la salud (Kollef *et al.* 2005). Las especies del género *Klebsiella* ocupan el segundo lugar como causa de bacteriemia por Gram negativos sólo después de *E. coli*.

K. ozaenae y *K. rhinoscleromatis* se asocian a enfermedades particulares (rinoscleroma y la rinitis atrófica crónica, respectivamente) y su frecuencia en el ambiente hospitalario es menor que las otras especies que conforman este género (Hansen *et al.* 1998; Ko *et al.* 2002; Podschun y Ullmann 1998; Schaberg *et al.* 1991).

2.1.2. Género *Escherichia*: generalidades, y patologías

Las especies de este género pueden ser inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos, la mayor parte fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano.

E. coli es la especie que se encuentra con mayor frecuencia de este género y es abundante en el tracto intestinal normal y al igual que otros saprofitos entéricos se puede volver patógeno cuando es introducido en tejido fuera del tracto intestinal, especialmente el urinario, biliar, peritoneo y meninges.

Este microorganismo puede presentar dos espectros de infecciones: entéricas y extraintestinales.

Las infecciones entéricas a su vez se pueden clasificar en 5 subtipos:

- a) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Los aislamientos de ECEH son agentes causales de diarrea hemorrágica, colitis y del síndrome urémico hemolítico, este último se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica y recuentos bajos de plaquetas, generalmente resulta en complicaciones renales que pueden llevar a la muerte.
- b) *E. coli* enterotoxigénica (ECET). Las cepas de ECET producen una enterotóxina lábil al calor y una enterotoxina termoestable capaces de producir cuadros de diarrea y se ha reportado con mayor frecuencia en países en desarrollo.
- c) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI). Las cepas de ECEI se asocian a cuadros diarreicos que pueden presentar sangre como resultado de la invasión de las células epiteliales del colon.

- d) *E. coli* enteropatógena (ECEP). Las cepas de ECEP no producen exotoxinas y su patogenicidad está asociada con la adherencia a las células epiteliales a través de los distintos factores de agregación que presenta. Los síntomas relacionados a esta infección incluyen diarrea prolongada, vómitos, fiebre y es más común en niños.
- e) *E. coli* enteroagregativa (ECEA). En las cepas de ECEA presenta factores de agregación que participan en la virulencia de este subtipo (Tille 2014).

Las cepas relacionadas con infecciones extraintestinales se agrupan en dos categorías que incluyen los uropatógenos y los asociados a cuadros de sepsis y meningitis. Los uropatógenos contienen islas de patogenicidad que codifican para factores de adhesión y diversas toxinas que participan en la virulencia en enfermedades como la cistitis o pielonefritis aguda.

Los aislamientos asociados a sepsis y meningitis se relacionan con meningitis neonatal, la cual tiene una alta morbilidad y mortalidad.

2.1.3. Género *Enterobacter*: generalidades y patologías

El género *Enterobacter* incluye 14 especies clasificadas de acuerdo a características bioquímicas y similitudes genómicas. Hasta la década de 1960 las especies de este género estaban agrupadas en la clasificación de *Klebsiella-Aerobacter*. A diferencia de las especies del género *Klebsiella*, con las que pueden confundirse al realizar la identificación, las especies del género *Enterobacter* son móviles y su cápsula tiende a ser menos notable. Las cepas de *Enterobacter* suelen colonizar a los pacientes hospitalizados, en particular a los tratados con antibióticos, y han sido asociados con infecciones de quemaduras, de heridas, de las vías respiratorias y del tracto urinario (Li *et al.* 2015; Tille 2014).

2.1.4. Género *Providencia*: generalidades y patologías

Las especies del género *Providencia* son microorganismos móviles, no fermentadores de la lactosa y patógenos oportunistas poco frecuentes. Entre las especies de este género, *Providencia stuartii* y *Providencia rettgeri* son las especies que causan la mayoría de infecciones, especialmente infecciones de las vías urinarias, particularmente IAAS.

Aunque la prevalencia de cuadros de bacteriemia asociados a este género son poco frecuentes, es importante un adecuado régimen tratamiento antimicrobiano de estas infecciones debido a que las especies de este género son intrínsecamente resistentes a múltiples antibióticos como la ampicilina, cefalosporinas de primera generación, tetraciclina, tigeciclina, polimixina B y colistina (Tille 2014).

2.1.5. Género *Citrobacter*: generalidades y patologías

Las especies del género *Citrobacter* son parte de la microbiota del tracto intestinal. La transmisión es principalmente de persona a persona o endógena y se asocia principalmente a infecciones del tracto urinario; sin embargo también se pueden asociar a septicemia, meningitis, abscesos en el cerebro y algunas complicaciones neuronales (Tille 2014).

2.2. Resistencia a antimicrobianos

En los individuos hospitalizados o inmunodeprimidos en especial en los pacientes que reciben tratamiento con antibióticos, el tubo digestivo, la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel se colonizan por enterobacterias. La proporción de microorganismos resistentes a múltiples antimicrobianos, incluidos los que producen betalactamasas de espectro extendido (BLEE), ha aumentado de forma ininterrumpida, de modo que la mayoría de aislamientos de origen hospitalario y muchos de los aislamientos recuperados en la comunidad, son resistentes a varias clases de antimicrobianos (Fuursted *et al.* 2012).

El incremento de cepas resistentes a diversos antibióticos se debe principalmente a dos vías de dispersión, en muchas ocasiones coexistentes: la adquisición horizontal de genes que codifican las carbapenemasas y la diseminación clonal de aislamientos productores de estas enzimas. Desde un punto de vista clínico, los principales factores de riesgo para la colonización e infección por estas cepas son la estancia prolongada en unidades de cuidados intensivos, la administración de terapia antimicrobiana de amplio espectro, los procesos quirúrgicos, los procedimientos instrumentales invasivos y la inmunosupresión.

Las tasas de mortalidad de las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos son altas, y van del 18 al 60% en casos de infección por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas.

El tratamiento antibiótico empírico inadecuado incrementa la probabilidad de una mala evolución clínica; mientras que las terapias con una combinación de antibióticos y la retirada o control del foco de infección se asocian con mayor supervivencia de los pacientes (Shon *et al.* 2013).

Las cepas productoras de carbapenemasas presentan además con frecuencia resistencia a otras familias de antibióticos no betalactámicos, por lo que es habitual la existencia de casos de resistencia extensa o panresistencia, frente a los cuales no hay una alternativa óptima de tratamiento antibiótico. Muchas de las enterobacterias productoras de carbapenemasas solo se muestran sensibles *in vitro* a antibióticos como la amikacina, la fosfomicina, la tigeciclina o la colistina (Fuursted *et al.* 2012; Sidjabat *et al.* 2011).

2.2.1. Propagación de resistencia por regiones móviles

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a fármacos mediante la adquisición de material genético de otros microorganismos resistentes mediante elementos genéticos móviles tales como plásmidos, ADN desnudo o transposones. Se le denomina como transferencia horizontal y puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre bacterias de diferente especie o género. Estos genes generalmente están dirigidos contra una familia o tipo de antibióticos, aunque un conjunto de genes puede acumularse en un mismo microorganismo y volverlo multifarmacorresistente, la cual se define como resistencia a tres o más clases de antibióticos.

La transferencia horizontal se ha documentado en ambientes tales como aguas residuales, agua superficial, sedimentos y abono ya que las comunidades microbianas en estos sitios pueden contener material genético que codifica para la resistencia a diversos antibióticos así como residuos de antibióticos que tienen efecto de presión positiva (DeNap y Hergenrother 2005; Normark y Normark 2002).

Los mecanismos de intercambio genético son:

1. Transformación: Captación e incorporación de segmentos de ADN del ambiente (provenientes de bacterias muertas) por otra bacteria viva (Gold y Moellering 1996; Wilson *et al.* 2002).
2. Conjugación: Ocurre cuando las bacterias transfieren genes de resistencia a una bacteria adyacente, a través de una estructura de naturaleza proteica llamada pili sexual que une los dos microorganismos y permite el intercambio genético de pequeños segmentos de ADN denominados plásmidos o transposones (McManus 1997). Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómico unidos a la membrana citoplasmática que constituyen entre el 1% al 10% del genoma de muchas especies bacterianas y que se puede replicar de manera independiente del ADN cromosómico. A su vez, los transposones son segmentos de ADN móviles que contienen una transposasa que les permite transferirse e insertarse en varios sitios del cromosoma bacteriano o en plásmidos. Algunos transposones y plásmidos tienen elementos génicos llamados integrones, capaces de capturar genes exógenos que pueden insertarse y llevar a una resistencia a múltiples fármacos (Carattoli 2013).
3. Transducción: Algunos virus bacterianos (bacteriófagos) pueden transferir a una bacteria segmentos génicos de resistencia de otra bacteria cuando empaqueta por equivocación parte de estos segmentos y al infectar a otra bacteria incluye los segmentos bacterianos que pueden intercambiarse con el de la bacteria infectada y volverla resistente, sin embargo, este es un evento poco frecuente en comparación con los previamente descritos (Tenover 2006).

Estos mecanismos pueden llevar a que una bacteria se torne resistente a múltiples agentes antibacterianos por lo que son denominadas multirresistentes al ser difíciles de tratar mediante antimicrobianos y erradicar del ambiente hospitalario son los principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias.

2.2.2. Mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos

El mecanismo enzimático de mayor importancia para la resistencia a carbapenémicos en enterobacterias es la producción de carbapenemasas; las cuales son un tipo de betalactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar un amplio espectro de betalactámicos incluidos los

carbapenémicos. Estas enzimas actúan hidrolizando el anillo betalactámico de estos antibióticos provocando su inactivación (Figura 1).

Estas enzimas se clasifican en cuatro clases que van de la A a la D en función de la homología de sus secuencias de aminoácidos (Clasificación de Ambler). Dentro de las clases A, B y D hay enzimas que presentan actividad de carbapenemasas (Peleg *et al.* 2008; Walther-Rasmussen y Hoiby 2006).

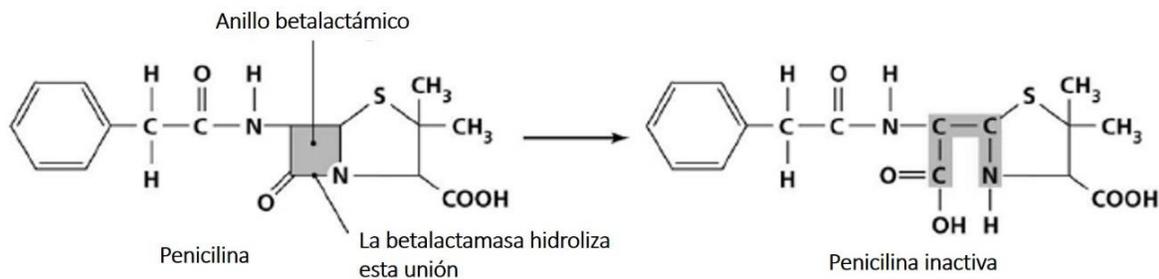


Figura 1. Mecanismo de acción de las betalactamasas.

2.2.2.1. Betalactamasas Clase A

La clase A corresponde a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam. Pueden ser inhibidas *in vitro* por el ácido clavulánico y el tazobactam, característica que es usada para su identificación (Perez *et al.* 2007; Strateva y Yordanov 2009).

Las enzimas de la clase A con actividad de carbapenemasas han sido identificadas principalmente en *E. cloacae*, *Serratia marcescens* y *K. pneumoniae*.

La carbapenemasa clase A reportada con más frecuencia es KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) que se localiza principalmente dentro de plásmidos.

Esta enzima ha sido reportada principalmente en *K. pneumoniae*, sin embargo, se ha detectado también en *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii*, *K. oxytoca*, *Salmonella spp.* y *E. coli*.

Otra de las carbapenemasa clase A es SME-1 (*Serratia marcescens enzyme*) que fue detectada inicialmente en Inglaterra en un aislamiento de *S. marcescens* en 1982. La enzima IMI-1

(*imipenemase*) y NMC (*non-metallo carbapenemase*) fueron detectadas en *E. cloacae*. Los genes que codifican para SME-1, IMI-1 y NMC están localizados en el cromosoma. Sin embargo, la enzima IMI-2 ha sido detectada dentro de plásmidos en especies del género *Enterobacter*.

La carbapenemasa BKC-1 (*Brazilian Klebsiella carbapenemase*) fue detectada en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* obtenido en el 2008 en Brasil y la enzima FRI-1 (*French imipenemase*) fue identificada en el 2015 en un aislamiento clínico de *E. cloacae* obtenido en Francia. Las enzimas cromosomales pueden ser inducidas en presencia del imipenem y cefoxitina (Nordmann *et al.* 2009; Potter *et al.* 2016; Queenan y Bush 2007).

2.2.2.2. Betalactamasas Clase B

La clase B corresponde a las metalobetalactamasas (MBL). El mecanismo de hidrólisis de las MBL depende de la interacción del antibiótico con iones de zinc presentes en el sitio activo de la enzima, por lo que son inhibidas por agentes quelantes de iones metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido mercaptoacético y ácido mercaptopropiónico (MPA) (Drawz y Bonomo 2010).

Estas enzimas confieren un alto nivel de resistencia a los carbapenémicos y otros betalactámicos, con excepción del aztreonam. Las MBL se subdividen en tres grupos en función de su estructura; en el grupo 1 se encuentran enzimas que presentan tres residuos de histidina, uno de cisteína y zinc como ión metálico; este grupo se conforma por las enzimas: IMP (*imipenemase*), VIM (*verona integron-encoded MBL*), GIM (*German imipenemase*), SIM (*Seoul imipenemase*), SPM (Sao Paulo MBL) y NDM (New Delhi MBL) (Peleg *et al.* 2008; Walsh *et al.* 2005).

Las primeras MBL descritas eran cromosómicas y se detectaron en patógenos oportunistas y microorganismos ambientales como: *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Las MBL se han diseminado ampliamente y su incidencia ha aumentado debido a que se asocian con plásmidos y transposones, haciendo más fácil su transferencia entre bacterias. Las MBL transmisibles reportadas con mayor frecuencia son VIM, IMP, GIM, SIM, SPM. De estas enzimas los tipos con más variantes son IMP y VIM, las cuales han sido reportadas en Gram negativos tanto fermentadores como no fermentadores de lactosa.

La MBL tipo NDM ha presentado un incremento en su incidencia en los últimos años, presenta 16 variantes y se ha reportado asociada a brotes por *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *E. cloacae*, y *E. aerogenes* (Chen *et al.* 2014; Queenan y Bush 2007; Rozales *et al.* 2014; Stoesser *et al.* 2015).

2.2.2.3. Betalactamasas Clase D

La clase D integra a las Oxacilinasas (OXA). Las oxacilinasas tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y algunas pueden hidrolizar carbapenémicos. No son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam ni agentes quelantes, sin embargo, su actividad puede ser inhibida *in vitro* por el cloruro de sodio (NaCl). Se han identificado 121 variantes diferentes de oxacilinasas, de las cuales 45 presentan capacidad de hidrolizar carbapenémicos.

Las enzimas Clase D con capacidad de hidrolizar carbapenémicos se clasifican en nueve subgrupos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos. La oxacilinasas de mayor importancia en las Enterobacterias es OXA-48, que forma parte de la familia OXA-48 al igual que las enzimas OXA-162, OXA-163 Y OXA-405. OXA-48 se ha reportado principalmente asociada a brotes por *K. pneumoniae* y *E. coli* (Morris *et al.* 2012; Poirel *et al.* 2010; Potter *et al.* 2016; Queenan y Bush 2007; Walther-Rasmussen y Hoiby 2006).

2.3. Diseminación de enterobacterias resistentes a carbapenémicos

Los reportes de enterobacterias resistentes a carbapenémicos se han incrementado en los últimos diez años, esto se ha asociado principalmente a una mayor propagación por la movilidad de individuos entre continentes y a la diseminación en el medio hospitalario de plásmidos que confieren resistencia a carbapenémicos (Jean *et al.* 2015). En la Figura 2 se presenta la distribución mundial de las principales carbapenemasas detectadas en enterobacterias resistentes a carbapenémicos.



Figura 2. Distribución mundial de carbapenemasas en enterobacterias (Jean SS *et al.* 2015, con modificaciones).

KPC es la carbapenemasa que se identifica con mayor frecuencia en Enterobacterias y se ha descrito principalmente en *K. pneumoniae* del complejo clonal 258.

Se han detectado dos clados que se diferencian en los genes relacionados a la síntesis de polisacáridos de la cápsula (*cps*). El gen KPC-2 se relaciona con *cps-1* y KPC-3 se asocia con *cps-2*; Se ha propuesto que la variación en KPC se debe a mutaciones puntuales seguidas de la recombinación del gen *cps* y no debida a transferencia horizontal.

Se ha detectado VIM en *K. pneumoniae* ST10, ST11, ST36, ST147 y ST383; NDM-1 con el ST10 en aislamientos de *K. pneumoniae* y una nueva variante de NDM que corresponde a NDM-13, la cual se encuentra integrada dentro del cromosoma bacteriano, se identificó en el ST101 en *E. coli* (Potter *et al.* 2016).

Las carbapenemasas que conforman la familia OXA-48 como OXA-48 y OXA-162 se han asociado principalmente con ST11 en *K. pneumoniae* (Potter *et al.* 2016).

2.4. Factores de virulencia en *K. pneumoniae*

K. pneumoniae utiliza una gran cantidad de estrategias que le permiten evadir la respuesta inmune del huésped lo que permite su crecimiento y protección. Los factores de virulencia de esta especie se dividen en cuatro clases: cápsula, lipopolisacáridos, sistemas de obtención de hierro (sideróforos) y fimbrias o pili (Figura 3). Se han identificado otros factores de virulencia importantes en este microorganismo tales como las proteínas de membrana exterior (OMPs por sus siglas en inglés), las porinas, bombas de eflujo, sistemas de transporte de hierro y genes involucrados en el metabolismo de la alantoina (5-ureidohidantoina o glioxildióxido) sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de acción y la relevancia clínica que presentan. (Paczosa y Mecsas 2016).

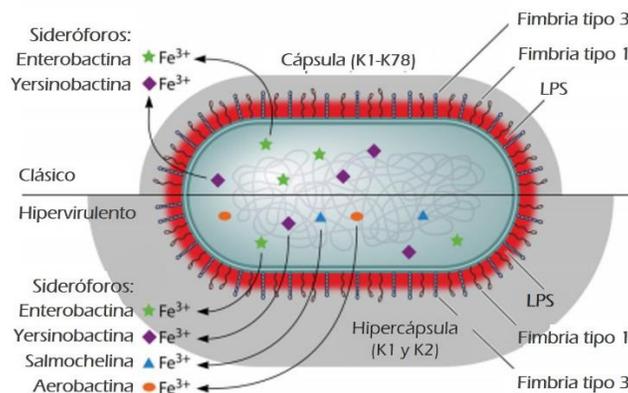


Figura 3. Esquema de principales mecanismos de resistencia en *K. pneumoniae* con un fenotipo clásico e hipervirulento (Paczosa y Mecsas 2016).

2.4.1. Cápsula

La cápsula es una matriz de polisacáridos que cubre a la célula y es el factor de virulencia más estudiado en esta especie. La matriz protege al microorganismo contra la acción bactericida del suero y de la fagocitosis, y es el determinante de virulencia más importante en *K. pneumoniae* (Paczosa y Mecsas 2016).

Se han descrito 78 serotipos capsulares denominados como K, con 25 de ellos reportados más frecuentemente y asociados al 70% de los aislamientos clínicos. Los serotipos K1, K2, K4 y K5 se asocian con infecciones graves en humanos y animales. El serotipo detectado con mayor

frecuencia es K2, seguido de K1. Estos serotipos son más resistentes a la fagocitosis y lisis intracelular por parte de los macrófagos alveolares y neutrófilos en comparación con otros serotipos.

Las cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* pueden producir altas cantidades de cápsula, presentando un fenotipo denominado como hipermucoviscoso, que consiste en un recubrimiento mucoviscoso de exopolisacáridos que es más resistente que la cápsula común y que puede contribuir a la patogenicidad de las cepas hipervirulentas.

El serotipo K1 y la hipermucoviscocidad se ha asociado a la formación de abscesos hepáticos. El serotipo K1 se asocia frecuentemente a neumonía y abscesos hepáticos, especialmente en cuadros clínicos que presentan complicaciones. Los serotipos K2, K4 y K5 se asocian con neumonía adquirida en la comunidad y el serotipo K3 se ha asociado a casos de rinoscleroma (Brisse *et al.* 2009).

En las cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* la producción de cápsula puede ser amplificada través de dos vías; a) por la expresión de dos reguladores contenidos dentro de plásmidos que corresponden al regulador del fenotipo mucoide *rmpA* y *rmpA2*; b) por la expresión de la copia cromosomal del regulador *rmpA* y la regulación de los genes de cápsula A y B (*rcaA* y *rcaB*). Entre los factores externos se encuentran un aumento de la concentración de glucosa que provoca un aumento de la producción de cápsula por RmpA, en cambio una concentración elevada de hierro resulta en una disminución de la producción de cápsula.

2.4.2. Lipopolisacáridos

También denominados como LPS o endotoxinas, son un componente de la parte externa de la membrana celular de las bacterias Gram negativas, aunque presenta variaciones entre las distintas especies la mayoría están comprendidos por un antígeno O, un cuerpo de polisacárido y un lípido A. Se han reportado nueve diferentes tipos de antígenos O en *K. pneumoniae* y el más común corresponde al antígeno O1.

El LPS se encarga de proteger al microorganismo de la respuesta inmune humoral del huésped, sin embargo, también es un importante estimulador de la respuesta inmune. El lípido A del LPS es un potente ligando del receptor TLR4 y la estimulación de este receptor provoca la

liberación de citocinas y quimiocinas que activan la respuesta inmune celular y provocan la eliminación de *K. pneumoniae*. Algunas cepas de *Klebsiella* pueden emplear la cápsula para cubrir parcialmente el LPS y así evitar su unión a TLR4, otro mecanismo para impedir esta unión que se ha reportado en varios microorganismos como *Yersinia pestis*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis* y más recientemente *K. pneumoniae* es mediante modificaciones en el lípido A, lo que impide que sea reconocido por receptores como TLR4 y por lo tanto la respuesta inmune no es activada. Esto provoca que los microorganismos que presentan un lípido A modificado tengan una mayor virulencia

La acción del antígeno O en la virulencia de estos microorganismos se ha relacionado con protección a la lisis por el complemento lo que permite la persistencia de este microorganismo y una subsecuente diseminación sistémica. En los aislamientos que presentan un antígeno O truncado o ausente incluso en presencia de cápsula el complemento es activado y el microorganismo es eliminado eficientemente. Otros genes involucrados en una adecuada producción de LPS son *uge* que codifica a UDP galacturonato 4-epimerasa y *wabG* que codifica GalA transferasa. El gen *uge* está presente en la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae* y su ausencia se ha relacionado con la producción de un LPS rugoso que es incapaz de causar infecciones del tracto urinario, neumonía o sepsis que las cepas silvestres. Los aislamientos que no presentan el gen *wabG* son incapaces de producir un LPS capaz de retener el antígeno capsular.

2.4.3. Fimbrias

Las fimbrias son un factor de virulencia importante como mediador de la adhesión de este microorganismo a distintas superficies. En *K. pneumoniae* las fimbrias tipo 1 y 3 son las principales estructuras de adhesión que se ha caracterizado como factor de patogenicidad. Sin embargo, otras estructuras de adhesión han sido descritas para este microorganismo y corresponden a la fimbria KPF-28, el factor no fimbrial CF29K y un material capsular. Estas estructuras permiten la unión del microorganismo a células de carcinoma y líneas celulares de intestino humano por lo cual se cree que participan en la colonización del tracto gastrointestinal.

La fimbria tipo 1 es una estructura delgada que se expresa en el 90% de aislamientos tanto de origen ambiental como clínico. La subunidad FimA es codificada por el gen del mismo nombre

y comprende a la mayoría de la estructura, sin embargo, las propiedades adhesivas están a cargo de una subunidad menor denominada FimH codificada por el gen *fimH*.

Las fimbrias tipo 3 son una estructura filamentosa codificada por el grupo de genes *mrkABCD*, en el que *mrkA* codifica el componente estructural principal y *mrkD* codifica la adhesina fimbrial. Los genes *mrkB* y *mrkC* codifican la chaperona y proteínas acomodadora, respectivamente. El gen *mrkF* codifica una proteína que se sugiere participa en la estabilización o ensamblaje de las fimbrias. Las fimbrias se han demostrado in vitro que desempeñan un papel en la unión de células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular. Además, se ha determinado que las fimbrias tipo 3 son responsables de la unión y formación de biopelículas en superficies bióticas y abióticas, incluyendo diferentes tipos de líneas celulares. Este tipo de fimbrias son conocidas por estar presentes en *K. pneumoniae* en dos variantes que corresponde, a una variante codificada cromosómicamente y otra variante localizada en plásmidos que presentan una homología de 60% a 96% de homología, en el caso del gen *mrkD* es el que presenta mayor diversidad. La variante plasmídica se ha encontrado en pocos aislamientos, mientras que la variante codificada cromosómicamente se encuentra en la gran mayoría de aislamientos de *K. pneumoniae* (Stahlhut *et al.* 2013).

