

“DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO MIGUEL SERVET EN UN PERIODO DE DOS AÑOS Y CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA COMPLEMENTARIOS”

Trabajo de Fin de Máster

Máster de Iniciación a la Investigación en Medicina

Directores:

Ana Isabel López Calleja

Antonio Rezusta López

Francisco Javier Castillo García

Marta María Gómara Lomero



Universidad
Zaragoza

2015



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN	8
1.Estado de la cuestión y dimensión del problema	8
2. Epidemiología	9
2.1 Situación mundial	9
2.2 Situación en Europa	10
2.3 Situación en España	13
2.4 Situación en Aragón	15
3. Implicaciones clínicas.....	17
4. Mecanismos de resistencia adicionales.....	19
4.1 Betalactamasas de espectro extendido	20
4.2 Cefalosporinasas de tipo AmpC	21
4.3 Disminución en la permeabilidad de porinas	23
5. Diagnóstico microbiológico.....	23
5.1 Cribado de cepas	24
5.2 Medios de cultivo específicos para el cribado de portadores	25
5.3 Métodos fenotípicos.....	25
5.4 Métodos basados en proteómica.....	26
5.5 Métodos moleculares	26
OBJETIVOS.....	28
1.Objetivo principal	28
2.Objetivos específicos	28

MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica	29
2. Selección de aislamientos y criterios de inclusión	29
3. Métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia	30
3.1 Detección fenotípica de carbapenemasas	30
3.2 Detección fenotípica de BLEE	31
3.3 Detección fenotípica de AmpC.....	31
4. Métodos genotípicos	31
4.1 Detección genotípica de carbapenemasas	31
4.2 Detección genotípica de BLEE	32
4.3 Detección genotípica de AmpC	33
5. Recopilación y Análisis de datos.....	34
RESULTADOS.....	35
1.Aislados incluidos	35
1.1Test fenotípicos	35
1.2 Test genotípicos	40
2.Datos epidemiológicos y distribución por pacientes	45
3.Datos clínicos de los pacientes con EPC.....	46
4.Datos microbiológicos	48
5.Sensibilidad antibiótica.....	51
DISCUSIÓN	53
1.Diagnóstico microbiológico problemático	53
2.Estudio de sensibilidad	55
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS.....	67

ABREVIATURAS

AmpC: Cefalosporinasa de tipo AmpC

BLEE: β -lactamasas de espectro extendido

CDC: "Centers for Disease Control and Prevention"

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CNM: Centro Nacional de Microbiología

DPA: ácido dipicolínico

E: Especificidad

EARS-Net: "European Antimicrobial Resistance Surveillance Network"

ECDC: "European Centre for Disease Prevention and Control"

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEE: Espacio Económico Europeo

EPC: Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas

EUCAST: "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet

I: Intermedio

IMP: "active on imipenem" metalobetalactamasa

KPC: "*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase".

MALDI-TOF: "Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight"

MBL: Metalobetalactamasa

NDM: New Delhi metalobetalactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OXA: "Oxacillin-hydrolyzing"

pAmpC: Cefalosporinasa de tipo AmpC plasmídica

PBA: Ácido borónico

PBP: "Penicillin binding protein"

PVRA-CNM: Programa de Vigilancia del Centro Nacional de Microbiología

R: Resistente

S: Sensibilidad

UE: Unión Europea

VIM: "Verona integrated metalobetalactamase".

VPP: Valor Predictivo Positivo

VPN: Valor Predictivo Negativo

RESUMEN

Durante los últimos años se ha producido la aparición y dispersión de enterobacterias productoras de enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo los antibióticos carbapenémicos. Estas enzimas, denominadas genéricamente carbapenemasas, pertenecen a las clases A, B y D de Ambler, donde se incluyen las tipo KPC, VIM y OXA.

En nuestro ámbito sanitario esto supone una grave amenaza para la salud de los pacientes y para la salud pública, ya que las infecciones producidas por estas cepas están asociadas a unas elevadas tasas de mortalidad y tienen una amplia capacidad de diseminación intra e interhospitalaria. Con frecuencia las cepas productoras de carbapenemasas presentan resistencia a otras familias de antibióticos, lo cual limita de manera importante las opciones terapéuticas y dificulta su control.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar de forma retrospectiva la presencia de carbapenemasas en enterobacterias aisladas en el HUMS en los últimos dos años (2013-2014), así como caracterizar otros mecanismos de resistencia adicionales (producción de BLEE, AmpC) que también pueden producir, en combinación con la pérdida de porinas, sensibilidad disminuida a los carbapenémicos.

Se seleccionaron aquellos aislados con CMI elevada a ertapenem ($\geq 0,5$ mg/l), imipenem (≥ 1 ó ≥ 2 mg/l según panel de sensibilidad antibiótica empleado) o meropenem (≥ 1 mg/l) detectadas por microdilución (MicroScan WalkAway Siemens) y/o con halos de inhibición < 25 mm para meropenem y/o ertapenem ó < 23 mm para imipenem. La detección fenotípica de carbapenemasas, BLEE y AmpC se realizó mediante prueba de discos combinados, y la confirmación molecular mediante PCR convencional múltiple.

En total se identificaron 88 aislados con pérdida de sensibilidad a carbapenems durante el periodo 2013-2014. Las especies de *Enterobacteriaceae* más prevalentes fueron *Enterobacter* spp. (33%, n=29), seguido de *Klebsiella* spp, (20%, n=18) y *Escherichia coli* (18%, n=16). De los 63 aislados estudiados molecularmente, dos se confirmaron por PCR como productores de carbapenemasa tipo OXA-48 (*Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter koseri*), el 39,6% (25/63) se confirmaron como productores de BLEE y el 14,2% (9/63) como productores de AmpC).

La implantación de técnicas moleculares de confirmación es imprescindible para un correcto diagnóstico microbiológico. Por el momento se han detectado dos casos de *Enterobacteriaceae* Productoras de Carbapenemasa (EPC) en nuestro hospital (OXA-48), autolimitados y sin propagación para otros pacientes. Sin embargo, dada la situación existente en otras zonas de España y la fácil y rápida diseminación de estas cepas es necesario seguir reforzando la vigilancia de EPC.

INTRODUCCIÓN

1. Estado de la cuestión y dimensión del problema

La resistencia antibiótica supone una seria amenaza para la salud pública. Durante los últimos años se ha producido un importante aumento de microorganismos multirresistentes a múltiples antibióticos, hasta convertirse en una emergencia sanitaria según todas las agencias internacionales de salud, llegando a diseñar programas de vigilancia y optimización del uso de antimicrobianos, y promocionando medidas para el control de las infecciones (ECDC Surveillance Report 2014).

En EEUU se estima que más de dos millones de personas enferman cada año debido a infecciones producidas por microorganismos resistentes a antibióticos, produciendo al menos unas 23.000 muertes. (CDC Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013).

Las enterobacterias son una de las familias bacterianas que presentan con más frecuencia resistencia antibiótica. El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es el enzimático, debido a la producción de β -lactamasas. Entre estas enzimas, las que han tenido una mayor relevancia clínica en la primera década del siglo XXI por su perfil hidrolítico y prevalencia son las que generan resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las β -lactamasas del tipo AmpC; en ambos casos los antibióticos carbapenémicos, como son el imipenem, el meropenem, el doripenem y el ertapenem, mantienen su actividad (Oteo *et al.* 2013).

Sin embargo, en los últimos años se ha producido la aparición y dispersión de enterobacterias productoras de enzimas, denominadas genéricamente

carbapenemasas, que confieren resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos incluidos los carbapenems (Oteo *et al.* 2013).

Con frecuencia las cepas productoras de carbapenemasas presentan corresistencias a otras familias de antibióticos no β -lactámicos, por lo que es habitual la existencia de casos de resistencia extensa (aislado no sensible al menos a un agente en todas categorías de antimicrobianos excepto en dos) o panresistencia (resistencia a todos los agentes antimicrobianos), según las definiciones de Magiorakos *et al.* 2012. Frente a estos casos las opciones terapéuticas están muy limitadas.

Las enterobacterias productoras de estas enzimas se han convertido en un problema clínico y de salud pública emergente, en continua evolución y con una alta velocidad de diseminación intra e interhospitalaria, de difícil control y tratamiento (Com. de Madrid, 2013).

2. Epidemiología

2.1 Situación mundial

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han detectado casos de EPC en todas las regiones de la OMS (Figura 1, tomada de Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014, OMS), superando el 50% de casos publicados en dos zonas (Europa y zona mediterránea del este).

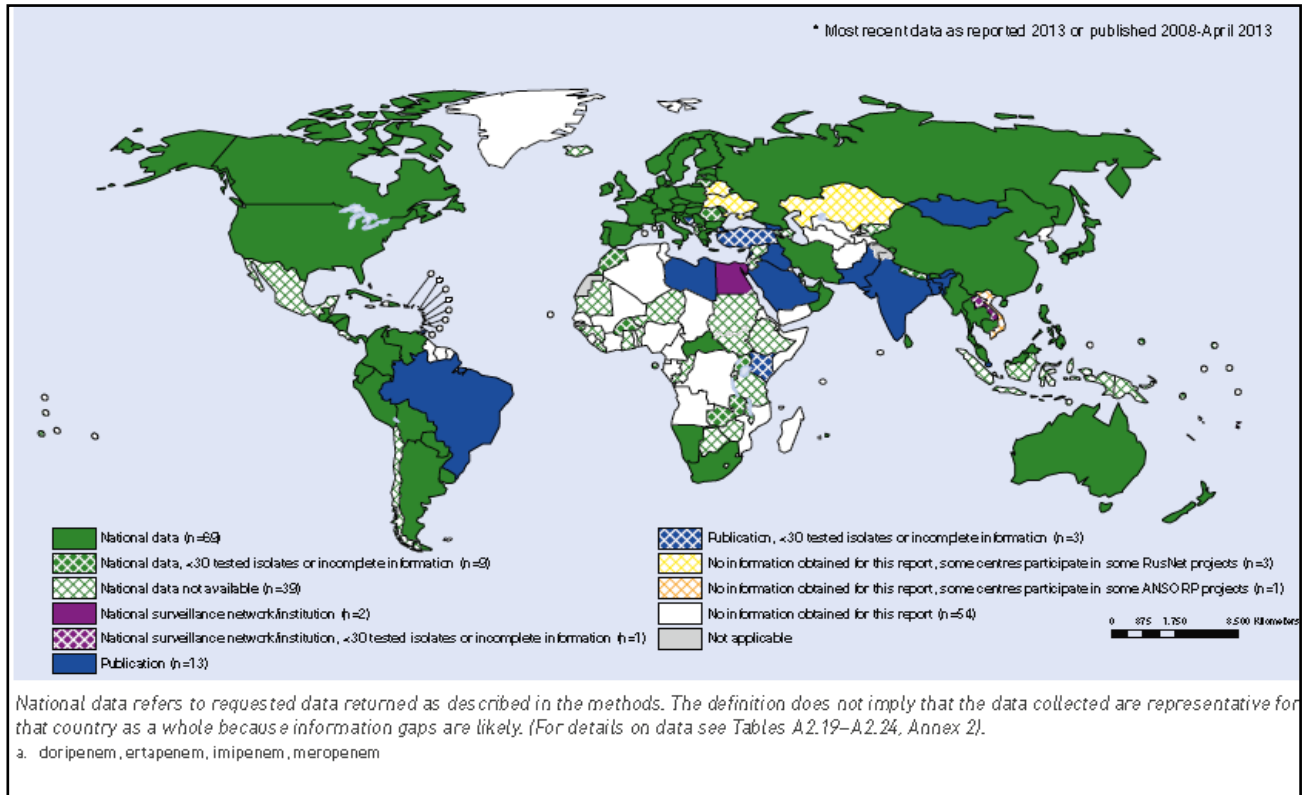


Figura 1. Fuentes de datos sobre *K pneumoniae* y resistencia a carbapenems.

Tomado de: WHO "Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014", disponible en <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

2.2 Situación en Europa

Durante los últimos cuatro años, se ha producido un incremento significativo en la resistencia combinada a múltiples antibióticos en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* en más de un tercio de los países de la UE/EEE. (Annual epidemiological report, ECDC 2014)

EARS-Net es la red oficial europea coordinada por el ECDC para la vigilancia, estudio y control de la resistencia a antibióticos en patógenos invasivos. Según el informe anual presentado en 2012, la resistencia de *E. coli* a carbapenems continúa siendo baja en Europa (0.1%), oscilando según porcentajes nacionales de un 0 a un 2,6% (Bulgaria); si bien es cierto que en el 2013 el porcentaje va en aumento (Figura 2). Del mismo modo pero con cifras más alarmantes, los aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems han experimentado una

significativa tendencia al aumento desde el año 2009 hasta el 2012, con porcentajes que van de 0 (7 países) hasta un 60.5% (Grecia) (Figuras 3 y 4).

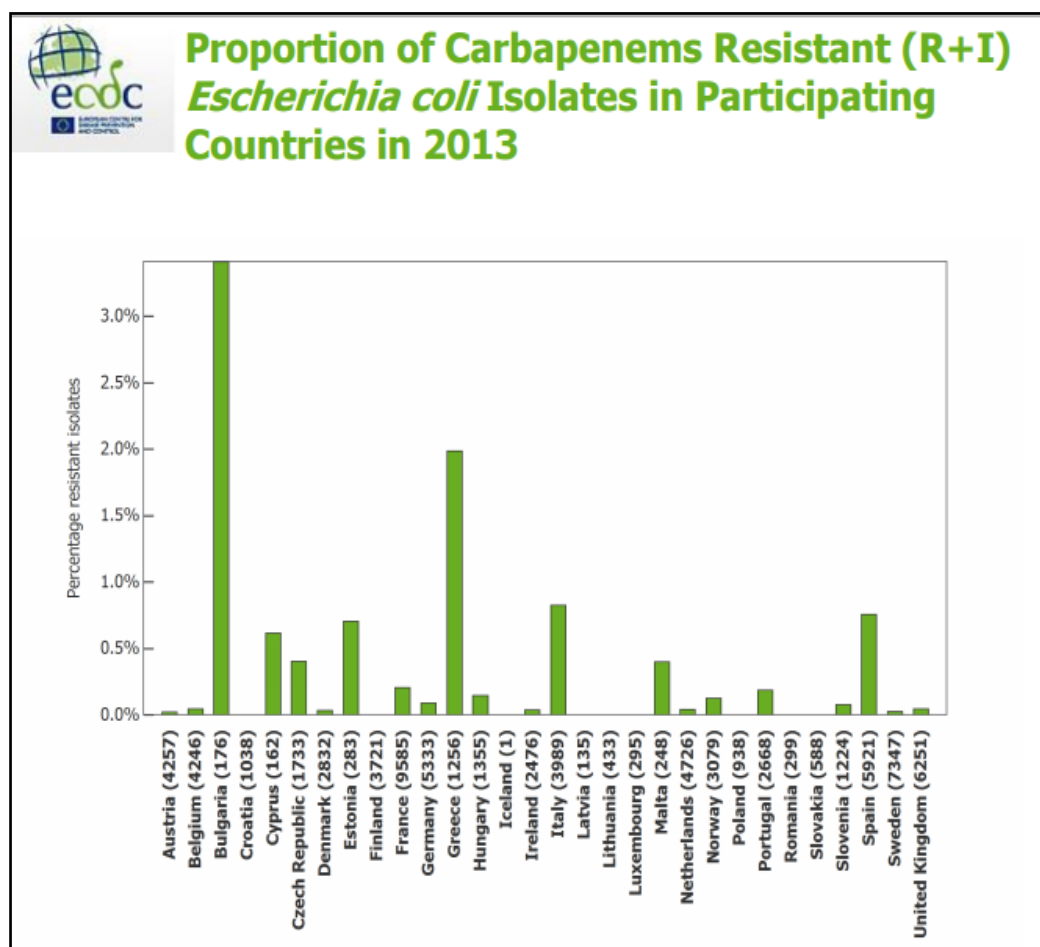


Figura 2. Proporción de aislados *E. coli* no sensibles a carbapemens (R+I) entre los países participantes en 2013.

