



FACULTAD DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TRABAJO DE FIN DE GRADO. GRADO EN BIOLOGÍA

CARBAPENEMASAS. MECANISMOS DE RESISTENCIA Y MÉTODOS FENOTÍPICOS DE DETECCIÓN

***CARBAPENEMASES. RESISTANCE MECHANISMS
AND PHENOTYPIC METHODS FOR DETECTION***

**COMPLEJO
ASISTENCIAL
UNIVERSITARIO
D SALAMANCA**



SARA GARCÍA VELA

Salamanca, Junio 2018

ÍNDICE

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
A. CONCEPTO, ORIGEN Y TIPOS DE RESISTENCIAS.....	1
B. ADQUISICIÓN DE CEPAS RESISTENTES.....	1
C. MECANISMOS DE RESISTENCIAS.....	3
D. BETA-LACTÁMICOS.....	3
E. BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.....	4
F. CARBAPENEMASAS.....	5
a. TIPOS.....	5
b. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	20
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

ABSTRACT

The emergence and spread of antibiotic resistance bacteria is a recent issue. Thus, the World Health Organization (WHO), has cataloged the antibiotics with the purpose of using them adequately. Beta-lactams are the antibiotics most widely used. The resistance enzymes for these antibiotics are known as beta-lactamases. Some beta-lactamases mutate and became extended spectrum beta-lactamases (ESBL), so that they generate resistance for all beta-lactams except for carbapenems. Carbapenems are cataloged by the WHO as “research” antibiotics. Carbapenemases are enzymes produced by enterobacteriaceae which hydrolyses carbapenems. The most frequent carbapenemases are OXA-48 (Class D), VIM (Class B) and KPC (Class A). When this enzymes and ESBL are simultaneously produced, make the effective treatment complicated as together they generate resistance for all beta-lactams. Thus, it is important an early detection of carbapenemases by phenotypic methods which are quicker than molecular ones. Moreover, colonization studies are important in order to prevent cross-infections between patients and self-infections.

In the study, we aimed to evaluate the frequency and emergence of carbapenemase-producing enterobacteriaceae (CPE), between the year 2015 to the first trimester of 2018, in the “Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA)”, and to compare it to other national studies. Additionally, we evaluate the different phenotypic methods for detection of CPE.

Hodge Test stands out between the phenotypic methods for detection of CPE. The β -CARBA-test is the most useful for CPE detection if rapidity is required in the diagnostic. But none of them allows to differentiate between the type of carbapenemase produced. To reach this objective, the most effective methods are: E-test and combined-disc with inhibitors methods. OXA-48 detection is easier with chromogenic media which can distinguish between CPE and OXA-48 producing CPE.

In the CAUSA, it is observed, an increase in the emergence of CPE. The predominating ones are type VIM carbapenemases, although at national level, it is OXA-48 type. KPC is the less frequent in both studies. The CPE most found is *Klebsiella pneumoniae*, which produces both, VIM and OXA-48. The coproduction of carbapenemases with ESBL has increased during the years of study, being OXA-48 and ESBL combination the most frequent. This situation is disturbing as it can lead to the emergence of multi-drug resistance bacteria. In the first years of the study, the majority of CPE were isolated from urinary tract infections and bacteremia. However, in the last year CPE were mostly isolated from colonization studies. So, the rapid detection of carbapenemases and preventive actions are being adequate, because, even though the emergence of CPE is increasing, the infections are in decrease.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Dra. Chan, directora general de la Organización Mundial de la Salud (OMS), “La resistencia a los antimicrobianos supone una amenaza a la esencia misma de la medicina moderna y a la sostenibilidad de una respuesta de salud pública mundial eficaz ante la amenaza persistente de las enfermedades infecciosas”¹.

En las últimas décadas la situación frente a las enfermedades infecciosas era muy favorable debido al uso de antibióticos. Sin embargo, a día de hoy, la muerte por infecciones bacterianas vuelve a cobrar importancia debido a la aparición de las denominadas resistencias a antibióticos^{2,3}.

A. CONCEPTO, ORIGEN Y TIPOS DE RESISTENCIAS

La resistencia se define como la capacidad de un microorganismo para resistir la acción de un fármaco antimicrobiano. Los microorganismos pueden adquirir la resistencia por dos mecanismos: mediante la mutación de sus genes (menos probable) o por la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal a través de elementos genéticos móviles⁴.

La resistencia es una herramienta que le permite a los microorganismos sobrevivir, adaptarse al entorno y competir con otros microorganismos. Hoy se sabe que algunos de éstos genes de resistencia tienen su origen en bacterias y hongos saprofitas que, desde hace miles de años, sintetizan productos químicos (bacitracina, penicilina, polimixina, etc) para evitar las agresiones de otros microorganismos de su entorno. Como consecuencia, y para poder sobrevivir, los microorganismos desarrollan mecanismos para contrarrestar la toxicidad de los antibióticos que sintetizan.

El imparable avance de la resistencia microbiana ha obligado a ampliar en los últimos años su concepto y definir microorganismos **multirresistentes** cuando son resistentes a tres o más grupos de antimicrobianos, **extremadamente resistentes** si sólo son sensibles a uno o dos grupos y **panresistentes** cuando presentan resistencia a todos los antimicrobianos comercialmente disponibles⁵.

B. ADQUISICIÓN DE CEPAS RESISTENTES

Las resistencias a los antibióticos se producen debido al mal uso de los mismos. El antibiótico no induce la resistencia pero sí actúa ejerciendo una presión selectiva que elimina las cepas sensibles, seleccionando aquellas con genes de resistencia. Se produce un cuello de botella en la

población microbiana. Aquellos microorganismos que sobreviven dispersarán la resistencia mediante la multiplicación clonal y transferencia horizontal de genes.

El mal uso de los antimicrobianos se debe en parte al manejo incorrecto por parte de la población que tiende a la automedicación, a no respetar la dosificación ni la duración del tratamiento o a la toma de antibióticos frente a infecciones de tipo vírico. En algunos casos se relaciona con la compra de antibióticos ilegales, más baratos y de menor calidad.

Además el uso de antimicrobianos es muy frecuente en otros sectores como en agricultura para preservar los cultivos o en veterinaria para tratar y prevenir infecciones. Por tanto, y como se muestra en la infografía de la OMS⁶ (**Figura 1**), las bacterias resistentes pueden acceder también al hombre a través de los alimentos que consume, del agua o por el contacto con animales. Como consecuencia, aparecen infecciones comunes como intoxicaciones alimenticias, infecciones de las vías urinarias, neumonía, bacteriemias, etc, resistentes ante las cuales se prescriben medicamentos de último recurso que son más caros, con más efectos secundarios y, a menudo, no son asequibles en países en vías de desarrollo.



Figura1. Resistencia a los antibióticos. ¿Cómo se propaga?⁶.

C. MECANISMOS DE RESISTENCIAS

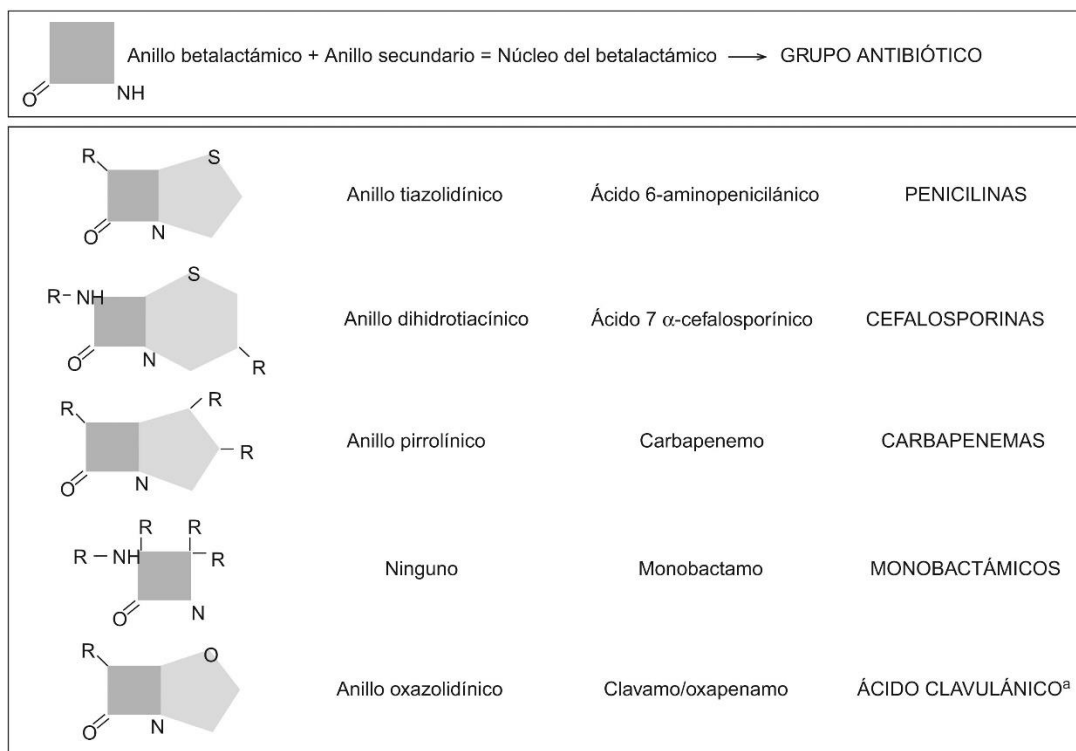
La inhibición del crecimiento bacteriano ocurre cuando el antibiótico interacciona con su molécula diana. Para que esto ocurra, el antibiótico debe estar en una concentración suficiente para llegar a la diana, reconocerla y destruirla. Podemos distinguir tres mecanismos de resistencia^{7, 8}.