2.4.4. Sideróforos

Durante la infección por *K. pneumoniae* el hierro es un recurso requerido por el patógeno el cual se encuentra limitado en el huésped debido a su respuesta inmune inespecífica la cual se encarga de restringirlo en el medio con la finalidad de delimitar el crecimiento del patógeno. Sin embargo, microorganismos como *K. pneumoniae* pueden adquirirlo del medio mediante la secreción de sideróforos que son moléculas que poseen una mayor afinidad por el hierro que las moléculas transportadoras del huésped. De esta manera los sideróforos pueden capturar el hierro de las proteínas transportadoras o adquirirlo del ambiente. Las cepas de *K. pneumoniae* codifican para varios sideróforos, la producción de más de un sideróforo podría contribuir a la optimización de la colonización por parte de este microorganismo en diferentes tejidos y mantener la captura de hierro en caso de que alguno de los sideróforos fuese neutralizado por el huésped. En *K. pneumoniae* se han descrito cuatro sideróforos que corresponden a enterobactina, yersinobactina,

salmochelina y aerobactina, siendo esta última la que presenta una menor afinidad por el hierro y la enterobactina la de mayor afinidad.

La expresión de enterobactina en los aislamientos de *K. pneumoniae* es casi constante por lo que se considera como el sistema primario para obtención de hierro. Esta proteína es codificada por el grupo de genes *entABCDEF* localizados en el cromosoma y es inhibido por la lipocalina-2.

La yersinobactina, inicialmente descrita en *Yersinia*, presenta una estructura diferente a la de la enterobactina y al contrario de esta no es inhibida por la lipocalina-2, pero si por la transferrina. Su inhibición por parte de la transferrina previene del desarrollo de *K. pneumoniae* en sangre y permite su desarrollo en infecciones pulmonares. Se ha reportado que en presencia de enterobactina la yersinobactina es sobreexpresada en infecciones pulmonares.

La salmochelina es una forma glicosilada de la enterobactina, el gen que codifica para esta modificación está presente dentro del cromosoma o plásmido como parte de los genes *iroBCDE*. La presencia de esta modificación impide que la salmochelina sea neutralizada por la lipocalina-2, por lo cual la presencia de este sideróforo favorece la colonización de la nasofaringe por parte de *K. pneumoniae* en pacientes con elevados niveles de lipocalina-2, por lo que se trata de pacientes con una mayor inmunocompetencia indicando que la salmochelina es un sideróforo de mayor virulencia y se ha encontrado en un 2 a 4% de aislamientos asociados a infecciones intrahospitalarias.

La aerobactina se ha descrito en un 6% de cepas de *K. pneumoniae* y su presencia se asocia con la producción de hipercápsula, sin embargo, no todos los aislamientos que presentan una hipercápsula presentan este sideróforo. Este sideróforo presenta una mayor importancia en aislamientos hipervirulentos donde es el sideróforo principal y se ha descrito en un 93 a 100% de aislamientos y su presencia es requerida en los aislamientos hipervirulentos para llevar a cabo una infección exitosa lo cual no ocurre con los otros sideróforos previamente descritos.

2.4.5. Formación de biopelícula

Este mecanismo permite la adhesión de los microorganismos en superficies biológicas y abióticas. Es una característica importante de patogenicidad de muchas bacterias, ya que facilita la colonización de material, contribuye a la resistencia a los medicamentos y la evasión del sistema

inmune del huésped. La formación de biopelícula implica una variedad de vías que están reguladas por *quórum sensing* y otros sistemas. El pili, las fimbrias y la producción de la proteína asociada a la biopelícula (BAP) contribuyen a la adhesión inicial, seguido por la producción de exopolisacáridos, un constituyente importante de la biopelícula madura que se encarga de suprimir la actividad de los neutrófilos y contribuye a la resistencia ambiental y a antibióticos debido a que impide la llegada de los fármacos a su sitio de acción, por lo que favorece la resistencia a un amplio espectro de antibióticos (Gordon y Wareham 2010; Howard *et al.* 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies de la familia Enterobacteriaceae como *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter spp.* son patógenos oportunistas que se reportan frecuentemente en infecciones asociadas a la atención de la salud.

En los últimos años la resistencia de estos microorganismos a diversos antibióticos, como los carbapenémicos un tipo de betalactámico que confiere un amplio espectro de resistencia a diversos antibióticos, ha aumentado y este incremento de cepas resistentes se debe principalmente a dos vías de dispersión, en muchas ocasiones coexistentes: la adquisición horizontal de genes que codifican las carbapenemasas y la diseminación clonal de cepas productoras de estas enzimas.

Los factores de virulencia y persistencia que presentan las Enterobacterias junto con la multifarmacorresistencia favorecen su presencia en el ambiente hospitalario y limitan los antimicrobianos que pueden emplearse para su tratamiento aumentando la morbi-mortalidad de los pacientes infectados con estos microorganismos.

4. HIPÓTESIS

La resistencia de los aislamientos de un brote hospitalario de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos se transfirió de forma horizontal debido a la presencia de uno o más genes que codifican para carbapenemasas, localizados en un plásmido conjugativo. Este gen se correlaciona con los factores de virulencia presentes en los microorganismos.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

5.1. Objetivo general

Realizar la caracterización del mecanismo que confiere la resistencia a carbapenémicos y correlacionar su presencia con los factores de virulencia presentes en aislamientos clínicos obtenidos en un brote hospitalario.

5.2. Objetivos particulares

1. Identificar aislamientos clínicos de enterobacterias resistentes a carbapenémicos.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a diversos antibióticos de importancia clínica.
3. Caracterizar el elemento móvil portador del gen que confiera la resistencia a carbapenémicos.
4. Establecer la diversidad clonal de los aislamientos previamente identificados.
5. Determinar los factores de virulencia presentes en aislamientos resistentes y susceptibles a carbapenémicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Estrategia general.



6.2. Identificación del brote hospitalario

El Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde” en Guadalajara, Jalisco es un hospital de tercer nivel de servicio, enseñanza e investigación, cuenta con 899 camas y brinda atención a pacientes adultos y pediátricos en 31 salas hospitalarias situadas en tres edificios interconectados.

En septiembre del 2014 se detectaron cinco aislamientos clínicos de enterobacterias resistentes a carbapenémicos en el laboratorio de bacteriología del Hospital Civil, siendo la primera presentación de ERC en este hospital, por lo que consideró la presentación de un brote hospitalario.

Para la realización de este estudio el trabajo fue sometido a su valoración por el Comité de Ética en Investigación del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y fue aprobado con el número de referencia 003/16.

6.3. Aislamientos clínicos

Para este trabajo de investigación se colectaron ERC asociadas al brote hospitalario que presentaron resistencia al menos a un carbapenémico (ertapenem, imipenem o meropenem) y enterobacterias susceptibles a carbapenémicos. El período de colección fue de septiembre del 2014 a julio del 2015.

Los aislamientos fueron recibidos, identificados y colectados en laboratorio de bacteriología del Hospital Civil de Guadalajara y posteriormente se enviaron al Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para ser incluidos en este trabajo. Además, se recolectó información clínica de los pacientes que presentaron aislamientos clínicos de ERC.

6.4. Identificación

Los microorganismos recolectados fueron identificados en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Civil de Guadalajara mediante el sistema automatizado Vitek (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). Ya en nuestro laboratorio se confirmó la identificación mediante pruebas bioquímicas convencionales. Cada aislamiento se sembró en agar sangre y se incubó a 37°C durante 24 h, transcurrido este tiempo se realizó el análisis de la morfología bacteriana mediante tinción de Gram y se observó el crecimiento en agar EMB. A los aislamientos que se observaron como bacilos Gram negativos, con fermentación de la lactosa en agar EMB se les realizó un sistema bioquímico el cual incluyó los siguientes medios: TSI, citrato de Simmons, LIA, Urea, MIO, SIM, caldo malonato y dos caldos glucosados para la prueba de rojo de metilo y Voges Proskauer.

6.5. Determinación de la producción de carbapenemasas

Se realizó la determinación de la producción de carbapenemasas a todos los aislamientos siguiendo el protocolo M100-S26 del CLSI. A partir de un cultivo joven y puro en un agar no

selectivo, como agar sangre, se realizó un inóculo suspendiendo 3/4 de una asada de la muestra a estudiar en 200µL de la solución de lisis (Tris-HCl) en un tubo Eppendorf nuevo. Se homogenizó el inóculo mediante agitación en vórtex y se transfirieron 100µL de la suspensión a un tubo Eppendorf nuevo etiquetado como “positivo” y se etiquetó el otro tubo como “negativo”. Se añadieron 100µL de la solución de trabajo (rojo de fenol con sulfato de zinc) al tubo Eppendorf etiquetado como “negativo” y al tubo “positivo” se le adicionaron 100µL de la solución de trabajo con antibiótico (6 mg/mL de imipenem) y se homogenizó la suspensión mediante agitación por un minuto en vórtex y posteriormente ambos tubos se incubaron a 37°C. La lectura de los resultados se realizó cada media hora hasta cumplir un periodo de incubación de dos horas observando el cambio de color en ambos tubos. La interpretación de resultados se realizó de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de la prueba de CarbaNP

Resultado	Tubo negativo (Solución de trabajo)	Tubo positivo (Solución de trabajo con antibiótico)
Positivo (Hay producción de carbapenemasas)	Rojo	Amarillo o naranja claro
Negativo (No hay producción de carbapenemasas)	Rojo	Rojo
No interpretable (Inválido)	Amarillo o naranja rojizo	Amarillo o naranja rojizo o claro

6.6. Detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos

6.6.1. Obtención de ADN por lisis térmica

Para llevar a cabo la obtención del material genético de los aislamientos, éstos se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron durante 18 a 24 h a 37°C, después se preparó una suspensión bacteriana en un tubo Eppendorf estéril, se tomaron de 3-4 colonias del cultivo puro y se homogenizó mediante agitación con vórtex en 100µL de agua destilada estéril, esta suspensión se sometió a calentamiento a 100°C durante 10 min, transcurrido este tiempo la suspensión se

centrifugó por 10 min a 12,000g, se descartó el precipitado y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril. El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

6.6.2. Detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos

Para realizar la detección de los principales genes que codifican para betalactamasas que confieren resistencia a carbapenémicos en las enterobacterias (KPC, IMP, NDM, VIM, y OXA-48) se llevaron a cabo PCRs de punto final empleando el material genético obtenido mediante lisis térmica y con los iniciadores descritos por Ellington, *et al.* (Ellington *et al.* 2007) para la amplificación de IMP; los reportados por Baroud, *et al.* (Baroud *et al.* 2013) para NDM; los reportados por Nordmann, *et al.* (Nordmann y Poirel 2002) para VIM y por Swayne, *et al.* (Swayne *et al.* 2011) para KPC y OXA-48. Las secuencias de los iniciadores empleados se encuentran descritas en la tabla 3.

Para la mezcla de PCR se añadieron 2 μ L de ADN a 23 μ L de una mezcla de reacción compuesta por: buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), MgCl₂ 3 mM, dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a 0.2 μ M y 1 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones de amplificación para IMP fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 52°C por 40s, elongación a 72°C por 50 s y por último 1 ciclo a 72°C por 5 min para la elongación final; las condiciones para NDM fueron 1 ciclo de 5 min a 95°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 1 min, elongación a 72°C por 45s y por último 1 ciclo a 72°C por 7 min para la elongación final; para VIM 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 25 s, alineamiento a 60°C por 40 s, elongación a 72°C por 50 s y por último 1 ciclo a 72°C por 6 min para la elongación final; y para OXA-48 y KPC 1 ciclo de 5 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, alineamiento a 60°C por 30s, elongación a 72°C por 30s y por último 1 ciclo a 72°C por 5 min para la elongación final. Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (2 μ g/mL), posteriormente se sometió a 100 V por 50 min, empleando un

marcador de 100-1,000 pb. Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital.

Tabla 3. Iniciadores de genes asociados a resistencia a carbapenémicos

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)
KPC F	GCAGCGGCAGCAGTTTGTGATT	184
KPC R	GTAGACGGCCAACACAATAGGTGC	
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	188
IMP-R	CCAAACYACTASGTTATCT	
NDM-1F	GGAAACTGGCGACCAACG	678
NDM-1 R	ATGCGGGCCGTATGAGTGA	
VIM-F	ATGGTGTTTGGTCGCATATC	510
VIM-R	TGGGCCATTCAGCCAGATC	
OXA-48 F	TTCGGCCACGGAGCAAATCAG	240
OXA-48 R	GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA	

6.7. Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos

Los antibióticos, las concentraciones y puntos de corte utilizados se seleccionaron en base a lo establecido por el CLSI en el documento M100-S26 y se siguió el protocolo establecido en el manual M07-A9 del 2016. Para la tigeciclina y colistina no existen puntos de corte establecidos por el CLSI, por lo cual se utilizaron los puntos de corte recomendados por el EUCAST. Los antibióticos empleados en este estudio fueron obtenidos en Sigma Aldrich® (Toluca, Estado de México).

6.7.1. Preparación del inóculo

Los aislamientos fueron sembrados en agar Mueller-Hinton y se incubaron por 24 h a 37°C. Posterior a la incubación de los cultivos, se prepararon los inóculos por suspensión de las colonias en 5 mL de solución salina que se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland empleando un espectrofotómetro se obtuvo una absorbancia entre 0.08-0.13 a una longitud de onda de 625nm. Posteriormente se realizó una dilución 1:150 en 10 mL de caldo Mueller-Hinton. El inóculo final

fue de 5×10^5 UFC/mL y se utilizó inmediatamente después de su preparación (máximo 15 minutos tras su preparación).

6.7.2. Preparación de las placas

Por cada aislamiento se preparó una placa de 96 pocillos (12 x 8) con diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar. Se añadieron 200 μ L de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posteriormente se añadió un volumen de 100 μ L de caldo Müller-Hinton utilizando una pipeta multicanal en todos los pocillos con excepción de los que tenían la concentración más alta de antibióticos y las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 μ L (2 a la 3, 3 a la 4, 4 a la 5, etc) de una celda a la otra empleando una micropipeta y se eliminaron los 100 μ L de la última dilución de cada antibiótico, de tal manera que antes del inóculo todas las celdas quedaron con un volumen total de 100 μ L. El primer pocillo de la placa se dejó como control positivo de crecimiento (sin antibiótico) y dos pocillos en la última fila se dejaron como controles negativos (sin inóculo).

POS	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	AMK 128	AMK 64	AMK 32	AMK 16	AMK 8
AMK 4	ETP 128	ETP 64	ETP 32	ETP 16	ETP 8	ETP 4	ETP 2	ETP 1	ETP 0.5	IMP 256	IMP 128
IMP 64	IMP 32	IMP 16	IMP 8	IMP 4	IMP 2	IMP 1	MEM 256	MEM 128	MEM 64	MEM 32	MEM 16
MEM 8	MEM 4	MEM 2	MEM 1	CIP 16	CIP 8	CIP 4	CIP 2	CIP 1	CIP 0.5	T/S 16/304	T/S 8/152
T/S 4/76	T/S 2/38	T/S 1/19	T/S 0.5/9.5	AZT 64	AZT 32	AZT 16	AZT 8	AZT 4	AZT 2	FOS 512	FOS 256
FOS 128	FOS 64	FOS 32	FOS 16	AMP 128	AMP 64	AMP 32	AMP 16	AMP 8	AMP 4	CHL 128	CHL 64
CHL 32	CHL 16	CHL 8	CHL 4	TGC 16	TGC 8	TGC 4	TGC 2	TGC 1	TGC 0.5	COL 16	COL 8
COL 4	COL 2	COL 1	COL 0.5							NEG	NEG

Figura 4. Esquema de la distribución de los antibióticos y las concentraciones (μ g/mL) empleadas en la placa de microtitulación. GEN: Gentamicina, AMK: Amikacina, ETP: Ertapenem, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, CIP: Ciprofloxacina, T/S: Trimetoprim/Sulfametoxazol, AZT: Aztreonam, FOS: Fosfomicina, AMP: Ampicilina, CHL: Cloranfenicol, TGC: Tigeciclina, COL: Colistina.

La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en el pocillo usado como control positivo. El control positivo presentó una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para la lectura se utilizó un lector de placas de microtitulación con luz led que permitió observar el crecimiento bacteriano. Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) que corresponde a la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo en estudio y se emplearon los puntos de corte indicados en la tabla 4 para clasificar los aislamientos como resistente, intermedio o susceptible. Para el control de calidad del estudio se emplearon las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 4. Puntos de corte empleados para los antibióticos analizados.

Tipo de antibiótico	Antibiótico	CMI (µg/mL)		
		S	I	R
Aminoglucósidos	Gentamicina	≤4	8	≥16
	Amikacina	≤16	32	≥64
Carbapenémicos	Ertapenem	≤0.5	1	≥2
	Imipenem	≤1	2	≥4
	Meropenem	≤1	2	≥4
Cefalosporinas	Ceftriaxona	≤1	2	≥4
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	≤1	2	≥4
Inhibidores de vía de folato	Trimetroprima-sulfametozol	≤2/38	-	≥4/76
Monobactámicos	Aztreonam	≤4	8	≥16
Fosfonatos	Fosfomicina	≤64	128	≥256
Penicilinas	Ampicilina	≤8	16	≥32
Fenicol	Cloranfenicol	≤8	16	≥32
Tetraciclinas	Tigeciclina	≤ 1	-	>2
Polimixinas	Colistina	≤2	-	>2

6.7.3. Clasificación de los aislamientos

Según lo señalado por Magiorakos *et al.* se realizó la clasificación de los aislamientos en multifarmacorresistente (MDR) a aquellos que fueron resistentes a uno o más de los antibióticos incluidos en mínimo tres de las siguientes clases: aminoglucósidos, carbapenémicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, inhibidores de la vía de folato, tetraciclinas, monobactámicos, penicilinas, fenicoles, fosfonatos y polimixinas (Magiorakos *et al.* 2012).

6.8. Identificación y caracterización del plásmido portador de resistencia a carbapenémicos

6.8.1. Obtención del patrón electroforético de plásmidos

Se realizó la extracción de plásmidos por la técnica de hidrólisis alcalina descrita por Kieser (Kieser 1984) con algunas modificaciones en los aislamientos que presentaron resistencia a carbapenémicos.

Las cepas se sembraron en caldo Luria Bertani (LB) e incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación, al día siguiente se colocaron 1.5mL de caldo en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 13,500rpm por 5 minutos y se repitieron estos pasos hasta obtener una pastilla de aproximadamente 10mm de alto, posteriormente la pastilla se resuspendió mediante agitación vigorosa en vórtex en 400µl de la solución de lisis (sacarosa, EDTA y Tris-HCl). Al tener una solución homogénea se adicionó 100µl de lisozima (10mg/mL) y se mezcló por inmersión seis veces y se incubaron los tubos en hielo durante 30min. Posteriormente se adicionaron 200µl de la solución de neutralización (NaOH y SDS), se mezcló por inmersión e incubaron los tubos por 30min a 55°C. Después de esta incubación las muestras se dejaron enfriar y se añadieron 80µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se agitó vigorosamente empleando el vórtex hasta que se formó una emulsión de color blanco, cuando la mezcla se observó homogénea, los tubos se centrifugarán por 20min a 14000 rpm a 4°C. Se tomaron 500µl del sobrenadante y se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo que se guardó a -20°C si no se utilizaba inmediatamente.

Para realizar la electroforesis y obtener el patrón electroforético se preparó un gel de agarosa al 0.6% empleando como disolvente TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA) al 0.5X. Se tomaron 50µl del sobrenadante previamente obtenido y se mezcló con 10µl de buffer de carga y posteriormente se colocó en el gel de agarosa; en el primer y último pocillo del gel se colocaba un marcador que corresponde a una cepa de *E. coli* con distintos plásmidos de peso conocido (150, 68, 36 y 7 kb). La electroforesis se corrió con TBE 0.5X como buffer de corrida a 80 V por 8h a 4°C.

Al concluir la corrida, se retiró el gel del equipo y se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/mL por 10 min y se lavó con agua destilada, por último se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm (Fotodocumentador UVP Bioluming Systems, EpiChemi 3 Darkroom).

Se realizó la estimación del tamaño molecular de el o los plásmidos detectados mediante la comparación de la movilidad electroforética en el gel de agarosa con la de los plásmidos de tamaño molecular conocido de la cepa de *E. coli* 50192. Para esto se midieron las distancias de migración de los fragmentos de ADN (en mm) sobre la fotografía obtenida del gel y posteriormente se construyó una curva de calibración en la que se representó la distancia recorrida (en mm) de los controles frente a sus pesos moleculares (en kb). La curva que se obtuvo fue una línea recta, lo cual permitió una correcta determinación de los valores por interpolación.

6.8.2. Conjugación bacteriana

Los experimentos se llevaron a cabo empleando la metodología previamente descrita por Miller (Miller 1972). El aislamiento de interés (cepa donadora) y la cepa receptora, que corresponde a la cepa *E. coli* J53-2 se incubaron en agar LB durante 16-18h a 37°C. Posteriormente, un inóculo de la cepa receptora se colocó en 30mL de caldo LB y un inóculo del aislamiento de interés en 1mL de caldo LB, y se incubaron en agitación durante 3h. Transcurrido este tiempo en un tubo nuevo y estéril se colocaron 800µL de la cepa receptora y 200µL del aislamiento de interés, este tubo se incubó a 30°C durante 3h sin agitación. Al concluir las 3h de incubación empleando una espátula Drigalski de vidrio se sembraron 100µL de la mezcla en placas de LB adicionadas con rifampicina (100µg/mL) e imipenem (2µg/mL) con. Las placas se incubaron a 37°C de 16-18h y los tubos se colocaron nuevamente en incubación sin agitación a 30°C durante 16 a 18h y al día siguiente se sembraron nuevas placas de LB con rifampicina e imipenem.

Transcurrida la incubación de los distintos juegos de placas se observaron en búsqueda de crecimiento de colonias aisladas. De no lograrse este tipo de crecimiento se realizaron diluciones con caldo LB estéril de la mezcla original y se realizó nuevamente el espatulado en placas nuevas. Al lograr el crecimiento de las colonias bacterianas aisladas se seleccionaron y se realizó la prueba de mínimos en la cual, se emplearon placas de agar MM y M9 que permiten la diferenciación de cepas transconjugantes (cepa que ha recibido el plásmido), ya que los agares presentan una concentración de aminoácidos diferentes que permite el desarrollo de la cepa donadora en ambos agares y la cepa receptora al igual que las transconjugantes solo presentan desarrollo en el medio M9, cuando se observó desarrollo de una cepa posible transconjugante en ambos agares se

consideró que la conjugación no fue exitosa y se seleccionaron las transconjugantes con desarrollo solo en el agar M9. En las cepas transconjugantes obtenidas se confirmó el éxito de la conjugación del plásmido con el gen de interés mediante PCR de punto final con las condiciones e iniciadores previamente descritos.

6.8.3. Transformación mediante electroporación

En los aislamientos de interés en los cuales los experimentos de transconjugación no fueron exitosos se llevó a cabo la transformación empleando células comerciales de *E. coli* electrocompetentes (Invitrogen One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*), los plásmidos que se emplearon para la transformación se obtuvieron a partir de cultivos de 16-18h en caldo LB mediante extracción con columnas utilizando el kit comercial High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante y se observó la integridad de los plásmidos obtenidos al colocarlos en un gel de agarosa al 1% a 80-100V durante 40 minutos en un campo electroforético, posteriormente se cuantificaron los plásmidos extraídos mediante el equipo NanoDrop (Thermo Scientific) y se utilizaron inmediatamente o colocaron a -20°C para su posterior utilización.