Tomado de ECDC, EARS-Net 2013. Disponible en:

http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/graph_reports.asp

x

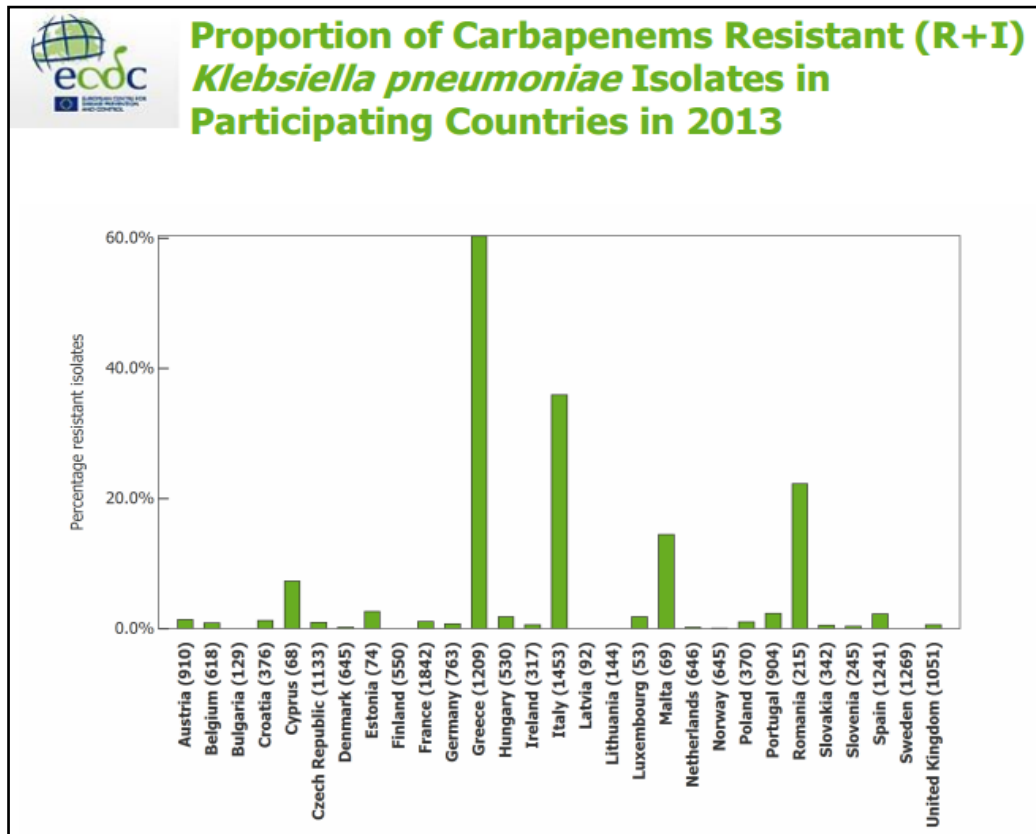


Figura 3. Proporción de aislados *K. pneumoniae* no sensibles a carbapenems (R+I) entre los países participantes en 2013.

Tomado de ECDC, EARS-Net 2013. Disponible en:

http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/graph_reports.aspx

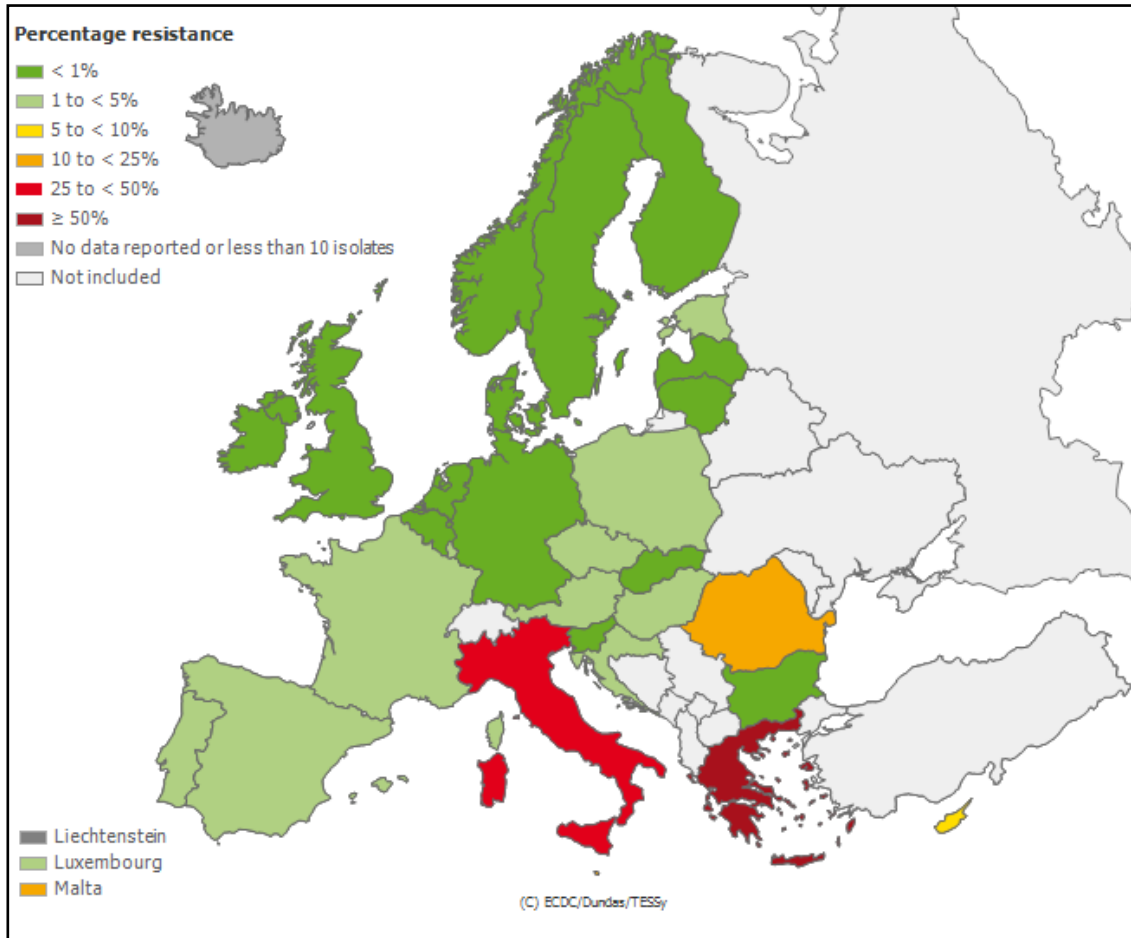


Figura 4. Proporción de aislados *K. pneumoniae* no sensibles a carbapenems (R+I) entre los países participantes en 2013.

Tomado de ECDC, Annual epidemiological report. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections 2014.

2.3 Situación en España

En el año 2005 se describió por primera vez la producción de carbapenemasas en enterobacterias en España, una cepa Metallo- β -lactamasa (MBL) del tipo VIM-1. En los años posteriores se detectaron casos esporádicos y algún brote aislado de enterobacterias productoras de MBL, principalmente VIM e IMP. Sin embargo, durante los últimos años la situación ha cambiado drásticamente, con un aumento global de los casos detectados, principalmente en *K. pneumoniae*, seguida de *Enterobacter* spp., con un incremento del tipo de carbapenemasas y

con un número mayor de hospitales afectados por grandes brotes a lo largo de la geografía española (Oteo *et al.* 2014).

Las últimas publicaciones del Centro Nacional de Microbiología (CNM) muestran un aumento de estos aislados en nuestro país.

- Hasta abril de 2009 no se describió el primer caso de carbapenemasa OXA-48. Desde entonces se han producido grandes brotes y casos aislados de enterobacterias, fundamentalmente *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 en varias hospitales de la geografía española, representando el mayor porcentaje de EPC en España según el proyecto EuSCAPE presentado en el 2014 (Aracilet *al.*2014). En un trabajo reciente (Ortega *et al.* 2014) se confirma además el aumento de los aislamientos de *E. coli* productores de carbapenemasas, principalmente OXA-48.
- La aparición de la carbapenemasa KPC en 2010, aunque se mantiene en una prevalencia globalmente baja, está produciendo importantes brotes. Según los datos obtenidos por el Programa de Vigilancia del Centro Nacional de Microbiología (PVRA-CNM), las enterobacterias productoras de KPC, principalmente *K. pneumoniae* productora de KPC-2, están aumentando en los últimos años en España. La principal causa de dicho aumento es la diseminación clonal interhospitalaria de determinados clones exitosos de *K. pneumoniae* (Oteo *et al.* 2015).
- La detección de cepas aisladas productoras de NDM-1 se han relacionado con una estancia previa en la India. (Gil-Romero *et al.*2012).
- Se ha registrado un aumento significativo de hospitales que comunican casos de enterobacterias productoras de carbapenemasas. En 2009, el PVRA-CNM recibió cepas procedentes de 6 hospitales, mientras que en 2012 las recibió de 30(Oteo *et al.* 2013).

- Paralelamente al incremento de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el medio hospitalario, se está produciendo un aumento de su detección en pacientes extrahospitalarios, lo que aumenta el riesgo de una rápida diseminación en la comunidad (Oteo *et al.* 2013).

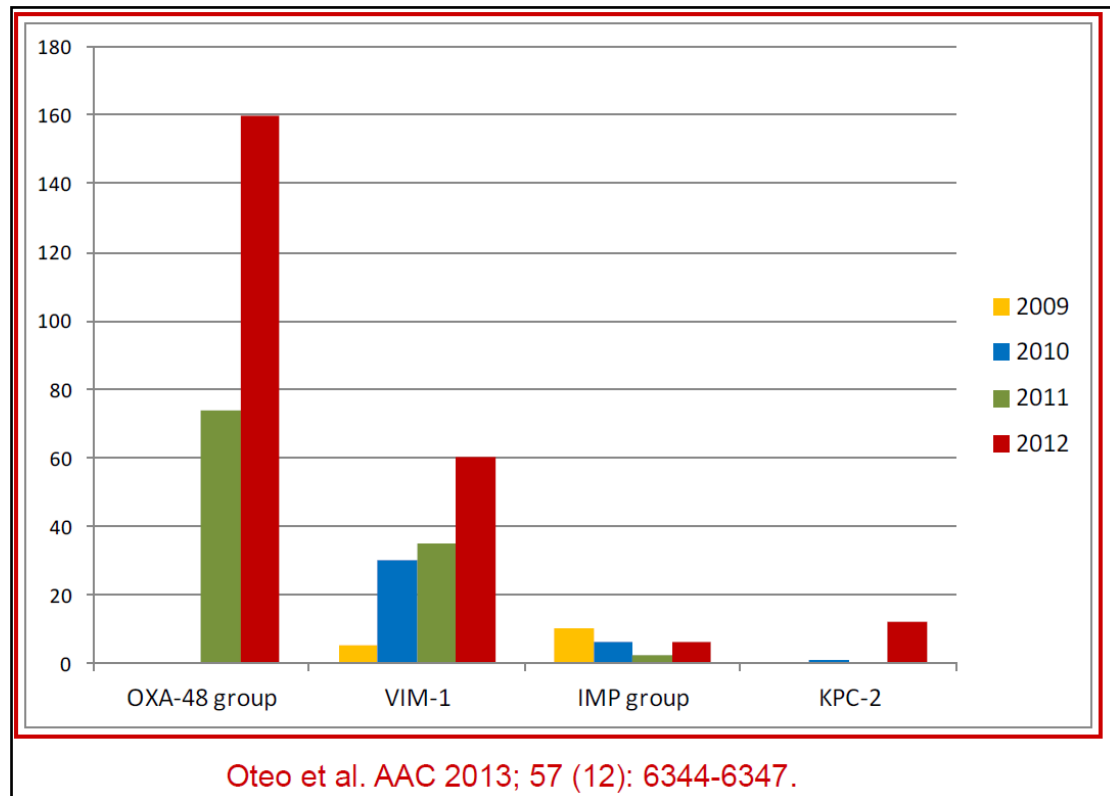


Figura 5. Tendencia evolutiva (2009-2012) de aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasas en España según el Programa de Vigilancia del CNM (ISCIII)

Tomado de: Oteo *et al.* 2013.

2.4 Situación en Aragón

Según el Estudionacional GEIH/GEMARA/REIPI sobre Enterobacterias productoras de carbapenemasas (Oteo *et al.* 2013), en la Comunidad Autónoma de Aragón no se había producido ningún caso de EPC hasta el año 2013.

Revisando la bibliografía, no se encuentran otras publicaciones sobre detección de EPC en nuestra comunidad hasta este último año (Bueno *et al.* 2015), donde

concluyen que el porcentaje de EPC es menor que en otras regiones españolas (0.044%) y detectan genes codificantes de MBL en 9 cepas de enterobacterias.

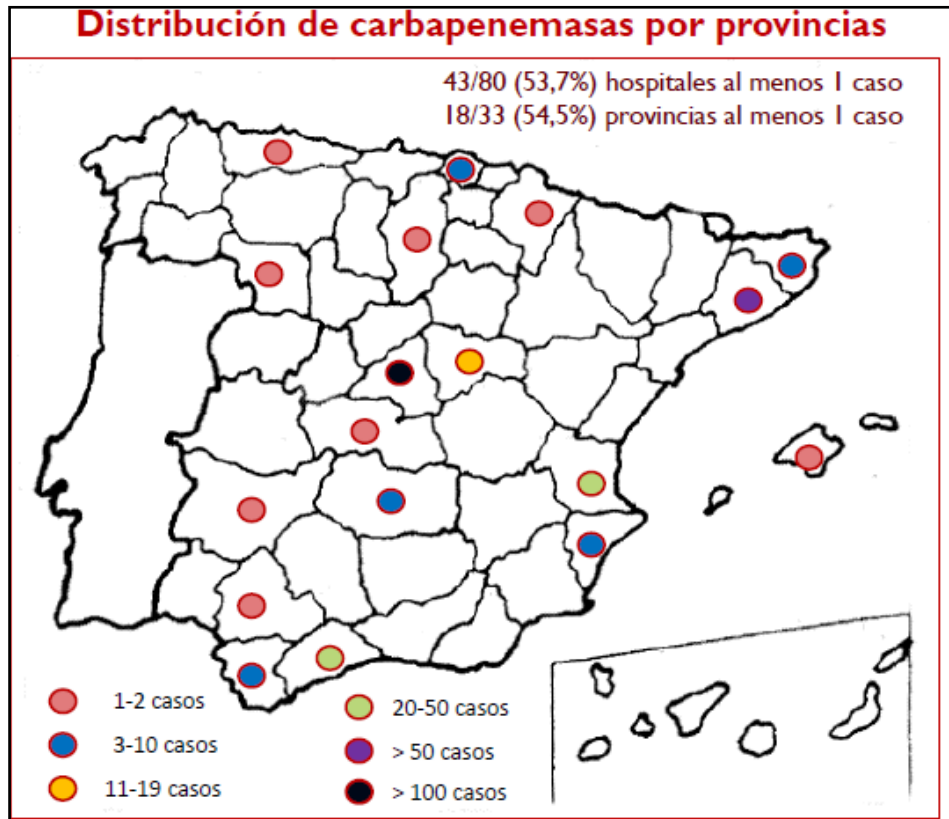


Figura 6. Distribución de carbapenemasas por provincias.
Tomado de: Oteo et al. 2013.