- Destrucción o modificación del antibiótico: La destrucción del antibiótico ocurre por hidrólisis mediante la producción de enzimas, sobre todo beta-lactamasas, y, la modificación por la producción de enzimas bifuncionales (fosforilasas, adenilasas, etc).
- Impedimento para que alcance la diana: Diferenciamos entre:
 - Impermeabilidad: Se produce por cambios o pérdidas de porinas. Es muy frecuente en bacterias gram-negativas.
 - Expulsión activa mediante bombas o eflujo: Impide que el antibiótico alcance una concentración adecuada.
- Modificación de la diana: Las modificaciones pueden ser por cambios en la afinidad, hiperproducción o protección de la diana.

D. BETA-LACTÁMICOS

La OMS publica en junio de 2017 una lista de antibióticos catalogándolos en tres grupos con la finalidad de garantizar que los antibióticos estén disponibles cuando se necesiten y que se receten de forma apropiada según las infecciones. Estas categorías incluyen “**acceso**”, en la que se encuentran antibióticos disponibles para tratar un amplio abanico de infecciones comunes, “**precaución**”, en la que se encuentran tratamientos de primera o segunda elección para un pequeño número de infecciones, y “**último recurso**”, en la que se incluyen antibióticos que deberían utilizarse únicamente para los casos más graves, cuando las demás alternativas no hayan funcionado⁹.

Los antibióticos beta-lactámicos son los antibióticos que más se prescriben en clínica tanto en el hospital como en la comunidad e incluyen a un amplio abanico de antibióticos entre los que encontramos penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, inhibidores de betalactamasas y carbapenémicos (**Figura 2**). Todos presentan un anillo beta-lactámico al que se va a unir otro secundario, característico de cada grupo, formando el núcleo^{10, 11}.



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

Figura 2. Estructura química de los diferentes tipos de beta-lactámicos y el inhibidor de betalactamasas¹¹.

Estos antibióticos, actúan interrumpiendo la formación de la pared celular tanto en bacterias gram-positivas como en bacterias gram-negativas. Se unen covalentemente con proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), e inhiben la síntesis de la pared celular actuando en las últimas etapas de formación del peptidoglucano. Y además, activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano.

Los antibióticos carbapenémicos son los beta-lactámicos de mayor espectro y actividad y por ello se utilizan en infecciones nosocomiales graves y en el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes. Son considerados antibióticos de “**último recurso**”; incluyen imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem. Recientemente, se han encontrado resistencias a estos antibióticos debidas a modificaciones en la diana en las PBPs, a la acción de bombas de eflujo y porinas que no permiten la penetración del antibiótico y, debido, principalmente, a la acción de las carbapenemasas, enzimas que hidrolizan el antibiótico^{9, 12}.

E. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

La resistencia a una amplia gama de antibióticos beta-lactámicos, la confieren un grupo de enzimas conocidas como betalactamasas de espectro extendido (BLEE o ESBL). Generan

resistencia frente a penicilinas, a monobactámicos y a cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación. No afectan a los carbapenémicos. Las producen diversos microorganismos gram-negativos siendo *E. coli* el más frecuente^{13, 14}.

Las BLEE se forman por una serie de mutaciones originadas a partir de otras beta-lactamasas menos activas (sólo resistentes a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación) y se transmiten por transferencia horizontal de genes, lo cual ayuda a su rápida dispersión¹⁵.

Su importancia clínica radica en que son muy frecuentes en infecciones nosocomiales, y, a menudo aparecen junto con otro tipo de beta-lactamasas, las carbapenemasas, complicando el tratamiento efectivo, puesto que estas últimas confieren resistencia a antibióticos de “último recurso”, contribuyendo así a la aparición de cepas multirresistentes¹².

F. CARBAPENEMASAS

Las carbapenemasas son enzimas producidas por bacterias gram-negativas (en su mayoría, de la familia Enterobacteriaceae y bacilos no fermentadores como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp.) que hidrolizan a los carbapenémicos y que confieren, en la mayoría de las ocasiones, resistencia a los mismos y a todos los beta-lactámicos. Se considera que una enterobacteria es resistente a carbapenémicos si presenta concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de $\geq 2\mu\text{g/ml}$ para ertapenem y $\geq 4\mu\text{g/ml}$ para doripenem, meropenem o imipenem¹⁶.

Encontramos genes que codifican carbapenemasas tanto en el ADN cromosómico como en plásmidos. La dispersión de la resistencia se produce fundamentalmente por transferencia horizontal de genes, por lo que una cepa no productora de la enzima puede volverse resistente al adquirir el gen¹⁷.

a. TIPOS DE CARBAPENEMASAS

Existen diferentes tipos de carbapenemasas (**Figura 3**):

- Carbapenemasas tipo serina: Se caracterizan por presentar serina en la posición 70 de su sitio activo. Diferenciamos entre:
 - o Clase A: Encontramos cinco grupos según su filogenia: SME, NMC e IMI que están codificadas en cromosomas y GES y KPC que están codificadas en plásmidos. El grupo con más interés clínico son las carbapenemasas KPC, ya que a menudo, las cepas productoras de KPC son productoras de otras beta-lactamasas, lo que complica un tratamiento efectivo y, además, son las más frecuentes.

- Clase D: Se dividen en grupos; OXA-23, OXA-245, OXA-48, OXA-58, OXA-72 y OXA-143. Los genes que codifican estas enzimas se encuentran tanto en cromosomas como en plásmidos.

La carbapenemasa de mayor importancia clínica de este grupo es la OXA-48, que tiene mayor actividad que el resto, hidroliza a imipenem unas 10 veces más, y es la más frecuente.

La mayoría de OXA se encuentran en cepas de *Acinetobacter* spp. cuya expansión se debe a la existencia de varios clones. En enterobacterias, la expansión se debe a transmisión horizontal de plásmidos.

- Metallo-beta-lactamasas (MBL): Se caracterizan por contener en su sitio activo, en vez de serina, uno o varios iones de Zn^{2+} , responsable del ataque nucleofílico al anillo beta-lactámico. Dentro de este tipo de carbapenemasas están las de clase B.

- Clase B: Encontramos varios tipos, entre los que destacan VIM, NDM e IMP. Los genes que codifican para este tipo de enzimas se encuentran tanto en cromosomas como en plásmidos. Estas carbapenemasas hidrolizan a todos los beta-lactámicos a excepción de aztreonam, un monobactámico por el que presentan poca afinidad. Al igual que en las cepas productoras de KPC, a menudo las cepas productoras de metallo-beta-lactamasas producen más de un tipo de beta-lactamasas.

La más importante en la clínica, por ser la más frecuente, es la MBL de tipo VIM.