Los experimentos de electroporación se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor que a continuación se indican. Las células electrocompetentes se colocaron en un recipiente con hielo hasta que se descongelaron gradualmente y se tuvo precaución de manejarlas delicadamente por su alta sensibilidad a los cambios de temperatura y lisis mecánica. Cuando las células estuvieron descongeladas se les adicionó el ADN plasmídico necesario para tener una concentración de 20ng y se mezcló suavemente sin pipetear de abajo hacia arriba. Las células se incubaron durante 5 a 30min en hielo y transcurrido este tiempo se transfirieron a una celda de electroporación de 2mm de diámetro (E.coli Pulser® Cuvette, BIO-RAD) y se colocó la celda en el electroporador (Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems) y se realizó la electroporación empleando las siguientes condiciones: voltaje de 2500V; capacitancia de 25μF, resistencia de 300Ω y una distancia de cubeta de 2mm. Cuando la electroporación concluyó se colocó 1mL de caldo LB estéril en la celda y el contenido de la celda se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se

incubó durante 1h a 37°C en agitación. Al concluir esta incubación 100µL de la mezcla se espatularon en agar LB que contenía imipenem a una concentración de 2µg/mL empleando una espátula Drigalski de vidrio y las placas se incubaron de 18-20h a 37°C. Transcurrido este tiempo se observaron buscando crecimiento y las colonias aisladas que se observaron se sembraron en agar LB sin antibiótico, se incubaron de 18-20h a 37°C y posteriormente se realizó la obtención del ADN mediante lisis térmica y la amplificación mediante PCR de punto final del gen que confiere resistencia a carbapenémicos presente en el aislamiento transformado.

6.8.4. Hibridación

6.8.4.1. Transferencia mediante *Southern blot*

Los aislamientos de interés que presentaron un patrón único de plásmidos, junto con sus transconjugantes o transformadas previamente obtenidas se sometieron a un ensayo de hibridación con la finalidad de determinar en cuál de los plásmidos se encontraba el gen que confiere la resistencia a carbapenémicos. Para ello se siguió la metodología previamente reportada por Garza, *et al.* (Garza-Ramos *et al.* 2014). Primero se realizó la obtención de plásmidos siguiendo la metodología previamente utilizada (Kieser 1984) y después se corrió un gel de plásmidos con las condiciones ya señaladas. Al concluir la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en el fotodocumentador, posteriormente se destiñó realizando lavados con agua destilada en agitación durante 20 min, después de desteñir el gel se sometió a un proceso de despurinización al adicionar HCl 0.2N durante 10 min, seguido de una desnaturalización por 45 min con 1.5M NaCl/0.5N NaOH, al concluir se neutralizó con 1M Tris-base /1.5M NaCl durante 45 min. Finalmente se realizó la transferencia mediante *Southern blot* a una membrana de nylon durante mínimo 18 h como se observa en la figura 5.

Concluidas las 18 h de transferencia se realizó el lavado de la membrana en un buffer de NaCl/Citrato de sodio durante 20 minutos y luego se dejó secando a temperatura ambiente, posteriormente se fijó el ADN empleando el Crosslinker (UVP, Ultra-Violet Products Ltd. Cambridge, Reino Unido). Cuando la hibridación no se llevó a cabo inmediatamente la membrana se almacenó en una superficie seca a temperatura ambiente.

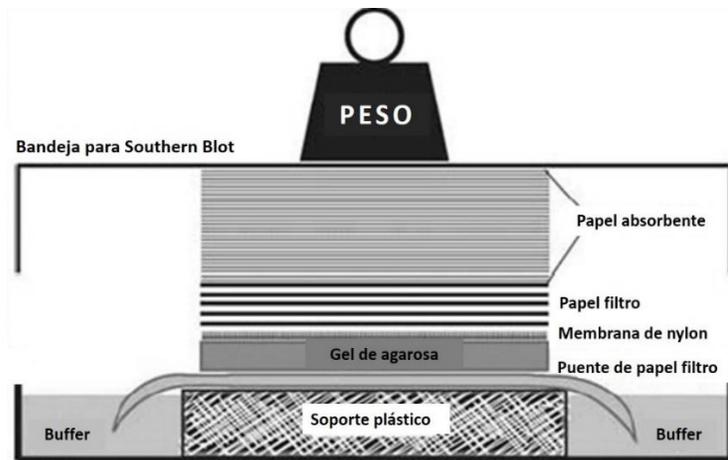


Figura 5. Esquema de Transferencia mediante *Southern blot*.

6.8.4.2. Hibridación con sondas quimioluminiscentes

Para llevar a cabo la hibridación se siguieron los siguientes pasos. El buffer de hibridación se calentó a 55°C, una vez que estuvo caliente la membrana se colocó en el buffer durante 15 min a 55°C en agitación empleando un horno de hibridación. Al concluir este tiempo se adicionó al buffer de hibridación de 5-10ng/mL de la sonda no radioactiva obtenida empleando el kit comercial (*ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System*; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Se colocó la membrana con el buffer en el horno de hibridación con agitación a 55°C durante 18h. Al concluir la incubación se eliminó el buffer de hibridación y se realizaron lavados de la membrana con un buffer de lavado primario (Urea, SDS, NaH₂PO₄, NaCl, MgCl₂, reactivo de bloqueo) que se precalentó a 55°C, se realizaron dos lavados de 10 min a 55°C con agitación. Posteriormente la membrana se transfirió a otro contenedor y se realizaron dos lavados con un buffer de lavado secundario (Tris base, NaCl) por 5 min a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de buffer de lavado y se colocó directamente sobre la membrana el reactivo para la generación de la señal quimioluminiscente, se cubrió toda la membrana con esta solución y se dejó reposar durante 2-5 min, se quitó el excedente de solución y se colocó en un cassette de radiografía, posteriormente se llevó a un cuarto oscuro y se colocó dentro del cassette una placa de radiografía y se expuso durante 10 a 30 min. Transcurrido este tiempo la placa radiográfica se reveló al colocarla en la solución de revelado durante un minuto, un lavado en agua por un minuto, un

minuto en la solución fijadora y un último lavado en agua. El revelado de la placa se realizó en el cuarto oscuro.

6.8.5. Digestión enzimática

Los aislamientos, transconjugantes o transformadas que presentaron un solo plásmidos se sometieron a una digestión enzimática con la enzima de restricción *HinIII* (Invitrogen, California, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante con la finalidad de comparar el patrón de restricción de los distintos plásmidos obtenidos. Además, mediante hibridación se determinó en cuál de los fragmentos del patrón de restricción estaba presente el gen que confería la resistencia a carbapenémicos.

6.8.6. Determinación del grupo de incompatibilidad de plásmidos

La detección de los grupos de incompatibilidad de plásmidos IncR, IncU, FIIy, FIIk y FIIs se realizó empleando los iniciadores y condiciones previamente reportados por Carattoli, *et al.* Y García-Fernández, *et al.* (Carattoli *et al.* 2005; Garcia-Fernandez *et al.* 2009). Esta determinación se realizó en las cepas transconjugantes y transformadas obtenidas, así como en los aislamientos clínicos que presentaron solo un plásmido.

Tabla 5. Iniciadores para determinación de grupos de incompatibilidad.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)
IncR F	TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC	
IncR R	GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	251
IncU F	TCACGACACAAGCGCAAGGG	
IncU R	TCATGGTACATCTGGGCGC	843
FIIy F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	
FIIy R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	227
FIIk F	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	
FIIk R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	148
FIIs F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	
FIIs R	CTCTGCCACAAACTTCAGC	259

6.9. Detección de clonas

Se analizó la presencia de clonas mediante electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP) en aislamientos resistentes a carbapenémicos y se realizó un análisis mediante tipificación multilocus de secuencias (MLST) en aislamientos representativos de las clonas predominantes que se obtuvieron, para realizar su comparación con clonas internacionales.

6.9.1. Electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP)

Para el análisis de EGCP se empleó el protocolo sugerido por (Gautom 1997). A partir de un cultivo puro en agar soya tripticaseína se inoculó una asada de una sola colonia en 5 mL de caldo triptonsoya. Se incubó hasta fase exponencial (16-18 h) a 37°C. Posteriormente se transfirieron 2 mL del cultivo líquido a un tubo Eppendorf y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante sin remover la pastilla y se añadió 1 mL de PIV frío, se mezcló empleando el vórtex hasta disolver totalmente y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se descartó el PIV de cada tubo y se añadieron 410 µL de PIV a cada muestra y se mezcló en vórtex para disolver la pastilla.

Se fundió agarosa al 1.5% (Agarosa Certificada para Campos Pulsados, Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) con buffer TBE 0.5X en microondas y se mantuvo entre 50-55°C mediante calentamiento en baño de agua. Se colocaron 150µL de la agarosa fundida en cada tubo y se mezcló utilizando el vórtex, esto se realizó una muestra a la vez para evitar que solidificará la agarosa previo a la preparación de los discos. Para preparar un disco de agarosa se colocaron 35µL de la mezcla con agarosa sobre un portaobjetos estéril forrado con papel parafilm (se prepararon entre 4-6 discos por muestra) y se dejaron solidificar a temperatura ambiente por 5 min y se transfirieron a un tubo Falcon estéril de 15 mL. Se preparó la solución para la lisis celular (EC-lisis) al adicionar 0.1mg de lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Canadá) y 10µL ARNsa de una concentración de 5mg/mL (Epicentre, Inc., Madison, WI, E.U.A.) al buffer EC que cambia a EC-lisis y se dejó a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de EC-lisis a cada tubo que contenía los discos y se llevaron al fondo, sin agitar en exceso para evitar su rompimiento y se incubaron por 3 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se desechó el EC-lisis empleando una gasa estéril, teniendo cuidado de

no desechar los discos y se preparó la solución ESP al adicionar 1mg de proteinasa K a 1 mL de solución ES, se añadió 1 mL de la solución ESP a cada tubo y se incubó toda la noche a 55°C (mínimo 17 h). Después la solución se eliminó con una gasa estéril y se agregaron 13 mL de TE 1X a cada tubo y se agitaron por inversión durante 1 h, posteriormente se eliminó el TE 1X de cada tubo y se adicionó nuevamente 13 mL, este paso se repitió cuatro veces más; posterior a estos lavados los discos se colocaron en un tubo Eppendorf con 1mL de TE 1X y se ocuparon inmediatamente para la restricción enzimática o de no ser así fueron almacenaron a 4°C.

Al día siguiente se transfirió con pinzas un solo disco a un tubo Eppendorf estéril de 2 mL y se añadieron 40µL del buffer de restricción con la enzima *XbaI* (Promega) que se preparó mezclando 34.6µL de agua, 4µL de buffer D 10X, 0.4µL de BSA 1% y 1µL de *XbaI* (10U/µL); los discos se incubaron toda la noche a 37°C.

Se limpió el equipo (CHEF-DR® III *Pulsed Field Electrophoresis Systems*, Bio-Rad) con agua destilada estéril que se dejó circulando por 20 min, se eliminó el agua y se agregaron 5 L de TBE 0.5X estéril y se dejó en el recirculador hasta que el equipo alcanzó 14°C. Se sacaron los discos de incubación y se añadieron 4 µL de buffer de carga 10X que contiene: SDS 0.9%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.05% (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y se preparó un gel de agarosa al 1% con 150 mL de buffer, y además se preparó un excedente de 10 mL. Se vació la agarosa a la placa, se colocó el peine, y los 10 mL excedentes de agarosa se dejaron en baño de agua a 50°C. Los discos de agarosa se colocaron en el gel, el marcador de PM al principio y al final, los pocillos se cubrieron con el excedente de agarosa que estaba a 50°C. El gel se colocó en el equipo y se programaron las siguientes condiciones: T inicial 0.5 s, T final 30s, tiempo de corrida 23 h, voltaje 6 V, ángulo 120 y temperatura de 14°C.

Al concluir la corrida, se retiró el gel del equipo y se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/mL por 10 min y se lavó con agua destilada, por último se reveló en un transiluminador con luz UV a 254nm (Fotodocumentador UVP Bioluminescence Imaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom).

El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual tomando en cuenta los criterios establecidos para esta técnica por Tenover, *et al.* (Tenover *et al.* 1995); con ello se creó una base de datos la cual se analizó empleando el programa estadístico SPSS® versión 20, utilizando el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard y como resultado final se obtuvo un dendograma con el objetivo de establecer los porcentajes de similitud

entre los patrones de restricción de los aislamientos para poder determinar la presencia de clonas. Se definió como clona a aquel aislamiento con un 100% de similitud en su patrón de restricción y como subtipos o cercanamente relacionados cuando presentaron diferencia en una a tres bandas entre los patrones de restricción obtenidos.

6.9.2. Análisis mediante tipificación multilocus de secuencias (MLST)

Para llevar a cabo el análisis mediante MLST se realizó una selección de aislamientos representativos en base a las especies, los genes de resistencia, los patrones de restricción de EGCP y el perfil de plásmidos detectado. Se siguió el protocolo sugerido por Diancourt *et al*; Miyoshi-Akiyama *et al*; y Wirth *et al*. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó empleando tres diferentes bases de datos: Pasteur (<http://bigsd.bpasteur.fr>) para *K. pneumoniae*; PUBMLST (<http://pubmlst.org>) para *E. cloacae* y Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk>) para *E. coli*.

Para el análisis de MLST se requiere la amplificación de siete genes que corresponden a *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* y *tonB* en el caso de *K. pneumoniae*; de *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rpIB* y *rpoB* para *E. cloacae* y *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdH*, *purA* y *recA* para *E. coli*. Los iniciadores, así como el tamaño esperado de los productos se encuentran en la tabla siguiente.

Tabla 6. Iniciadores empleados en MLST.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)	T. alineamiento (°C)
<i>K. pneumoniae</i>				
<i>rpoB</i>	Vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	501	50
	Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
<i>gapA</i>	gapA173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	450	60
	gapA181	CTTCAGAAGCGCTTTGATGGCTT		
<i>mdh</i>	mdh130	CCCAACTCGCTTCAGGTTACG	477	50
	mdh867	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG		
<i>pgi</i>	pgi1F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	432	50
	pgi1R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
<i>phoE</i>	phoE604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	420	50
	phoE604.2	TGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT		
<i>infB</i>	infB1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	318	50
	infB1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
<i>tonB</i>	tonB1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	414	45
	tonB2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

Tabla 6.- Iniciadores empleados en MLST (continuación).

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)	T. alineamiento (°C)
<i>E. cloacae</i>				
<i>dnaA</i>	dnaA-f2 dnaA-r	AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG	748	50
<i>fusA</i>	fusA-f2 fusA-r2-seq	TCGCGTTCGTTAACAATAATGGACCGTAT ATCTCTTCACGYTTGTTAGCGTGCATCT	708	50
<i>gyrB</i>	gyrB-f3-seq gyrB-r3-seq	AAAACCGGTACYATGGTGCCTTTCTGG GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCCTTCC	811	50
<i>leuS</i>	leuS-f2 leuS-r	GATCARCTSCCGGKATCCTGCCGGAAG ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT	844	50
<i>pyrG</i>	pyrG-f pyrG-r	AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC	534	50
<i>rpIB</i>	rpIB-f rpIB-r	GTAAACCGACATCTCCGGGTGCTCGCCA ACCTTTGGTCTGAACGCCACGGAGTT	745	50
<i>rpoB</i>	rpoB-f rpoB-r	CCGAACCGTTCGCGAACATCGCGCTGG CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT	748	50
<i>E. coli</i>				
<i>adk</i>	adkF adkR	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583	54
<i>fumC</i>	fumCF fumCR	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806	54
<i>gyrB</i>	gyrBF gyrBR	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911	60
<i>icd</i>	icdF icdR	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	54
<i>mdh</i>	mdhF1 mdhR1	AGCGCGTTCGTGTTCAAATGC CAGGTTTCAACTCTCTCTGT'	932	60
<i>purA</i>	purAF purAR	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA'	816	54
<i>recA</i>	recAF1 recAR1	ACCTTTGTAGCTGTACCACG AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	780	58

Para la mezcla de PCR de cada uno de los siete genes que se estudiarán se añadirán 6 µL de ADN a 44 µL de una mezcla de reacción compuesta por: buffer 1X (NH₄ 1X pH 8.8), MgCl₂ 3 mM, dNTP's 0.8 mM, cada iniciador a 0.2 µM y 1 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones de amplificación para los genes de *E. coli* fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 min a 95°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1min, alineamiento a 55°C por 1 min, elongación a 72°C por 2 min y por último 1 ciclo a 72°C por 5 min para la elongación final. En el caso de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos de desnaturalización

a 94°C por 20s, alineamiento a la temperatura indicada para cada gene en la tabla por 30s, elongación a 72°C por 30s y por último 1 ciclo a 72°C por 5 min para la elongación final.

Para verificar la presencia del producto de PCR esperado, se realizó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL), colocando el gel a 100 V por 50 min, empleando un marcador de 100-1,000 pb. Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital.

6.10. Determinación de factores de virulencia

Esta parte del proyecto se realizó en los aislamientos de *K. pneumoniae*. Se realizó el análisis en aislamientos resistentes y susceptibles a carbapenémicos con la finalidad de llevar a cabo una correlación entre los hallazgos detectados.

6.10.1. Determinación de viscosidad

Las cepas se clasificaron como mucoides o no mucoides mediante la prueba del hilo o “*string test*”, que consiste en incubar los aislamientos en placas de agar de sangre a 37°C durante 16-18hrs, transcurrido este tiempo con ayuda de un asa bacteriológica se estiro una cadena de crecimiento de la colonia bacteriana y si la cadena formada era igual o mayor a 5mm la cepa se consideró como hipermucoviscosa (Fang *et al.* 2004). Además se llevó a cabo la detección del gen *rmpA* y *rmpA2* que codifica a un regulador del fenotipo mucoide, se emplearon las condiciones e iniciadores previamente descritos por (Garza-Ramos *et al.* 2016).

6.10.2. Determinación de serotipos capsulares

En los aislamientos se investigaron dos serotipos capsulares, que se asocian con mayor frecuencia con el aumento de la virulencia que corresponden a K1 y K2 mediante PCR de punto final con los cebadores y condiciones anteriormente reportadas por (Garza-Ramos *et al.* 2016).

6.10.3. Determinación de genes que codifican para factores de virulencia

Se realizó la determinación de genes asociados a virulencia empleando los cebadores y condiciones previamente descritos por (Garza-Ramos *et al.* 2016) (Tabla 7).

Tabla 7.- Iniciadores de genes que codifican para factores de virulencia en *K. pneumoniae*.

Factor de virulencia que codifica	Gen	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)
<i>Fimbria tipo 1</i>	<i>fimA</i>	CGGACGGTACGCTGTATTTT GCTTCGGCGTTGTCTTTATC	436
<i>Fimbria tipo 1</i>	<i>fimH</i>	TGGTGGTTCGACCTCTCCACGCAGATTTTTTGCC TCAGCTGAACGCCTATCCCCTGCGCCGGCGAGGCGG	576
<i>Fimbria tipo3</i>	<i>mrkA</i>	CGGTAAAGTTACCGACGTATCTTGTACTG GCTGTTAACCACACCGGTGGTAAC	498
<i>Fimbria tipo3</i>	<i>mrkD</i>	CTGACGCTTTTTATTGGCTTAATGGCG GCAGAATTTCCGGTCTTTTCGTTTAGTAG	757
<i>Enterobactina</i>	<i>entB</i>	GATGAAGACGATACCGTGC ACCGAATCCAGACCGTAGTC	389
<i>Salmochelina</i>	<i>iroB</i>	ATCTCATCATCTACCCTCCGCTC GGTTCGCCGTCGTTTTCAA	235
<i>Yersinobactina</i>	<i>irp2</i>	GCTACAATGGGACAGCAACGAC GCAGAGCGATACGGAAAATGC	230
<i>Aerobactina</i>	<i>iucA</i>	AATCAATGGCTATTCCCCTG CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG	239
UDP galactonato 4-epimerasa	<i>uge</i>	GATCATCCGGTCTCCCTGTA TCTTCACGCCTTCTTCACT	534
<i>Ureasa</i>	<i>ureA</i>	GCTGACTTAAGAGAACGTTATG GATCATGGCGCTACCT(C/T)A	337

6.10.4. Determinación de producción de biopelícula

Se realizó la determinación semicuantitativa de biopelícula mediante la técnica de cristal violeta siguiendo la metodología descrita previamente por (Bandeira *et al.* 2014) con algunas modificaciones sugeridas por (Burmolle *et al.* 2012). A partir de un cultivo de 18-24h en agar soya tripticaséina se realizó un inóculo al 1.0 de la escala de McFarland (3.0×10^8 UFC/mL) en solución salina estéril, posteriormente se realizó una dilución 1:20 (1.5×10^7 UFC/mL) del inóculo en caldo soya tripticaséina suplementado con glucosa al 1%. Se añadieron 200µL de cada dilución por cuadruplicado en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y se cubrió e incubó

24 h a 37°C con agitación. Transcurrida la incubación se transfirieron 100µL del sobrenadante a una placa de microtitulación nueva, solo un pocillo por aislamiento y se realizó la medición de la absorbancia a 600nm en un lector de ELISA, esta medición corresponde a la de las células planctónicas. Después, se eliminó el resto de sobrenadante de cada celda y se lavaron con 200µL de solución salina dos veces. Posteriormente se añadieron 100µL de cristal violeta al 1% a cada pocillo y se dejó reposar por 20 min a temperatura ambiente. Al concluir este período de tiempo cada placa se lavó 5 veces empleando 200µL agua destilada estéril y se dejó secar en posición invertida durante 10 min. Posteriormente se añadieron 100µL de etanol al 95% y la placa se incubó por 10-15min a temperatura ambiente con agitación, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 595nm (absorbancia de la biopelícula). Empleando la absorbancia de las células planctónicas y de la biopelícula se calculó el índice de biopelícula ($A_{\text{biopelícula}}/A_{\text{cel. planctónicas}} = A_{595}/A_{600}$). El índice de biopelícula se utilizó para normalizar la cantidad de biopelícula formada del total de células presentes en cada una de las muestras analizadas y para realizar la clasificación de la producción de biopelícula en los aislamientos.

Los aislamientos que presentaron un índice menor a 0.90 se clasificaron como no adherentes o no productores; con un valor mayor a 0.90 pero menor a 1.20 se clasificaron como débilmente productores y los aislamientos con un índice superior a 1.20 se clasificaron como fuertes productores de biopelícula. Estos valores se obtuvieron al realizar una comparación entre los sistemas de interpretación de resultados sugeridos por (Stepanovic *et al.* 2007) empleando los valores de absorbancia e incluyendo el índice de biopelícula para realizar la corrección de la diferencia de desarrollo entre los aislamientos analizados.

Como controles de calidad se emplearon las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 que corresponden a cepas bajas y altas productoras de biopelícula, respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación y origen de los aislamientos clínicos

Durante el periodo de estudio que correspondió de septiembre del 2014 a julio del 2015 en el Hospital Civil de Guadalajara se recuperaron 3,044 aislamientos de enterobacterias, de las cuales 222 aislamientos se preseleccionados en función del perfil de susceptibilidad, espécimen y área hospitalaria de procedencia (102 aislamientos resistentes y 120 susceptibles a carbapenémicos) y se enviaron al laboratorio de Microbiología e inmunología de la facultad de Ciencias Biológicas.

De los 222 aislamientos recuperados, 86 fueron resistentes a carbapenémicos y productores de carbapenemasas. De cada especie bacteriana identificada se trabajó solo un aislamiento por paciente por lo cual, solo se estudiaron 52 aislamientos clínicos obtenidos de 51 pacientes diferentes, debido a que uno de los pacientes presentó dos especies bacterianas con resistencia a carbapenémicos (*E. cloacae* y *E. coli*).

La mayoría de los aislamientos se obtuvieron de especímenes respiratorios y de muestras de orina con un 23.1% (n=12), respectivamente, seguidos de muestras de secreciones con 17.3% (n=9), sangre con 13.5% (n=7), catéter central con 11.5% (n=6), líquido peritoneal con 3.9% (n=2) y otros especímenes con 7.7% (n=4). Los aislamientos se obtuvieron de quince salas hospitalarias diferentes (Figura 6).

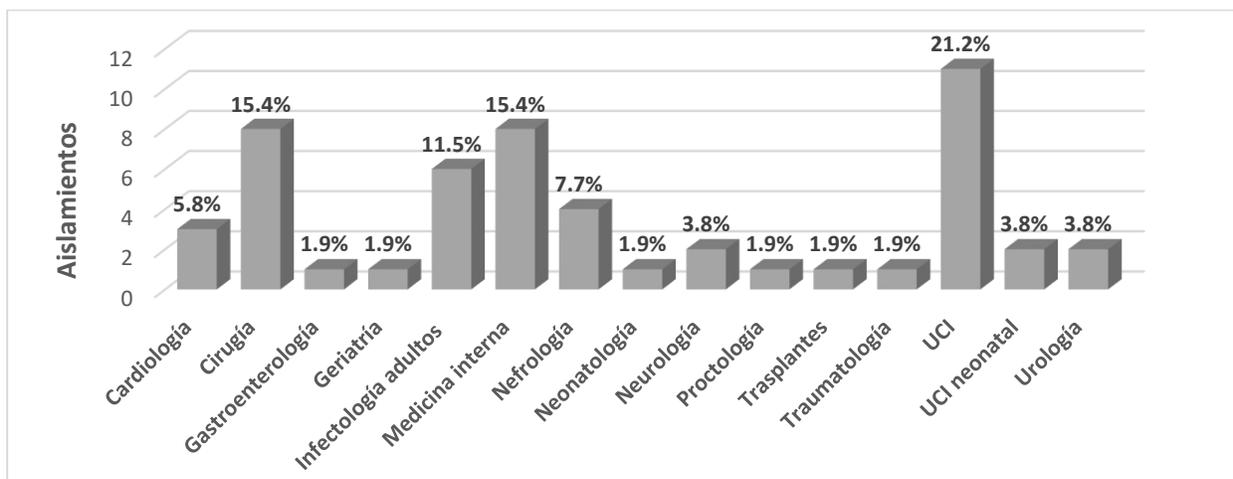


Figura 6. Área hospitalaria de procedencia de los distintos aislamientos.