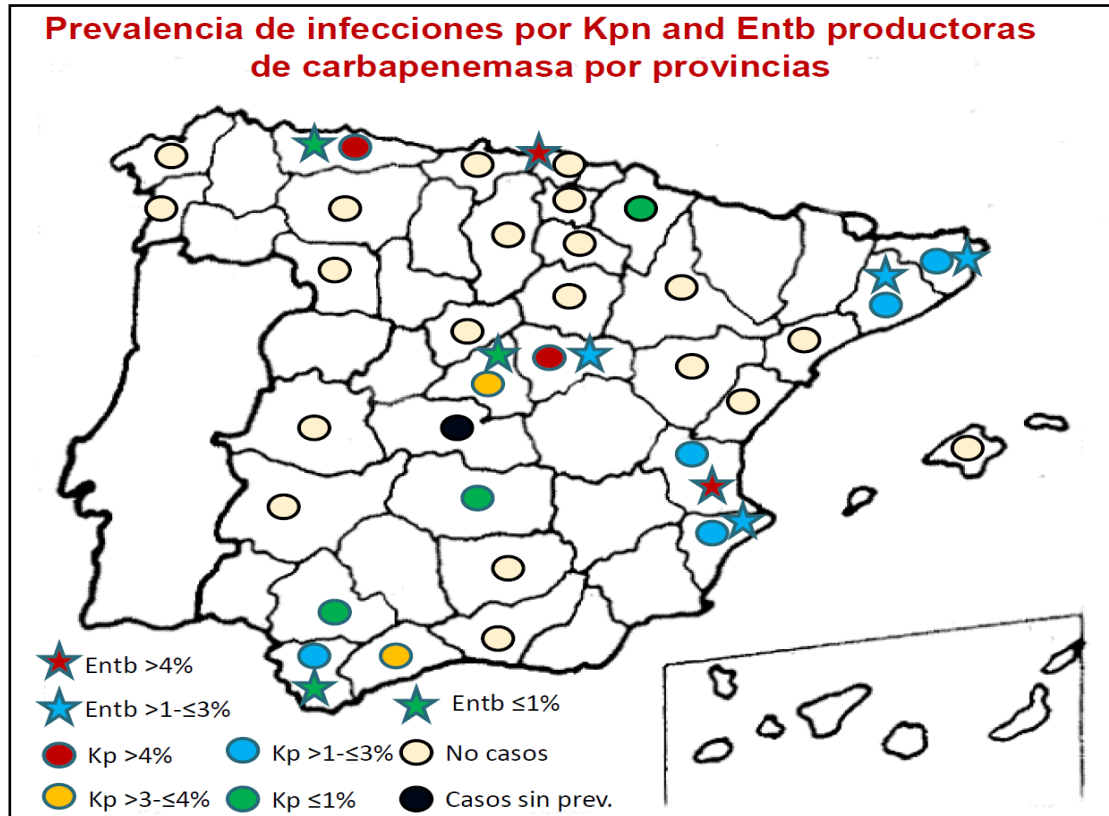


Figura 7. Prevalencia de infecciones por *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp productoras de carbapenemasas por provincias.

Tomado de: Oteo *et al.* 2013

3. Implicaciones clínicas

Existen dos tipos de clasificación de β -lactamasas, según dos propiedades: una funcional y otra molecular (Queenan *et al.* 2007)

La clasificación funcional divide a las β -lactamasas en cuatro grupos, de acuerdo a sus tasas de hidrólisis para un amplio espectro de sustratos β -lactámicos y sus perfiles de inhibición. Dentro de esta clasificación, las carbapenemasas se encuentran en el subgrupo 2f y grupo 3 (Queenan *et al.* 2007).

La clasificación molecular se determina por la homología entre aminoácidos, dividiendo a las β -lactamasas en cuatro grupos bien correlacionados con la clasificación funcional pero sin tener en cuenta la capacidad enzimática. Las

clases moleculares A, C y D incluyen a las β -lactamasas con serina en su sitio activo, mientras que las de tipo B son metaloenzimas con zinc en su sitio activo (Queenan *et al.* 2007).

Según esta clasificación molecular de Ambler (Ambler, 1980) las carbapenemasas pertenecen a las clases A, B y D:

- Clase A, principalmente enzimas del tipo KPC
- Clase B ó metalo- β -lactamasas dependientes de zinc, principalmente del tipo VIM, IMP y NDM
- Clase D, enzimas tipo OXA-48

Clase molecular ¹ (Grupo funcional ²)	Enzimas	Inhibición por		ATM	Microorganismos	Localización genética
		CLA	EDTA			
A (2f)	Sme, IMI, NmCA	±	-	R	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Crom
	KPC	+	-	R	Enterobacterias	PI
	GES	+	-	R	Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PI
B (3)	L1 CcrA Cpha BclI	-	+	S/R ³	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Bacillus cereus</i>	Crom
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	S	Enterobacterias <i>Pseudomonas</i> spp. BGNNF	PI (Crom) ⁴
D (2df)	OXA (OXA-48)	±	-	S	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterias	Crom, PI

¹Según la clasificación de Ambler, ²según la clasificación de Bush y Jacoby, 2010; ³puede aparecer resistente por la coexistencia con otros mecanismos de resistencia, ⁴ocasionalmente de codificación cromosómica. CLA, ácido clavulánico; ATM, aztreonam; BGNNF, bacilos gramnegativos no fermentadores; PI, plasmídica; Crom, cromosómica

Figura 8. Clasificación general de las carbapenemasas

Tomado de: Cercenado *et al.* SEIMC 2011

Los determinantes genéticos que codifican las carbapenemasas frecuentemente están asociados a plásmidos conjugativos que facilitan su diseminación. Asimismo, y aunque no de manera exclusiva, suelen estar presentes en los denominados clones de alto riesgo que tienen un carácter epidémico y que favorecen su persistencia (Com. de Madrid 2013).

Ambas características favorecen su rápida diseminación inter e intrahospitalaria y su difícil control.

Desde un punto de vista clínico, los principales factores de riesgo para la colonización e infección por estas cepas son la estancia en UCI, la administración de antibioterapia de amplio espectro de forma prolongada, la cirugía, los procedimientos instrumentales invasivos y la inmunosupresión. Las tasas de mortalidad son altas, oscilando entre el 18 y el 60% en casos de infección por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas, siendo las tasas más altas entre pacientes con bacteriemia. El tratamiento antibiótico empírico inadecuado incrementa la probabilidad de una peor evolución clínica, mientras que las terapias con una combinación de antibióticos y la retirada o control del foco de infección se asocian con mejor supervivencia de los pacientes (Oteo *et al.* 2013).

Con frecuencia las cepas productoras de carbapenemasas presentan corresponsibilidades a otras familias de antibióticos no β -lactámicos, por lo que es habitual que adquieran un perfil de multirresistencia frente al cual 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 colistina, la tigeciclina, la fosfomicina o la amikacina. (Oteo *et al.* 2013).

El principal mecanismo de transmisión de las EPC es el contacto (personal sanitario, ropa de cama, material sanitario, objetos...), al contaminar el entorno del paciente. El paciente portador (colonizado y/ o infectado) es el principal reservorio (Com. de Madrid 2013).

4. Mecanismos de resistencia adicionales

La resistencia a carbapenems también puede producirse aún en ausencia de carbapenemasas a través de la desrepresión de cefalosporinasas AmpC cromosómicas, adquisición de plásmidos por vía exógena que codifican cefalosporinasas o betalactamasas de espectro extendido (BLEE), o por disminución en la permeabilidad de porinas. (Wozniak *et al.* 2012).

4.1 Betalactamasas de espectro extendido

Las enzimas BLEE tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. (Poirelet *et al.* 2012, Montsein *et al.* 2007, Cercenado *et al.* SEIMC 2011).

Las BLEE se pueden clasificar en diferentes grupos, según las distintas clasificaciones. La mayoría de ellas pertenecen a la clase molecular A de Ambler. Entre ellas se encuentran las TEM y SHV, derivadas de betalactamasas con menor espectro de hidrólisis, la familia CTX-M, procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*, y otras menos prevalentes como las denominadas PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby. (Poirel *et al.* 2012, Montsein *et al.* 2007, Cercenado *et al.* SEIMC 2011)

Clase de Ambler	Clase de Bush-Jacoby	Sustrato	Inhibición por clavulánico	Enzimas
A	2be	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactámicos	+	SHV, TEM, CTX-M, PER, VEB
A	2ber	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactámicos	-	CMT (<i>complex mutant TEM</i>)
D	2de	Cefalosporinas espectro ampliado	+/-	OXA

Figura 9. Clasificación de las betalactamasas de espectro extendido

Tomado de: Cercenado *et al.* SEIMC 2011

La familia más prevalente en la mayor parte del mundo es la CTX-M, tanto en infecciones hospitalarias como de la comunidad, habiendo casi sustituido a las BLEE de los tipos TEM y SHV (Zaho *et al.* 2013, Cantón *et al.* 2008).

Como muestran los últimos datos obtenidos del EARS-Net, desde el año 2000 se ha constatado un aumento en el porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, situándose en el año 2012 en un valor medio del 11,9% de *E. coli* resistentes (4,4% Suecia a 38,1% Bulgaria) y en un 25,6% de *K. pneumoniae* (1,7% Finlandia a 74,8% Bulgaria). En cuanto a cepas BLEE, los porcentajes oscilan entre el 70,5% y 100% de *E. coli* BLEE, y entre el 62% y 100% de *K. pneumoniae* BLEE, dependiendo del país.

En España, se han realizado estudios multicéntricos para conocer la prevalencia de BLEE en nuestros hospitales (Díaz *et al.* Proyecto GEIH-BLEE 2006). Los resultados muestran que desde el año 2000 hasta el 2006, el porcentaje de aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE se había multiplicado por 8 y por 2, respectivamente, situándose en 4,04% (rango de 0,4 a 20,3) y 5,04% (rango de 0 a 30), para cada cepa.

Otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEE en enterobacterias productoras de β -lactamasas cromosómicas AmpC (Oliver *et al.* Control de Calidad SEIMC).

4.2 Cefalosporinas de tipo AmpC

Las β -lactamasas AmpC son cefalosporinas de relevancia clínica codificadas en el cromosoma de muchas *Enterobacteriaceae*, pero pueden integrarse en elementos genéticos transferibles, lo que ha permitido su difusión a microorganismos que carecen de forma natural de AmpC cromosómico o lo expresan a bajo nivel, como *Klebsiella* spp., *Salmonella enterica* o *Proteus mirabilis* (Jacoby *et al.* 2009).

Las β -lactamasas AmpC pueden hidrolizar penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactams, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos (Jacoby *et al.* 2009, Cercenado *et al.* SEIMC 2011).

Se caracterizaron por primera vez en 1988, y hasta la fecha se han descrito siete familias: ACC, CMY, DHA, FOX, MIR, ACT and MOX (Pérez-Pérez *et al.* 2002).

La prevalencia de las infecciones causadas por bacterias productoras de AmpC plasmídica (pAmpC) varía en función del tipo de enzima y la localización geográfica, siendo bla_{CMY-2} la enzima de distribución más universal (Jacoby *et al.* 2009, Seral *et al.* 2012).

Aunque no se dispone de datos exactos de prevalencia de pAmpC debido, principalmente, a la falta de un método estandarizado para su detección, hay estudios en los que se observa un aumento de la prevalencia y diversidad en nuestro país, siendo del 0,43% en el periodo de 1999-2007 (Mata *et al.* 2010) y de un 0.64% en el 2009 (Miró *et al.* 2013).

Según este mismo estudio, la prevalencia nacional de pAmpC fue del 0,6%, siendo Cataluña y Asturias las comunidades con mayor prevalencia y Baleares la de menor, con un 0,35%. Al igual que en el resto de Europa, la variante plasmídica CMY-2 fue la enzima encontrada con mayor frecuencia en este estudio (66,7%) seguida de DHA-1 (25,6%).

En Aragón, entre junio de 2008 y junio de 2009, la prevalencia global de pAmpC fue de 0,66%, observándose el 0,57% en *E. coli*, el 0,25% en *K. pneumoniae* y el 0,43% en *P. mirabilis* siendo CMY-2 y DHA-1 las únicas variantes encontradas. (Gude *et al.* 2010).

4.3 Disminución en la permeabilidad de porinas

Para conferir resistencia a los carbapenems, la hiperproducción de enzimas AmpC necesita estar asociada con la alteración de porinas (Nordmann *et al.* 2009).

Se han publicado algunos estudios que describen alteraciones en las familias OmpC o OmpF de las proteínas de la membrana externa en *Enterobacter* spp. y OmpK35 o OmpK36 de *K. pneumoniae* (Pagès *et al.* 2008, Doumith *et al.* 2009). Estas alteraciones incluyen mutaciones en partes específicas de la proteína que convierte a la porina en no funcional o llevan a la represión de genes con la consecuente pérdida de porina.

La pérdida de porinas OpmC y OmpF se ha descrito como responsable de la resistencia a carbapenems en *E. coli* y *Serratia marcescens* (Oteo *et al.* 2008, Hutsul & Worobecet *al.* 1997). En el caso de *Morganella morganii*, la disminución en la sensibilidad a carbapenems se ha atribuido a la pérdida de la porina mayor 37kDa (Mitsuyama *et al.* 1987).

En algunos aislados de *Enterobacter cloacae*, los cambios en las porinas junto con las bombas de eflujo pueden conferir resistencia a ertapenem, como se describe en el trabajo de Yang *et al.* 2012.

5. Diagnóstico microbiológico

El Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) es el hospital de referencia para las áreas de salud II y V de Aragón. Cuenta con 1.308 camas, y atiende de forma directa a una población de 383.046 habitantes. A él están adscritos tres centros médicos de especialidades (CME), referencia a su vez de los centros de salud: CME Ramón y Cajal, CME Grande Covián y CME San José.

5.1 Cribado de cepas

La detección de carbapenemasas es complicada, debido a que pueden presentar CMIs a carbapenems por debajo del punto de corte clínico de sensibilidad antibiótica y no ser detectadas por los sistemas automatizados habitualmente empleados (Microscan, Wider, Vitek, Phoenix, entre otros). Recientemente, EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ha establecido unos puntos de corte para el cribado de estas *Enterobacteriaceae* (Figura 10).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.12	≥22	<25 ²
Imipenem ³	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem ⁴	≤0.5	>0.12	≥25	<25

¹Best balance of sensitivity and specificity
²In some cases zone diameters for OXA-48-producers are up to 26 mm, so <27 mm may be used as a screening cut-off in countries where OXA-48 is endemic, but at the expense of lower specificity.
³With imipenem, the separation between the wild-type and carbapenemase-producers is relatively poor. Imipenem is therefore not recommended for use as a stand-alone screening test compound.
⁴High sensitivity but low specificity, and therefore not recommended for routine use.

Figura 10. Puntos de corte clínicos y de cribado para *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (según metodología EUCAST)

Tomado de: EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_121222.pdf (EUCAST 2013, Version 1.0)

Se recomienda realizar el cribado con meropenem que es el que presenta mayor sensibilidad y especificidad (Hrabáket *al.* 2014).

En el caso de cepas OXA-48, que pueden no expresar resistencia a carbapenems, la resistencia a temocilina es un buen marcador (Hrabáket *al.* 2014).

5.2 Medios de cultivo específicos para el cribado de portadores

Existen medios comerciales cromogénicos (CHROMagar-KPC, Brilliance CRE, CHROMID Carba) para cultivo de muestras de vigilancia epidemiológica (hisopos rectales). El medio de preparación casera SUPERCARBA (Nordmann *et al.* 2012) (agar Drigalski, ZnSO₄, cloxacilina y ertapenem), presenta mejor sensibilidad según la literatura frente a los comerciales, para la detección de cualquier tipo de carbapenemasa, incluidas las OXA-48, aunque sus inconvenientes son tener menor especificidad, ser de preparación casera, y no ser cromogénico (Hrabák *et al.* 2014).

5.3 Métodos fenotípicos

Existen varios tests fenotípicos para la detección de carbapenemasas:

- *Test modificado de Hodge*: observación de la distorsión del halo de inhibición de una cepa indicadora sensible (*Escherichia coli* ATCC 25922) alrededor de la estría de la cepa problema en una placa con un disco de carbapenémico. No distingue entre clases de carbapenemasas. Indicado por CLSI para el cribado de carbapenemasas.
- *Test CarbaNP*: consiste en la detección de la hidrólisis del imipenem mediante un cambio de color por cambio del pH del medio. Indicado por CLSI 2015 y EUCAST como prueba de cribado. No distingue entre clases de carbapenemasas (Nordmann *et al.* 2012).
- *Prueba de discos combinados*: Se basa en el aumento del halo de inhibición del carbapenem adicionado de un inhibidor frente al carbapenem solo (generalmente 5 mm). Se emplea ácido borónico o fenilborónico para la detección de KPC; EDTA o ácido dipicolínico para la detección de MBL.