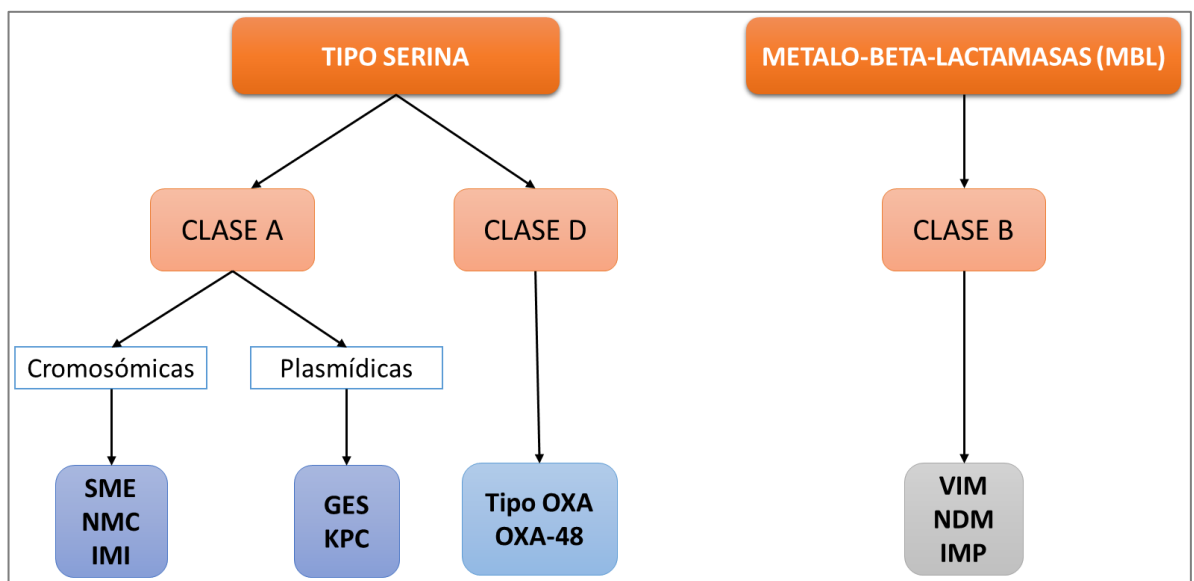


Figura 3: Tipos de carbapenemasas.

La producción de estas enzimas por las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal del hombre (enterobacterias) ha suscitado una enorme preocupación y se consideran hoy día un problema de salud pública mundial ya que, por la globalización, estas enterobacterias productoras de carbapenemasas se han extendido y diseminado rápidamente a todo el mundo ¹⁸.

b. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS

Una detección rápida y precisa de cepas productoras de carbapenemasas es muy importante para poder asignar un tratamiento eficaz.

Para la detección de las cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) primero se debe realizar un cribado o sospecha (*screening*) seguido de una confirmación que puede ser fenotípica y/o genotípica^{19,20}.

El cribado se lleva a cabo mediante sistemas automatizados, como Vitek, Wider, MicroScan, etc. Estos sistemas interpretan sensibilidades a diferentes antibióticos mediante la lectura de suspensiones bacterianas en paneles comercializados. Si mediante estos sistemas se sospecha una resistencia a carbapenémicos (CMI elevadas), se procede a los métodos de confirmación fenotípicos²¹.

También se puede hacer el cribado con medios cromogénicos. Son placas de medio de cultivo que incorporan un cromógeno (sustrato que libera color al ser degradado) que permite diferenciar por el color de las colonias el microorganismo aislado, y un carbapenémico para detectar su resistencia.

Entre los métodos de detección fenotípicos encontramos:

- Test de Hodge modificado: Es la técnica que el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recomienda para la detección fenotípica de carbapenemasas. La inactivación de los carbapenémicos por la cepa productora de carbapenemasa permite el crecimiento de un microorganismo indicador sensible a los lados de una estría efectuada con la cepa productora, en una placa con un disco de carbapenémico. Esta técnica permite detectar la producción de carbapenemasas pero no la clase a la que pertenecen. Para ello se realizan pruebas adicionales.
- β -CARBA test: Es un método bioquímico. Se basa en la detección de la acidificación resultante de la hidrólisis del imipenem. Se observa por un cambio en el color de rojo a amarillo. Permite visualizar la presencia de carbapenemasas, pero no su tipo.

- Medios cromogénicos: Como se ha comentado previamente, son placas con medios de agar que permiten diferenciar entre cepas productoras de carbapenemasas, y a mayores, de alguna clase de carbapenemasas, mediante un cambio en la pigmentación de la colonia problema.
- Sinergia con doble discos: Consiste en la visualización de una ampliación del halo de inhibición en forma de cerradura debido al crecimiento de cepas productoras de carbapenemasas en agar con discos de carbapenémicos y sus inhibidores, EDTA o ácido dipicolínico, para carbapenemasas de clase B y ácido borónico, para carbapenemasas de clase A.
- Discos combinados con inhibidores: Es un método similar al anterior, pero el inhibidor está en el mismo disco que el carbapenémico y, para su valoración, únicamente se visualiza el halo de inhibición que produce.
- E-test: Cuantifican la sinergia entre carbapenémicos y sus inhibidores. Consiste en una tira de plástico no porosa que contiene gradientes del antimicrobiano e inhibidores mediante el cual se pueden interpretar las diferencias de CMIs entre las dos partes de la tira.
- MALDI-TOF: Es un método espectrofotométrico. Se basa en el análisis del espectro de degradación de la molécula de un carbapenémico.

Estos métodos son los más importantes en clínica puesto que son rápidos y proporcionan la información necesaria para poder establecer un tratamiento.

Entre los métodos moleculares de detección genotípica encontramos:

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Detecta genes que codifican carbapenemasas. Presenta una alta especificidad pero no detecta posibles nuevos genes de resistencia. En ocasiones también se procede a la secuenciación.
- Microarrays: Son microchips que miden niveles de expresión de determinados genes de forma simultánea.

Los métodos moleculares, cuya finalidad es detectar los genes que expresan la producción de las carbapenemasas, no tienen tanto interés clínico puesto que no son estrictamente necesarios para poder establecer el tratamiento. Su interés es epidemiológico.

2. OBJETIVOS

1. Conocer la frecuencia y los tipos de carbapenemasas producidas por enterobacterias aisladas en muestras clínicas en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) desde el año 2015 hasta la actualidad.
2. Comparar la frecuencia y características de las cepas halladas en nuestro medio con otros estudios a nivel nacional.
3. Valorar los métodos fenotípicos utilizados en su detección.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se va a realizar una revisión retrospectiva de las cepas de bacterias de la familia Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas, aisladas en el CAUSA desde el año 2015 hasta el primer trimestre de 2018. Estas carbapenemasas han sido detectadas mediante métodos de detección fenotípica y confirmadas por métodos genotípicos (PCR a tiempo real). La base de datos utilizada ha sido el sistema GLIMS (Mips Ibérica).

Mediante la utilización de tres cepas productoras de carbapenemasas de los tipos KPC (clase A), VIM (clase B) y OXA-48 (clase D) y una cepa control, se procederá a realizar los distintos métodos de detección fenotípica. Los primeros, van a ser los métodos que detectan la presencia o ausencia de carbapenemasa, el test de Hodge y el β -CARBA-test y, posteriormente, los métodos que, además de lo anterior, nos permiten diferenciar entre carbapenemasas de clase A, clase D y clase B, que son los métodos cromogénicos, la prueba de discos y E-test combinados con inhibidores.

- **TEST DE HODGE:** En una placa de agar Mueller-Hinton se siembra en césped una cepa de *E. coli* sensible, previamente diluida en caldo nutritivo, a una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, aproximadamente. Después, se coloca un disco con un carbapenémico (meropenem) en el centro de la placa. Se inoculan de tres a cinco colonias de la cepa productora de carbapenemasas formando una estría radial desde aproximadamente 2 mm del disco hacia el borde de la placa. Finalmente se incuba a 35°C durante 16-20 horas ^{15, 19}.

El test de Hodge es positivo cuando aparece crecimiento de la cepa de *E. coli* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por el antibiótico y la estría de la cepa productora de carbapenemasa formando una hendidura en la parte proximal al disco y una imagen en hoja de trébol. La liberación de las carbapenemasas es la responsable del crecimiento de la cepa de *E. coli*.

- **β -CARBA-test (Bio-Rad):** En un microtubo se añaden 40 μ l de cada uno de los dos reactivos del kit comercial (uno incoloro, y otro amarillo). Se añade al microtubo una o dos colonias de la cepa productora de carbapenemasa, y se deja incubar a 35°C durante 30 minutos aproximadamente.

El β -carba-test es positivo cuando se observa un cambio de color de amarillo a rojo.