En los 52 aislamientos seleccionados se identificaron cinco especies bacterianas: *K. pneumoniae* 88% (n=46); *E. cloacae* 6% (n=3), *E. coli*, *P. rettgeri* y *C. freundii* (2%, n=1 cada uno).

7.2. Identificación de carbapenemasas

Los 52 aislamientos incluidos en este estudio fueron resistentes al menos a uno de los carbapenémicos incluidos en el panel del sistema automatizado Vitek (meropenem o ertapenem) y el 100% fue positivo a la prueba de CarbaNP, indicando que son productores de carbapenemasas.

De los cinco genes asociados a resistencia a carbapenémicos analizados se detectaron cuatro genes que correspondieron a NDM-1, VIM, KPC e IMP y ninguno de los aislamientos presentó OXA-48.

El gen de carbapenemasa que se identificó con mayor frecuencia fue a NDM-1 (92.3%, n=48) y fue detectado en *K. pneumoniae* 90% (n=43), *E. cloacae* 6% (n=3), *E. coli* y *P. rettgeri* (2%, n=1 cada uno).

El gen VIM fue identificado en el 5.6% (n=3) de los aislamientos y se detectó en dos especies bacterianas: a *K. pneumoniae* (n=2) y *C. freundii* (n=1). El gen KPC se detectó en un aislamiento de *K. pneumoniae* y el aislamiento de *P. rettgeri* presentó el gen IMP además de la presencia del gen NDM-1, siendo el único aislamiento que portaba más de un gen de carbapenemasa.

En la figura 7 se presenta la distribución temporal de los 52 aislamientos resistentes a carbapenémicos recuperados durante los once meses de estudio del brote hospitalario, indicando la especie bacteriana, el gen asociado a la resistencia a carbapenémicos.

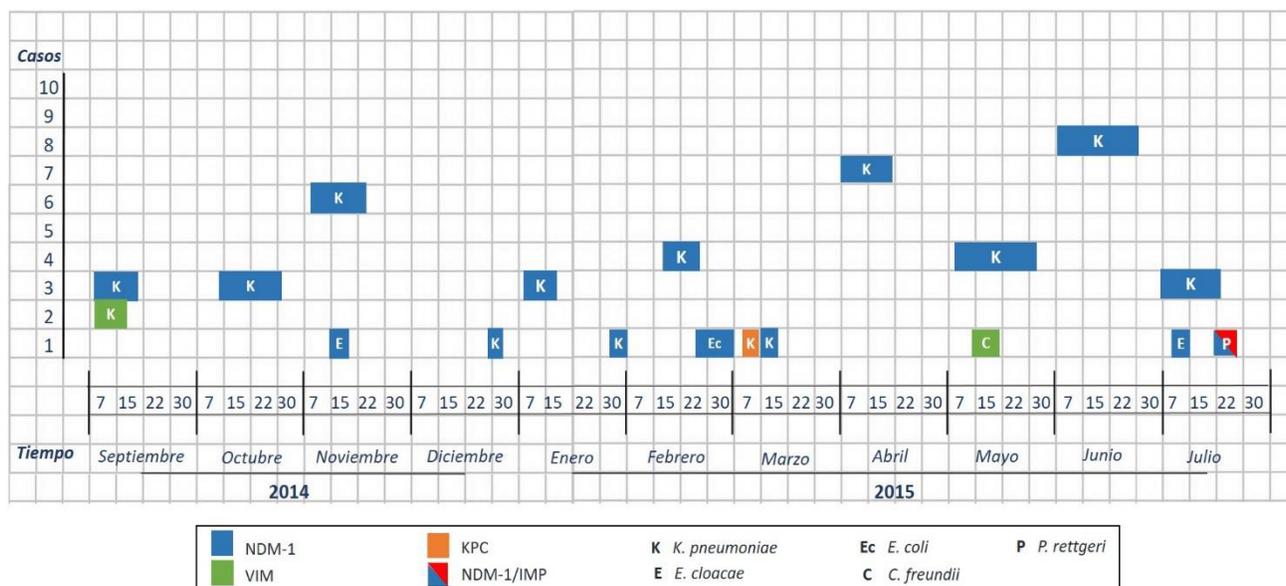


Figura 7. Distribución temporal de los aislamientos resistentes a carbapenémicos.

7.3. Información clínica

En este estudio se obtuvo la información clínica de 40 de los de los 51 pacientes incluidos en el proyecto. La media de edad de los pacientes fue de 44 años con un rango de cero a 79 años y el 70% correspondieron a pacientes masculinos. La media de días de estancia hospitalaria previa a un cultivo positivo fue de 28 días con un rango de seis a 76 días.

Se detectó que la principal causa de hospitalización fue daño craneoencefálico con un 20%, seguida de infecciones del tracto respiratorio inferior con 15%, enfermedad renal crónica y quemaduras con 7.5% cada una. Las principales comorbilidades identificadas fueron hipertensión arterial en un 40%, insuficiencia renal aguda con 27.5% y diabetes mellitus con 25%. El principal factor de riesgo detectado fue el uso de catéter urinario con un 85% de frecuencia seguido de ventilación mecánica (72.5%) uso de catéter venoso central (67.5%), intervención quirúrgica en los últimos tres meses (62.5%) estancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (57.5%). El 60% de pacientes recibió de cinco a más antibióticos para su tratamiento previo al aislamiento del microorganismo resistente a carbapenémicos, las clases de antibióticos utilizados se detallan en la tabla 8.

La tasa de mortalidad en los pacientes fue del 37.5% y la mortalidad atribuible a la infección fue del 35%.

Tabla 8. Antibióticos utilizados previo a cultivo bacteriano positivo.

Tipo de antibióticos	n (%)
Carbapenémicos	29 (72.5)
Cefalosporinas	28 (70)
Tigeciclina	20 (50)
Linezolid	20 (50)
Rifampicina	14 (35)
Colistina	13 (32.5)
Piperacilina/tazobactam	12 (30)

7.4. Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos

Los aislamientos de ERC presentaron una alta resistencia a ampicilina (100%), ceftriaxona (100%), trimethoprima/sulfamethoxazol (98%), ertapenem (96%), fosfomicina (92%), meropenem (90%), imipenem (88%), ciprofloxacina (87%), gentamicina (83%), amikacina (79%), y aztreonam (73%). Además, para otros antimicrobianos como cloranfenicol (52%), tigeciclina (19%) y colistina (4%) se detectó una menor resistencia.

Los datos de susceptibilidad para los aislamientos de *K. pneumoniae* NDM-1 se presenta en la tabla 9, en la cual se muestran los valores de CMI, y el porcentaje de aislamientos resistentes y susceptibles a los distintos antibióticos analizados. Los tres aislamientos de *E. cloacae* portadores del gen NDM-1 analizados en este estudio presentaron un 100% de resistencia a todos los antibióticos estudiados con excepción de tigeciclina con un 33.3% de resistencia y colistina con ningún aislamiento resistente.

El 98% de los aislamientos se clasificaron como MDR y el único aislamiento que no se clasificó como MDR fue el aislamiento de *C. freundii*, el cual fue positivo para el gen VIM.

Tabla 9.- Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *K. pneumoniae* NDM-1.

Antibiótico	CMI (µg/mL)			Aislamientos n (%)	
	Rango	50%	90%	Susceptible	Resistente
Amikacina	≤4 - ≥128	≥128	≥128	6 (14)	37 (86)
Gentamicina	≤1- ≥32	≥32	≥32	5 (11.6)	38 (88.4)
Ertapenem	4 - ≥128	16	32	0 (0)	43 (100)
Imipenem	2 - ≥256	8	16	0 (0)	38 (88.4)
Meropenem	2 - 256	8	16	1 (2.3)	40 (93)
Ceftriaxona	≥64	≥64	≥64	0 (0)	43 (100)
Trimethoprima/ Sulfamethoxazol	8/152 – 16/304	16/304	16/304	0 (0)	43 (100)
Aztreonam	≤2- ≥128	16	32	7 (16.3)	32 (74.4)
Ampicilina	64- ≥128	≥128	≥128	0 (0)	43 (100)
Ciprofloxacina	≤0.5 – ≥16	≥16	≥16	3 (7)	38 (88.4)
Fosfomicina	256 - ≥512	512	≥512	0 (0)	43 (100)
Cloranfenicol	≤4- ≥128	16	128	6 (14)	20 (46.5)
Colistina	≤0.5- ≥16	≤0.5	2	41 (95.3)	2 (4.7)
Tigeciclina	≤0.5- 8	2	4	7 (16.3)	9 (21)

7.5. Identificación de plásmidos

Mediante la hidrólisis alcalina descrita por Kieser y una posterior migración electroforética se obtuvo el perfil de plásmidos en los aislamientos y se encontró que presentaron de uno a cinco plásmidos con tamaños de 40 a 170 kb. El perfil de plásmidos obtenido en los 48 aislamientos portadores del gen NDM-1 fue heterogéneo y se obtuvieron quince perfiles distintos: *K. pneumoniae* (n=11), *E. cloacae* (n=2), *E. coli* y *P. rettgeri*, (n=1, cada uno).

Mediante los experimentos de hibridación se detectó la presencia del gen NDM-1 en cuatro plásmidos distintos con tamaños de 130 a 170 kb. En el aislamiento de *K. pneumoniae* 14-3423 se identificaron dos plásmidos de 130 y 150 kb portadores del gen NDM-1 (carril 5, figura 8). En dos de los aislamientos estudiados, uno de *K. pneumoniae* (15-1880) y otro de *P. rettgeri* (15-1941) no se observó la presencia del gen NDM-1 en los plásmidos que portaban. Sin embargo, al repetir la hibridación con un nuevo producto de extracción se observó la hibridación positiva en un plásmido de 130 kb para el aislamiento 15-1880, pero continuó siendo negativa para el aislamiento 15-1941, la hibridación se repitió en dos ocasiones más con el mismo resultado. El aislamiento de *E. coli* (15-1327) fue el único aislamiento que presentó solo un plásmido con un tamaño de 130 kb. En la figura 8 se muestra el perfil de plásmidos de los 15 patrones obtenidos y la hibridación obtenida para esos aislamientos.

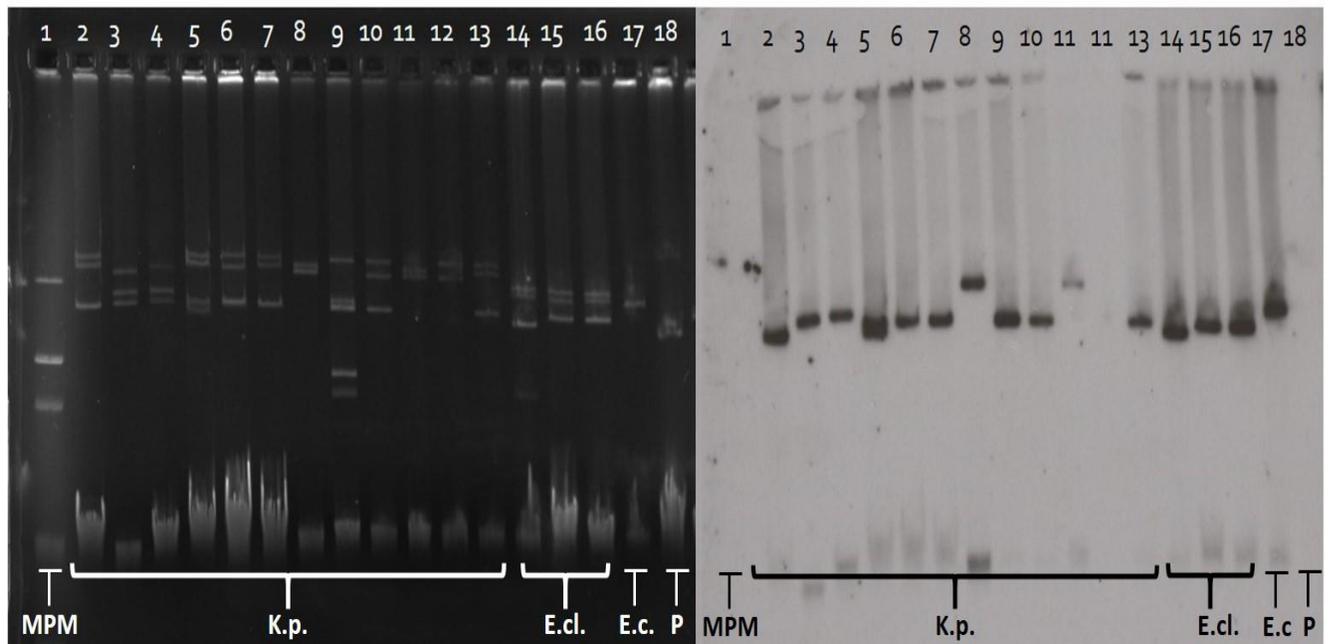


Figura 8.- Perfil de plásmidos e hibridación de aislamientos resistentes a carbapenémicos con patrón de plásmidos representativo. Marcador de peso molecular (MPM); *K. pneumoniae* (K.p); *E. cloacae* (E.cl); *E. coli* (E.c) y *P. rettgeri* (P).

En los aislamientos portadores del gen VIM se observaron dos patrones de plásmidos uno en los aislamientos de *K. pneumoniae* que presentaron dos plásmidos de 150 y 160 kb en cambio, el aislamiento de *C. freundii* presentó dos plásmidos de tamaño molecular de 50 y 160 kb. El aislamiento portador del gen KPC presentó cinco plásmidos con tamaños entre 140 a 160 kb.

7.6. Caracterización de plásmidos portadores de carbapenemasas

Mediante ensayos de conjugación se determinó la capacidad de los aislamientos recuperados en el brote hospitalario de transferir el plásmido portador del gen NDM-1 o el gen VIM, dependiendo del aislamiento analizado, a una cepa receptora que no presentaba plásmidos.

Entre los aislamientos portadores del gen NDM-1, se realizaron ensayos de conjugación en las cepas que presentaron perfiles de plásmidos diferentes y correspondieron a quince aislamientos.

De los aislamientos analizados únicamente diez fueron capaces de transferir el gen NDM-1 a la cepa receptora y correspondieron a *K. pneumoniae* (n=8) y *E. cloacae* (n=2). Sin embargo, de estos diez aislamientos con capacidad de transferir el plásmido únicamente ocho de las transconjugantes obtenidas presentaron un solo plásmido, con un tamaño entre 130 a 150 kb. Los aislamientos que fueron incapaces de transferir alguno de sus plásmidos además de tres cepas de *K. pneumoniae*, fueron los aislamientos de *P. rettgeri* y *E. coli*.

Las ocho transconjugantes obtenidas que presentaron un solo plásmido y el único plásmido presente en *E. coli* se sometieron a una digestión enzimática con la finalidad de comparar el patrón de restricción de los distintos plásmidos obtenidos. Mediante la digestión se observó un único patrón de restricción y mediante hibridación se determinó que en siete de los plásmidos el gen NDM-1 se encontraba presente en el mismo fragmento de un peso mayor a 1.5kb y en uno de los aislamientos se encontraba presente en un fragmento de menor tamaño, como se observa en la figura 9.

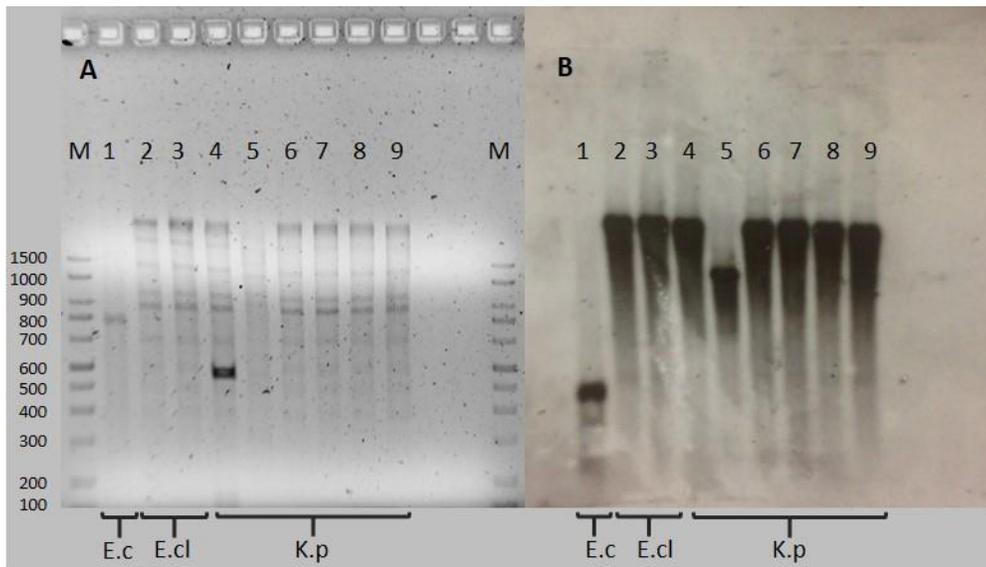


Figura 9. Patrón de restricción con la enzima *HinIII* (A) e hibridación con sonda quimioluminiscentes (B). M: Marcador de peso molecular de 1.5 kb; 1: 15-1327, *E. coli*; 2: TT 14-3442; 3: TT 15-0026; 4: TT 14-3335; 5: TT 14-3337; 6: TT 14-3424; 7: TT 14-3425; 8: TT 15-1363; 9: TT 15-1372. *E. coli* (E.c); *E. cloacae* (E.cl); *K. pneumoniae* (K.p).

En los aislamientos portadores del gen VIM se determinó que solo el aislamiento de *C. freundii* tenía la capacidad de transferir el plásmido portador del gen VIM y la transconjugante obtenida presentó únicamente un plásmido, mediante PCR se comprobó la presencia del gen VIM en la transconjugante obtenida. El aislamiento portador del gen KPC fue incapaz de transferir el plásmido portador del gen de resistencia y no se llevó a cabo la determinación de cuál de los cinco plásmidos que presentaba era portador del gen KPC.

7.7. Diversidad clonal

El análisis de diversidad clonal se llevó a cabo empleando dos metodologías la de EGCP y MLST. La primera para determinar la relación clonal entre los aislamientos que formaron parte del brote y MLST para realizar una comparación con las clonas internacionalmente reportadas.

La técnica de EGCP se utilizó en los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* empleando la enzima de restricción *XbaI* la cual, generó entre 15 a 20 fragmentos de restricción. En la figura 9 se presenta el dendograma obtenido para los aislamientos de *K. pneumoniae*. En los 46 aislamientos analizados se observaron 14 patrones de restricción diferentes con un porcentaje de similitud del 75 al 100%. El 60.9% (28/46) de los aislamientos se clasificaron como parte de la clona A. La clona A además presentó seis subtipos con un 19.5% (9/46) de frecuencia. Otras clonas detectadas correspondieron a la clona B y C con 4.3% (2/46) de frecuencia cada una y la clona D y H con un 2.2% (1/46) de frecuencia cada una. Las clonas B y E portaban los genes VIM y KPC, respectivamente.

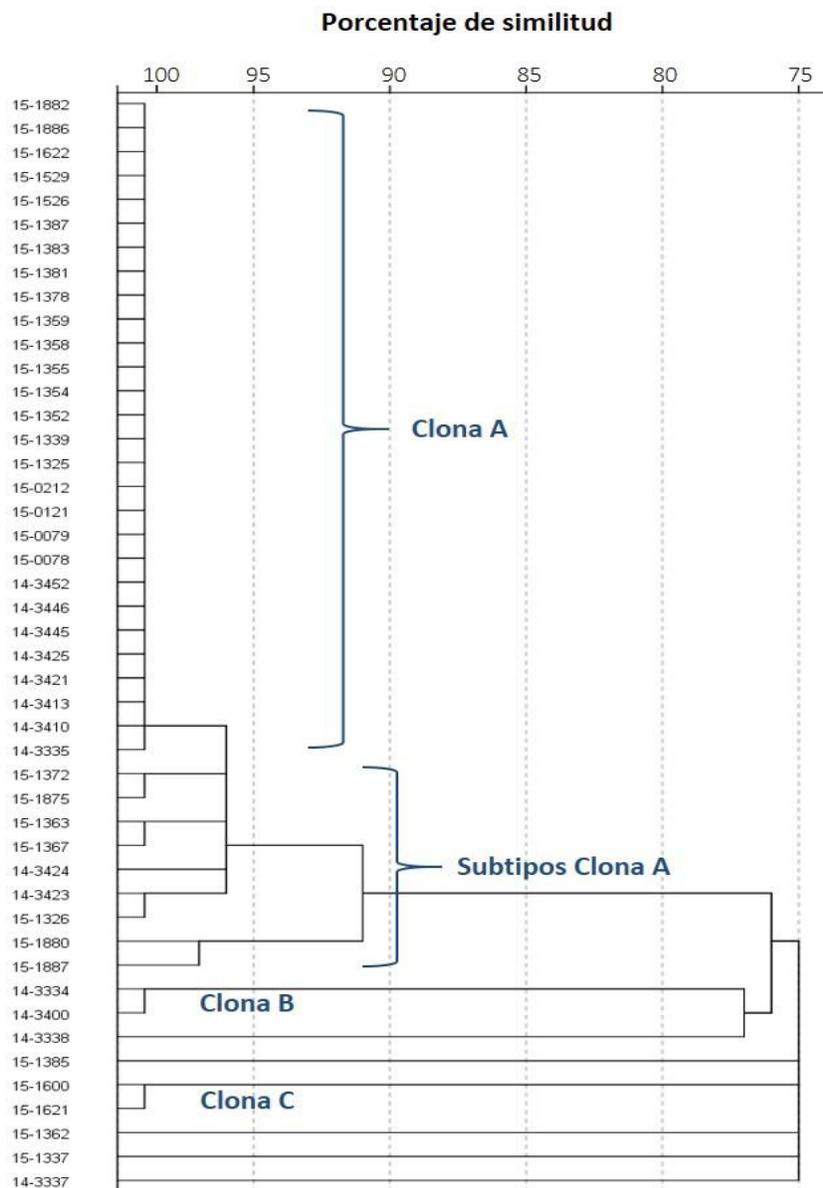


Figura 10. Dendrograma de aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (n=48).

La clona A y sus subtipos de *K. pneumoniae* estuvieron presentes durante los once meses que duró el estudio. En cambio, otras clonas no relacionadas como las clonas B y F solo se presentaron al inicio del estudio y las clonas E, F, G y H se detectaron en los últimos meses del estudio (figura 11).

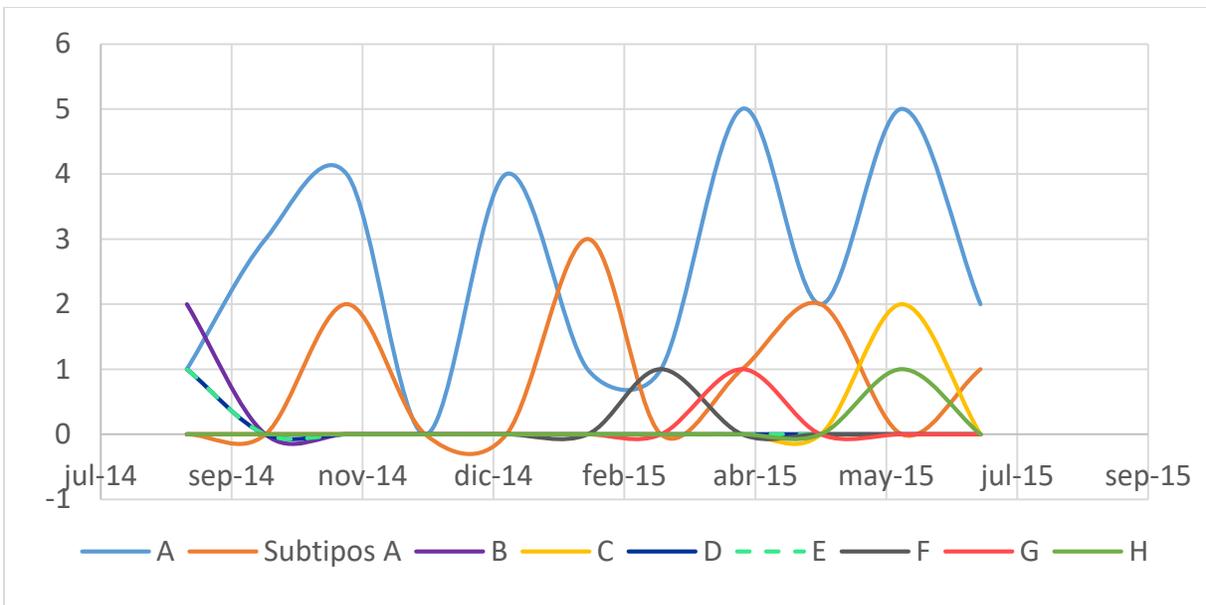


Figura 11. Distribución temporal de clonas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (n=48).