No existen inhibidores para la detección de OXA-48. Se han comercializado kits (Rosco Diagnostica o Liofilchem) que incluyen discos de meropenem 10µg; meropenem-borónico; meropenem-DPA; meropenem-cloxacilina y temocilina. La inhibición con borónico permite la detección de KPC (diferenciando de AmpC según la inhibición con cloxacilina). La inhibición con DPA permite la detección de MBL, y la resistencia a temocilina la detección de OXA-48. Para la detección de cepas coproductoras de dos tipos (KPC y MBL) es necesario un disco adicional que incluya carbapenem+dipicolínico+borónico, aunque estas cepas suelen presentar alta resistencia a carbapenems. También existen tiras combinadas en lugar de discos con inhibidores (Maurer *et al.* 2014).

- *Prueba de sinergia de doble disco:* se realiza por aproximación de discos con inhibidores a discos de carbapenémicos y observación del efecto sinérgico. Se debe ajustar la distancia óptima entre los discos y es de peor interpretación que la anterior (Hrabák *et al.* 2014).

5.4 Métodos basados en proteómica

La espectrometría de masas basada en ionización desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) permite la detección de resistencias mediante la incubación de la cepa problema con un carbapenem (meropenem o ertapenem) y detección posterior de los picos de hidrólisis del antibiótico. Por el momento no se emplea de rutina pero constituye un complemento a las técnicas convencionales (Hrabák *et al.* 2014).

5.5 Métodos moleculares

Los métodos moleculares (basados en PCR, PCR a tiempo real, secuenciación o microarrays) constituyen la técnica de referencia para la identificación definitiva de las cepas portadoras de carbapenemasas (Hrabák *et al.* 2014).

Se han publicado diferentes PCR simples para la detección de un único gen y también multiplex para la detección simultánea de diferentes familias (Poirel *et al.* 2011). Son de realización casera, y permiten la detección, entre otras, de KPC, MBL (VIM, IMP, NDM) y OXA-48.

En cuanto a PCR a tiempo real, se han desarrollado diferentes métodos con elevada sensibilidad y especificidad. Por el momento existen pocas comercializadas. XpertCarbaR de Cepheid permite el diagnóstico en una hora, a partir de muestra rectal, diferenciando VIM, IMP, NDM, KPC y OXA-48 (Maurer *et al.* 2014).

OBJETIVOS

1. Objetivo principal

Evaluar de forma retrospectiva la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en el HUMS en los dos últimos años (2013-2014).

2. Objetivos específicos

2.1 Evaluación de los métodos de detección fenotípica y genotípica de las EPC

2.2 Caracterización molecular de otros mecanismos de resistencia adicionales (producción de BLEE, AmpC) que también pueden producir, en combinación con la pérdida de porinas, sensibilidad disminuida a los carbapenémicos

2.3 Estudio de las características microbiológicas, epidemiológicas y clínicas de los pacientes infectados/colonizados por cepas con sensibilidad disminuida a carbapenems

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica

El test de sensibilidad antibiótica empleado de rutina de forma general en el Hospital Universitario Miguel Servet es microdilución en caldo mediante el sistema automatizado Microscan Walkaway® (Siemens Healthcare, España actualmente Beckman Coulter).

Se utilizaron paneles comerciales MicroScan® (Neg MIC Panel Type 37 y Neg Combo Panel Type 53 y a partir de julio de 2014 Neg MIC Panel Type 44 EUCAST).

La identificación bacteriana se realizó mediante espectrometría de masas con el sistema Bruker Biotyper 3.1, MALDI-TOF (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Germany).

2. Selección de aislamientos y criterios de inclusión

Se realizó un estudio retrospectivo durante el período de enero de 2013 a diciembre de 2014, incluyendo en el estudio aquellos aislados con sensibilidad disminuida al menos a un carbapenem, presentando CMI elevada a ertapenem ($\geq 0,5$ mg/l), imipenem (≥ 1 ó ≥ 2 mg/l según panel de sensibilidad antibiótica empleado) ó meropenem (≥ 1 mg/l) detectadas por microdilución (MicroScan WalkAway Siemens) y/o con halos de inhibición < 25 mm para meropenem y/o ertapenem ó < 23 mm para imipenem, siguiendo criterios de la guía EUCAST para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasa. (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2013, Version 1.0)

Sólo se incluyó el primer aislamiento por paciente/especie. Para el estudio genotípico se dispuso de los aislados archivados en glicerol (Clinical Microbiology Procedures Handbook 2010).

3. Métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia

3.1 Detección fenotípica de carbapenemasas

Todos los aislados se analizaron para detectar la producción de carbapenemasas mediante prueba de discos combinados. El test utilizado fue distinto dependiendo de la fecha del aislamiento. Hasta agosto de 2013 se realizaba el método con carbapenems en combinación con ácido borónico (PBA) y un quelante del metal como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para la detección de carbapenemasas de serina clase A (KPC) y metalo- β -lactamasas respectivamente. Se utilizaron discos de meropenem 10 μ g, meropenem 10 μ g adicionado de 400 μ g de PBA, meropenem 10 μ g adicionado de 292 μ g de EDTA, y meropenem 10 μ g adicionado de PBA y EDTA (400 μ g/292 μ g) (método 1).

De septiembre de 2013 en adelante se hizo un cambio de reactivo para ampliar la detección de cepas productoras de carbapenemasas tipo OXA-48 y similares, realizando la detección fenotípica mediante KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) que incluye discos de meropenem 10 μ g, meropenem/ácido dipicolínico (DPA), meropenem/PBA, meropenem/cloxacilina y temocilina 30 μ g (método 2). Se siguieron las instrucciones del fabricante para la realización de la técnica e interpretación de resultados.

3.2 Detección fenotípica de BLEE

Se realizó mediante sistema automatizado Microscan Walkaway. En los casos en que no se confirmó BLEE por Microscan pero existía alarma de sospecha según criterios EUCAST (CMI>1mg/L para cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefepima) se realizaba prueba de discos combinados con β -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam) y ácido clavulánico.

3.3 Detección fenotípica de AmpC

Se realizó por prueba de discos combinados con β -lactámico (cefotetan 30mg) y cefotetan adicionado de 400 μ g de PBA según criterios EUCAST en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, si CMI>8 mg/L para cefoxitina y CMI >1mg/L para ceftazidima y/o cefotaxima.

4. Métodos genotípicos

La extracción de DNA se realizó mediante el reactivo PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems). La amplificación se realizó en termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con GelRed™ Nucleid Acid Stain 10,000 in water (Biotium). Se empleó el marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker VIII (ROCHE) 1114-19 pares de bases (ver imagen en Anexo 1). (Wozniak *et al.* 2012).

4.1 Detección genotípica de carbapenemasas

La detección genotípica se llevó a cabo en todas las cepas archivadas (n=63). Se realizó PCR convencional múltiple para detección de carbapenemasas utilizando primers que detectaban los genes bla-NDM, bla-VIM, bla-KPC y bla-OXA-48 (Poirel *et al.* 2011), y en algunos casos seleccionados se empleó PCR

comercial a tiempo real (Xpert CarbaR, Cepheid). Los primers utilizados para amplificación de carbapenemasas se muestran en la Tabla 1.

Como cepas de control se utilizaron:

3. VIM: *K pneumoniae* EARS 2487
4. KPC: *K pneumoniae-1* KPC; *K pneumoniae-2* KPC (cepas clínicas cedidas por Werfen)
5. OXA-48: *K pneumoniae* EARS 1447

Tabla 1.
Oligonucleótidos utilizados para detección de carbapenemasas (Poirel *et al.* 2011).

Primer ^a	Secuencia (dirección 5´-3´)	Gen	Tamaño del producto (pb) ^b
VIM-F VIM-R	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	blaVIM	390
OXA-F OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	blaOXA-48	438
NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	blaNDM	621
KPC-Fm KPC-Rm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	blaKPC	798

a F, primer sentido; R, primer antisentido

b La numeración de los nucleótidos comienza en el codón de inicio de los genes

4.2 Detección genotípica de BLEE

La confirmación molecular de BLEE se realizó por PCR convencional múltiple según Monstein *et al.* 2007, que permite discriminar los genes ^{bla}-SHV, ^{bla}-TEM y ^{bla}-CTX-M en aislados de *Enterobacteriaceae* previamente caracterizados fenotípicamente BLEE. También amplifica (mediante el primer CTX-M) el gen productor de enzima cromosómica K1 en todas las *Klebsiella oxytoca* incluidas en el estudio.

Se usaron como cepas control:

- TEM: *E coli* ATCC 35218
- SHV: *Kpneumoniae* SHV-5 (A56) (cepa cedida por Dra. A. Valverde, Hospital Ramón y Cajal, Madrid)
- CTX-M: *E coli* SEIMC- CCSRC01 CTX-M-1

Tabla 2.
Oligonucleótidos utilizados para detección de BLEE (Monstein *et al.* 2007)

Primer	Secuencia (dirección 5´-3´)	TM en °C	Gen	Tamaño del producto (pb)
bla-SHV.SE bla-SHV.AS	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	45 45	bla-SHV	747
TEM-164.SE TEM-165.AS	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	53 52	bla-TEM	445
CTX-M-U1 CTX-M-U2	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	54 58	bla-CTX-M	593

4.3 Detección genotípica de AmpC

La detección genotípica de AmpC se realizó por PCR convencional múltiple siguiendo el método descrito por Pérez-Pérez & Hanson (2002), utilizando la cepa de referencia AMPC *E coli* SEIMC- CCSRC14 CMY-2. Se utilizaron seis pares de primers que amplifican genes codificantes de las seis familias de enzimas AmpC: ACC, FOX, CMY/MOX, DHA, LAT/CMY/BIL y ACT/MIR.

Tabla 3.
Oligonucleótidos utilizados para detección de AmpC (Pérez-Pérez *et al.* 2002)

Primer	Secuencia (dirección 5´-3´)	Gen	Tamaño del producto (pb)
MOXMF MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	520
CITMF CITMR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	462
DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	DHA-1, DHA-2	405
ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	ACC	346
EBCMF EBCMR	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	MIR-1T ACT-1	302
FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	FOX-1 a FOX-5b	190

5. Recopilación y Análisis de datos

Se han recopilado los datos demográficos y microbiológicos de los casos incluidos:

- Edad
- Sexo
- Fecha de entrada de la muestra
- Servicio u hospital remitente de la muestra
- Microorganismo
- Tipo de muestra
- Resultados de sensibilidad antibiótica

Se analizaron los datos mediante Microsoft Excel (Microsoft Office).

Para los cálculos de sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos empleados se utilizó el programa DAG_Stat, Biostats (Mackinnon 2000).

RESULTADOS

1. Aislados incluidos

Se recopilaron 88 aislados clínicos (estudiados fenotípicamente) de enterobacterias procedentes de 87 pacientes atendidos en el Hospital Universitario Miguel Servet (un paciente presentó dos aislados de diferente género y especie).

Para el estudio genotípico se disponía de 63 aislados archivados en glicerol, el resto no pudieron ser estudiados.

1.1 Test fenotípicos

1.1.1 Detección fenotípica de carbapenemasas

De las 88 detecciones fenotípicas de carbapenemasas, 15 eran compatibles con EPC; sin embargo, sólo se disponía de 63 aislados archivados para estudio genotípico, de los que únicamente dos se confirmaron por PCR como aislados productores de carbapenemasa tipo OXA-48 (1 *K. pneumoniae* y 1 *C. koseri*).

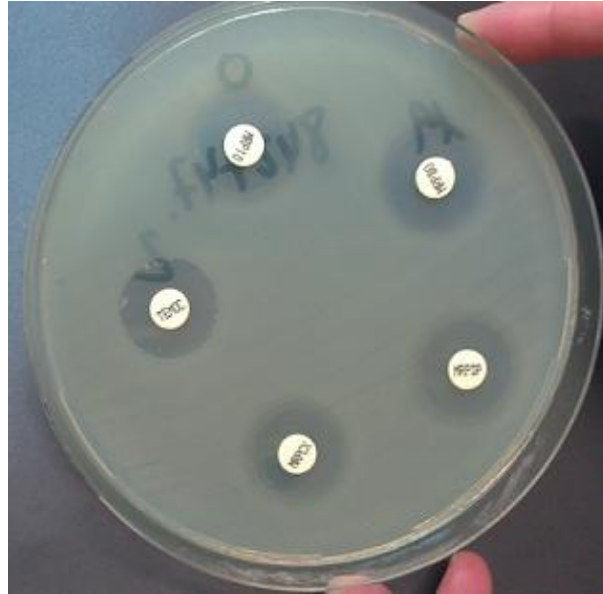


Figura 11: Detección fenotípica de carbapenemas mediante KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark). Resultado negativo al no observarse diferencia >5mm entre halos.
MRP10: meropenem 10µg, MRPDP: meropenem/DPA, MRPBO: meropenem/PBA, MRPCX: meropenem/cloxacilina y TEMOC: temocilina 30 µg

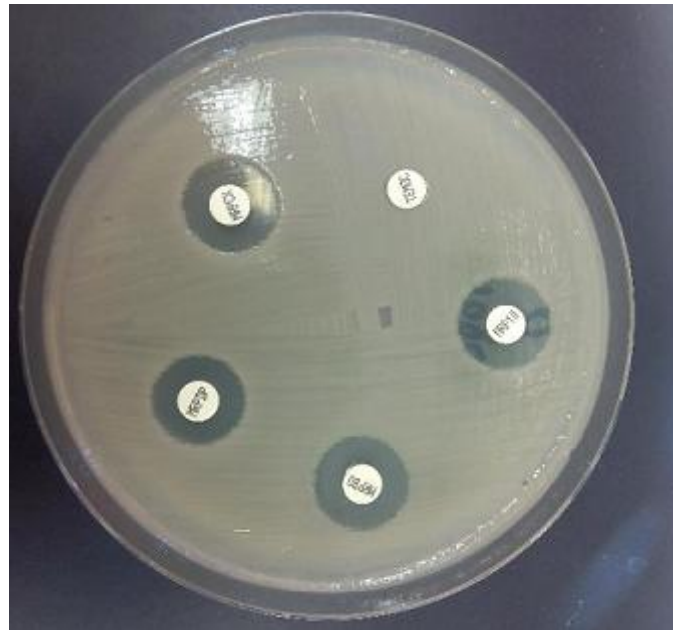


Figura 12: Detección fenotípica de carbapenemas mediante KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark). Resultado positivo compatible con cepa productora de OXA-48 (31KP) al observarse halo de inhibición <12mm en el disco de temocilina.

Table 1.

		Meropenem + Phenylboronic MRPBO	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	No zone of inhibition
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	No zone of inhibition

(a) : synergism CAZ/ Clavulanate.

Neither AmpC, KPC nor MβL: All zones within 3 mm of each other.
 OXA-48 show negative results with KPC+MBL Confirm kit, but it is Temocillin resistant (no zone around Temocillin 30 ug Neo-Sensitabs).

Table 2

		Triple Disk MER + DPA + BO double inhibitor
KPC	MRPDP	≥ 4 mm
MBL	MRPBO	≥ 4 mm
KPC + MBL	MRPDP	≥ 4 mm <u>and</u>
	MRPBO	≥ 4 mm

Figura 13: Interpretación de resultados del test fenotípico según instrucciones del fabricante. KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark). Disponible en: <http://www.rosco.dk/default.asp?mainmenu=20&submenu=47&webmanage=Instructions%20for%20use%20Kits>

La tabla 4 muestra la concordancia entre la técnica fenotípica (positiva para Método 1 o Método 2) y la PCR.