- **MÉTODOS CROMOGÉNICOS:** Utilizamos placas comerciales de bioMérieux. Son biplacas con dos medios que son selectivos gracias a la presencia de antibióticos, sustratos cromogénicos y peptonas que conducen a una coloración específica de la colonia. Una parte de la placa permitirá el crecimiento de cepas productoras de carbapenemasas (por la presencia del antibiótico) con un color característico y, la otra, hará lo mismo pero únicamente con cepas productoras de carbapenemasas tipo OXA-48 (por la presencia del antibiótico e inhibidores de carbapenemasas de Clase A y Clase B).

Para realizar la prueba, se siembran las colonias productoras de carbapenemasas en ambos lados de la placa y se incuba a 35°C durante 16-20 horas.

Esta prueba se considera positiva para presencia de carbapenemasas de tipo VIM o KPC cuando el cambio de color se produce en la primera mitad de la placa descrita pero no en la segunda; y, será positiva para presencia de carbapenemasas tipo OXA-48 cuando el cambio en la pigmentación se da en ambas partes.

- **PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDORES:** Se utilizan los discos comerciales conocidos como ROSCO. Para ello, se siembra en césped en una placa de agar Mueller-Hinton la cepa productora de carbapenemasa a partir de una suspensión de la misma en caldo nutritivo con una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, aproximadamente. Se colocan en la placa 5 discos: meropenem, meropenem + cloxaciclina (para detectar la presencia de resistencias asociadas a la actividad de la beta-lactamasa AmpC), meropenem + ácido borónico (para inhibir el crecimiento de carbapenemasas de clase A), meropenem + ácido dipicolínico (para inhibir el crecimiento de carbapenemasas de clase B) y temociclina (antibiótico para el cual siempre son resistentes las cepas productoras de OXA). Se incuba a 35°C durante 16-20 horas.

La prueba es positiva para las diferentes carbapenemasas cuando presentan los halos de inhibición presentes en la **Tabla 1**.

- **E-TEST:** Se siembra en césped en una placa de agar Mueller-Hinton la cepa productora de carbapenemasas a partir de una suspensión en solución caldo nutritivo, con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente. Una vez que el inóculo se ha secado completamente, se pone la tira de E-TEST sobre el agar con unas pinzas. Se inocula a 35°C durante 16-20 horas. Se utilizan tiras con meropenem en un extremo y meropenem con ácido dipicolínico o meropenem con ácido borónico en el otro. Se considera productora

de carbapenemasa si las CMI's del extremo que contiene los inhibidores se reduce en al menos 3 o más diluciones en relación a la del otro extremo.

Tabla 1: Guía de identificación de carbapenemasas según sensibilidades y resistencias por halos de inhibición²².

		Meropenem + Phenylboronic MRPBD	Meropenem + DPA MRPDP	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	Temocilin 30 µg
AmpC + porin loss	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4mm and	≤ 3 mm	≥ 5mm	≥ 12mm
ESBL + porin loss (a)	Meropenem 10 µg MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12mm
KPC	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Variable
	Meropenem + Cloxacillin (MRPCX)	≥ 4mm	-	-	-
MβL	Meropenem 10 µg MRP10	< 4mm	≥ 5mm	≤ 3 mm	Variable
OXA-48 and similars	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	<=12 mm
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	<=12 mm

a: Synergism CAZ / Clavulanate.

4. RESULTADOS

En relación al estudio retrospectivo, se han detectado un total de 55 enterobacterias productoras de carbapenemasas desde el año 2015 hasta el primer trimestre del 2018.

La distribución de las mismas en los diferentes años incluidos en el estudio se indica en la **Figura 4**.

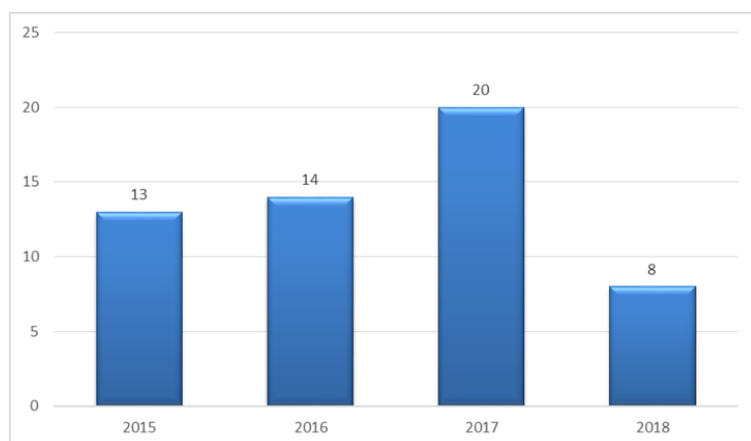


Figura 4. Número de cepas de EPC aisladas en el CAUSA en el periodo estudiado

Las metalo-beta-lactamasas de tipo VIM fueron las carbapenemasas predominantes (39), seguidas de OXA-48 (12) y KPC (4). Su distribución en función de los años de estudio se muestra en la **Figura 5**.

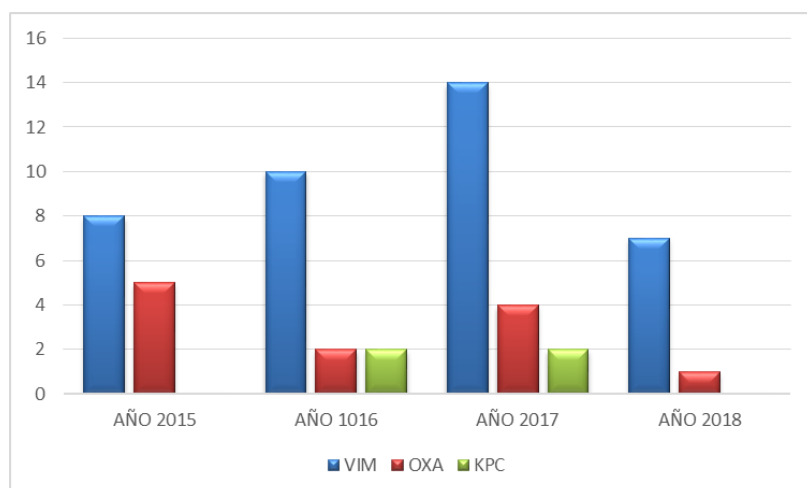


Figura 5. Tipos de carbapenemasas presentes en muestras del CAUSA desde 2015 hasta el primer trimestre de 2018.

Se han detectado carbapenemasas en 5 especies de enterobacterias; *Klebsiella pneumoniae* (17), *Serratia marcescens* (14), *Enterobacter cloacae* (12), *K. oxytoca* (11) y *Escherichia coli* (1). En la **Figura 6** se muestra el número y tipo de carbapenemasa producida por las distintas especies en los años de estudio.

En todas las especies se detectó la presencia de VIM. Las carbapenemasas de tipo serina sólo se observaron en *K. pneumoniae* (OXA-48), *S. marcescens* (OXA-48) y *K. oxytoca* (KPC).