Entre los tres aislamientos clínicos de *E. cloacae* analizados se presentó una diferencia de dos bandas en su patrón de restricción y se clasificaron como cercanamente relacionados y como clona A y subtipo A1.

El análisis mediante MLST se realizó en aislamientos seleccionados en función de la clona detectada mediante EGCP, el perfil de plásmidos y la carbapenemasa detectada. En los aislamientos de *K. pneumoniae* se detectaron secuencias tipo (ST) previamente reportadas que correspondieron al ST392 en el aislamiento 14-3335; ST309 en aislamiento 14-3337; ST846 en aislamiento 14-3338; y ST307 en aislamiento 14-3423. Además, se identificaron dos nuevas ST la ST2400 en el aislamiento 15-1362; y ST2399 en el aislamiento 15-1600. En el aislamiento 15-1327 de *E. coli* se identificó la ST10, y la ST182 en el aislamiento 14-3442 de *E. cloacae*.

7.8. Factores de virulencia

La distribución de los genes de virulencia detectados entre los aislamientos susceptibles y resistentes a carbapenémicos se encuentra en la tabla 10. En ambos grupos los genes que se presentaron con mayor frecuencia correspondieron a *fimH*, *entB*, *mrkA* y *ureA*. Ninguno de los

aislamientos presentó los genes *K1*, *iucA* ni *rmpA2*. Se encontró que la presencia de los genes *fimA* y *uge* estuvo asociada con los aislamientos susceptibles a carbapenémicos ($P = <0.001$).

Tabla 10.- Distribución de factores de virulencia en aislamientos resistentes y susceptibles a carbapenémicos.

Grupo	Genes de virulencia									
	<i>entB</i>	<i>iroB</i> , K2	<i>irp2</i>	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>uge</i>	<i>ureA</i>	<i>rmpA</i>
RC	97.7% (42/43)	0% (0/43)	60.5% (26/43)	18.6% (8/43)	100% (43/43)	74.4% (32/43)	0% (0/43)	27.9% (12/43)	76.7% (33/43)	0% (0/43)
SC	100% (23/23)	13% (3/23)	47.8% (11/23)	65.2% (15/23)	95.7% (22/23)	100% (23/23)	4.3% (1/23)	82.6% (19/23)	100% (23/23)	8.7% (2/23)
P	NS	NS	0.467	<0.001	NS	NS	NS	<0.001	NS	NS

El 81.8% (54/66) de los aislamientos fueron no productores de biopelícula, el 1.5% (1/66) se clasificaron como productores débiles y el 16.7% (11/66) como productores fuertes de biopelícula. Todos los aislamientos que fueron capaces de producir biopelícula fueron resistentes a carbapenémicos. La producción de biopelícula tanto fuerte como débil se encontró asociada con la resistencia a carbapenémicos ($P = <0.05$).

Tabla 11.- Producción de biopelícula en aislamientos resistentes y susceptibles a carbapenémicos.

Clasificación	No adherentes	Débilmente productores	Fuertes productores
Resistentes a carbapenémicos	69.8% (30/43)	4.6% (2/43)	25.6% (11/43)
Susceptibles a carbapenémicos	100% (23/23)	0% (0/23)	0% (0/23)
P	NS	NS	NS

8. DISCUSIÓN

Algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae* son patógenos oportunistas causales frecuentes de infecciones en el ambiente intrahospitalario. El incremento de la frecuencia de aislamientos con resistencia a un amplio espectro de fármacos incluyendo los carbapenémicos complica el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos y favorece la presentación de brotes hospitalarios. Además, los distintos factores de virulencia y persistencia que estos microorganismos presentan son un factor importante que favorece su éxito como patógenos intrahospitalarios y hace difícil su erradicación del hospital. Es por esto que en este estudio se llevó a cabo la caracterización del mecanismo de resistencia a carbapenémicos presente en enterobacterias asociadas a un brote hospitalario en un hospital de tercer nivel en Guadalajara, Jalisco y determinar si los factores de virulencia son diferentes entre microorganismos resistentes y susceptibles a este grupo de antibióticos.

A nivel mundial se han identificado once carbapenemasas en la familia *Enterobacteriaceae*; de las cuales se han identificado tres en México. La primer carbapenemasa identificada en México fue VIM, la cual fue reportada en el 2009 en el mismo hospital que es objeto de nuestro estudio (Morfin-Otero *et al.* 2009). Posteriormente se detectó KPC en el 2013 en un Hospital de la Ciudad de México y finalmente, se detectó NDM-1 en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, en Monterrey Nuevo León. En este proyecto se detectaron las carbapenemasas NDM, VIM, KPC e IMP de manera, simultánea en un periodo de 11 meses. La presencia de más de una carbapenemasa en el mismo periodo de tiempo y en el mismo hospital es un evento que se ha reportado previamente en otros hospitales en China y Kuwait, donde se identificaron tres carbapenemasas: NDM, KPC e IMP en China, y NDM, KPC y OXA-48 en Kuwait (Jamal *et al.* 2016; Wang *et al.* 2016) sin embargo, este fenómeno no había sido reportado en México.

En este estudio, la carbapenemasa detectada con mayor frecuencia fue NDM-1 con un 92.3% de frecuencia en los aislamientos analizados. Esta MBL fue identificada por primera vez en el 2008 en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* en un paciente hospitalizado en Nueva

Delhi, India y en la actualidad ha sido reportada a nivel mundial y en distintas especies bacterianas (Dortet *et al.* 2014).

El primer reporte de NDM-1 en México fue en el estado de Nuevo León en el 2013 en aislamientos clínicos de *P. rettgeri*. Este gen se detectó un año después en Morelos en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (Barrios *et al.* 2013; Barrios *et al.* 2014). En este estudio el gen NDM-1, se detectó en cuatro especies bacterianas (*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *P. rettgeri*).

La presencia del gen NDM-1 en más de una especie durante un brote hospitalario ha sido reportada previamente en México con la detección tres especies de enterobacterias (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *E. coli*) en cuatro pacientes. En este estudio los aislamientos de *K. pneumoniae* (n=3) pertenecieron a la misma clona (Torres-Gonzalez *et al.* 2015). Sin embargo, este estudio previo no incluye el alto número de especies y aislamientos reportados en el presente trabajo.

En el presente estudio, se detectaron 5 especies de Enterobacterias portadoras de NDM-1: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, y *P. rettgeri*. Esta última es resistente a carbapenémicos en pocas ocasiones y cuando se ha reportado se asocia con el gen NDM-1. Interesantemente, el aislamiento de esta especie es además portador del gen IMP cuya presencia ha sido únicamente reportada en Japón (Nishio *et al.* 2004; Shiroto *et al.* 2005). La presencia de dos carbapenemasas en un mismo aislamiento no se había reportado para *P. rettgeri*.

Los factores de riesgo para la infección por ERC detectados en el presente estudio son similares a lo previamente descritos en otros estudios, tales como el uso de ventilación mecánica, la admisión en UCI, la estancia hospitalaria prolongada y el empleo de antimicrobianos principalmente carbapenémicos y cefalosporinas. Pero a diferencia de estudios previos, no se confirmó como factor de riesgo el uso de fluoroquinolonas previo al cultivo bacteriano (Ling *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016).

La mortalidad atribuible para la infección por ERC (35%) fue menor a lo reportado en un hospital de China (57.4%) (Wang *et al.* 2016). Sin embargo, la mortalidad atribuible a la infección únicamente por microorganismos portadores del gen NDM-1 (34.2%) fue superior a lo reportado

en Kuwait (28.6%) (Jamal *et al.* 2016). Este hallazgo señala la importancia de realizar un adecuado control del brote hospitalario y erradicación de estos microorganismos, debido a que la prevalencia en el ambiente hospitalario de cepas con este gen de resistencia puede incrementar considerablemente la mortalidad en este hospital.

Los aislamientos analizados presentaron una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos estudiados y el 98% fue clasificado como MDR, lo cual es de esperarse ya que los plásmidos que acarrean los genes de carbapenemasas pueden a su vez portar otros genes de resistencia (Jean *et al.* 2015). El único aislamiento que no se clasificó como MDR fue de la especie *C. freundii* portador del gen VIM, que a pesar de ser portador y productor de una carbapenemasa no presentó resistencia a ninguno de los tres carbapenémicos analizados. Este mismo fenómeno se observó en las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de este mismo gen ya que entre los carbapenémicos, fueron resistentes únicamente a imipenem. Este se ha observado anteriormente, en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *C. freundii* portadoras de VIM que mostraron susceptibilidad o valores de CMI cercanos al valor de susceptible a uno o los tres carbapenémicos estudiados (ertapenem, imipenem y meropenem) (Aschbacher *et al.* 2008)

La producción de metalobetalactamasas como NDM-1 no confiere resistencia a aztreonam, sin embargo, en los aislamientos analizados portadores del gen NDM-1 se detectó una resistencia del 74.4% a este fármaco; esto podría explicarse por la presencia de otro gen de resistencia con acción sobre este antibiótico, ej. BLEE o AmpC (betalactamasa clase C). Se ha reportado la presencia de las BLEE CTX-M-15 y CMY-4 en aislamientos portadores NDM-1 (Kumarasamy *et al.* 2010). Sin embargo, en este estudio no se analizó la presencia de BLEEs en los aislamientos por lo cual se desconoce cuál es el mecanismo involucrado a la alta resistencia a este fármaco.

En infecciones por microorganismos que presentan resistencia a carbapenémicos se pueden emplear tigeciclina y/o colistina como antibióticos último recurso; los cuales son fármacos de toxicidad muy elevada, y características farmacológicas que limitan su uso en algunas infecciones, Por ejemplo, la tigeciclina no concentra en sangre por lo que no puede usarse en casos de bacteriemia. Por todo lo anterior, debe haber una vigilancia estricta de bacterias resistentes a carbapenémicos para prevenir su diseminación; no solo de las especies portadoras del gen en una

expansión clonal, sino de la diseminación del plásmido por transferencia horizontal entre varias especies.

En este estudio se detectó que el 19.6% de los aislamientos fueron resistentes a tigeciclina. En 2016 el Programa de Vigilancia a Antimicrobianos SENTRY para aislamientos CRE recuperados en América Latina mostró un 2.6% de resistencia a este fármaco (Sader *et al.* 2016); y una resistencia del 4% para la colistina. Si bien se han reportado valores superiores en otros países (India y Reino Unido de 6% y 11%, respectivamente) (Kumarasamy *et al.* 2010), este trabajo es el segundo informe de resistencia a colistina en Enterobacterias en nuestro país; con el primero de ellos reportado en el Hospital Regional ISSSTE 1° de Octubre en la Ciudad de México (Garza-Ramos U *et al.* 2014). Hasta la fecha no se ha identificado cuál o cuáles son los mecanismos involucrados en la resistencia a este antibiótico, pero la presencia de pocos aislamientos resistentes y únicamente en dos hospitales en México sugieren que se trata de un mecanismo cromosómico, lo que ha impedido su diseminación a nivel nacional. Sin embargo, es necesario realizar análisis adicionales para elucidar el mecanismo involucrado en la resistencia a este fármaco y determinar si existe posibilidad de transferencia hacia otras especies.

Ambos reportes de resistencia, tanto a tigeciclina como colistina, son de gran trascendencia tomando en cuenta que ambos son fármacos de último recurso y en caso de haber resistencia a estos fármacos, las alternativas terapéuticas son nulas.

En este estudio se detectó una alta clonalidad en los aislamientos analizados de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. En los aislamientos de *K. pneumoniae* se detectaron ocho clonas y seis subtipos de la clona A, que en conjunto conformaron el 80.4% del total de aislamientos analizados. El 6.5% de los aislamientos fueron portadores de los genes VIM y KPC y no estaban genéticamente relacionados con los aislamientos portadores del gen NDM-1; sin embargo, los aislamientos portadores del gen VIM si se encontraron relacionados entre ellos.

En este trabajo se demostró en el laboratorio la conjugación exitosa en varios de los aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de NDM-1, lo cual sugiere fuertemente que se favoreció la transferencia horizontal del elemento móvil portador del gen de resistencia durante el brote. Las clonas no relacionadas genéticamente se detectaron solo al inicio y final del período de estudio lo

cual sugiere que la dinámica clonal al principio y final del brote permitió la presencia de diferentes clonas favorecida por la transferencia horizontal del elemento móvil. En cambio, la persistencia de la clona predominante A y sus subtipos durante los once meses del estudio, se podría deber a expansión clonal favorecida por la persistencia de la clona en el ambiente hospitalario o su mantenimiento dentro de un portador que permitió su propagación en distintas áreas hospitalarias por un período de tiempo prolongado.

Mediante los análisis de MLST se encontraron cuatro secuencias tipo (ST) previamente reportados (ST307, ST309, ST392 y ST846) y ST nuevas de *K. pneumoniae* (ST2399 y ST2400). Además, se detectaron ST previamente descritas en *E. coli* (ST10) y en *E. cloacae* (ST182).

De las distintas secuencias tipo detectadas para *K. pneumoniae* en este estudio, la única previamente reportada asociada al gen NDM-1 corresponde al ST846 que se detectó en el 2016 en Shanghái, China (Zhu *et al.* 2016). En cambio, los ST307 y ST392 se han reportado únicamente asociados a aislamientos portadores de los genes KPC y OXA-48 y este es el primer reporte donde se asocian con aislamientos portadores del gen NDM-1 (Ruiz-Garbajosa *et al.* 2016; Yang *et al.* 2013).

El gen NDM-1 se detectó en plásmidos de tamaño entre 130 a 170 kb; sin embargo, en la mayoría de los aislamientos el plásmido portador del gen de resistencia presentó un tamaño de 140 \pm 10 kb y los cuatro aislamientos que presentaron los plásmidos de mayor tamaño correspondieron a una clona diferente de la predominante. Durante los distintos ensayos llevados a cabo el aislamiento de *P. rettgeri* perdió el plásmido que contenía el gen NDM-1 y fue imposible determinar en cuál de los plásmidos que presentaba este aislamiento se encontraba localizado el gen NDM-1.

Se logró la transferencia los plásmidos portadores del gen NDM-1 con un tamaño entre 130-150 kb en aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*; sin embargo, fue imposible de llevar a cabo en los aislamientos de *E. coli* y *P. rettgeri* indicando que los plásmidos portadores de este gen en estas especies no eran conjugativos y siendo posiblemente la razón que impidió que se presentarán más aislamientos de estas especies durante el brote hospitalario estudiado.

Mediante el ensayo de restricción enzimática de los plásmidos de tamaño similar portadores del gen NDM-1 se obtuvo un único patrón de restricción, lo cual sugirió que el entorno de los plásmidos analizados era posiblemente el mismo, no obstante, al realizar la hibridación para localizar el fragmento específico que contenía el gen NDM-1 se detectó que se encontraba localizado en el mismo fragmento en siete de los ocho plásmidos analizados. Estos hallazgos al igual que la presencia de plásmidos con tamaños diferentes sugieren que ocurrió un rearrreglo en los plásmidos presentes en este brote. Se ha descrito la presencia del gen VIM en plásmidos de diferente tamaño debido a la presencia de integrones que permiten la movilidad del gen de resistencia favoreciendo su reacomodo dentro del plásmido (Aschbacher *et al.* 2008). En este trabajo no se analizó la presencia de integrones que pudieran favorecer la movilidad por lo cual solo se puede inferir que la presencia de integrones podrían haber favorecido el rearrreglo que ocurrió dentro de los plásmidos portadores del gen NDM-1.

Se determinó la presencia de catorce genes relacionados con virulencia y la producción de biopelícula en los aislamientos de *K. pneumoniae* sensibles y resistentes a carbapenémicos. En este estudio nos enfocamos en *K pneumoniae* ya que fue la especie que se encontró con mayor frecuencia en el brote hospitalario. La frecuencia de los 14 genes analizados fue similar a lo previamente reportado en aislamientos obtenidos en México (Garza-Ramos *et al.* 2016) y la distribución fue similar entre los grupos de aislamientos susceptibles y resistentes en la mayoría de los genes con excepción de *uge* y *fimA*, los cuales se detectaron con mayor frecuencia en aislamientos susceptibles a carbapenémicos (P <0.001). El gen *fimA* que codifica para la fimbria tipo 1 contribuye a la invasión de las células de vejiga y en la producción de biopelícula y a pesar de su baja frecuencia en los aislamientos resistentes a carbapenémicos estos presentaron una mayor capacidad de formación de biopelícula con respecto a los aislamientos susceptibles.

La producción de biopelícula en superficies bióticas y abióticas se ha asociado con las fimbrias tipo 1 o tipo 3, la cápsula y los lipopolisacáridos en *K. pneumoniae*, pero la fimbria tipo 3, específicamente *mrkA* se ha descrito como el principal factor de virulencia que contribuye en este proceso. Sin embargo, en este estudio se observó que los aislamientos susceptibles que presentaron los genes *mrkA*, *fimA* o ambos fueron incapaces de formar biopelícula *in vitro*. Resultados similares han sido reportados previamente en un estudio llevado a cabo en México, en

el cual el gen *mrkA* se detectó en el 57% de los aislamientos productores de biopelícula (Vuotto *et al.* 2014). Nuestros resultados sugieren que otro mecanismo que no fue analizado en este estudio está involucrado en la formación de biopelícula.

El gen *uge* codifica para la proteína UDP galacturonato 4-epimerasa que se involucra en la producción de LPS. Este gen se encuentra presente en la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae* y su ausencia ocasiona la producción de un LPS rugoso que es menos capaz de causar infecciones del tracto urinario, neumonía o sepsis que las cepas *wild type* y es susceptible a la eliminación mediada por el complemento, incluso en presencia de cápsula. Este gen se detectó con mayor frecuencia en los aislamientos susceptibles a carbapenémicos, sin embargo, se requieren más estudios para determinar la relevancia de la diferencia observada entre ambos grupos estudiados.

La producción de biopelícula fue mayor en los aislamientos resistentes a carbapenémicos que en los aislamientos susceptibles a estos fármacos. Este hallazgo ya había reportado, sin embargo se analizaron solo 5 aislamientos (Fuursted *et al.* 2012). Además, la producción de la biopelícula podría favorecer la resistencia a los antibióticos de los aislamientos en conjunto con los genes de resistencia que presentan. Se requieren estudios adicionales para confirmar la participación de la biopelícula en la resistencia.

La frecuencia de los factores de virulencia entre ambos grupos analizados es muy similar. Un estudio previo mostró que las cepas portadoras del gen NDM-1 presentaron mayor virulencia en modelos de sepsis murino. En este estudio se desconoce la virulencia de los aislamientos *in vivo*, por lo que se requieren más análisis para determinar cuál de los grupos estudiados presenta una mayor virulencia.

9. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de las especies de *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. rettgeri* y *C. freundii* resistentes a carbapenémicos en un hospital de tercer nivel en México.
- La resistencia a carbapenémicos en los aislamientos obtenidos se relacionó con los genes NDM-1, VIM, KPC e IMP.
- El gen NDM-1 fue responsable del brote hospitalario y los demás genes se presentaron de manera esporádica.
- Los aislamientos presentaron una elevada resistencia a la mayoría de los antibióticos analizados.
- El gen de resistencia NDM-1 se encontró dentro de plásmidos conjugativos con evidencia de que un rearrreglo ocurrió en estos elementos móviles.
- En este brote hospitalario ocurrió una diseminación horizontal del elemento móvil portador del gen NDM-1 y además se presentó una diseminación de clonas.
- Los genes *fimA* y *uge* se encontraron con mayor frecuencia en los aislamientos susceptibles a carbapenémicos.
- La producción de biopelícula fue mayor en los aislamientos resistentes a carbapenémicos.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar la identificación y caracterización del mecanismo involucrado en la resistencia a colistina en los aislamientos resistentes a este antibiótico.
- Determinar la participación de la proteína UDP galacturonato 4-epimerasa en la virulencia de los aislamientos susceptibles a carbapenémicos.
- Realizar más estudios para determinar cuál de los grupos (aislamientos susceptibles o resistentes) presenta mayor virulencia en modelos animales.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aschbacher, R., Doumith, M., Livermore, D. M., Larcher, C., Woodford, N. 2008. Linkage of acquired quinolone resistance (*qnrS1*) and metallo-beta-lactamase (*blaVIM-1*) genes in multiple species of Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy. *J Antimicrob Chemother* 61: 515-523.

Asensio, A., Oliver, A., Gonzalez-Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Ros, P., . . . Canton, R. 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 30: 55-60.

Bandeira, M., Carvalho, P. A., Duarte, A., Jordao, L. 2014. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens* 3: 720-731.

Baroud, M., Dandache, I., Araj, G. F., Wakim, R., Kanj, S., Kanafani, Z., . . . Matar, G. M. 2013. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 41: 75-79.

Barrios, H., Garza-Ramos, U., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., Garza-Gonzalez, E., . . . Silva-Sanchez, J. 2013. Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *J Antimicrob Chemother* 68: 1934-1936.

Barrios, H., Silva-Sanchez, J., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Sanchez-Francia, D., Aguirre-Torres, J. A., . . . Garza-Ramos, U. 2014. Detection of a NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST22) clinical isolate at a pediatric hospital in Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 33: 335.

Baylis, C. L. 2006. Enterobacteriaceae. In *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Ltd.

Bosques-Padilla, F. J., Vazquez-Elizondo, G., Villasenor-Todd, A., Garza-Gonzalez, E., Gonzalez-Gonzalez, J. A., Maldonado-Garza, H. J. 2010. Hepatitis C virus infection in health-care settings: medical and ethical implications. *Ann Hepatol* 9 Suppl: 132-140.

Brenner, D. J., Krieg, N.R. and Staley, J.R. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer 2.

Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., Grimont, P. 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4: e4982.

Burmolle, M., Norman, A., Sorensen, S. J., Hansen, L. H. 2012. Sequencing of IncX-plasmids suggests ubiquity of mobile forms of a biofilm-promoting gene cassette recruited from *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* 7: e41259.

Carattoli, A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 303: 298-304.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63: 219-228.

Chen, C. J., Wu, T. L., Lu, P. L., Chen, Y. T., Fung, C. P., Chuang, Y. C., . . . Siu, L. K. 2014. Closely related NDM-1-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One* 9: e104899.

DeNap, J. C., Hergenrother, P. J. 2005. Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Org Biomol Chem* 3: 959-966.

Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014: 249856.

- Drawz, S. M., Bonomo, R. A. 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23: 160-201.
- Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M., Woodford, N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 59: 321-322.
- Fang, C. T., Chuang, Y. P., Shun, C. T., Chang, S. C., Wang, J. T. 2004. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med* 199: 697-705.
- Fuursted, K., Scholer, L., Hansen, F., Dam, K., Bojer, M. S., Hammerum, A. M., . . . Struve, C. 2012. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). *Microbes Infect* 14: 155-158.
- Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., Carattoli, A. 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 63: 274-281.
- Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Tamayo-Legorreta, E., Ibarra-Pacheco, A., . . . Silva-Sanchez, J. 2014. Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 483-485.
- Garza-Ramos, U., Moreno-Dominguez, S., Hernandez-Castro, R., Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., . . . Moncada-Barron, D. 2016. Identification and Characterization of Imipenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Susceptible *Klebsiella variicola* Isolates Obtained from the Same Patient. *Microb Drug Resist* 22: 179-184.
- Gautam, R. K. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 35: 2977-2980.
- Gold, H. S., Moellering, R. C., Jr. 1996. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 335: 1445-1453.
- Gordon, N. C., Wareham, D. W. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 35: 219-226.
- Hansen, D. S., Gottschau, A., Kolmos, H. J. 1998. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect* 38: 119-132.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R. D. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3: 243-250.
- Jamal, W. Y., Albert, M. J., Rotimi, V. O. 2016. High Prevalence of New Delhi Metallo-beta-Lactamase-1 (NDM-1) Producers among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Kuwait. *PLoS One* 11: e0152638.
- Jean, S. S., Lee, W. S., Lam, C., Hsu, C. W., Chen, R. J., Hsueh, P. R. 2015. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Future Microbiol* 10: 407-425.
- Kieser, T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12: 19-36.
- Ko, W. C., Paterson, D. L., Sagnimeni, A. J., Hansen, D. S., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., . . . Yu, V. L. 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis* 8: 160-166.