Tabla 4. Resultados de los test fenotípicos (métodos 1 y 2) utilizados respecto a la PCR para la detección de carbapenemasas

TEST FENOTÍPICOS CARBAPENEMASA					
PCR		POSITIVO (método 1 ó 2)	NEGATIVO	Total	
		POSITIVO	2	0	2
		NEGATIVO	13	48	61
			15	48	63

Dado que el test fenotípico que se utiliza actualmente empezó a aplicarse a partir de septiembre de 2013 (Método 2), la tabla 5 muestra la concordancia entre éstos resultados y la PCR, referido a los aislados en los que se aplicó (n=47).

Tabla 5. Resultados del test fenotípico comercial KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) (método 2) utilizado respecto a la PCR para la detección de carbapenemasas

TEST FENOTÍPICOS CARBAPENEMASA					
PCR		POSITIVO	NEGATIVO	Total	
		POSITIVO	2	0	2
		NEGATIVO	6	39	45
			8	39	47

En la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad, especificidad, eficiencia, VPP, VPN de los test fenotípicos tomando la PCR como método de referencia, considerando:

1. Todos los resultados de los dos test fenotípicos juntos (método 1 ométodo 2),obteniendo una S=100% y una E=78,6%.
2. Los resultados del test fenotípico por método 2 (método empleado actualmente en el laboratorio).

No se ha podido analizar el método 1 de forma independiente por falta de resultados positivos con el método de referencia.

Tabla 6. Sensibilidad, especificidad, eficiencia, VPP, VPN de los test fenotípicos tomando la PCR como método de referencia

	Métodos 1 y 2 (N=63)	Método 2 (N=47)
Sensibilidad	100%	100%
Especificidad	78%	86%
Eficiencia	79%	87%
Valor predictivo positivo	13%	25%
Valor predictivo negativo	100%	100%

1.1.2 Detección fenotípica de BLEE

Se obtuvieron 27 aislados con test fenotípico positivo compatible con producción de BLEE, de los que se confirmaron el 92,6% (n=25) por PCR. Los dos aislados no confirmados fueron *E. coli*.

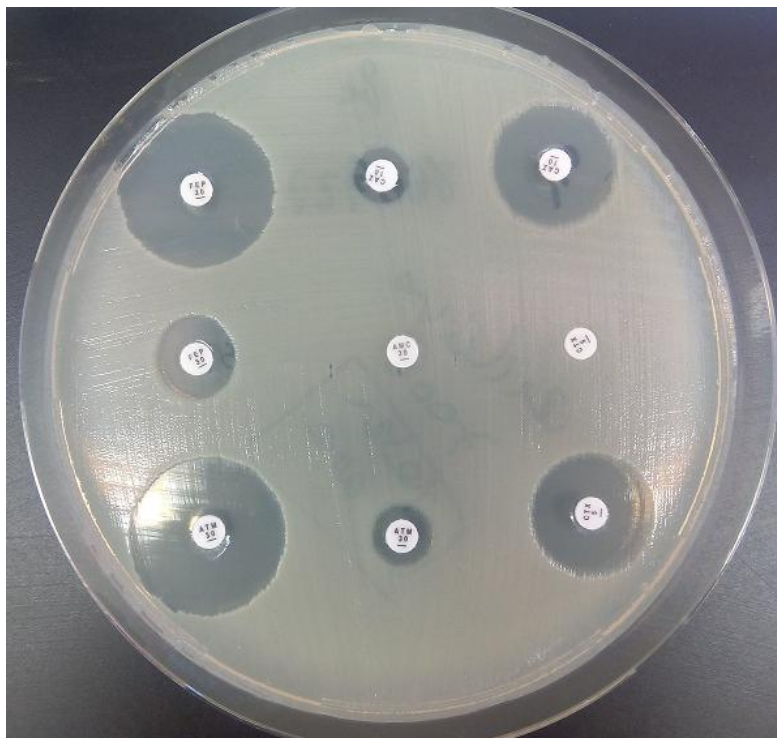


Figura 14: Detección fenotípica de BLEE por método de discos combinados.

Comparando los halos, se observa una ampliación del halo de inhibición >5mm con los discos de cefalosporinas/aztreonam añadidos de ácido clavulánico, respecto a los discos sin inhibidor.

ATM: Aztreonam; FEP: cefepima; CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima

1.1.3 Detección fenotípica de AmpC

Se detectaron 9 aislados compatibles con producción de AmpC fenotípicamente, de los que se confirmaron 8 por PCR (88.8%).

El aislado que no se confirmó genotípicamente como productor de AmpC fue una cepa de *E. coli*.



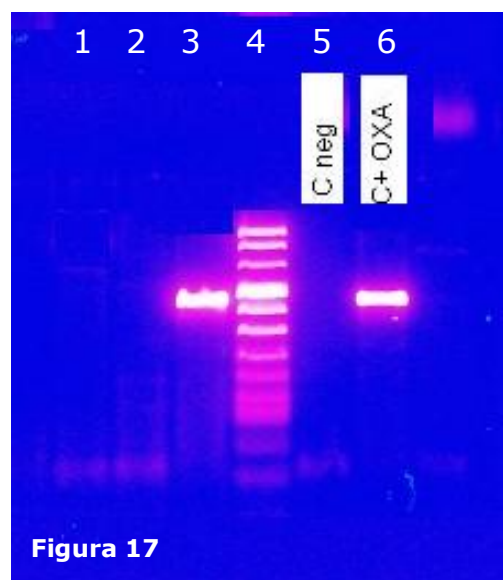
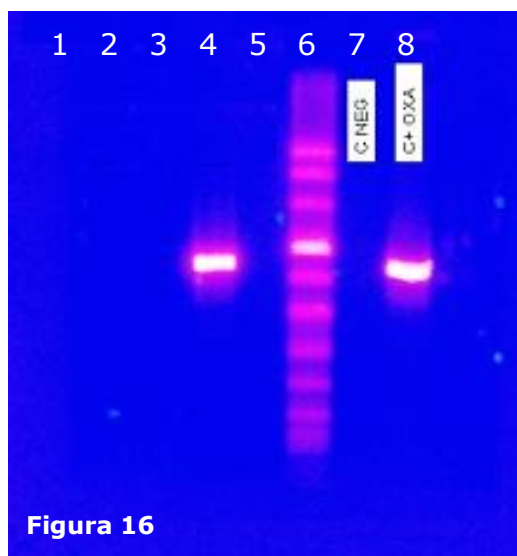
Figura 15: Detección fenotípica de AmpC por método de discos combinados.

Comparando los dos halos, a la izquierda se observa la ampliación del halo de inhibición (>5mm) con el disco de cefotetán (CTT) añadido de ácido borónico, mientras a la derecha se dispone el disco de cefotetán solo.

1.2 Test genotípicos

1.2.1 Detección genotípica de carbapenemasas

Se confirmaron dos aislados (*K. pneumoniae* y *C. koseri*) productores de carbapenemasa tipo OXA-48 por PCR convencional (Poirel *et al.* 2011) y comercial (Xpert CarbaR, Cepheid). No se obtuvo ningún producto de amplificación del resto de cepas.



Figuras 16 y 17: Detección molecular por PCR convencional múltiple de los dos aislados productores de carbapenemasa tipo OXA-48 con amplificación a 438pb

Figura 16. Calles 1 a 3 y 5: muestras negativas 9EC, 10EC, 12EC, 20KP, calle 4: muestra positiva 31KP (*K. pneumoniae* OXA-48), calle 6: marcador de peso molecular, calles 7 y 8: control negativo y positivo OXA-48

Figura 17: Calles 1 a 2: muestras negativas 45ENT, 41ENT, calle 3: muestra positiva 52CB (*C. koseri* OXA-48), calle 4: marcador de peso molecular., calles 5 y 6: controles negativo y positivo OXA-48.

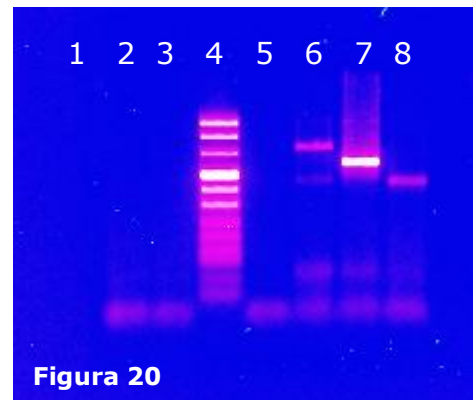
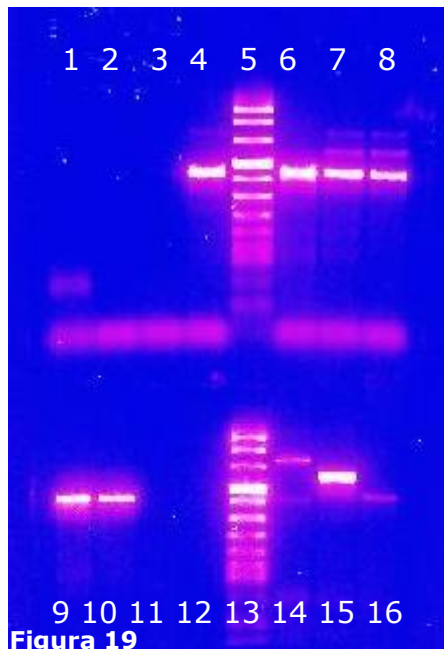
C+ OXA: Control positivo para OXA-48; C NEG: Control negativo. Codificación muestras: ver Anexo 2.

Test Report		
Patient ID:	813723	
Sample ID:	Xpert C 040915124707	
Test Type:	Specimen	
Sample Type:		
Assay Information		
Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert Carba-R	1	In Vitro Diagnostic
Test Result:	<p>IMP1 NOT DETECTED;</p> <p>VIM NOT DETECTED;</p> <p>NDM NOT DETECTED;</p> <p>KPC NOT DETECTED;</p> <p>OXA48 DETECTED</p>	

Figura 18. Informe obtenido por PCR comercial Xpert CarbaR, Cepheid, para el aislado *C. koseri* productor de OXA-48.

1.2.2 Detección genotípica de BLEE

En total se confirmaron 25/63 aislados como productores de BLEE, lo que supone un 39,6% de las cepas incluidas en el estudio fenotípico y genotípico.



Figuras 19 y 20. Detección molecular de BLEE por PCR convencional según Monstein *et al.* 2007. Productos de amplificación de los controles utilizados para la detección molecular.

Figura 19: Calles 1 a 3 y 11: muestras negativas 14EC, 10EC, 10EC, 59SER, calles 4 y 6: muestra positiva 35ENT (TEM y SHV), calles 5 y 13: marcador de peso molecular, calles 7 a 10, muestras positivas 23KP, 23KP (SHV, CTX-M y TEM), 22KP, 22KP (TEM), calles 12 y 14 a 16: Control negativo, Controles positivos SHV, CTX-M y TEM

Figura 20: Calles 6 a 8: Control positivo SHV a 747pb, control positivo CTX-M a 593pb y control positivo TEM a 445pb

Codificación muestras: ver Anexo 2.

Todos los aislados de *K. oxytoca* incluidos en el estudio (n=4) se confirmaron molecularmente como cepas hiperproductoras de betalactamasa cromosómica K1.

Las especies mayoritarias que mostraron mecanismo de resistencia BLEE fueron *K. pneumoniae* (48%) y *E. coli* (20%).

Además, tres aislados de *K. pneumoniae* mostraron también la presencia de betalactamasa tipo AmpC.

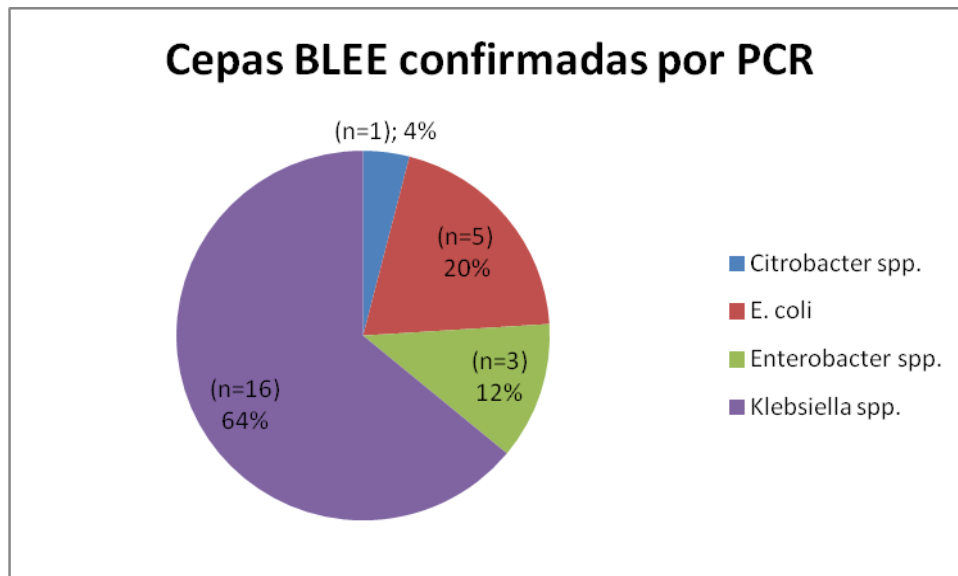


Figura 21. Cepas BLEE confirmadas por PCR (n=25)

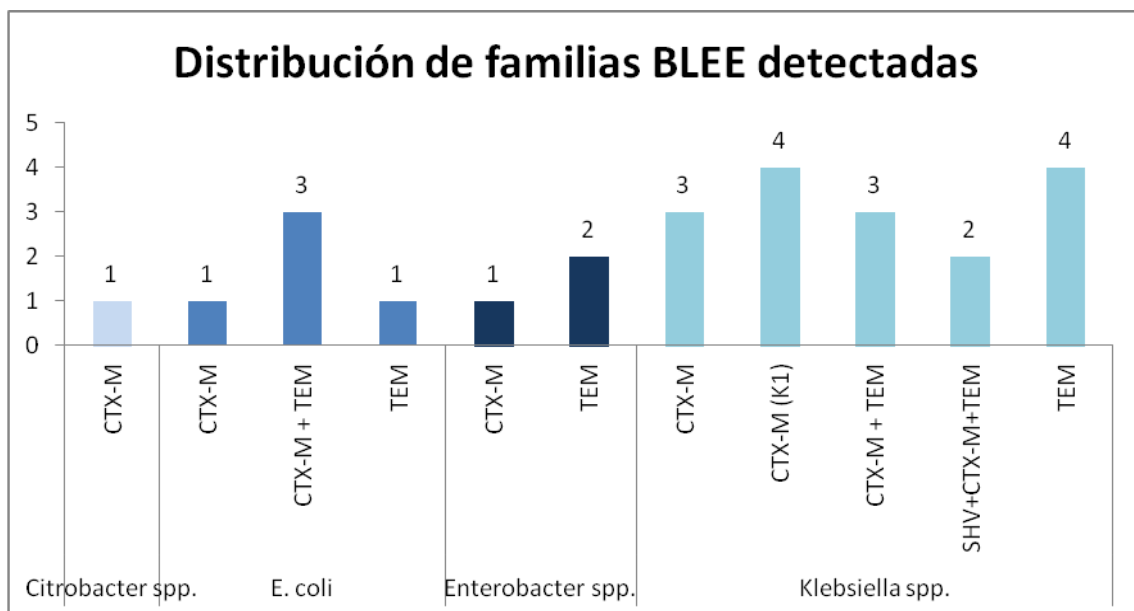


Figura 22. Distribución de familias BLEE detectadas en el estudio

La familia BLEE más predominante fue TEM (60%), seguido de CTX-M (56%), mientras que el gen SHV estuvo presente tan sólo en el 8% de los aislados.

En cuanto a la adquisición de más de un gen de resistencia, el 24% de los aislados (n=6) poseían dos genes (CTX-M y TEM), y el 8% (n=2) presentaba los

tres genes de resistencia detectados en esta técnica (CTX-M, TEM y SHV). Estos últimos fueron dos aislados de *K. pneumoniae*.