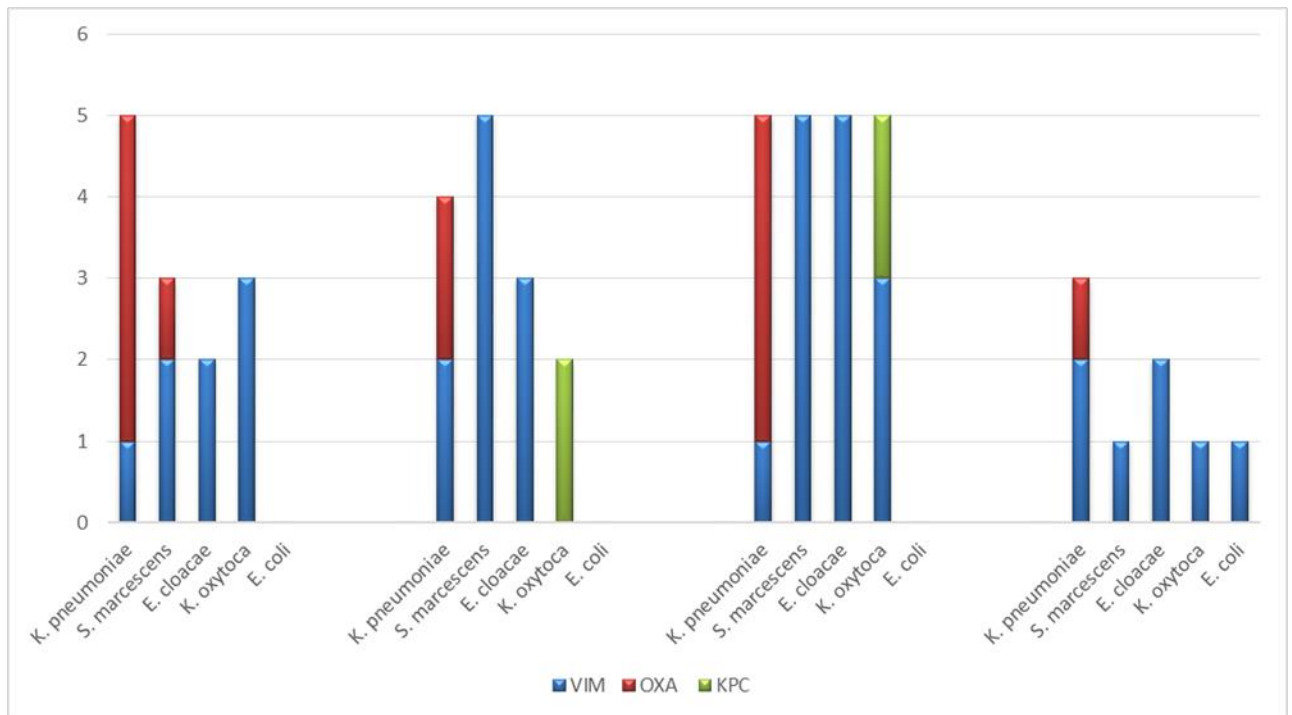


Figura 6. Tipos de carbapenemasas producidas por las diferentes EPC desde el año 2015 (izquierda) hasta el primer trimestre de 2018 (derecha).

Respecto a la asociación con otros mecanismos de resistencia, en nuestro estudio, 19 de las 55 EPC (34,54%), eran a su vez productoras de BLEE y la mayoría se asociaron al género *Klebsiella*, en especial a *K. pneumoniae* (12/19). Los datos globales se recogen en la **Tabla 2** y su distribución por años en las figuras: **Figura 7.1**, **Figura 7.2** y **Figura 7.3**.

Tabla 2. Coproducción de carbapenemasas y BLEE por las diferentes especies de EPC

2015 - PRIMER TRIMESTRE 2018						
	VIM		OXA-48		KPC	
	VIM	VIM + BLEE	OXA	OXA + BLEE	KPC	KPC + BLEE
<i>K. pneumoniae</i>	4	2	1	10	-	-
<i>K. oxytoca</i>	5	2	-	-	2	2
<i>S. marcescens</i>	12	1	-	1	-	-
<i>E. cloacae</i>	11	1	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	1	-	-	-	-	-
Total	33	6	1	11	2	2

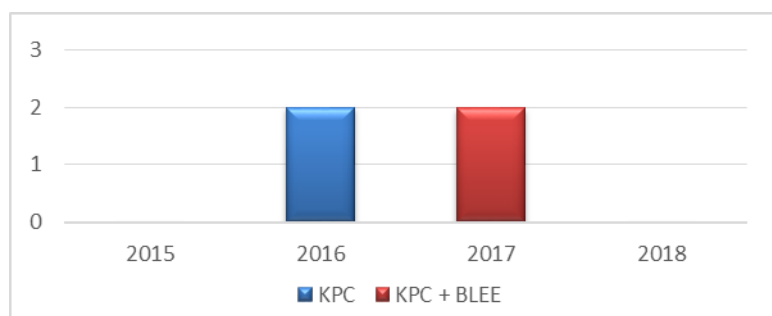


Figura 7.1. Recuento en los diferentes años de estudio de la producción de carbapenemasa tipo KPC y de la coproducción de KPC con BLEE.

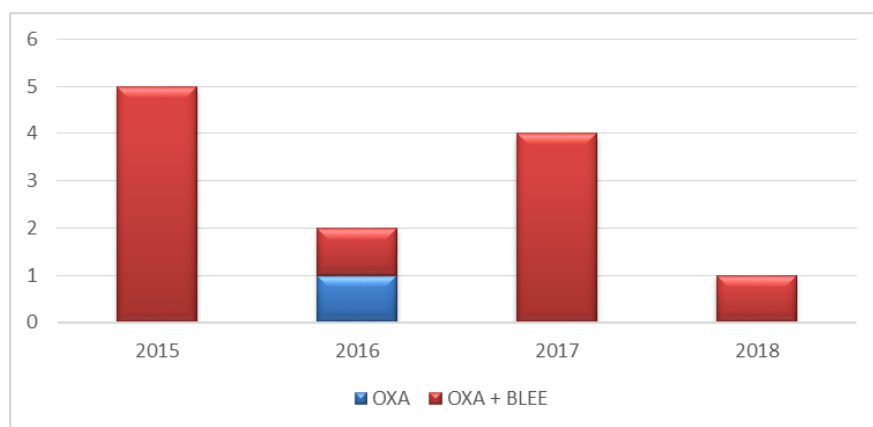


Figura 7.2. Recuento en los diferentes años de estudio de la producción de carbapenemasa tipo OXA-48 y de la coproducción de OXA-48 con BLEE.

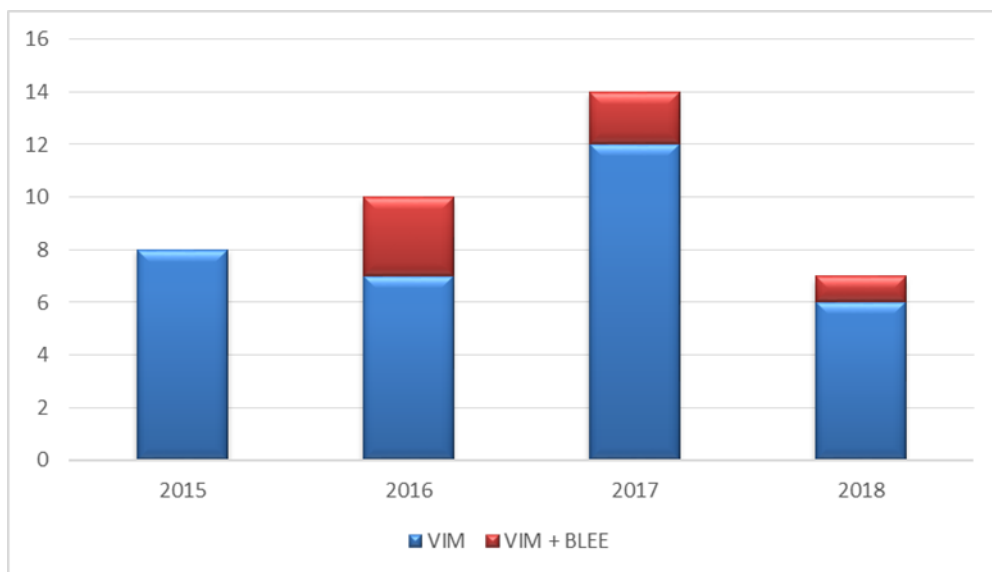


Figura 7.3. Recuento por años de la producción de carbapenemasas tipo VIM y de la coproducción de carbapenemasas VIM con BLEE.

En relación a las muestras clínicas en las que se aislaron las EPC, encontramos 20 cepas en estudios de colonización y 35 en pacientes con infección. Los cuadros clínicos fueron: bacteriemia (7), infecciones urinarias (6), infecciones de heridas (4) infecciones de drenajes (4), neumonías (4), infecciones óseas (2) y otros. La evolución año a año se muestra en la **Figura 8**.

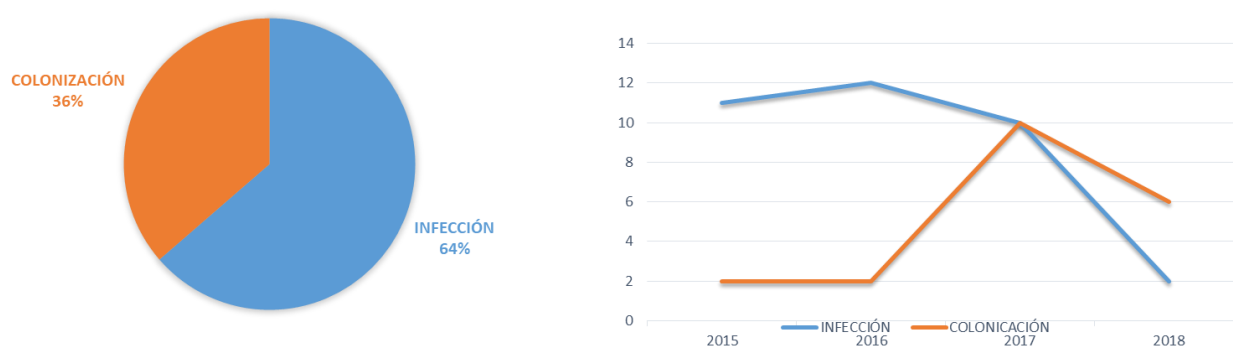


Figura 8. Porcentajes de colonización e infección por EPC y evolución de las mismas a lo largo de los años de estudio (2015-2018).