Kollef, M. H., Shorr, A., Tabak, Y. P., Gupta, V., Liu, L. Z., Johannes, R. S. 2005. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 128: 3854-3862.

Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., . . . Woodford, N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10: 597-602.

Li, T. J., Li, C. X., Cheng, S. P., Wang, X. M., Fu, S. M., Li, X. J., . . . Lu, Y. E. 2015. Separation and confirmation of nine Enterobacteriaceae strains that carry the gene. *Exp Ther Med* 9: 1241-1246.

Ling, M. L., Tee, Y. M., Tan, S. G., Amin, I. M., How, K. B., Tan, K. Y., Lee, L. C. 2015. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control* 4: 26.

Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., . . . Fridkin, S. K. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 370: 1198-1208.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281.

McManus, M. C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm* 54: 1420-1433; quiz 1444-1426.

Miller, J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor Laboratories: Cold Spring Harbor, New York.

Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Deshpande, L. M., Sader, H. S., Castanheira, M. 2009. Dissemination of a bla(VIM-2)-carrying integron among Enterobacteriaceae species in Mexico: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb Drug Resist* 15: 33-35.

Morris, D., McGarry, E., Cotter, M., Passet, V., Lynch, M., Ludden, C., . . . Cormican, M. 2012. Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4030-4031.

Nishio, H., Komatsu, M., Shibata, N., Shimakawa, K., Sueyoshi, N., Ura, T., . . . Arakawa, Y. 2004. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 42: 5256-5263.

Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9: 228-236.

Nordmann, P., Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321-331.

Normark, B. H., Normark, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252: 91-106.

Paczosa, M. K., Meccas, J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80: 629-661.

Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538-582.

Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., Bonomo, R. A. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3471-3484.

Podschun, R., Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11: 589-603.

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

Pollack, M., Charache, P., Nieman, R. E., Jett, M. P., Reimhardt, J. A., Hardy, P. H., Jr. 1972. Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet* 2: 668-671.

Potter, R. F., D'Souza, A. W., Dantas, G. 2016. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resist Updat* 29: 30-46.

Queenan, A. M., Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20: 440-458, table of contents.

Rozales, F. P., Ribeiro, V. B., Magagnin, C. M., Pagano, M., Lutz, L., Falci, D. R., . . . Zavascki, A. P. 2014. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* 25: 79-81.

Ruiz-Garbajosa, P., Hernandez-Garcia, M., Beatobe, L., Tato, M., Mendez, M. I., Grandal, M., . . . Canton, R. 2016. A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 71: 348-352.

Sader, H. S., Castanheira, M., Farrell, D. J., Flamm, R. K., Mendes, R. E., Jones, R. N. 2016. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int J Antimicrob Agents* 48: 144-150.

Schaberg, D. R., Culver, D. H., Gaynes, R. P. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 91: 72S-75S.

Shiroto, K., Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Watanabe, K., Matsushima, Y., Yamaguchi, K. 2005. Metallo-beta-lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *J Med Microbiol* 54: 1065-1070.

Shon, A. S., Bajwa, R. P., Russo, T. A. 2013. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4: 107-118.

Sidjabat, H., Nimmo, G. R., Walsh, T. R., Binotto, E., Htin, A., Hayashi, Y., . . . Paterson, D. L. 2011. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to the New Delhi Metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* 52: 481-484.

Stahlhut, S. G., Chattopadhyay, S., Kisiela, D. I., Hvidtfeldt, K., Clegg, S., Struve, C., . . . Krogfelt, K. A. 2013. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. *J Bacteriol* 195: 5602-5613.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115: 891-899.

Stoesser, N., Sheppard, A. E., Shakya, M., Sthapit, B., Thorson, S., Giess, A., . . . Crook, D. W. 2015. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother* 70: 1008-1015.

- Strateva, T., Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 58: 1133-1148.
- Swayne, R. L., Ludlam, H. A., Shet, V. G., Woodford, N., Curran, M. D. 2011. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 38: 35-38.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 34: S3-10; discussion S64-73.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Tille, P. M. (2014). *Bayle & Scott's Diagnostic Microbiology* (Thirteenth edition ed.). Misiuri, EUA: Elsevier.
- Torres-Gonzalez, P., Bobadilla-Del Valle, M., Tovar-Calderon, E., Leal-Vega, F., Hernandez-Cruz, A., Martinez-Gamboa, A., . . . Ponce-de-Leon, A. 2015. Outbreak caused by Enterobacteriaceae harboring NDM-1 metallo-beta-lactamase carried in an IncFII plasmid in a tertiary care hospital in Mexico City. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 7080-7083.
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., Varaldo, P. E. 2014. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* 3: 743-758.
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordmann, P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306-325.
- Walther-Rasmussen, J., Hoiby, N. 2006. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57: 373-383.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yao, X., Xian, H., Liu, Y., Li, H., . . . Wang, H. 2016. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35: 1679-1689.
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., . . . Sievert, D. M. 2016. 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, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37: 1288-1301.
- Wilson, J. W., Schurr, M. J., LeBlanc, C. L., Ramamurthy, R., Buchanan, K. L., Nickerson, C. A. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* 78: 216-224.
- Yang, J., Ye, L., Guo, L., Zhao, Q., Chen, R., Luo, Y., . . . Han, L. 2013. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin Microbiol Infect* 19: E509-515.
- Zhu, J., Sun, L., Ding, B., Yang, Y., Xu, X., Liu, W., . . . Hu, F. 2016. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35: 611-618.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Paola Bocanegra Ibarias

Candidata para el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en Microbiología

Tesis: **CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE HOSPITALARIO DE
ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS**

Campo de estudio: Microbiología médica y epidemiología molecular.

Datos Personales: Nacida en Villa Comaltitlán, Chiapas el 28 de Octubre de 1988.

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2011 con el grado de Químico Clínico Biólogo y en el año 2013 con el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica.

Experiencia profesional: Profesor y asistente de investigación en la Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ANEXO I

Pruebas fenotípicas para identificación a nivel de género

Tinción de Gram

Sobre un portaobjetos limpio y seco se colocó una gota de solución salina estéril, posteriormente con un asa bacteriológica se transfirió una colonia a la solución salina y se homogenizó el inóculo, se extendió y se dejó secar. La preparación se fijó por calor y después se cubrió con cristal violeta durante un minuto, se enjuagó con agua, después se aplicó lugol, se dejó por un minuto y se enjuagó con agua, se decoloró con una mezcla de alcohol-acetona 70:30 por 5 segundos, se enjuagó con agua y se agregó safranina durante 1 minuto, se enjuagó con agua, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se observó al microscopio con los objetivos de 40X y 100X.

Crecimiento en Agar MacConkey y medio TSI

Se partió de un cultivo puro de 24 horas para realizar una resiembra en Agar MacConkey resembrando en tres zonas empleando un asa de platino y además se inoculó un medio de TSI, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C y transcurrido este tiempo se observó el crecimiento y se realizó la interpretación de la siguiente manera:

- Agar MacConkey.
 - Los microorganismos fermentadores forman colonias de color rosa.
 - Los microorganismos oxidativos forman colonias incoloras o de color muy claro.
- Medio TSI.

- En los microorganismos fermentadores se observa un cambio en la coloración del medio de rojizo a amarillo en el fondo o por completo.
- En los microorganismos oxidativos se observa el medio sin cambio de color, es decir permanece de color rojizo.

Prueba de oxidasa. Método de Kovac

Se humedeció un papel filtro con 2-3 gotas de dihidroclorhidrato de tetra-metil-*p*-fenilendiamina al 1% y en este se colocó y extendió una colonia de no más de 24 horas, empleando un palillo de madera, durante los siguientes 10 segundos se observó en busca de un cambio de color. La interpretación de los resultados fue la siguiente manera:

- **Positivo:** Desarrollo de color violeta oscuro dentro de 10 segundos
- **Negativo:** Ausencia de color

Movilidad

Se partió de un cultivo puro de 24 horas para realizar una resiembra por punción profunda utilizando un asa bacteriológica en punta en el medio semisólido de SIM, se inoculó el centro del tubo y la punción abarcó aproximadamente dos tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie, el medio se incubó de 18 a 24 hr a 37°C. La interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera:

- **Positivo:** Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- **Negativo:** Crecimiento solamente en la línea de siembra.

Tabla 2. Recopilación de resultados de virulencia de factores de virulencia de los aislamiento analizados

Cepa	Susceptibilidad a carbapenémicos	Factores de virulencia											Producción de biopelícula			
		<i>fimH</i>	<i>fimA</i>	<i>rmpA</i>	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>uge</i>	<i>ureA</i>	K2				
14-3334	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3335	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3337	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3338	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3400	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Debil
14-3410	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3413	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes						
14-3421	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3423	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3424	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3425	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3445	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3446	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
14-3452	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes						
15-0078	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes						
15-0079	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No adherentes
15-0121	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes						

Tabla 2. Recopilación de resultados de virulencia de los aislamiento analizados (Continuación)

Cepa	Susceptibilidad a carbapenémicos	Factores de virulencia											Producción de biopelícula		
		<i>fimH</i>	<i>fimA</i>	<i>rmpA</i>	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>uge</i>	<i>ureA</i>	K2			
15-0212	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1325	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1326	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1337	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1339	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1352	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1354	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1355	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes
15-1358	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1359	Resistente	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes						
15-1362	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes
15-1363	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1367	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1372	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1378	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1381	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1383	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fuerte

Tabla 2. Recopilación de resultados de virulencia de los aislamientos analizados (Continuación)

Cepa	Susceptibilidad a carbapenémicos	Factores de virulencia											Producción de biopelícula		
		<i>fimH</i>	<i>fimA</i>	<i>rmpA</i>	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>uge</i>	<i>ureA</i>	K2			
15-1385	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fuerte
15-1387	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Fuerte
15-1526	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fuerte
15-1529	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Fuerte
15-1600	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Debil
15-1621	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Fuerte
15-1622	Resistente	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fuerte
15-1875	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Fuerte
15-1880	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fuerte						
15-1882	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Fuerte
15-1886	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Fuerte
15-1887	Resistente	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3332	Susceptible	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No adherentes
14-3396	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No adherentes
14-3397	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3403	Susceptible	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3411	Susceptible	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes

Tabla 2. Recopilación de resultados de virulencia de los aislamientos analizados (Continuación)

Cepa	Susceptibilidad a carbapenémicos	Factores de virulencia											Producción de biopelícula		
		<i>fimH</i>	<i>fimA</i>	<i>rmpA</i>	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>uge</i>	<i>ureA</i>	K2			
14-3415	Susceptible	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3428	Susceptible	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3448	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3453	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3459	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3476	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
14-3481	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-0122	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-0175	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-0211	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-0308	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-0313	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-0314	Susceptible	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1333	Susceptible	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	No adherentes
15-1347	Susceptible	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No adherentes
15-1379	Susceptible	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	No adherentes
15-1601	Susceptible	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	No adherentes

*Todos los aislamientos fueron negativos a la presencia de los genes *rmpA2*, *iucA* y *K1*.

ANEXO III.

Preparación de reactivos y soluciones.

Bromuro de etidio, 0.5 mg/mL (Solución stock).

Diluir 25mg de bromuro de etidio en 40mL de agua ultrapura. Aforar a 50mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio, 2 µg/mL.

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1mL de la solución stock y 249mL de agua ultrapura). Almacenarse en la oscuridad.

Buffer de fosfatos 0.01M pH 7.2

Disolver 0.4267g de K₂HPO₄, 0.3470g de KH₂PO₄ en agua destilada, ajustar pH 7.2 y aforar a 500mL.

Buffer de lavado primario (2M urea, 0.1% SDS, 50mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 0.2% reactivo de bloqueo)

Disolver 48g de urea, 0.4g SDS, 40mL de la solución 0.5M de NaH₂PO₄, 8g de NaOH en agua destilada y aforar para un volumen final de 400mL con agua destilada.

Buffer de lavado secundario Stock de 20X (Tris base 1M, 2M NaCl, pH 10.0)

Disolver 12.1g de tris base y 11.6g de NaCl en agua destilada, ajustar el pH a 10.0 y aforar con agua destilada para un volumen final de 100mL. Para la solución de trabajo mezclar 5mL del stock con 200 de MgCl₂ 1M, aforar con agua destilada para un volumen final de 100mL.

Cloruro de magnesio MgCl₂ 1M

Disolver 4.76g de cloruro de magnesio en 50mL de agua destilada.

EC

Disolver 29.2g de NaCl, 1g de deoxicolato de sodio, 2.5g de laurilsarcosina de sodio, 2.5g de brij 58, 5mL de Tris-base 1M pH 8, 100mL EDTA 0.5M pH 8 en agua destilada. Aforar a 500mL.

Esterilizar en autoclave.

EDTA 500mM.

Disolver 18.62g de EDTA en 100mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.

ES.

Disolver 93.1g de EDTA en 400mL de agua destilada, ajustar el pH a 9 con \approx 20g de NaOH, añadir 0.5g de sarcosyl. Aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

ESP.

Añadir a 1mL de ES 1mg de Proteinasa K.

Fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 0.5M, pH 7.0

Disolver 5.99g de NaH_2PO_4 en agua destilada, ajustar el pH a 7.0 y aforar con agua a un volumen final de 100mL.

NaOH 0.1M.

Disolver 0.4g de NaOH en 100mL de agua destilada.

PIV.

Disolver 29.22g de NaCl en 5mL de Tris-base 1M pH 8 en agua destilada, aforar a 500mL.

Esterilizar en autoclave.

Solución para desnaturalización (1.5M NaCl/0.5N NaOH)

Disolver 35.06g de cloruro de sodio y 8g de NaOH en agua destilada y aforar para un volumen final de 400mL con agua destilada.

Solución para neutralización (1M Tris-HCl/1.5N NaCl, pH 7.4)

Disolver 78.78g de tris-HCl y 43.83g de NaOH en agua destilada, ajustar pH 7.4 y aforar a 500mL con agua destilada.

Solución de transferencia (SSC 20X, pH 7.0)

Disolver 175.3g de NaCl y 88.2g de citrato de sodio en agua destilada, ajustar pH 7.0 y aforar para un volumen final de 800mL con agua destilada.

Solución de Kieser 1

Disolver 10.27g de sacarosa, 0.394g de tris-HCl y 0.931g de EDTA en agua destilada, ajustar pH a 8.0 y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada

Solución de Kieser 2

Disolver 1.2g de NaOH y 1g de SDS en agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada

TBE 10X.

Disolver 27g de Tris-base, 13.7g de ácido bórico, 10mL de EDTA 0.5M pH 8 en agua destilada, ajustar pH a 8 y aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

TE 1X (Tris-HCl mM pH 8, EDTA 1 mM).

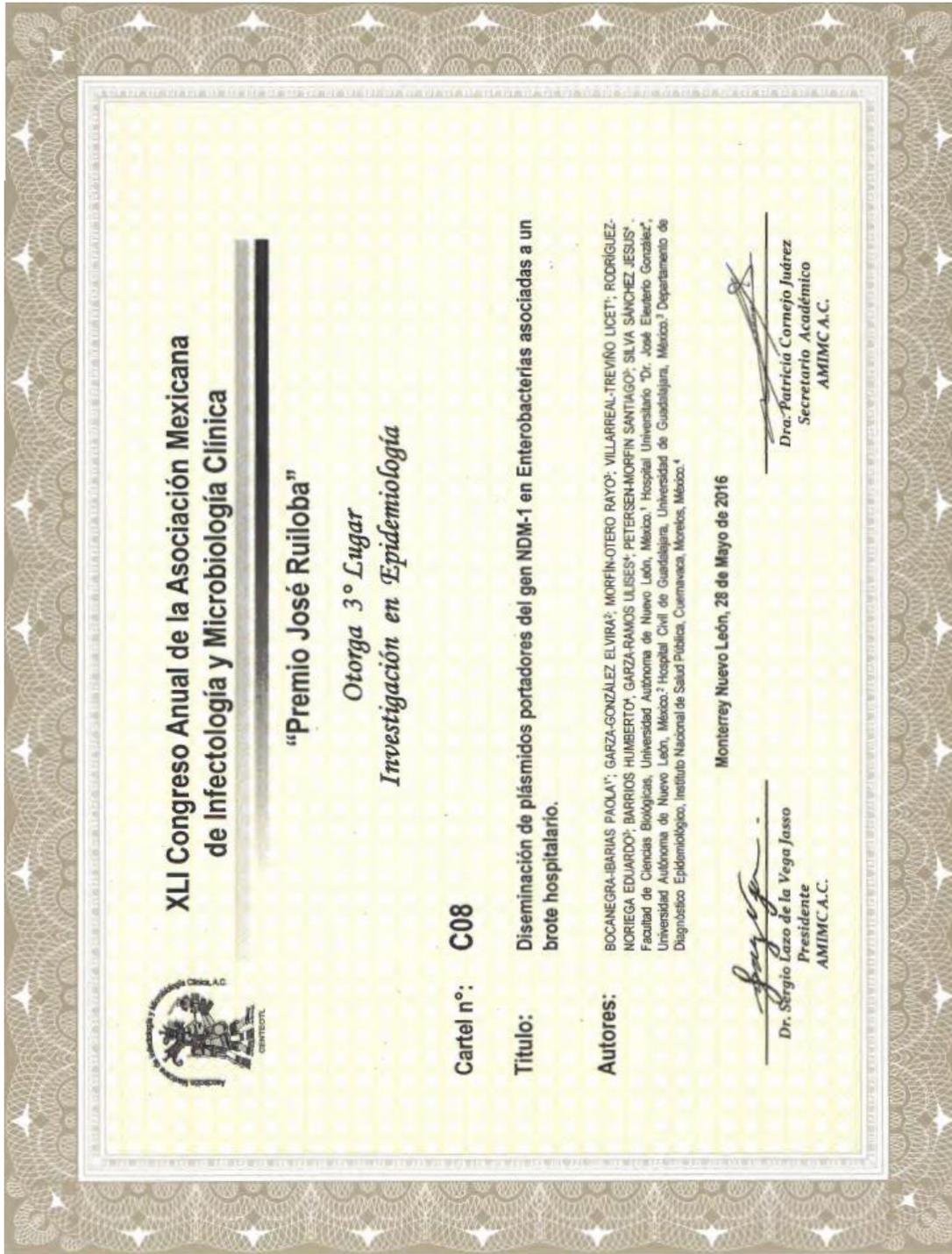
Mezclar 10mL de Tris-HCl 500mM pH 8 y 1mL de EDTA 500mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 500mL. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl 500 mM.

Disolver 30.3g de Tris base en 300mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 500mL.

ANEXO IV.

Premio José Ruiloba.



ANEXO V.

Artículos

Artículos enviados:

- **Título:** Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico.

Revista: Plos One.

Estatus: enviado desde el 13 de enero del 2017.

- **Título:** NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a burned patient: a case report

Revista: Case Reports in Infectious Diseases

Estatus: enviado desde el dos de febrero del 2017.

PLOS ONE

Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico
Short Title:	Report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico
Corresponding Author:	Jesus Silva-Sanchez, Ph.D Instituto Nacional de Salud Publica Cuernavaca, Mor MEXICO
Keywords:	Enterobacteriaceae; K. pneumoniae; E. cloacae; E. coli; P. rettgeri; carbapenemase; NDM-1; colistin-resistance; biofilm
Abstract:	<p>Objectives: To characterize the microbiological, molecular and epidemiological data of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in a tertiary-care hospital in Mexico.</p> <p>Methods: From September 2014 to July 2015, all CRE clinical isolates recovered during an outbreak in the Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde" in Jalisco, Mexico were screened for antimicrobial susceptibility, carbapenemase production, carbapenemase-encoding genes, and plasmid profiles. Horizontal transfer of imipenem resistance; and clonal diversity by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST); as well as biofilm production and the presence of 14 virulence genes were analyzed in selected isolates.</p> <p>Results: Fifty-two carbapenem-resistant isolates corresponding to 5 species were detected, i.e., <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=46), <i>Enterobacter cloacae</i> (n=3), <i>Escherichia coli</i> (n=1), <i>Providencia rettgeri</i> (n=1) and <i>Citrobacter freundii</i> (n=1) with carbapenemase encoding genes NDM-1 (92.3%), VIM (4%), IMP (2%) and KPC (2%) detected in these isolates. NDM-1 gene was detected in plasmids from 130 to 170 kb in <i>K. pneumoniae</i> (90%); <i>E. cloacae</i> (6%), <i>E. coli</i> (2%) and <i>P. rettgeri</i> (2%). The transfer of plasmids was obtained in eight transconjugants. One plasmid restriction pattern was detected, with the NDM-1 identified in different restriction fragments. Predominant clone A of <i>K. pneumoniae</i> isolates archived 28/48 (60%) isolates. <i>K. pneumoniae</i> ST307, ST309, ST392, ST846, ST2399, and ST2400 were detected; as well as <i>E. cloacae</i> ST182 and <i>E. coli</i> ST10.</p>
Order of Authors:	Paola Bocanegra-Ibarias Elvira Garza-González Rayo Morfin-Otero Humberto Barrios Licet Villarreal-Treviño Eduardo Rodríguez-Noriega Ulises Garza-Ramos Santiago Petersen-Morfin Jesus Silva-Sanchez, Ph.D
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	JSS: grants 136339 and 130224 from Mexican Council for Science and Technology (http://conacyt.gob.mx/)

Please describe all sources of funding that have supported your work. **This information is required for submission and will be published with your article, should it be accepted.** A complete funding statement should do the following:

Include **grant numbers and the URLs** of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.

Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If the funders had **no role** in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "*The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.*"

However, if the study was **unfunded**, please provide a statement that clearly indicates this, for example: "*The author(s) received no specific funding for this work.*"

* typeset

Competing Interests

You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.

Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the [PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests](#))?

If yes, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: *I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:*

If no authors have any competing interests to declare, please enter this

The authors have declared that no competing interests exist.

<p>statement in the box: "The authors have declared that no competing interests exist."</p> <p>* typeset</p>	
<p>Ethics Statement</p> <p>You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should also be included in the Methods section of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.</p> <p>Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)</p> <p>All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.</p> <p>Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.</p> <p>Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)</p> <p>All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research." The relevant guidelines</p>	<p>The local ethics committee (Comité de Ética en Investigación del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde," Jalisco, Mexico) approved this study with reference number 003/16. Informed consent was waived by the Ethics Committee because no intervention was involved and no patients identifying information was included</p>

<p>followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.</p> <p>If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.</p> <p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p>Field Permit</p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	
<p>Data Availability</p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the PLOS Data Policy and FAQ for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>
<p>Please describe where your data may be found, writing in full sentences. Your answers should be entered into the box below and will be published in the form</p>	<p>All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.</p>

you provide them, if your manuscript is accepted. If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of **XXX** with the appropriate details.

If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, "All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."

If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All **XXX** files are available from the **XXX** database (accession number(s) **XXX**, **XXX**)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below.

If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:

"Data are available from the **XXX** Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."

"Data are from the **XXX** study whose authors may be contacted at **XXX**."

* typeset

Additional data availability information:

Tick here if the URLs/accession numbers/DOIs will be available only after acceptance of the manuscript for publication so that we can ensure their inclusion before publication.

Mark Patrick Nicol
Editor of
PLOS ONE

Dear Editor:

In this submission, please find the manuscript entitled “Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1 carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico” that we are submitting to the *PLOS ONE* journal for consideration as a Research article.

The aim of this study was to characterize the microbiological, molecular and epidemiological data of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in a tertiary-care hospital in Mexico. The main findings are that the NDM-1 gene was disseminated horizontally among different species in a tertiary care Hospital in Mexico, also with proof of strain spread. We have provided evidence of plasmid transfer but, given the variation in plasmid sizes, a complex rearrangements must also be occurring. Besides the biofilm production is higher in the carbapenem-resistant isolates than in the carbapenem-susceptible isolates.

All authors have participated in either the study design, data analysis, and/or manuscript redaction; have read, approved the final manuscript, and agree with its submission.

We recommend some reviewers

1. Karen Bush, Indiana University, USA (karbush@indiana.edu).
2. Jordi Vila, University of Barcelona, Spain (jvila@ub.edu).
3. Laurent Poirel, University of Fribourg, Switzerland (laurent.poirel@unifr.ch).

We think that Mohamed N. Seleem or Vladimir Pinheiro do Nascimento may be an excellent Editor. Thank you in advance for considering this manuscript.