1.2.3 Detección genotípica de AmpC

Del total de cepas incluidas para estudio genotípico el 14,2% (9/63) se confirmaron molecularmente como productoras de betalactamasa tipo AmpC. Se encontraron dos discordancias respecto al test fenotípico:

1. Un aislado de *P. mirabilis* con test fenotípico negativo para AmpC (realizado con cefotetan/cefotetan-ácido borónico) amplificó con el primer CIT (familia LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1).
2. Un aislado de *E. coli* con test fenotípico compatible con AmpC pero que no se confirmó por PCR.

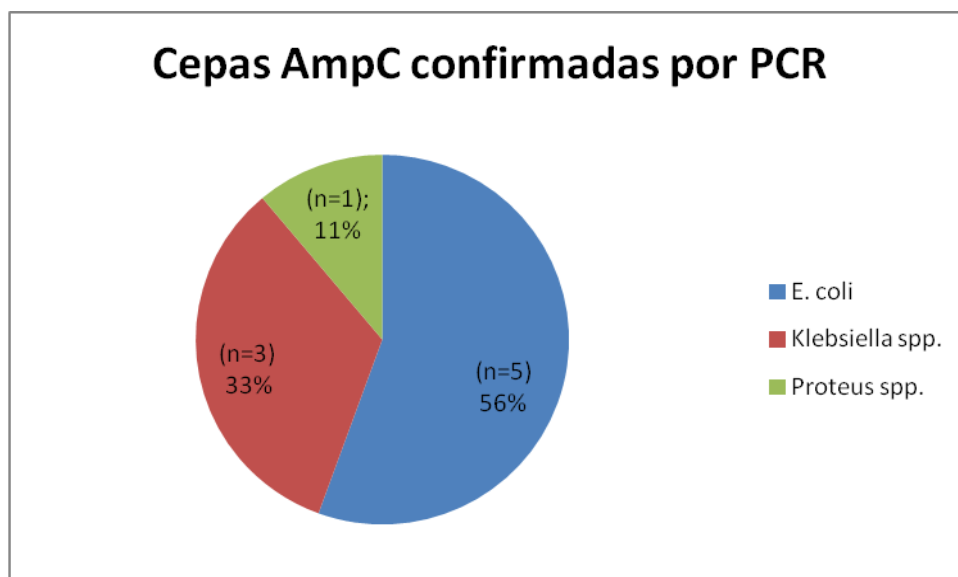


Figura 23. Aislados AmpC confirmados por PCR (n=9)

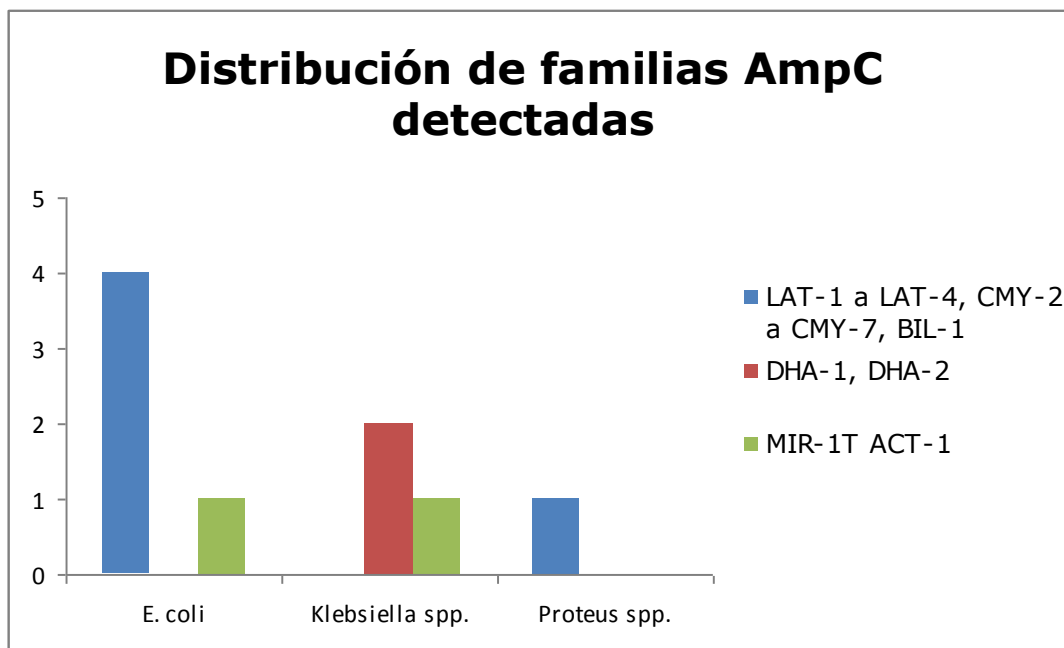


Figura 24. Distribución de familias AmpC detectadas

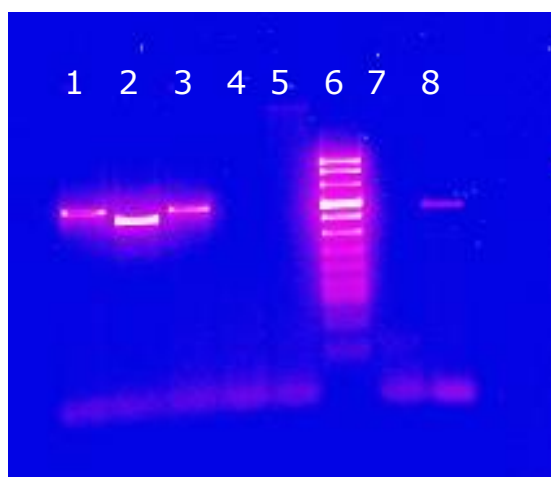


Figura 25: Detección molecular de AmpC según Pérez-Pérez *et al.* 2002
 Calles 1 a 3: muestras positivas 2EC (CIT), 29KP (DHA), 7EC (CIT), calles 4 y 5: muestras negativas 19KP, 30KP, calle 6: marcador de peso molecular, calles 7 y 8: control negativo y control positivo CIT. Codificación muestras: ver Anexo 2.

2. Datos epidemiológicos y distribución por pacientes

Los 88 microorganismos estudiados se aislaron a partir de muestras clínicas (38,6% de orina, 23,8% de muestras respiratorias, 18,1% de líquidos biológicos

y tejidos, 9% de frotis epidemiológicos, 10,2% de hemocultivos), como refleja la tabla 7.

Tabla 7. Origen de las muestras de cada especie de microorganismo estudiados fenotípicamente(n=88)

Especies	Líquidos biológicos y tejidos	Muestras respiratorias	Frotis epidem.	Orina	Hemocultivos	Total
<i>Citrobacter spp.</i>				2		2
<i>Enterobacter especies</i>	6	5		12	6	29
<i>Escherichia coli</i>	2	3	4	7		16
<i>Klebsiella spp.</i>	3	4	3	8		18
<i>Morganella spp.</i>	5	4	1	1	1	12
<i>Proteus spp</i>				2	2	4
<i>Providencia spp</i>				1		1
<i>Serratia spp.</i>	1	4		1		6
Total general	16	21	8	34	9	88

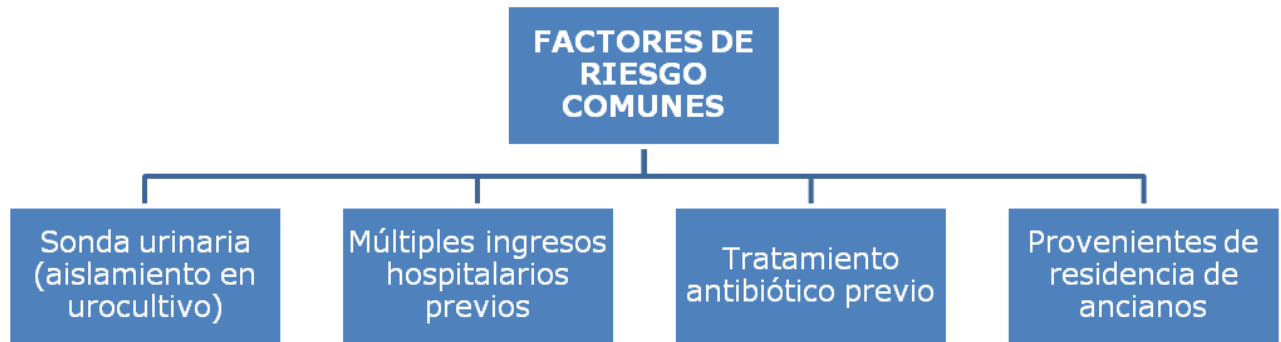
Un 9,2% de los pacientes (n=8) estaban en edad pediátrica (0 a 6 años), mientras que el 63.2% eran >65 años (n=55). La distribución por sexo fue de un 54% hombres (n=47), frente a un 45.9% de mujeres (n=40).

En el momento del aislamiento, el 65,5% de los pacientes (n=57) estaban hospitalizados, un 27,5% (n=24) procedían de centros de Atención Primaria y especialidades y un 8% (n=7) acudieron a Urgencias.

Los servicios peticionarios tuvieron la siguiente distribución: 17% UCI (n=15), 10,3% Medicina Interna (n=9), 10,3% Cirugía (n=9), 4,6% Hematología (n=4), 3,4% Nefrología (n=3), 3,4% Infecciosos (n=3), 4,6% Neonatos/Pediatría (n=4), 2,3% Cardiología (n=2), 2,3% Angiología Vascul ar (n=2), 2,3% Neumología (n=2), 1,1% Unidad de Lesionados Medulares (n=1), 1,1% Radiología (n=1) y 1,1% Neurología (n=1).

3. Datos clínicos de los pacientes con EPC

En dos pacientes se aisló una EPC. Ambos presentaban factores de riesgo comunes.



Primer caso: Mujer de 84 años con aislamiento de *K. pneumoniae* OXA-48 en orina. Provenía de una residencia de ancianos de Tenerife y era portadora de sonda urinaria debido a infecciones urinarias de repetición. Se le realizaba recambio de sonda cada 3 meses.

Como antecedentes clínicos presentaba demencia tipo Alzheimer, bronquitis asmática e ingresos hospitalarios previos por cuadros de sepsis (causados por SARM y *E. coli* BLEE) y tratamiento antibiótico previo.

Ingresa en nuestro hospital en el Servicio de Medicina Interna en julio de 2014 por sepsis severa e ITU (shock séptico de origen urinario).

En mayo de 2015 la paciente vuelve a ingresar por infección urinaria, y se vuelve a aislar *Klebsiella pneumoniae* OXA-48. Fue tratada con gentamicina y tigeciclina.

Segundo caso: Hombre de 67 años con aislamiento de *C. koseri* OXA-48 en orina. Se trataba de un paciente tetrapléjico ingresado en la Unidad de Lesionados Medulares del hospital. Por su diagnóstico de vejiga neurógena era portador de sonda vesical permanente, acudiendo a revisión en el momento del aislamiento. Dado sus múltiples ingresos previos, presentaba varios aislamientos de diversos microorganismos en orina. En las muestras posteriores no se volvió a aislar *C. koseri* OXA-48. El paciente no mostraba sintomatología clínica, por lo que no recibió en esa ocasión tratamiento antibiótico.

Ambas cepas se remitieron y confirmaron por el Centro Nacional de Microbiología como cepas productoras de carbapenemasa tipo OXA-48, y en el caso de *K. pneumoniae*, productora además de BLEE tipo CTX-M-15.

4. Datos microbiológicos

La especie bacteriana más predominante en el estudio fue *Enterobacter* spp. (33%, n=29), seguida de *Klebsiella* spp, (20%, n=18) y *E. coli* (16%, n=16), como muestra la figura 26.

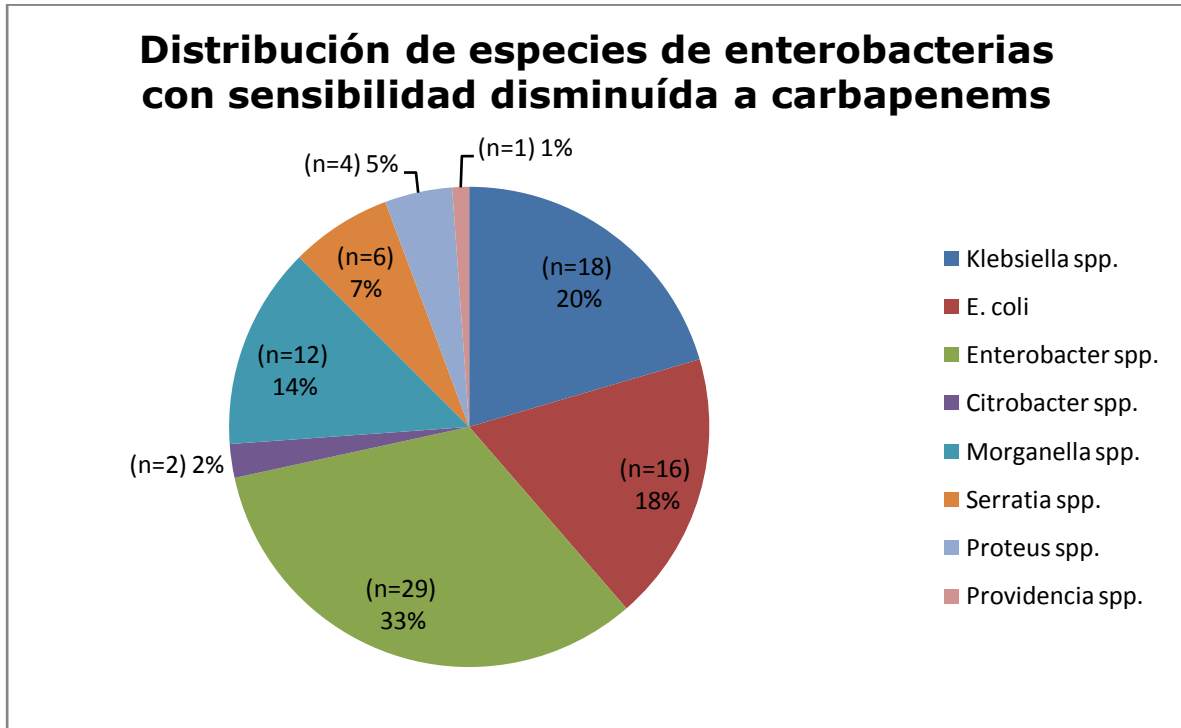


Figura 26. Distribución de especies de enterobacterias incluidas en el estudio (n=88)

La distribución fue semejante para los 63 aislados de los que se disponía en el estudio genotípico (figura 27), representando *Enterobacter* spp. el 30% (n=19), *Klebsiella* spp. el 27% (n=17), y *E. coli* el 22% (n=14) de los aislados.