En cuanto al diagnóstico, y como se ha comentado previamente, se han utilizado tres cepas productoras de carbapenemasas de los tipos KPC, VIM y OXA-48 y una cepa control de *E. coli* sensible a carbapenémicos para valorar los diferentes métodos fenotípicos de detección de éstas enzimas.

El test de Hodge fue positivo en las tres cepas productoras de carbapenemasas, y negativo en la cepa control (**Figura 9**). En el primer caso, se observa claramente el crecimiento de *E. coli* con la imagen de hoja de trébol.

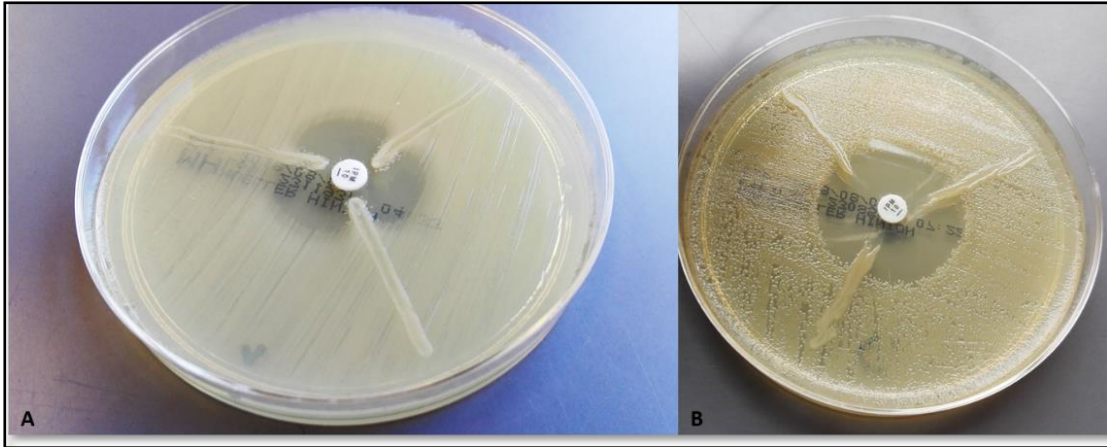


Figura 9. A, test de Hodge positivo. B, test de Hodge negativo.

Los mismos resultados se obtuvieron con β -CARBA-test (**Figura 10**). El ensayo fue positivo para las tres EPC, y negativo para la cepa control.

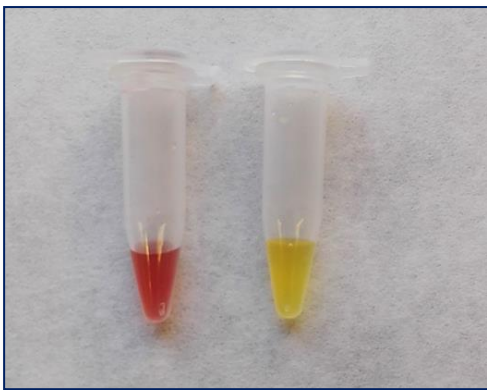


Figura 10. Resultado rojo, positivo, de una de las cepas productoras de carbapenemasas y resultado amarillo, negativo, de la cepa control.

En cuanto a los medios cromogénicos, se observa que las tres cepas crecen en la mitad de la placa y sólo la productora de OXA-48 lo hace en ambos lados de la placa (**Figura 11**). El color rojo en la placa donde se sembró la cepa control, no se considera positivo, sino que son restos de la muestra que quedan en la placa.

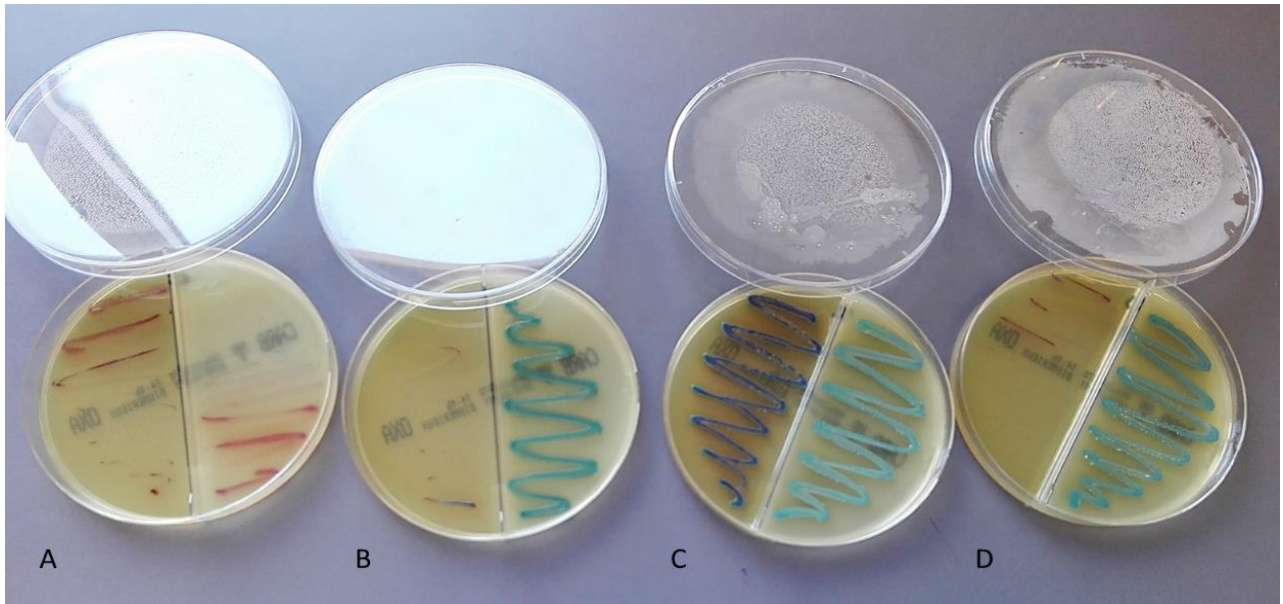


Figura 11. Resultados de la prueba cromogénica; A, negativo, corresponde a la cepa control. B, positivo para producción de carbapenemasas y negativo para producción de OXA-48, corresponde a la cepa productora de KPC. C, positivo para producción de carbapenemasas y para OXA-48, corresponde con la cepa productora de OXA-48. D, positivo para producción de carbapenemasas y negativo para producción de OXA-48, corresponde a la cepa productora de VIM.

En relación a la detección con los discos combinados con inhibidores, para la cepa productora de KPC se observa sensibilidad al meropenem + ácido borónico, lo que indica que, efectivamente, la cepa es productora de carbapenemasas de clase A. Para la cepa productora de OXA-48, observamos resistencia tanto al meropenem combinado con ácido borónico como al meropenem combinado con ácido dipicolínico. Además, presenta resistencia a temociclina, por lo cual se llega a la conclusión de que es, en efecto, una cepa productora de carbapenemasas tipo OXA. Para la cepa productora de VIM, se observa sensibilidad al meropenem + ácido dipicolínico, lo que indica que se trata de una cepa productora de carbapenemasas de clase B (**Figura 12**).

Los E-test se utilizaron para ver las CMIs de las cepas productoras de KPC y de VIM. Para las cepas productoras de OXA, este test no funciona. La **Figura 13** muestra los E-test observándose la disminución de la CMIs en el extremo de la tira que contiene el inhibidor.