Sincerely,
Jesus Silva-Sanchez

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública
E-mail: jsilva@insp.mx

1 **Molecular and microbiological report of a hospital outbreak**
2 **of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico**

3
4 Paola Bocanegra-Ibarias^{1¶}, Elvira Garza-González^{2¶}, Rayo Morfín-Otero^{3¶}, Humberto Barrios⁴,
5 Licet Villarreal-Treviño^{1¶}, Eduardo Rodríguez-Noriega^{3¶}, Ulises Garza-Ramos^{4¶}, Santiago
6 Petersen-Morfín^{3¶}, Jesus Silva-Sanchez^{4*}

7
8 ¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los
9 Garza, Nuevo León, Mexico.

10 ² Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad
11 Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.

12 ³ Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Centro Universitario de Ciencias de la Salud,
13 Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde, Universidad de Guadalajara, Guadalajara,
14 Jalisco, Mexico.

15 ⁴ Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública,
16 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

17

18

19 ***Corresponding author:**

20 E-mail address: jsilva@insp.mx (JSS)

21

22 **Abstract**

23 **Objectives:** To characterize the microbiological, molecular and epidemiological data of an
24 outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in a tertiary-care hospital in
25 Mexico.

26 **Methods:** From September 2014 to July 2015, all CRE clinical isolates recovered during an
27 outbreak in the Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde" in Jalisco, Mexico were screened for
28 antimicrobial susceptibility, carbapenemase production, carbapenemase-encoding genes, and
29 plasmid profiles. Horizontal transfer of imipenem resistance; and clonal diversity by pulsed-field
30 gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST); as well as biofilm
31 production and the presence of 14 virulence genes were analyzed in selected isolates.

32 **Results:** Fifty-two carbapenem-resistant isolates corresponding to 5 species were detected, i.e.,
33 *Klebsiella pneumoniae* (n=46), *Enterobacter cloacae* (n=3), *Escherichia coli* (n=1), *Providencia*
34 *rettgeri* (n=1) and *Citrobacter freundii* (n=1) with carbapenemase encoding genes NDM-1
35 (92.3%), VIM (4%), IMP (2%) and KPC (2%) detected in these isolates.

36 NDM-1 gene was detected in plasmids from 130 to 170 kb in *K. pneumoniae* (90%); *E. cloacae*
37 (6%), *E. coli* (2%) and *P. rettgeri* (2%). The transfer of plasmids was obtained in eight
38 transconjugants. One plasmid restriction pattern was detected, with the NDM-1 identified in
39 different restriction fragments.

40 Predominant clone A of *K. pneumoniae* isolates archived 28/48 (60%) isolates. *K. pneumoniae*
41 ST307, ST309, ST392, ST846, ST2399, and ST2400 were detected; as well as *E. cloacae* ST182
42 and *E. coli* ST10.

43 The *fimA* and *uge* genes were more likely to be identified in *K. pneumoniae* carbapenem-
44 susceptible isolates ($p = <0.001$) and biofilm production was more liable to be observed in
45 carbapenem-resistant isolates. ($p = <0.05$).

46 **Conclusions:** Four *Enterobacteriaceae* species harboring the NDM-1 gene were detected in a
47 nosocomial outbreak in Mexico; horizontal transfer and strain transmission were demonstrated
48 for the NDM-1 gene. Given the variation in the size of the plasmid harboring NDM-1, complex
49 rearrangements must also be occurring.

50

51 **Keywords**

52 *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. rettgeri*, carbapenemase, NDM-1,
53 colistin-resistance, biofilm.

54

55 **Introduction**

56 Nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) are of
57 particular concern since they can spread rapidly worldwide, and few treatment options remain
58 available for these diseases [1]. Several carbapenem resistance mechanisms have been described
59 in bacteria, and one of the most important in Gram-negative species is the production of
60 carbapenemase enzymes [1,2], which are broad-spectrum beta-lactamases with activity against
61 carbapenems [3]. A high diversity of carbapenemases has been reported in *Enterobacteriaceae*,
62 including the Ambler class A KPC, class B metallo- β -lactamases, VIM, IMP, and NDM, and
63 class D carbapenemase OXA-48 type [4].

64 The NDM-1 gene is located most frequently on large conjugative plasmids of several
65 incompatibility groups. These plasmids also harbor genes conferring resistance to almost all
66 antibiotics that are used to treat enterobacterial infections [2,4]. Plasmids encoding NDM-1 were
67 initially observed in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, [4] but it has been
68 demonstrated that these plasmids can be conjugatively transferred into other species, which
69 facilitates the spread of the NDM-1 gene. Carbapenem resistance associated with the NDM-1
70 gene has been described in *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*,
71 *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., and *Providencia* spp. [4,5] with a nearly worldwide
72 dissemination [3,5].

73 In Mexico, the first report of NDM-1 was identified in *Providencia rettgeri* [6], and it was
74 subsequently identified in a *K. pneumoniae* pediatric isolate [7]. Furthermore, horizontal transfer
75 and clonal dissemination have been reported in this country, in an outbreak caused by an
76 enterobacterial strain carrying the NDM-1 gene [8].

77 The analysis of an extensive collection of NDM-1-producing enterobacterial isolates showed that
78 the spread of the NDM-1 gene is not related to specific clones, specific plasmids, or a single
79 genetic structure [4]. The rapid and successful spread of carbapenem-resistant NDM-1-positive
80 organisms may be associated with other antibiotic resistance mechanisms; however, the
81 coexistence of multidrug resistance and virulence mechanisms has also been proposed [9].

82 Several virulence factors have been described in *K. pneumoniae*, including adhesins, capsular
83 serotype, iron-scavenging systems, lipopolysaccharide, and biofilm production. Biofilms have
84 been associated with the increase of bacterial resistance to host defense mechanisms, antibiotics,
85 and the persistence on abiotic surfaces [10]. The aim of this study was to characterize the

86 epidemiological, microbiological and molecular data of an outbreak of CRE in a tertiary-care
87 hospital in Mexico.

88

89 **Materials and methods**

90 **Hospital setting and recognition of outbreak**

91 This study was performed in the Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” in
92 Jalisco, Mexico. This hospital is an 899-bed tertiary-care teaching hospital located in
93 Guadalajara, the second largest city in Mexico. This hospital provides care to adult and pediatric
94 patients in 31 wards situated among three connected buildings.

95 In September 2014, carbapenem resistance was detected in five *Enterobacteriaceae* clinical
96 isolates. The infection control department was alerted, and from there, all *Enterobacteriaceae*
97 isolates between September 2014 and July 2015 were collected for analysis.

98

99 **Ethics Statement**

100 The local ethics committee (Comité de Ética en Investigación del Antiguo Hospital Civil de
101 Guadalajara “Fray Antonio Alcalde,” Jalisco, Mexico) approved this study with reference
102 number 003/16. Informed consent was waived by the Ethics Committee because no intervention
103 was involved and no patients identifying information was included

104

105 **Clinical isolates and Patients**

106 *Enterobacteriaceae* species were identified using the VITEK automated system (bioMérieux,

107 Marcy-l'Étoile, France) and identification for *K. pneumoniae* was confirmed by PCR [11].
108 Drug susceptibility was performed using the VITEK automated system and confirmed by the
109 broth microdilution method in isolates that presented resistance to at least one carbapenem
110 (ertapenem, imipenem, meropenem) [12]. Guidelines of the European Committee on
111 Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) version 6.0 were used for colistin and
112 tigecycline [13]. Multidrug-Resistance (MDR) was defined as non-susceptibility to one or more
113 agents of at least three different antibiotic classes [14].
114 Carbapenem-resistant isolates were screened to detect carbapenemase production using the
115 CarbaNP test [12], and to detect the carbapenemase-encoding genes for MBL (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*,
116 and *bla_{NDM}*) and OXA-48 by PCR [15-17].
117 We recovered demographic and clinical data from patients infected with a carbapenem resistant-
118 carbapenemase producer isolates. From each enterobacterial species, one isolate per patient was
119 analyzed.

120

121 **Plasmid analysis**

122 Plasmid profiles were obtained from all carbapenem-resistant isolates according to the method
123 described by Kieser [18]. Horizontal transfer of carbapenem resistance by bacterial conjugation
124 with *E. coli* J53-2 as the receptor strain was performed as described [19] in isolates that
125 presented a different plasmid profile; transconjugants were selected on Luria agar supplemented
126 with rifampin (100 µg/ml) plus imipenem (2 µg/ml) and enzymatic digestion with *HinIII*
127 (Invitrogen, California, USA) was performed in isolates with only one plasmid present. The
128 incompatibility groups were detected by PCR in these isolates [20].

129 Additionally, Southern hybridization with a non-radioactive probe of the NDM-1 gene was
130 performed in NDM-1 positive isolates.

131

132 **Clonal diversity studies**

133 Clonal diversity was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multi-Locus
134 Sequence Typing (MLST) analysis in selected isolates. For PFGE, chromosomal DNA was
135 prepared using the methodology described by Kaufmann [21] with some modifications.
136 Chromosomal DNA from the isolates was digested with 10 U of *XbaI* (Takara Bio Inc., Shiga,
137 Japan) with following conditions: temperature of 14°C, the voltage of 6 V/cm, run time of 23 h,
138 and switch time of 1–30 s. PFGE patterns were analyzed visually and interpreted according to
139 the criteria suggested by Tenover *et al.* [22].

140 MLST was performed on selected isolates according to species, PFGE pattern and plasmid
141 analysis using the MLST websites: <http://bigsd.b.pasteur.fr>, <http://mlst.warwick.ac.uk>, and
142 <http://pubmlst.org> [23-25].

143

144 **Virulence factors**

145 Virulence genes from *K. pneumoniae* [serotypes K1 and K2, *rmpA*, *rmpA2* (regulator of mucoid
146 phenotype), *uge* (uridine diphosphate galacturonate-4 epimerase), *ureA* (urease), *entB*
147 (enterobactin), *iroB* (salmochelin), *irp2* (yersiniabactin), *iucA* (aerobactin), *fimA* (fimbrial), *fimH*
148 (fimbrial), *mrkA* (fimbrial), and *mrkD* (fimbrial)] were screened by PCR [26] in both
149 carbapenem-resistant (NDM-1 positive) and randomly selected carbapenem-susceptible isolates.
150 Furthermore, semi-quantitative determination of biofilm formation was performed in these

151 isolates (both carbapenem-resistant and carbapenem susceptible) by crystal violet staining as
152 previously described by Bandeira *et al.*, with modifications described by Burmølle *et al.* [10,27].
153 The biofilm index (OD₅₉₅/OD₆₀₀) was used to normalize the amount of biofilm formed to the
154 total cell content of each sample tested. The biofilm production was classified using the biofilm
155 index as non-adherent (<0.90), weakly adherent (>0.90 - <1.20) and strongly adherent (>1.20)
156 The cut-off values were defined according to a comparison in the classification with others
157 methodologies previously reported [28]. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (a high biofilm
158 producer) and *E. coli* ATCC 25922 (a low biofilm producer) were used as quality control
159 organisms.

160

161 **Statistical analysis**

162 The similarity coefficients were generated from a similarity matrix calculated using the Jaccard's
163 coefficient.

164 Percentages of biofilm production and from each virulence factor were compared using Mann-
165 Whitney test. A P value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis
166 was performed in the SPSS Statistics 22 software (IBM Corporation, Somers, NY, USA).

167

168 **Results**

169 **Species and carbapenem resistance**

170 During the eleven months of study, 3044 isolates of *Enterobacteriaceae* were recovered;
171 86/3044 (2.83%) of them were carbapenem-resistant and carbapenemase-producers. From each
172 enterobacterial species, one isolate per patient was selected for the study (52 isolates).

173 Five species were found to produce a carbapenemase: *K. pneumoniae* 46, (88%), *E. cloacae* 3,
174 (6%), *E. coli*, *P. rettgeri* and *Citrobacter freundii* (1, 2% each).

175 The NDM-1 gene was detected in 48/52 (92.3%) isolates belonging to *K. pneumoniae* (43, 90%),
176 *E. cloacae* (3, 6%), *E. coli* and *P. rettgeri* (1, 2% each).

177 The VIM gene was detected in 3/52 (5.6%) isolates belonging to *K. pneumoniae* (n=2) and *C.*
178 *freundii* (n=1). KPC and IMP genes were detected in one isolate of *K. pneumoniae* and *P.*
179 *rettgeri*, respectively.

180 The *P. rettgeri* isolate harbored two carbapenemase genes (NDM-1 and IMP). The OXA-48 gene
181 was not detected in any of the isolates.

182 The first carbapenem-resistance isolate was an NDM-1-producing *K. pneumoniae* (Fig 1).
183 Isolates harboring the NDM-1 gene were detected throughout the study.

184

185 **Figure 1. Temporal distribution of recovered carbapenem-resistant Enterobacteriaceae**
186 **isolates.**

187 Grey squares represent NDM-1; black squares represent VIM; white squares represent KPC;
188 grey and lined squares represent the NDM-1/IMP. K represents *K. pneumoniae*; E represents *E.*
189 *cloacae*; Ec represents *E. coli*; C represents *C. freundii*; and P represents *P. rettgeri*

190

191 **Demographic and clinical data**

192 The 52 isolates were recovered from 51 patients, with one of them was co-infected with two
193 NDM-1 species (*E. cloacae* and *E. coli*). The mean age was 44 (0-79) years; 70% were male, and
194 the mean length of stay (LOS) before positive culture was 28 (range 6-76) days. Clinical

195 characteristics and outcome of 40/51 patients are shown in Table 1. The most frequent cause of
 196 hospitalization was brain injury (20% of patients), followed by lower respiratory tract infection
 197 (15%), chronic renal failure, and burn injuries (7.5% each).

198

199 **Table 1.** Clinical characteristics and outcome of patients (n=40)

200

Characteristic	No. (% of patients or range)
Specimens	
Urine	10 (25)
Respiratory sources	9 (22.5)
Blood	8 (20)
Secretions	8 (20)
Vascular catheter	3 (7.5)
Peritoneal fluid	2 (5)
Hospital wards	
Internal medicine	23 (57.5)
Neurosurgery	6 (15)
ICU	5 (12.5)
Surgery	4 (10)
Pediatric	2 (5)
Comorbidities	
Hypertension	16 (40)
Acute kidney injury	11 (27.5)
Diabetes mellitus	10 (25)
Risk factors	
Urinary catheterization	34 (85)
Mechanical ventilation	29 (72.5)
Central venous catheter	27 (67.5)
Previous surgery	25 (62.5)
ICU stay	23 (57.5)
Mean LOS before positive culture (range)	28 (6-76)
Corticosteroids use	9 (22.5)
Mortality rate	37.5%
Mortality rate attributable to infection	35%
Number of antibiotics used before isolation	
0–4	16 (40)
5 or more	24 (60)

Class of antibiotic used before isolation	
Carbapenems	29 (72.5)
Cephalosporins	28 (70)
Tigecycline	20 (50)
Linezolid	20 (50)
Rifampicin	14 (35)
Colistin	13 (32.5)
Piperacillin/tazobactam	12 (30)

201
202
203
204
205

ICU = intensive care unit; LOS = length of stay.

Antimicrobial susceptibility patterns

206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218

Regarding all the 52 CRE, a high resistance to ampicillin (100%), ceftriaxone (100%), trimethoprim/sulfamethoxazole (98%), ertapenem (96%), fosfomycin (92%), meropenem (90%), imipenem (88%), ciprofloxacin (87%), gentamicin (83%), amikacin (79%), and aztreonam (73%) was detected. Lower resistance to chloramphenicol (52%), tigecycline (19%), and colistin (4%) was observed. From the CRE isolates, 51/52 (98%) were classified as MDR and the single non-MDR isolate corresponded to *C. freundii* positive for VIM carbapenemase.

Considering the *E. cloacae* isolates, all were resistant to all antibiotics tested except for tigecycline (one strain resistant).

Regarding only the NDM-1-producing *K. pneumoniae*, a high drug resistance was detected. The minimum inhibitory concentration (MIC) range, MIC₉₀, and MIC₅₀, as well as the percentage of resistant and susceptible isolates to each of the antimicrobial agents tested, are indicated in Table 2.

Table 2. Antimicrobial susceptibility of NDM-1 producing *K. pneumoniae* isolates (n=43)

Antibiotic	MIC (mg/L)	Isolates n (%)
------------	------------	----------------

	Range	50%	90%	Susceptible	Resistant
Amikacin	≤4 - ≥ 128	≥ 128	≥ 128	6 (14)	37 (86)
Gentamicin	≤1- ≥ 32	≥ 32	≥ 32	5 (11.6)	38 (88.4)
Ertapenem	4 - ≥ 128	16	32	0 (0)	43 (100)
Imipenem	2 - ≥256	8	16	0 (0)	38 (88.4)
Meropenem	2 - 256	8	16	1 (2.3)	40 (93)
Ceftriaxone	≥ 64	≥ 64	≥ 64	0 (0)	43 (100)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	8/152 – 16/304	16/304	16/304	0 (0)	43 (100)
Aztreonam	≤2- ≥128	16	32	7 (16.3)	32 (74.4)
Ampicillin	64- ≥128	≥ 128	≥ 128	0 (0)	43 (100)
Ciprofloxacin	≤0.5 – ≥16	≥ 16	≥ 16	3 (7)	38 (88.4)
Fosfomycin	256 - ≥512	512	≥ 512	0 (0)	43 (100)
Chloramphenicol	≤4- ≥128	16	128	6 (14)	20 (46.5)
Colistin	≤0.5- ≥16	≤0.5	2	41 (95.3)	2 (4.7)
Tigecycline	≤0.5- 8	2	4	7 (16.3)	9 (21)

220 Classification of isolates as resistant, intermediate, or susceptible based on CLSI and EUCAST
221 interpretive criteria.

222

223 **Plasmid pattern, hybridization and transfer of carbapenem**
224 **resistance**

225 The plasmid profiles of all the 52 CRE clinical isolates harbored between one and five plasmids
226 with sizes of 40-170 kb. The plasmid profile of NDM-harboring *Enterobacteriaceae* isolates
227 (n=48) was heterogeneous with 15 different sizes of plasmids. Characteristics of 15
228 representative isolates of *Enterobacteriaceae* harboring NDM-1 are shown in Table 3. Ten

229 isolates (*K. pneumoniae*, n=8; and *E. cloacae*, n=2) were successful in transfer the resistance
 230 with eight transconjugants receiving only one plasmid, (from 130 to 150 kb) and contained the
 231 NDM-1 gene. Enzymatic digestion revealed one unique restriction pattern, with the NDM-1 gene
 232 present on a >1.5 Kb fragment in seven transconjugants and a smaller 1.0 Kb fragment in one
 233 transconjugant (Fig 2). The IncFIIk and IncFIIy incompatibility groups were identified in the
 234 eight transconjugants and the *E. coli* isolate that presented a single plasmid, in 88.9% (8/9) and
 235 22.2% (2/9) of the plasmids, respectively.

236 The Southern hybridization experiments showed the presence of NDM-1 gene in four different
 237 plasmids, with sizes from 130 kb to 150 kb. One NDM-1 gene copy was identified in two
 238 different plasmids (130 kb and 150 kb) harbored in *K. pneumoniae* (14-3423) isolate.
 239 Conjugation was unsuccessful for the *E. coli*, and *P. rettgeri* clinical isolates. The Southern
 240 hybridization experiment was unsuccessful for the *P. rettgeri* isolate.

241

242 **Table 3.** Characteristics of representative isolates of *Enterobacteriaceae* harboring NDM-1

243

Clinical isolate data															
Strain ID	14-3335	14-3337	14-3338	14-3423	14-3424	14-3425	14-3442	15-0026*	15-1880	15-1327*	15-1363	15-1362	15-1372	15-1887	15-1941
Species	<i>K. pn</i>	<i>E. cl</i>	<i>E. cl</i>	<i>K. pn</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pn</i>	<i>K. pn</i>	<i>K. pn</i>	<i>K. pn</i>	<i>P. re</i>					
Collection date	09-06-16	09-16-14	09-16-14	11-06-14	11-07-14	11-09-14	11-13-14	12-29-14	02-18-15	02-26-15	04-13-15	04-19-15	05-15-15	07-20-15	07-21-15
Ward	NF	N-ICU	N-ICU	IM	NS	NS	NF	PS	IF	PS	IM	UR	GE	CA	IM
Specimen	U	C	W	C	W	BAL	PF	U	BAL	C	B	W	U	U	U
Susceptibility. MIC mg/L (Interpretation)															
GEN	>32 (R)	<1 (S)	16 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	: >32 (R)	<1 (S)	>32 (R)	>32 (R)	<1 (S)
AMK	>128 (R)	<4 (S)	16 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	128 (R)	8 (S)	>128 (R)	16 (S)	>128 (R)	>128 (R)	16 (S)
CRO	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)									
ETP	>128 (R)	4 (R)	8 (R)	16 (R)	32 (R)	16 (R)	32 (R)	128 (R)	32 (R)	8 (R)	32 (R)	32 (R)	16 (R)	16 (R)	4 (R)
IMP	256 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	8 (R)	32 (R)	256 (R)	4 (R)	8 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)	4 (R)
MEM	256 (R)	2 (S)	4 (R)	8 (R)	16 (R)	8 (R)	16 (R)	16 (R)	128 (R)	4 (R)	16 (R)	8 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)
CIP	>16 (R)	<0.5 (S)	2 (I)	>16 (R)	2 (I)	>16 (R)	8 (R)	>16 (R)	>16 (R)						
SXT	16/304 (R)	16/304 (R)	16/304 (R)	16/304 (R)	16/304 (R)	16/304 (R)									

ATM	>16 (R)	<2 (S)	8 (I)	16 (R)	8 (I)	16 (R)	<2 (S)	16 (R)	16 (R)	<2 (S)					
FOF	>512 (R)	512 (R)	256 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)	>512 (R)	>512 (R)	32 (I)	>512 (R)	256 (R)	512 (R)	>512 (R)	128 (I)
AMP	>128 (R)	64 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)
CHL	>128 (R)	<4 (S)	16 (I)	32 (R)	16 (I)	16 (I)	>128 (R)	>128 (R)	32 (R)	>128 (R)	128 (R)	64 (R)	32 (R)	32 (R)	128 (R)
TGC	2 (I): (S)	<0.5 (S)	1 (S)	2 (I)	2 (I)	2 (I)	1 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	2 (I)	2 (I)	2 (I)	8 (R)	1 (S)
CST	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	2 (S)	<0.5 (S)	<0.5 (S)	>16 (N/A)

Molecular characterization

Clone	A (n=28)	D (n=1)	E (n=1)	A1 (n=2)	A2 (n=1)	A (n=28)	A1 (n=1)	A (n=2)	A5 (n=1)	N/A	A3 (n=2)	G (n=1)	A4 (n=1)	A6 (n=1)	N/A
Plasmid profile (No of isolates)	140, 160, 165 (21)	140, 145, 155 (1)	140, 145, 155 (1)	138, 140, 163, 166 (1)	140, 162, 166 (3)	140, 164, 166 (7)	135, 142, 144 (1)	132, 142, 144 (2)	140, 162, 166 (1)	140 (1)	70, 78, 140, 142, 166 (2)	162, 164 (4)	140, 163, 166 (1)	140, 163, 166 (1)	128, 165 (1)
Plasmid carrying NDM-1 (kb)	130	130	130	130, 150	130	130	150	150	130	130	130	170	130	130	-
Conjugation	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No

244 (*): same patient; K. pn: *K. pneumoniae*; E. cl: *E. cloacae*; NF: nephrology; N-ICU: neonatal
245 ICU; IM: internal medicine; NS: neurosurgery; PS: pediatric surgery; IF: infectiology; UR:
246 urology; GE: geriatrics; CA: cardiology; U: urine; C: catheter; W: wound; BAL: bronchoalveolar
247 lavage; PF: peritoneal fluid; B: blood;
248 R: resistant; I: intermediate; S: susceptible; N/A: Not applicable; GEN: gentamicin; AMK:
249 amikacin; CRO: ceftriaxone; ETP: ertapenem; IMP: imipenem; MEM: meropenem; CIP:
250 ciprofloxacin; SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole; ATM: aztreonam; FOF: fosfomicin; AMP:
251 ampicillin; CHL: chloramphenicol; TGC: tigecycline; CST: colistin.