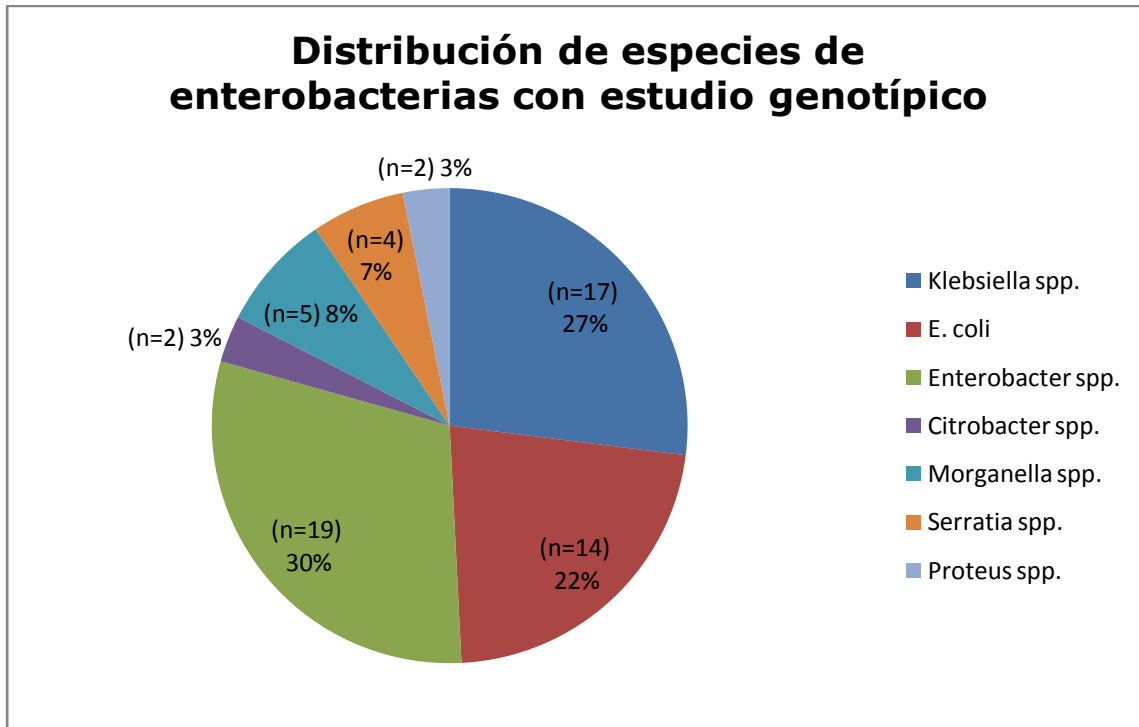


Figura 27. Distribución de especies de enterobacterias con estudio genotípico (n=63)

Enterobacter spp.

Tres aislados eran fenotípicamente compatibles con producción de carbapenemasa, ninguno de ellos confirmado por PCR. Respecto a otros mecanismos de resistencia, el 15,7% (3/19) presentaron genes de resistencia BLEE.

El 79.3% de los aislados (23/29) tenían AmpC desreprimida, los otros seis aislados mantenían CMI a cefalosporinas de tercera generación sensibles.

Entre los aislados con AmpC desreprimida, 16 presentaron además resistencia a cefepima.

Klebsiella spp.

Teniendo en cuenta los test moleculares (63 aislados), un 92.3% (12/13) de *K. pneumoniae* mostraban resistencia BLEE y un 23% (3/13) presentaban AmpC,

además de presentar al mismo tiempo estos tres aislados resistencia BLEE. Hubo un aislado en el que no se detectó ningún mecanismo de resistencia.

Cuatro aislados de *K. oxytoca* amplificaron con el primer CTX-M, debido a la presencia de betalactamasa cromosómica tipo K1.

De los seis aislados que tuvieron test fenotípico compatible con producción de carbapenemasa, uno de ellos se confirmó a nivel molecular (*K. pneumoniae* OXA-48 y CTX-M).

E. coli

En este caso dos tests fenotípicos eran compatibles con EPC pero ninguno se confirmó a nivel molecular.

El 42.8% (6/14) de los aislados fueron AmpC (uno de los aislados no se pudo confirmar por PCR), el 50% (7/14) eran BLEE (aunque 2 aislados no se confirmaron por PCR) y en un aislado no se encontró ninguno de estos mecanismos de resistencia.

Morganella spp.

De los cinco aislados, uno de ellos tuvo el test fenotípico compatible con producción de OXA-48, pero la PCR resultó negativa.

El 33.3% de los aislados (4/12) tenían la AmpC desreprimida.

Serratia spp.

El 66.6% de los aislados (4/6) tenían la AmpC desreprimida

Citrobacter spp.

De los dos aislados estudiados, uno fue BLEE además de tener la AmpC desreprimida (*Citrobacter freundii* complex). Por el contrario, el aislado que se confirmó como productor de OXA-48 (*C. koseri*) mantenía la sensibilidad a los betalactámicos. Ambos fueron sensibles a quinolonas y aminoglucósidos.

Proteus spp.

A pesar de que uno de los aislados presentó el test fenotípico negativo para AmpC (realizado con cefotetan/cefotetan-ácido borónico), posteriormente se confirmó a nivel molecular, ampliando con el primer CIT (familia LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1).

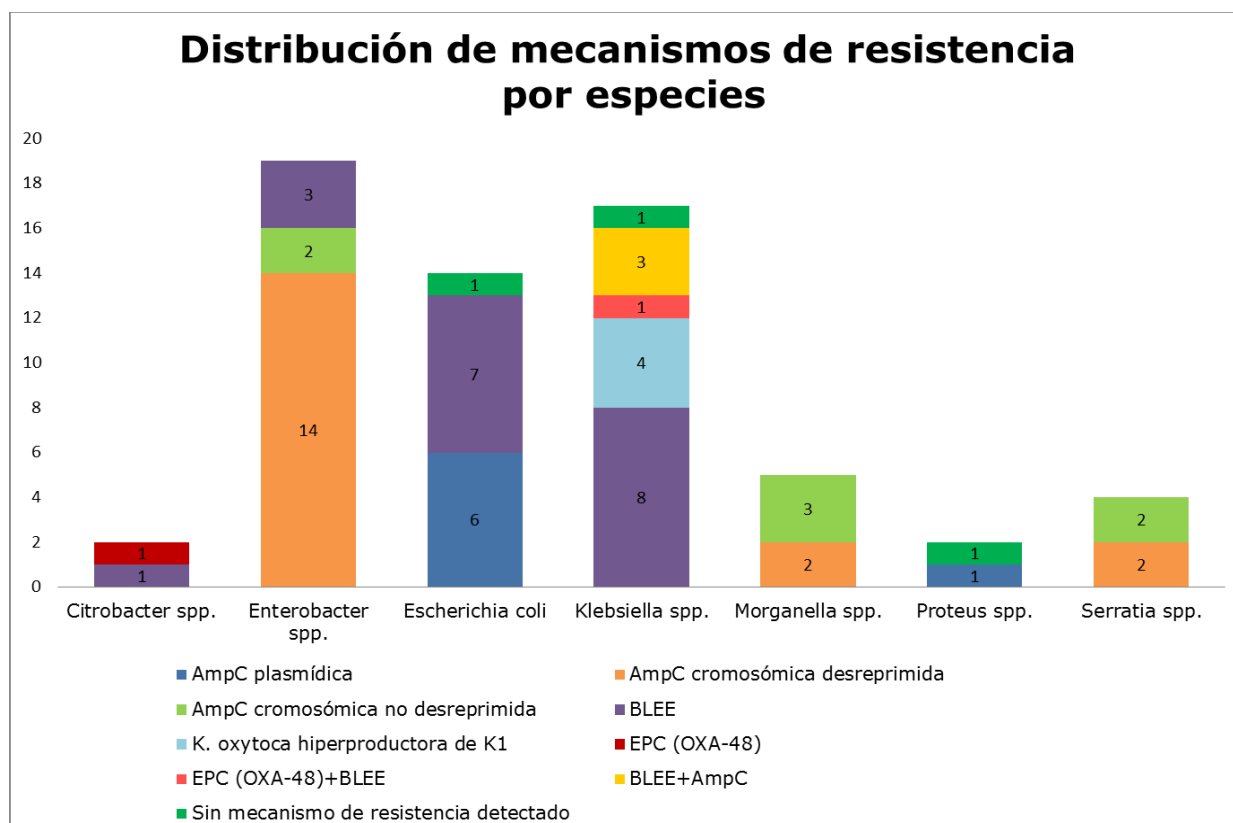


Figura 28. Distribución de mecanismos de resistencia por especies (n=63)

5. Sensibilidad antibiótica

Siguiendo los puntos de corte para la interpretación de CMI en *Enterobacteriaceae* según EUCAST 2015, la distribución de CMI de todos los aislados se muestra en el anexo 3.

Los 88 aislados presentaron las siguientes sensibilidades: 76,1% a imipenem, 82,9% a meropenem, 26,1% a ertapenem, siendo el carbapenem más afectado.

Dos aislados fueron no sensibles a los tres carbapenémicos (*K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp.).

Respecto a la sensibilidad a aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina fueron los más afectados (70,4% y 65,9% respectivamente), mientras que la sensibilidad a amikacina fue de un 86,3%. Un 42% de los aislados permanecieron sensibles a ciprofloxacino.

Excluyendo la resistencia intrínseca, la mayoría de los aislados fueron sensibles a colistina (96% ya que dos aislados de *Enterobacter* spp eran resistentes).

DISCUSIÓN

1. Diagnóstico microbiológico problemático

Este estudio trata de detectar los mecanismos responsables de la resistencia a carbapenems en enterobacterias. Hasta la realización de este estudio no se habían detectado EPC en nuestro hospital, si bien hay constancia de 9 casos de metalobetalactamasas tipo VIM (*Enterobacter* y *Citrobacter* spp) detectados en el Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza) durante el período 2012-2014. (Bueno *et al.* 2015). En nuestra Comunidad Autónoma no se han encontrado otros estudios que detecten estas cepas.

La búsqueda de estos aislados supone un importante desafío para los laboratorios de microbiología, ya que la presencia de carbapenemasas no siempre define resistencia a carbapenémicos, pudiendo mostrar incluso un fenotipo sensible a ellos (Nordmann *et al.* 2011). Debido a esto, EUCAST propone puntos de corte por debajo de los puntos de corte clínicos para la detección de estas EPC.

En este estudio, de los 63 aislados el 23,8% presentaron el test fenotípico compatible con la producción de carbapenemasas; sin embargo el 20,6% (13/63) se consideraron falsos positivos al no detectarse los genes que codifican estas enzimas.

Revisando la literatura se describe que el test de Hodge puede dar resultados erróneos debido a la producción de BLEE o AmpC asociado a la pérdida de porinas, mostrando porcentajes similares e incluso mayores de falsos positivos (Wozniak *et al.* 2012; Pasteran *et al.* 2009; Carvalhaes *et al.* 2010). Aunque EUCAST no recomienda su uso debido a su baja especificidad y sensibilidad, CLSI

propone este test como cribado para la detección de carbapenemasas. En nuestro hospital no se realiza el test de Hodge como cribado en la detección de carbapenemasas por lo que no se pueden comparar los resultados.

En otros estudios también se han dado falsos positivos mediante la prueba de discos combinados, no confirmados posteriormente por PCR (La Lastra *et al.* 2014, Wozniak *et al.* 2012, Bartolini *et al.* 2014). Evaluando varios métodos fenotípicos, el que se utiliza actualmente en nuestro hospital (KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit, Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) se recomienda como la mejor opción para el análisis de carbapenemasas en la rutina del laboratorio, por su mayor sensibilidad y especificidad respecto a otros, llegando al 80-100% de sensibilidad y obteniendo entre un 93% y 100% de especificidad según varias publicaciones (Bartolini *et al.* 2014, Miriagou *et al.* 2013, Doyle *et al.* 2012).

En nuestro estudio se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 86% con este método, lo que guarda relación con los anteriores artículos.

Las indicaciones del fabricante de este test sólo exigen confirmación molecular para OXA-48, ya que la temocilina no es específica para esta enzima y otros mecanismos pueden conferir también resistencia (Hrabák *et al.* 2014). Otro problema que presenta este test es la posible subestimación de aislados que produzcan simultáneamente AmpC y carbapenemasa de clase A, debido a que la sinergia de meropenem con cloxacilina y ácido borónico se interpretaría como AmpC y pérdida de porinas de acuerdo al algoritmo actual de EUCAST (Maurer *et al.* 2014). Bartolini *et al.* 2014 describe este problema en su estudio, recomendando ante resultados dudosos por hiperproducción de ampC, confirmar la cepa en medio suplementado de cloxacilina.

No obstante, actualmente en el trabajo de rutina del hospital se confirma a nivel genotípico cualquier resultado compatible con EPC por este test.

Una alternativa para la detección rápida de EPC se basa en métodos colorimétricos que detectan la hidrólisis de los carbapenems mediante cambios de color (Nordmann 2012). El test Carba NP ha sido evaluado para la detección

de EPC, obteniendo buena especificidad aunque presenta problemas de sensibilidad, debido a cepas mucosas o enzimas con baja expresión de hidrólisis de carbapenem, como ocurre con las cepas OXA-48 (Tijet *et al.* 2013; Dortet *et al.* 2014; Maurer *et al.* 2014). Por el momento es necesario realizar estudios multicéntricos para obtener más resultados.

Algunos autores han propuesto algoritmos para la detección de carbapenemasas en la rutina diaria del laboratorio (Hrabák *et al.* 2014, Maurer *et al.* 2014), basados en el cribado de muestras epidemiológicas mediante cultivo en medios selectivos y/o PCR sobre muestra directa ante un posible brote, detección directa de la capacidad de hidrólisis enzimática (Carba-NP, MALDI-TOF), test fenotípicos basados en inhibidores y posterior confirmación molecular de los genes codificadores de carbapenemasa (PCR, técnica microarray).

En el Laboratorio de Microbiología del HUMS se sigue un flujo de trabajo similar a los propuestos, tanto para muestras epidemiológicas como aislados clínicos con perfil de sensibilidad sospechoso. Ante una muestra con CMIs para carbapenems que cumple con los puntos de corte propuestos por EUCAST para el cribado de EPC, se realiza un test fenotípico basado en distintos inhibidores y si el resultado es compatible con la producción de carbapenemasa se confirma por PCR. Asimismo, todas las muestras de cribado epidemiológico se siembran en medios de cultivo cromogénicos que detectan carbapenemasas. Se dispone además de una técnica de PCR comercial validada para detectar EPC a partir de frotis rectales.

2. Estudio de sensibilidad

Por nuestros resultados, la mayoría de los aislados analizados no mostraron resistencia debida a la producción de carbapenemasas, sino a la producción de BLEE y AmpC seguramente asociadas a otros mecanismos descritos aunque no estudiados (pérdida de porinas o mutaciones en sus secuencias codificadoras, bombas de eflujo (Martínez-Martínez *et al.* 2008, Livermore *et al.* 2008, Papaparaskevas *et al.* 2006).

La presencia de BLEE se encontró en el 39.6% de los aislados (25/63, excluyendo dos aislados no confirmados por PCR), con predominio de bla-TEM y bla-CTX-M, tal y como se describe en la literatura (Cantón *et al.* 2008). Estos datos son similares a los encontrados en otros estudios, donde la prevalencia de BLEE en enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenémicos es de alrededor del 50% (La Lastra *et al.* 2014; Wozniak *et al.* 2012). La mayoría de los aislados BLEE positivos se asociaron a *K. pneumoniae* (12/27).

El 14.2% de los aislados poseían β -lactamasa de tipo AmpC plasmídica (9/63, excluyendo un *E. coli* confirmado por PCR), ampliando la mayoría de los aislados con el primer CIT (familia LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1). Al no ser objeto de este estudio, no se conoce la familia a la que pertenecen los aislados, ya que se requeriría técnica de secuenciación de los genes AmpC. No obstante, el primer CIT incluye la familia hasta ahora más prevalente en nuestro medio, CMY-2 (Jacoby *et al.* 2009, Seral *et al.* 2012).

Teniendo en cuenta los aislados que poseían AmpC cromosómica (49/88: *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Morganella* spp, *Citrobacter* spp.), se observó que el 65.3% tenían la enzima desreprimida, al igual que en otros estudios (Fernández-Cuenca *et al.* 2006, Wozniak *et al.* 2012). En algunos de estos aislados es notable la resistencia a cefepima (69.5% ó diecinueve aislados de *Enterobacter* spp. un 25% en *M. morganii* ya que hubo un aislado, 75% en *Serratia* spp. con tres aislados). Según el estudio de Fernández-Cuenca *et al.* esta resistencia podría explicarse debido a la hiperproducción de AmpC asociada a pérdida de porinas, o bien a la hiperproducción de una β -lactamasa AmpC con actividad hidrolítica aumentada respecto a cefepima (Fernández-Cuenca *et al.* 2006).

Una de las limitaciones de este estudio es que no se ha analizado la resistencia debida a la pérdida de porinas. Varias publicaciones demuestran que la disminución en la permeabilidad de la membrana debida a las porinas contribuye a la resistencia antimicrobiana, particularmente cuando se están expresando

otros mecanismos de resistencia (Martínez- Martínez *et al.* 2008; Bennet *et al.* 2010).