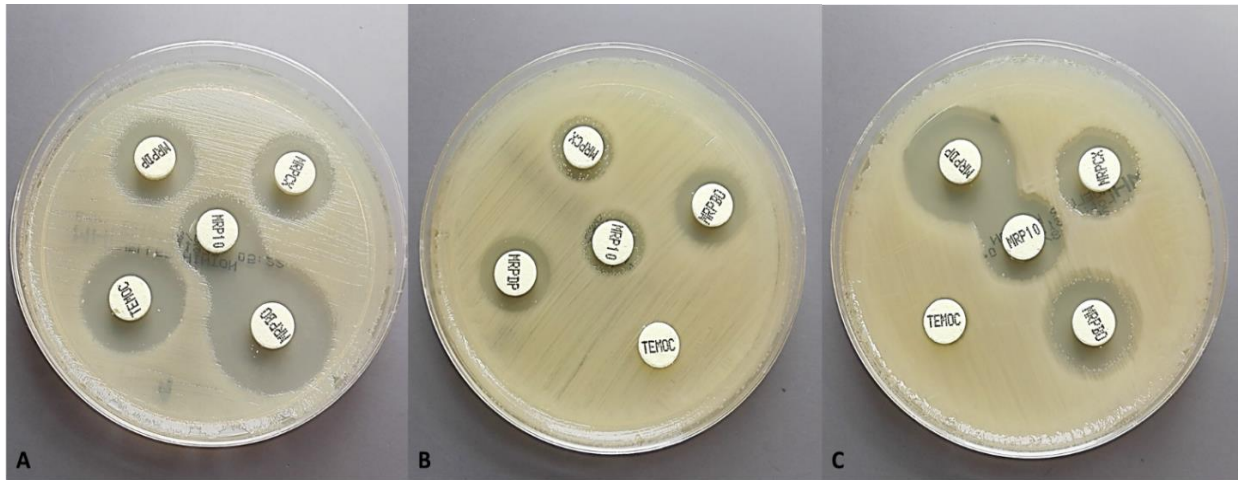


Figura 12. Halos de inhibición de la prueba de discos combinados con inhibidores para la cepa productora de KPC (A), la cepa productora de OXA-48 (B) y la cepa productora de VIM (C).

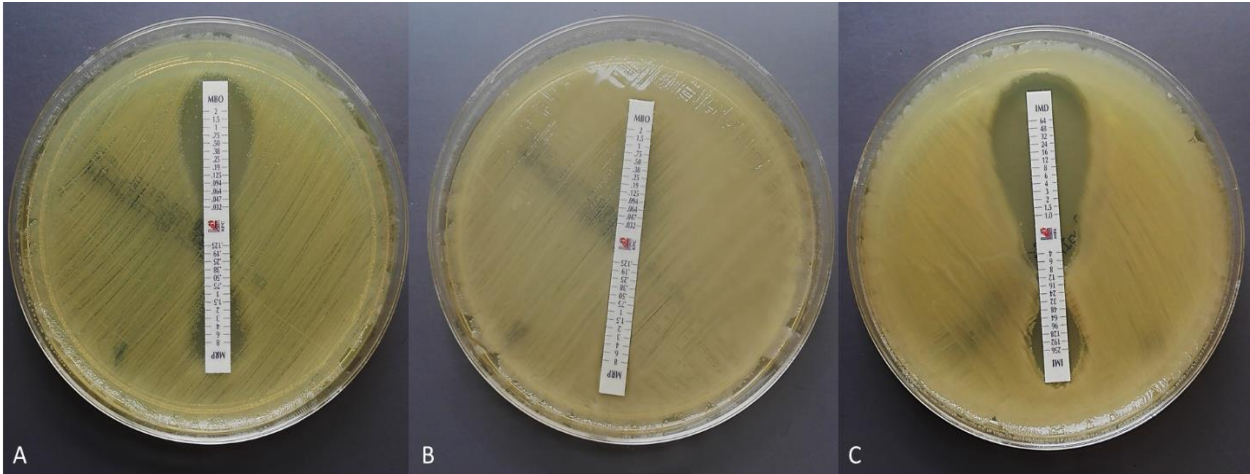


Figura 13. Prueba de E-TEST donde observamos CMI y halos de inhibición de la cepa productora de KPC (A), productora de OXA-48 (B) y productora de VIM (C).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En cuanto al análisis retrospectivo de las carbapenemasas aisladas en el CAUSA desde 2015 hasta el primer trimestre de 2018, se observa una tendencia ascendente en relación a la aparición de las mismas. En general predominan las metalo-carbapenemasas, en concreto las de tipo VIM en todo el periodo de estudio, mostrando además un incremento a lo largo de los años. La aparición de cepas productoras de OXA se mantiene constante y solo se observa la aparición de cepas KPC positivas a partir del año 2016.

Las carbapenemasas se detectaron en 5 especies de enterobacterias. La especie predominante fue *K. pneumoniae* (30,9%), seguida de *S. marcescens* (25,4%), *E. cloacae* (21,9%), *K. oxytoca* (20%) y *E. coli* (1,8%).

Destaca la producción de carbapenemasa tipo VIM por parte de *E. coli* en el primer trimestre de 2018 ya que es la primera vez que se aíslan en nuestro medio cepas de *E. coli* productoras de algún tipo de carbapenemasa. Esto podría ser preocupante, ya que las infecciones por *E. coli* son muy comunes no sólo en el hospital sino también en la comunidad. Las cepas productoras de KPC y de OXA-48 corresponden a enterobacterias de las especies *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, respectivamente. Aunque hay que señalar que en general éstas especies, así como el resto de las enterobacterias, producen con mayor frecuencia carbapenemasas de tipo VIM en nuestro ámbito.

En relación a la asociación de carbapenemasas y BLEE se percibe que conforme pasan los años, aparecen más cepas que combinan la producción de ambos tipos de beta-lactamasas. La asociación más frecuente se observa en las cepas productoras de OXA-48 con un 91,6%, seguidas de las productoras de KPC con un 50% y sólo el 15,3% de las enterobacterias VIM positivas producen también beta-lactamasas de la clase BLEE. Además esta doble producción enzimática se observa que va en aumento desde el año 2015. Como se ha comentado, esto es preocupante ya que las cepas con éste perfil son resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos (a veces sólo aztreonam permanece sensible) y con frecuencia a otras clases de antibióticos lo que limita las opciones terapéuticas a fármacos alternativos, más tóxicos y menos eficaces. En 2017, un informe de la OMS incluye a las EPC dentro de las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud en el hombre y la engloba en el grupo de “prioridad crítica” por su multirresistencia²³.

Con respecto al tipo de infección, la mayoría (64% de EPC) fueron aisladas de muestras de sangre y orina, seguidas de una amplia variedad de muestras como heridas, esputo, úlceras,

catéteres, etc. El 36% restante de EPC se obtuvieron en estudios de colonización. La detección de los pacientes colonizados o portadores de estas bacterias es esencial por el riesgo que tienen de desarrollar una infección invasiva y para evitar que las EPC se transmitan a otros pacientes o que colonicen superficies o materiales sanitarios. Así se impide que se diseminen en el hospital y produzcan brotes epidémicos²⁴. En los últimos años ha disminuido el número de infecciones respecto a las colonizaciones lo que apoya la eficacia de las medidas de vigilancia epidemiológica implantadas.

Comparando con lo que ocurre a nivel nacional, en un estudio realizado por Oteo y colaboradores²⁵ en 2013, con un total de 379 EPC procedentes de 83 hospitales españoles, concluyen que lo que más predomina son las cepas productoras de carbapenemasas de clase D (71,5%), siendo OXA-48 (95,2%) la más frecuente seguida de OXA-245, con una representación del 4,7%. Sin embargo, en Salamanca las carbapenemasas tipo OXA-48 son las segundas en frecuencia. Se encuentran representadas en un 21,8% desde el año 2015 hasta el 2017. Todas ellas pertenecientes al tipo OXA-48, y no se han encontrado OXA-245.

A nivel nacional, las segundas más prevalentes son las carbapenemasas de clase B (metalo-beta-lactamasas), con un 25,3%. De esas metalo-beta-lactamasas, la mayoría son de tipo VIM (96 cepas aisladas), pero también se encuentran las de tipo IMP (6 cepas aisladas). En el CAUSA, la mayoría de las cepas productoras de carbapenemasas son de tipo VIM. Forman en promedio el 70,9% de todas las EPC aisladas. Además, las metalo-beta-lactamasas de tipo IMP no se han encontrado en Salamanca.

Finalmente, a nivel de España, las cepas productoras de KPC son las menos frecuentes, al igual que ocurre en el CAUSA. En el estudio de Oteo y colaboradores representan el 2,1%, habiéndose encontrado tan solo 8 cepas. En el CAUSA se encuentran 4 carbapenemasas de tipo KPC, representando el 7,3% del total de carbapenemasas.