252

253

254 **Figure 2. Restriction pattern and Southern hybridization of selected plasmids.** (A):
255 Restriction pattern; (B): Southern hybridization; M: Molecular weight marker of 1.5 kb; 1: 15-
256 1327; 2: TT 14-3442 *E. cloacae*; 3: TT 15-0026; 4: TT 14-3335; 5: TT 14-3337; 6: TT 14-3424;
257 7: TT 14-3425; 8: TT 15-1363; 9: TT 15-1372. E.cl represents *E. cloacae*; E.c represents *E. coli*;
258 and K.p. represents *K. pneumoniae*

259

260

261 **Clonal diversity**

262 *K. pneumoniae* (n=46) and *E. cloacae* (n=3) isolates were subjected to PFGE assays. Regarding
263 *K. pneumoniae*, 14 distinct patterns were detected. The percentage of similarity ranged from 75%
264 to 100%, with restriction patterns of 15–20 bands and the 60.9% (28/46) of the isolates
265 corresponding to clone A [detected during the 11 months of surveillance and with 6 subtypes
266 (9/46, 19.5%)]; 4.3% (2/46) to clones B and C; and 2.2% (1/46) to clones D to H.

267 Clone A harbored NDM-1, Clone B, and E strains harbored VIM and KPC genes, respectively.

268 Regarding *E. cloacae* isolates, they were classified as closely related with only two different
269 bands in the restriction pattern and are considered as subtypes. (Clone A and A1).

270

271 Regarding MLST assays, selected isolates were *K. pneumoniae* (n=6), *E. coli* and *E. cloacae*
272 (n=1 each). Regarding *K. pneumoniae*, four ST previously reported were detected (ST392, strain
273 14-3335; ST309, strain 14-3337; ST846, strain14-3338; and ST307, strain 14-3423).
274 Furthermore, two new ST were identified (ST2400, strain 15-1362; and ST2399 strain 15-1600).

275 *E. coli* (15-1327) isolate corresponded to ST10, and *E. cloacae* (14-3442) isolate corresponded to
276 ST182.

277

278 **Virulence factors**

279 Virulence factors analyzed in both carbapenem-resistant and carbapenem susceptible isolates
 280 showed that the presence of *fimA* and *uge* genes was more likely to be detected in carbapenem-
 281 susceptible isolates (P = <0.001) (Table 4).

282 Regarding biofilm production, the 81.8% (54/66) of the isolates were classified as non-adherent,
 283 1.5% (1/66) as weakly adherent, and 16.7% (11/66) as strongly adherent. All strongly and
 284 weakly adherent isolates were carbapenem-resistant (Table 4). Biofilm production (strong plus
 285 weak) was found to be associated with carbapenem resistance (P = <0.05).

286

287 **Table 4.** Distribution of virulence factors in NDM-1 producing *K. pneumoniae* isolates and
 288 carbapenem susceptible isolates

289

Group	Virulence genes										Biofilm production		
	<i>entB</i>	<i>iroB</i> , K2	<i>irp2</i>	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>uge</i>	<i>ureA</i>	<i>rmpA</i>	non-adherent	weakly adherent	strongly adherent
CR	97.7% (42/43)	0% (0/43)	60.5% (26/43)	18.6% (8/43)	100% (43/43)	74.4% (32/43)	0% (0/43)	27.9% (12/43)	76.7% (33/43)	0% (0/43)	69.8% (30/43)	4.6% (2/43)	25.6% (11/43)
CS	100% (23/23)	13% (3/23)	47.8% (11/23)	65.2% (15/23)	95.7% (22/23)	100% (23/23)	4.3% (1/23)	82.6% (19/23)	100% (23/23)	8.7% (2/23)	100% (23/23)	0% (0/23)	0% (0/23)
P-value	NS	NS	0.467	<0.001	NS	NS	NS	<0.001	NS	NS	NS	NS	NS

290

291 CR: Carbapenem-resistant isolates; CS: Carbapenem-susceptible isolates. NS: Not significant.
292 *iucA*, *K1*, and *rmpA2* genes were not detected.

293

294 **Discussion**

295 Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* is linked to nosocomial outbreaks worldwide and
296 represents an important epidemiological concern because of the high frequency of intrahospital
297 dissemination. In recent years, the reports of outbreaks related to carbapenemase production,
298 specifically to NDM-1, has been increased in several countries, including Mexico. In this study,
299 we characterized the epidemiological, microbiological, and molecular data of an outbreak of
300 CRE in a tertiary-care hospital in western Mexico and detected that the most commonly gene
301 identified was NDM-1. The presence of only one carbapenemase type (NDM-1) involving *K.*
302 *pneumoniae*, *E. cloacae*, and *E. coli* in four epidemiologically related patients has been reported
303 in Mexico [8], but not comprising the high number of species and isolates reported in this study.

304

305 In addition to being detected in *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, and *E. coli*, the NDM-1 gene has
306 been reported in *P. rettgeri* isolates [6]. In this species, resistance to carbapenems is rarely
307 described, and when is reported, it is mainly associated with NDM-1 [6,29]. In this study, the *P.*
308 *rettgeri* isolate presented both NDM-1 and the IMP gene. The presence of IMP in *P. rettgeri* has
309 been reported only in Japan [30,31], and to the best of our knowledge, the presence of NDM-1
310 and IMP in the same isolate has not been reported to date. Unfortunately, the *P. rettgeri* isolate
311 lost the plasmid carrying NDM-1 during experiments, and we were unable to characterize it. Due
312 to the presence of the IMP gene, the isolate remained carbapenem-resistant.

313

314 Of the several carbapenemases previously described worldwide, the KPC has been reported as
315 the predominant carbapenemase gene associated with CRE intrahospital infections [3]. Likewise,
316 strains with KPC-2 and KPC-3, as well as VIM-2, are causing outbreaks in Mexico [32-34].
317 Nevertheless, in the recent years, NDM-1 gene has frequently been associated with outbreaks,
318 particularly with strains of *K. pneumoniae* and *E. coli* [4].

319

320 We detected more than one CRE species and multiple carbapenemases genes in the same
321 hospital in the same period. This diversity has been previously reported, but in countries
322 geographically distant from Mexico (China and Kuwait) [35,36] and no known relationship with
323 these reports could be documented. Because of this, our report underscores the importance of
324 active surveillance not only of carbapenem resistance but also the production of carbapenemase
325 and related carbapenemase genes in all Enterobacterial species.

326

327 The transfer of plasmids of 130-150 kb carrying NDM-1 was demonstrated for *K. pneumoniae*,
328 and *E. cloacae* and these experiments partially explain, the high dissemination inter and intra-
329 species observed during the outbreak. In contrast, conjugation experiments were unsuccessful for
330 the *E. coli* and *P. rettgeri* clinical isolates. The inability of conjugation could explain the lack of
331 dissemination of these species/plasmids during the outbreak.

332

333 Similar restriction patterns were detected in eight plasmids of similar size (130-150 kb) with the
334 NDM-1 gene present on the same restriction fragment in 7/8 plasmids. These results and the
335 different size of plasmids, strongly suggest rearrangements of plasmids during the short period of

336 this outbreak. Rearrangements of plasmids have been previously reported for plasmids
337 harboring VIM gene [37], but to our knowledge, rearrangements in plasmids encoding NDM-1
338 described .

339
340 One of the most significant findings of this study was the high attributable mortality detected for
341 any CRE (35%, 14/40), even that this percentage was lower than previous reports (57.4%, 54/94)
342 [35]. Furthermore, a high attributable mortality related to CRE NDM-1 producers was observed,
343 regarding that lower values have been reported (28.6%, 6/21) [36].

344
345 In this study, we corroborated that the use of artificial devices, admission to ICU, previous
346 antimicrobial therapy, especially with carbapenems and cephalosporins, are the principal risk
347 factors for infection with CRE. [35,38] In contrast, other previously described risk factors for
348 infection with CRE were not confirmed, such as the previous use of fluoroquinolones [38].

349
350 The CRE isolates analyzed showed high resistance to most antimicrobial agents tested, with the
351 98% of the isolates classified as MDR. Interestingly, we detected one isolate of *C. freundii*
352 susceptible to the three carbapenems by microdilution but resistant to meropenem and ertapenem
353 using the VITEK system, and it harbored the VIM gene. The other *K. pneumoniae* isolates that
354 harbored VIM presented only resistance to imipenem. It has been reported that the presence of
355 VIM produces MIC values close to the breakpoint and susceptible values, and our results
356 confirmed these findings [37].

357

358 Although aztreonam is not inactivated by metallo- β -lactamases such as NDM-1, 73% of the CRE
359 isolates were resistant to this antibiotic. In the UK, isolates that are NDM-1 positive and resistant
360 to aztreonam presented additional resistance genes (CTX-M-15 or CMY-4 genes) [36,39]. The
361 presence of other genes such as ESBLs or AmpC enzymes may have contributed to aztreonam
362 resistance.

363
364 In our study, the 19.6% isolates were resistant to tigecycline. The high resistance detected is a
365 point of concern because the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program reported in 2016 that
366 only 2.6% of CRE from Latin America presented tigecycline resistance [40], and by these new
367 findings, we may infer that tigecycline resistance is increasing.

368 Colistin resistance was also detected (4%), and this is now a serious global menace as previous
369 reports from India and UK showed percentages of resistance of 6% and 11%, respectively [39].
370 This study is the second report of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* in Mexico [32]. The
371 molecular mechanism of resistance to colistin presented in Mexico is not known, and additional
372 analysis is ongoing in our group to evaluate the mechanism(s) involved.

373
374 Among the *K. pneumoniae* and *E. cloacae* isolates, a high clonality was observed, with eight
375 clones and six subtypes of clone A detected in *K. pneumoniae*, representing the 80.4% of
376 isolates; with most of them presenting the NDM-1 gene (6.5% carrying the VIM or KPC genes
377 and not related to the NDM-1 outbreak).

378 Clone A strains were present throughout the study (11 months), and the non-related clones were
379 present only in the beginning and at the end of the survey. This observation could indicate that
380 the clonal dynamics at the start and end of the outbreak allow the presence of different clones

381 favored by horizontal gene transfer. Subsequently, the persistence of one predominant clone
382 could be caused by clonal expansion.

383 MLST results showed two new ST for *K. pneumoniae* (ST2399 and ST2400) along with four
384 reported ST for *K. pneumoniae* (ST307, ST309, ST392, and ST846) and one for *E. coli* (ST10).
385 However, only ST846 has been previously reported in *K. pneumoniae* isolates carrying NDM-1
386 [41]. ST307 strains have only been described as harboring the KPC and OXA-48 genes [42].

387
388 The combination of clonal expansion and horizontal gene transfer demonstrated in this study has
389 been described in Mexico, UK, and Chennai, India. In contrast, isolates from Haryana, India,
390 showed an apparent clonal expansion by the demonstration of two types of predominant
391 plasmids [8,39].

392
393 Fourteen genes encoding virulence factors and the biofilm production were tested in
394 carbapenem-resistant and selected carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* isolates, and the
395 frequency of genes was similar to that previously reported in Mexico[26]. The virulence gene
396 distribution between both groups was similar except for the *fimA* and *uge* genes. The presence of
397 *fimA* and *uge* genes was more frequently detected in carbapenem-susceptible *K. pneumoniae*
398 isolates ($P < 0.001$). The type 1 fimbriae, encoded by *fimA*, contribute to the invasion of bladder
399 cells and biofilm formation. Despite the low frequency of the *fimA* gene in the carbapenem-
400 resistant isolates, these strains were capable of high biofilm production.

401
402 Biofilm production has been associated with type 1 or type 3 fimbriae, capsule, and LPS. The
403 type 3 fimbrial gene, *mrkA*, has been proposed as the major virulence factor that mediates

404 biofilm formation on abiotic and biotic surfaces. However, susceptible isolates that present
405 *mrkA*, *fimA* or both genes failed to form a biofilm. Similar findings have been reported for
406 biofilm producing isolates that contained the *mrkA* gene in which the 57% produced type 3
407 fimbriae. These isolates contained a homolog of the *E. coli* adhesive structure (ECP) operon,
408 which was shown to contribute to biofilm formation [43]. Our results suggest the participation of
409 other virulence factors that were not analyzed in this study.

410 The *uge* gene encodes a UDP galacturonate-4-epimerase, involved in LPS production. The *uge*
411 gene is usually present in most *K. pneumoniae* isolates, and in the absence of this gene, *K.*
412 *pneumoniae* produces a rough LPS that is less capable of causing urinary tract infections,
413 pneumonia, and sepsis and is susceptible to complement-mediated killing, even in the presence
414 of the capsule. More studies are required to determine the relevance of the differences observed
415 for these genes in the study groups.

416 In this study, we confirmed that biofilm production is higher in the carbapenem-resistant isolates
417 than in the carbapenem-susceptible isolates as previously reported [9], and the presence of
418 biofilm may contribute to drug resistance. We also showed that carbapenem-resistant and
419 susceptible isolates presented almost the same frequency of virulence factors. Contrary results
420 have been reported, with a *K. pneumoniae* carrying NDM-1 more virulent in a murine sepsis
421 model [9].

422 This studies had several limitations. First, there was a lack of information about the travel of
423 patients or healthcare workers to places where NDM-1-producing strains are endemic. However,
424 NDM-1 strains been reported in Mexico previously, and the dissemination could be the result of
425 local transmission. Another significant limitation of our study is the absence of analysis of CRE

426 carriers in the hospital. The above limitations could be resolved in future studies of CRE in this
427 region.

428 The results obtained in this study indicate that NDM-1 was disseminated horizontally among
429 different species in a tertiary care Hospital in Mexico, also with proof of strain spread. We have
430 provided evidence of plasmid transfer but, given the variation in plasmid sizes, complex
431 rearrangements must also be occurring. In this analysis, the presence of other carbapenemase
432 genes encoding VIM, KPC and IMP were sporadic.

433

434 **Acknowledgements**

435 The authors thank Alejandro Sanchez-Perez and Teresa Rojas for their assistance in the
436 laboratory. We are grateful to the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system
437 (Paris, France) for importing novel alleles, profiles, and/or isolates at <http://bigsdbs.pasteur.fr/>.

438 This work was partially supported by grants 136339 and 130224 from CONACyT (Mexican
439 Council for Science and Technology).

440

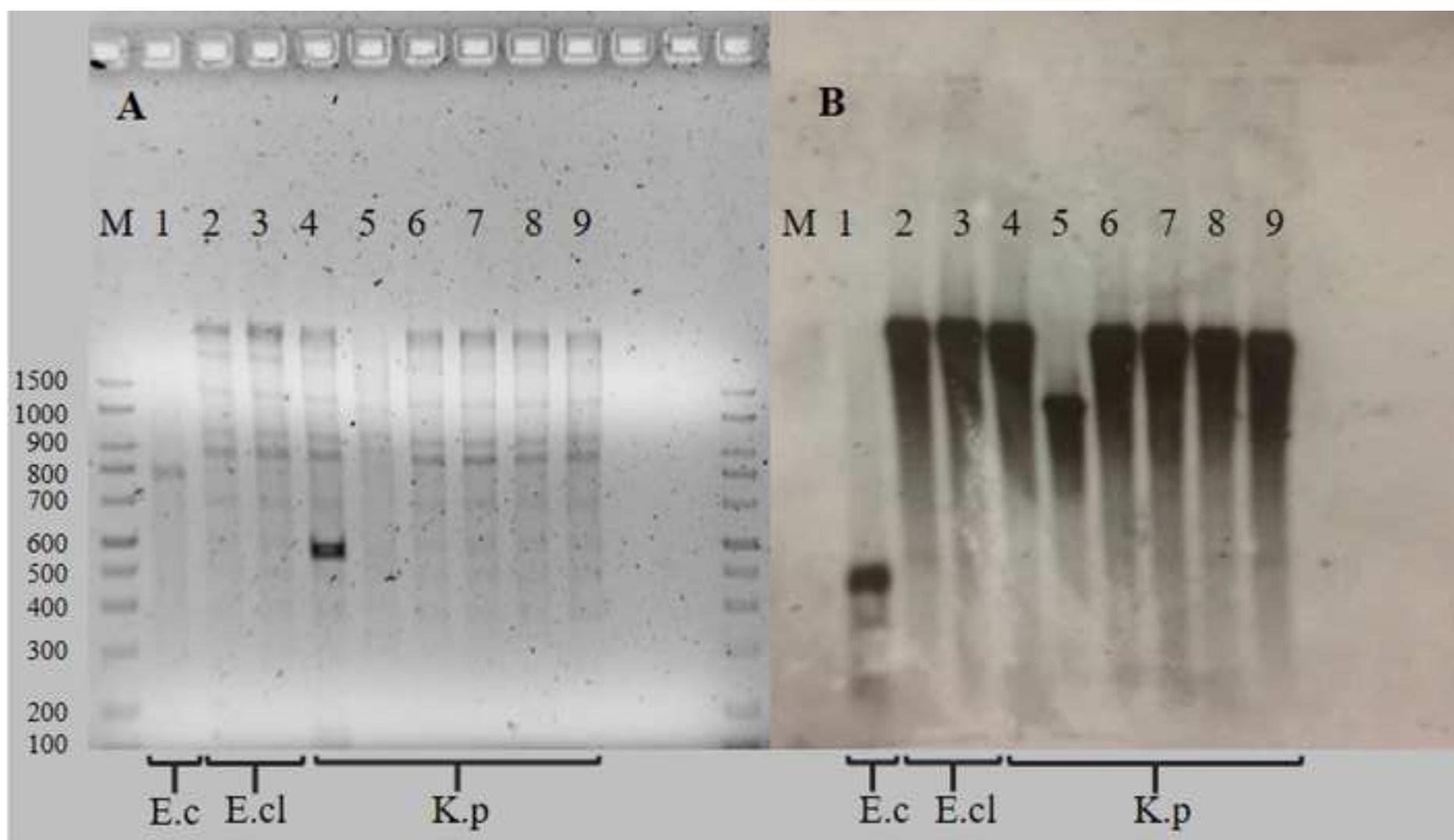
441 **References**

- 442 1. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, et al. (2014) Emergence of NDM-1-producing
443 Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* 25: 79-81.
- 444 2. Wei WJ, Yang HF, Ye Y, Li JB (2015) New Delhi Metallo-beta-Lactamase-Mediated Carbapenem
445 Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. *Chin Med J (Engl)* 128:
446 1969-1976.
- 447 3. Jean SS, Lee WS, Lam C, Hsu CW, Chen RJ, et al. (2015) Carbapenemase-producing Gram-negative
448 bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Future Microbiol*
449 10: 407-425.
- 450 4. Dortet L, Poirel L, Nordmann P (2014) Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in
451 Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014: 249856.

- 452 5. Chen CJ, Wu TL, Lu PL, Chen YT, Fung CP, et al. (2014) Closely related NDM-1-encoding plasmids from
453 *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One* 9: e104899.
- 454 6. Barrios H, Garza-Ramos U, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Rojas-Moreno T, et al. (2013) Isolation of
455 carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *J Antimicrob Chemother*
456 68: 1934-1936.
- 457 7. Barrios H, Silva-Sanchez J, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Sanchez-Francia D, et al. (2014) Detection
458 of a NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST22) clinical isolate at a pediatric hospital in
459 Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 33: 335.
- 460 8. Torres-Gonzalez P, Bobadilla-Del Valle M, Tovar-Calderon E, Leal-Vega F, Hernandez-Cruz A, et al.
461 (2015) Outbreak caused by Enterobacteriaceae harboring NDM-1 metallo-beta-lactamase
462 carried in an IncFII plasmid in a tertiary care hospital in Mexico City. *Antimicrob Agents
463 Chemother* 59: 7080-7083.
- 464 9. Fuursted K, Scholer L, Hansen F, Dam K, Bojer MS, et al. (2012) Virulence of a *Klebsiella pneumoniae*
465 strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). *Microbes Infect* 14: 155-158.
- 466 10. Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L (2014) Exploring Dangerous Connections between
467 *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens* 3: 720-731.
- 468 11. Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Martinez-Romero E, Tinoco P, Pina-Gonzales M, et al. (2015)
469 Development of a multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella
470 variicola*. *BMC Microbiol* 15: 64.
- 471 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility
472 testing. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-six informational
473 supplement M100S CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
- 474 13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. . Clinical breakpoints - bacteria
475 (v 60) 2016.
- 476 14. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, et al. (2012) Multidrug-resistant,
477 extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for
478 interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281.
- 479 15. Nordmann P, Poirel L (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol
480 Infect* 8: 321-331.
- 481 16. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes
482 encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 59: 321-322.
- 483 17. Baroud M, Dandache I, Araj GF, Wakim R, Kanj S, et al. (2013) Underlying mechanisms of
484 carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*
485 and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1
486 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 41: 75-79.
- 487 18. Kieser T (1984) Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and
488 *Escherichia coli*. *Plasmid* 12: 19-36.
- 489 19. Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor
490 Laboratory. xvi, 466 p. p.
- 491 20. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, et al. (2005) Identification of plasmids by PCR-
492 based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63: 219-228.
- 493 21. Kaufmann ME (1998) Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* 15: 33-50.
- 494 22. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, et al. (1995) Interpreting chromosomal
495 DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial
496 strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- 497 23. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S (2005) Multilocus sequence typing of *Klebsiella
498 pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43: 4178-4182.

- 499 24. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, et al. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an
500 evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60: 1136-1151.
- 501 25. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T (2013) Multilocus sequence
502 typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8: e66358.
- 503 26. Garza-Ramos U, Moreno-Dominguez S, Hernandez-Castro R, Silva-Sanchez J, Barrios H, et al. (2016)
504 Identification and Characterization of Imipenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and
505 Susceptible *Klebsiella variicola* Isolates Obtained from the Same Patient. *Microb Drug Resist* 22:
506 179-184.
- 507 27. Burmolle M, Norman A, Sorensen SJ, Hansen LH (2012) Sequencing of IncX-plasmids suggests
508 ubiquity of mobile forms of a biofilm-promoting gene cassette recruited from *Klebsiella*
509 *pneumoniae*. *PLoS One* 7: e41259.
- 510 28. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, et al. (2007) Quantification of biofilm in
511 microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment
512 of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115: 891-899.
- 513 29. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TP, et al. (2013) Isolation of NDM-
514 producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 68: 2956-2957.
- 515 30. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, et al. (2004) Metallo-beta-lactamase-
516 producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical
517 laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 42: 5256-5263.
- 518 31. Shiroto K, Ishii Y, Kimura S, Alba J, Watanabe K, et al. (2005) Metallo-beta-lactamase IMP-1 in
519 *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *J Med Microbiol* 54: 1065-1070.
- 520 32. Garza-Ramos U, Barrios H, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Tamayo-Legorreta E, et al. (2014)
521 Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from
522 outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 483-485.
- 523 33. Rodriguez-Zulueta P, Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyes-Mar J, Velez-Perez F, et al. (2013) First
524 outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates in a Mexican
525 Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 4086-4088.
- 526 34. Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Deshpande LM, Sader HS, Castanheira M (2009) Dissemination
527 of a bla(VIM-2)-carrying integron among Enterobacteriaceae species in Mexico: report from the
528 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb Drug Resist* 15: 33-35.
- 529 35. Wang Q, Zhang Y, Yao X, Xian H, Liu Y, et al. (2016) Risk factors and clinical outcomes for
530 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- 531 36. Jamal WY, Albert MJ, Rotimi VO (2016) High Prevalence of New Delhi Metallo-beta-Lactamase-1
532 (NDM-1) Producers among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Kuwait. *PLoS One* 11:
533 e0152638.
- 534 37. Aschbacher R, Doumith M, Livermore DM, Larcher C, Woodford N (2008) Linkage of acquired
535 quinolone resistance (qnrS1) and metallo-beta-lactamase (blaVIM-1) genes in multiple species
536 of Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy. *J Antimicrob Chemother* 61: 515-523.
- 537 38. Ling ML, Tee YM, Tan SG, Amin IM, How KB, et al. (2015) Risk factors for acquisition of carbapenem
538 resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist*
539 *Infect Control* 4: 26.
- 540 39. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, et al. (2010) Emergence of a new
541 antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and
542 epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10: 597-602.
- 543 40. Sader HS, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Mendes RE, et al. (2016) Tigecycline antimicrobial
544 activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from
545 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int J Antimicrob Agents* 48: 144-150.

- 546 41. Zhu J, Sun L, Ding B, Yang Y, Xu X, et al. (2016) Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*
547 ST76 and ST37 isolates in neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35: 611-618.
- 548 42. Ruiz-Garbajosa P, Hernandez-Garcia M, Beatobe L, Tato M, Mendez MI, et al. (2016) A single-day
549 point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a
550 complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J*
551 *Antimicrob Chemother* 71: 348-352.
- 552 43. Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE (2014) Antibiotic Resistance Related to Biofilm
553 Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* 3: 743-758.
- 554



“Remember, if you need a helping hand, it’s in the end of your arm, as you get older, remember you have another hand: the first is to help yourself, the second is to help others”

“The greatest victory has been to be able to live with myself, to accept my shortcomings.... I’m a long way from the human being I’d like to be. But I’ve decided I’m not so bad after all”

Audrey Hepburn