En cuanto a las diferentes especies de EPC aisladas a nivel nacional, predominan *K. pneumoniae* (74,4%), *E. cloacae* (10,3%), *E. coli* (8,4%), *K. oxytoca* (2,9%), *Citrobacter freundii* (1,8) y *S. marcescens* (1,1%). En el CAUSA también prevalecen las EPC de la especie *K. pneumoniae* pero con un porcentaje menor (30,3%). Comparado con los aislamientos del estudio nacional, los porcentajes de *E. cloacae* (21,8%), *K. oxytoca* (20%) y *Serratia marcescens* (25,4%) fueron superiores y los de *E. coli*, (1,8) inferiores. Todas estas diferencias posiblemente se deben a que en el CAUSA predominan las carbapenemasas tipo VIM, producidas por un amplio abanico de

enterobacterias, mientras que, a nivel nacional, predominan las OXA-48, enzima sintetizada en su mayoría por *K. pneumoniae*.

En cuanto a la coproducción de carbapenemasas con beta-lactamasas de espectro extendido, a nivel nacional, del total de cepas productoras de carbapenemasas, 70,4% fueron su vez productoras de BLEE. De estas, la mayoría producen BLEE junto con OXA-48, con menor frecuencia se asocian a VIM y rara vez con cepas productoras de KPC. En el CAUSA, observamos un menor porcentaje de coproducción de BLEE junto con carbapenemasas, de 34,5%. La diferencia de porcentaje se debe a que la mayoría de cepas productoras de BLEE son a su vez productoras de OXA-48, las cuales no son tan frecuentes en Salamanca. De las más frecuentes aquí, carbapenemasas VIM, tan solo 6 de las 39 producen BLEE. No obstante, comparando año a año, se ve un claro aumento de aparición de cepas BLEE en el CAUSA. En ambos estudios *K. pneumoniae* fue la especie que más coproducía ambas beta-lactamasas.

A nivel nacional, es más frecuente encontrar EPC en infecciones (79,2%) que en colonizaciones (20,8%), y, las infecciones más comunes son las del tracto urinario, seguidas de infecciones cutáneas, respiratorias, sangre y otras. Igualmente, en Salamanca son más frecuentes las infecciones, predominando las bacteriemias y las infecciones urinarias. Sin embargo, en el transcurso de los años, se encuentran más EPC aisladas de colonizaciones que de infecciones, debido a la búsqueda activa de pacientes colonizados para evitar brotes epidémicos²⁴. El hecho de que en el primer trimestre del 2018 encontremos tan solo 2 infecciones frente a 6 colonizaciones indica que las medidas de detección temprana y de prevención están siendo adecuadas, por lo que en nuestro medio no se han producido brotes epidémicos²⁶.

Comparando los diferentes métodos fenotípicos para la detección de cepas productoras de carbapenemasas:

- Test de Hodge: Indica la presencia de cepas productoras de carbapenemasas pero presenta limitaciones en cuanto a que no especifica el tipo. Es un método sencillo de realizar y fácil de interpretar. Es útil para comenzar con la detección pero requiere pruebas adicionales.
- β -CARBA-test: Es un método de detección de cepas productoras de carbapenemasas que tampoco diferencia en cuanto al tipo pero que es muy útil debido a su rapidez. El resultado se obtiene en tan solo 30 minutos y es fácil de interpretar.
- Métodos cromogénicos: Indican de forma sencilla la presencia de cepas productoras de carbapenemasas y, a mayores, la producción de OXA-48, que es la más difícil de detectar

por no tener inhibidor propio. Sin embargo, no diferencia entre los demás tipos de carbapenemasas por lo que, en determinados casos, requiere pruebas adicionales.

- Discos combinados con inhibidores: Una vez detectada la cepa productora de carbapenemasa, este método es muy útil para diferenciar el tipo de carbapenemasa, al presentar inhibidores para carbapenemasas de clase A y de clase B. Además, permite detectar otro tipo de beta-lactamasas como AmpC.
- E-test: Permite ver las CMI's y detectar carbapenemasas de clase A y B, pero, como limitación, encontramos que no es válido para las de tipo OXA (clase D).

CONCLUSIONES:

- En nuestro medio, la frecuencia de aislamientos de EPC ha aumentado en los últimos años.
- La carbapenemasa más prevalente es la metalo-beta-lactamasa de tipo VIM.
- *Klebsiella pneumoniae* es la enterobacteria que con mayor frecuencia produce carbapenemasas.
- Es frecuente la asociación de las carbapenemasas tipo OXA-48 con betalactamasas de espectro extendido (BLEE).
- El porcentaje de pacientes colonizados por EPC en el 2018 ya es superior al de infectados.
- El Test de Hodge es el indicado para detectar la presencia de EPC de forma efectiva, sin embargo, si se requiere rapidez en el diagnóstico, el uso del β -CARBA-test es el más adecuado.
- Para diferenciar el tipo de carbapenemasa producida, la inhibición de la actividad de la enzima con inhibidores selectivos mediante discos o tiras de E-test son los más efectivos.
- La forma más rápida y eficaz de detección de carbapenemasas tipo OXA-48 es la utilización de medios (placas) cromogénicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. *Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos*. 2016. Who Library Cataloguing in Publication Data, 1–30. doi.org/ISBN 978 92 4 3509761.
2. Alos, JI. *Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2015;33(10):692-699.
3. Martínez J L, Baquero F. *Emergence and spread of antibiotic resistance : setting a parameter space*. *Ups J Med Sci*. 2014;119 (2) 68-77.
doi.org/10.3109/03009734.2014.901444.
4. Munita JM, Arias, CA. *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. *Microbiol Spectr*. 2016 April; 4(2): doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
5. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. *Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes*. *Rev Esp Quimioter*.2016;29(Suppl.1):21-25.
6. Organización Mundial de la Salud. *Resistencia a los antibióticos ¿cómo se propaga?*. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/Spanish_WHO_HWC_infographics_howitspreads_low-res.pdf?ua=1 7.
7. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. *Resistance mechanisms*. *Ann Transl Med*.2016;4 (17): 326. doi: [10.21037 / atm.2016.09.14](https://doi.org/10.21037/atm.2016.09.14).
8. Martinez L, Calvo J. *Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(Suppl. 4):4-9.
9. OMS. *Aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos*. Centro de prensa. www.who.int/drugresistance/AMR_Emergence_Spread/es/ [Acceso: 12-2-17].
10. Bus K, Bradford PA. *β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6:a025247.
11. Suarez C, Gudiol F. *Antibióticos betalactámicos*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:116-129. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001.
12. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, et al. *La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(10):666–670.
13. Garcia-Hernandez A. M., Garcia Vazquez, E., Hernandez-Torres A., Ruiz J., Yague G., Herrero J. A. et al. *Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de*

- espectro extendido (BLEE) significacion clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter.*2011;24(2):57-66.
14. Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. *Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology.* Curr Issues Mol Biol.2015;17:11. doi.org/10.1016/B978-1-4377-1738-9.00102-X.
 15. Paterson DL, Bonomo, RA. *Extended-Spectrum -Lactamases: a Clinical Update.* Clin Microbiol Rev.2005; 18:657–686. doi:10.1128/cmr.18.4.657–686.2005.
 16. CLSI/NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement.* Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. M-100-S25.
 17. Duin D, Doi Y. *The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.* Virulence. 2017; 8(4)460–469. doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343.
 18. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tasiou P, Daikos GL. *Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions.* Clin. Microb. Rev. 2012; 25:682-707 doi10.1128 / CMR.05035-11.
 19. Cercenado E. *Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio.* Rev Esp Quimioter 2015; 28 (Suppl.1):8-11.
 20. Navarro F, Calvo J, Cantón R, et al. *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos.* Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(7):524–534.
 21. Lutgring JD, Limbagob, BM. *The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant- Enterobacteriaceae Detection.* J Clin Microbiol. 2016;54:529-534. doi: 10.1128 / JCM.02771-15.
 22. KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit. Rosco Diagnóstica A/S.
 23. OMS. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research.* Centro de prensa. Disponible en: www.who.int/.../WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_W. Acceso [17-11-17].
 24. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). *Protocolo de vigilancia y control de microorganismos multirresistentes o de especial relevancia clínico-epidemiológica (Protocolo MMR).* Madrid, 2016. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-procedimientos/pdf_2016/Protocolo-MMR.pdf.
 25. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, et al, on behalf of GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI. *Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83*

*hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. Antimicrob Agents Chemother.*2015;59(6):3406-3412.

26. *Programa para el control de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en el SSPA.* Julio 2014. Programa PIRASOA. Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales. Disponible en: http://safh.org/wp-content/uploads/2014/10/Programa-para-el-control-de-las-EPC_SSPA.pdf.