En *K. pneumoniae*, las porinas OmpK35 y OmpK36 parecen regular la entrada de carbapenems y otros β -lactámicos a través de la pared celular (Martínez-Martínez *et al.* 2008; Martínez-Martínez *et al.* 1999). Estos canales son homólogos en *E. coli* (OmpF and OmpC) y *E. cloacae* (OmpF and OmpD), respectivamente (Martínez-Martínez *et al.* 2008; Pages *et al.* 2008). La ausencia o disminución de estas porinas en combinación con BLEE causa resistencia a cefoxitina, aumenta la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y disminuye la sensibilidad a carbapenems, particularmente a ertapenem. (Martínez-Martínez *et al.* 2008; Jacoby *et al.* 2004; Doumith *et al.* 2009). Los niveles de sensibilidad a carbapenems entre *E. cloacae* y *E. coli* parecen estar relacionados con el grado de expresión del ARNm de sus respectivas porinas (Doumith *et al.* 2009; Oteo *et al.* 2008).

La resistencia a ertapenem entre los 88 aislados de nuestro estudio (73.9% de aislados resistentes a ertapenem, principalmente en aislados de *K. pneumoniae* BLEE y *Enterobacter* spp.) podría estar por lo tanto potenciada por la disminución en la permeabilidad de membrana debido a la baja expresión de porinas de la superficie celular.

En contraste, la alteración de las bombas de expulsión no es frecuente y su rol en la resistencia a carbapenémicos en estos agentes es menor (La Lastra *et al.* 2014).

En nuestro estudio, todos los aislados estudiados tenían algún mecanismo de resistencia asociado, exceptuando un aislado de *E. coli*, un aislado de *K. pneumoniae* y un *Proteus* spp. Estos aislados podrían tener otro mecanismo responsable de su resistencia a los carbapenems, como la expresión de una molécula bloqueante del canal de porinas (Pagès *et al.*, 2008). Otra posibilidad es la alteración de las PBP, como por ejemplo una PBP de baja afinidad, un

mecanismo de resistencia que se ha estudiado en varias especies, incluidas *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Wozniak *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

1. La aparición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, constituye un serio problema de salud pública que afecta a todo tipo de instituciones y a la comunidad en general. Este estudio constituye un aporte para dilucidar los mecanismos involucrados en la sensibilidad disminuida a los carbapenémicos, problema emergente que cada día cobra más importancia.
2. Pese a describirse varios brotes en el resto de la geografía española, hasta ahora no se había detectado ninguna EPC en nuestro Hospital, confirmándose en 2014 dos casos de EPC de clase OXA-48 (unaislado de *K. pneumoniae* y otro de *C. koseri*)
3. Las enterobacterias productoras de carbapenemasas pueden presentar un bajo nivel de resistencia e incluso sensibilidad a carbapenémicos *in vitro*, por lo que representan un desafío clínico, diagnóstico y terapéutico.
4. Probablemente los mecanismos que explican la sensibilidad disminuida a carbapenémicos en este estudio involucran mecanismos de resistencia enzimática a β -lactámicos combinados con cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana (pérdida, modificación y/o disminución de la expresión de porinas) y/o hiperexpresión de bombas de eflujo.
5. Pese al bajo número de EPC detectado hasta el momento, es imprescindible realizar una vigilancia activa de estas enzimas en cualquier aislado de enterobacterias con sensibilidad disminuida a cualquier carbapenémico. Conocer nuestra realidad local permite tomar las medidas adecuadas de vigilancia y control, así como estar alerta ante la llegada de nuevas EPC.

BIBLIOGRAFÍA

Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1980; 289:321-331.

Aracil M.B, Pérez-Grajera I, Esteban-Cantos A, Fernández-Romero S, Lara N, Oteo J, Pérez-Vázquez M.D, Campos J. y Grupo Nacional de Estudio EuSCAPE Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda. Resultados nacionales del proyecto europeo "European survey carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*" (EuSCAPE). SEIMC 2014

Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Ritcher S.N, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. *Gut Pathogens* 2014;6:13

Bueno J, Bellés A, Seral C, Arribas J, Sánchez M.J, Salvo S, Rojo-Bezares B, Sáñez Y, Castillo F.J. Caracterización molecular de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas. SEIMC 2015

Bush K. and Jacoby G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases Antimicrobial agents and Chemotherapy, 2010;54:969-76

Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque T.M. Prevalence and spread of extended-spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:Suppl. 1:144-153

Centers for Disease Control and Prevention Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013. Disponible en <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> Atlanta CDC; 2013

Cercenado E, cantón R. *et al.* Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. 38 Procedimiento en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC, 2011 [consultado 29 Jul 2015]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>.

Doumith M., Ellington M. J., Livermore D.M. y Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother 2009; 63:659–667.

Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. Clin Microbiol Infect 2014; 20:340–344.

Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. J Clin Microbiol 2012; 50:3877–3880.

EARS-Net 2012. EARS-Net Annual Report 2012 and the EARS-Net interactive database

European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections 2014. Disponible en www.ecdc.europa.eu Stockholm ECDC; 2014

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 1.0 December 2013

Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Martínez J.M, Martínez-Martínez L, Pascual A. In vivo selection of *Enterobacter aerogenes* with reduced susceptibility to cefepime and carbapenems associated with decreased expression of a 40 kDa outer membrane protein and hyperproduction of AmpC β -lactamase. International Journal of Antimicrobial Agents 2006; 27:549-52.

Gil-Romero Y, Sanz-Rodríguez N, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. New description of a NDM-1 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* carrier in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 31:418–9.

Gude M, Seral C, Arias A, Cebollada R, González M, Salvo S, *et al.* Prevalencia de AmpC plasmídicas en enterobacterias de origen clínico. En: XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 19-22 Mayo 2010; Barcelona; Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2010. Abstract 508.

Hrabák J, Chudá_cková E, Papagiannitsis C. C. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clin Microbiol Infect 2014; 20:839–853

Hutsul J. A. y Worobec E. Molecular characterization of the *Serratia marcescens* OmpF porin, and analysis of *S. marcescens* OmpF and OmpC osmoregulation. Microbiology 1997; 143:2797–2806.

Interpretation and Rapid Identification of Bacterial Growth on Primary Culture Media En: García L.S. Clinical Microbiology Procedures Handbook 3ª ed. Washington DC: ASM Press; 2010. p.135-149

Jacoby G. A, Mills DM, Chow N. Role of b-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other b-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:3203–6.

Jacoby G. A. AmpC β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 2009;22:161-82

Jain A, Hopkings K.L, Turton J, Doumith M, Hill R, Loy R, Meunier D, Pike R, Livermore D.M, Woodford N. NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. J Antimicrob Chemother 2014; 69:1777-1784

La Lastra V, Rivas L.M, Silva F, Ulloa M.T, Pinto M.E, Vidal M. Detección de serinocarapenemasas de clase A y otros mecanismos de resistencia enzimática a β -lactámicos en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, aisladas de pacientes de un hospital universitario de Santiago, Chile. Rev Chilena Infectol 2014; 31:682-688

Livermore D.M, Russell H, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among *Enterobacteriaceae* from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06 Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 62, Suppl. 2, ii41–ii54

Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic test and inter-rater agreement. Computers in Biology and Medicine 2000; 30:127-134.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268–81.

Mata C, Miró E, Rivera A *et al.* Prevalence of acquired AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:472–476

Maurer F.P, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg G.V, Hombach M. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests in *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. *J. Clin. Microbiol.* 2015;53:95-104

Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouvelekis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:E412–E415.

Mitsuyama J., Hiruma R., Yamaguchi A. y Sawai T. Identification of porins in outer membrane of *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* spp. and their role in outer membrane permeation of β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:379–384.

Monstein H.J, Östhalm-Balkhed Å. Nilsson M. V, Nilsson M. Dornbusch K. Nilsson L. E. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 2007; 115:1400–8

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

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:1791-8

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

Ortega A, Bautista V, Fernández-Romero S, Sáez D, Lara N, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J, Oteo J y PVRA del CNM Centro Nacional de Microbiología. *Escherichia*

coliproductor de carbapenemasas: resultados del programa de vigilancia del centro nacional de microbiología (2012-2014)Majadahonda 2015

Oteo J., Delgado-Iribarren A, Vega D., Bautista V., Rodríguez M.C., Velasco M., Saavedra J.M., Pérez-Vázquez M., García-Cobos S. y otros autores. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 534–537

Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina J.M, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Campos J, the Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Program Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013; 57:6344–6347

Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, Horcajada J.P, Del Pozo J.L, Riera M, Sierra R, Bou G, Salavert M.2014. 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; 32:666–670

Oteo J, et al. Estudio nacional GEIH/GEMARA/REIPI sobre Enterobacterias productoras de carbapenemasas: Aspectos Microbiológicos.Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gemara/dcientificos/ponencias/2014/JO-SEIMC2014.pdf>

Oteo J, Ramiro R, Sáez D, S. Fernández-Romero, Bautista V, Lara N, Ortega A, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J y PVRA del CNM Centro Nacional de Microbiología. ISCIII. Majadahonda. 2015. Enterobacterias productoras de carbapenemasa KPC: diseminación clonal de *Klebsiella pneumoniae* perteneciente a los secuenciotipos st11 y st101 productora de KPC-2

Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Control de Calidad SEIMC

Pagès J.M, James C.E. y Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gramnegative bacteria. Nat Rev Microbiol 2008; 6:893–903

Papaparaskevas J, Pantazatou A, Stefanou I, Mela V, Galatidis N, Avlami A. Differences in the evolution of imipenem susceptibility among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates during a 6-year period in a tertiary care hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 29:197-200

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:1631-1639.

Plan de Prevención y Control frente a infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas de la Comunidad de Madrid [consultado 17 Julio 2015].

Disponible

en:

<http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-isposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DPLAN+PREVENCION+Y+CONTROL+EPC+CM+v1+sept+2013.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352838664739&ssbinary=true>

Poirel L, Walsh T.R., Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70:119-23.

Seral C, Gude M.J, Castillo, F.J. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas):origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter* 2012;25:89-99

Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:4578-80.

World Health Organization. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014, disponible en <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

Woodford N, Tierno P.M., Jr, Young K, Tysall L, Palepou M.F., Ward E, Painter R. E., Suber D.F., Shungu D. y otros autores (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4793-4799.

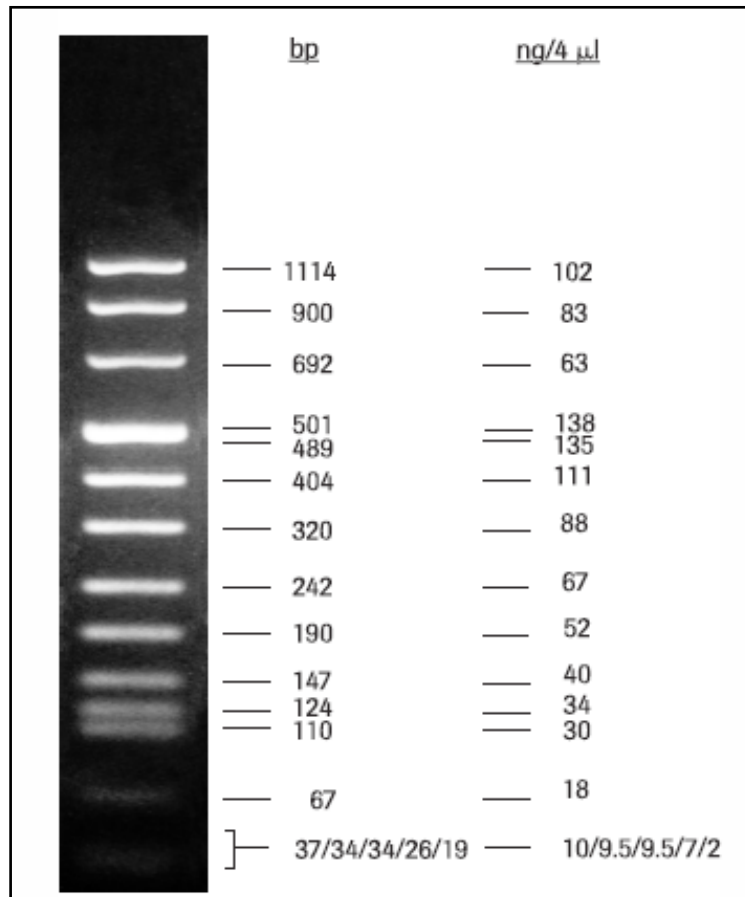
Wozniak A, Villagra N.A, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, Román J.C, Mora G.C, García P. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *Journal of Medical Microbiology* 2012; 61:1270-1279

Yang F.C., Yan J.J., Hung K.H. y Wu, J. J. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol* 2012; 50 :223-226.

Zhao W.H., Hu Z.Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013; 39: 79-101

ANEXOS

Anexo 1. Marcador de peso molecular empleado



Anexo 2. Resultado de los test fenotípicos, genotípicos y CMI de carbapenems de las enterobacterias incluidas en el estudio (n=63)

Aislamiento	Test fenotípico			PCR			CMI (mg/L)				
	BLEE	AmpC	Carbapenemasa	Bla-CTX-M	bla-SHV	bla-TEM	AmpC	Carbapenemasa	IMI	MER	ERT
<i>E. coli</i>											
1EC	-	NP	-					-	8	≤1	1
2EC	-	+	-				LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	-	≤2	≤1	2
3EC	-	+	-				LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	-	≤2	≤1	1
4EC	-	+	-				MIR-1T ACT-1	-	≤1	≤1	1
8EC	+	-	-	+	-	+		-	4	8	>1
9EC	+	-	-	+	-	+		-	≤1	2	>1
10EC	+	NP	-	-	-			-	≤1	ND	1
11EC	+	-	-	+	-	+		-	≤2	≤1	1
5EC	-	+	-		-		LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	-	≤1	≤1	1
12EC	+	-	-	+	-	-		-	≤1	≤1	>1
13EC	+	-	-	-	-	+		-	≤1	≤1	>1
6EC	-	+	-				-	-	≤2	≤1	1
14EC	+	-	Compatible OXA-48	-	-	-		-	≤1	ND	1
7EC	-	+	Compatible KPC				LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	-	≤2	≤1	1
<i>Klebsiella spp.</i>											
16KO	+	-	-	+	-	-		-	≤2	≤1	1
19KP	-	-	-	-	-	-		-	≤2	4	>4
30KP	+	+	-	+	-	-	MIR-1T ACT-1	-	≤2	≤1	1
20KP	+	NP	-	-	-	+		-	≤1	≤1	1
21KP	+	-	-	+	-	+		-	≤2	2	>4
22KP	+	-	-	-	-	+		-	≤1	≤1	1
23KP	+	-	-	+	+	+		-	≤2	≤1	2
25KP	+	-	-	-	-	+		-	≤2	4	>4

Aislamiento	Test fenotípico			PCR			CMI (mg/L)				
	BLEE	AmpC	Carbapenemasa	Bla-CTX-M	bla-SHV	bla-TEM	AmpC	Carbapenemasa	IMI	MER	ERT
26KP	+	-	-	+	-	+		-	≤2	4	>4
27KP	+	NP	-	+	-	+		-	≤2	8	>4
28KP	+	+	-	+	+	+	DHA-1, DHA-2	-	≤2	≤1	4
29KP	+	+	Compatible KPC y MBL	-	-	+	DHA-1, DHA-2	-	2	2	≤0.5
24KP	+	-	Compatible KPC	+	-	-		-	≤2	≤1	2
18KO	-	-	Compatible KPC y MBL	+	-	-		-	>8	≤1	>4
17KO	-	-	Compatible KPC	+	-	-		-	≤2	2	2
31KP	+		Compatible OXA-48	+	-	-	-	OXA-48	8	>8	>4
15KO	-	-	Compatible KPC	+	-	-		-	≤1	≤1	>1
Enterobacter spp											
32ENT	-		-					-	≤1	ND	>1
33ENT	-		-					-	4	≤1	≤0.5
34ENT	-		-					-	≤2	≤1	1
35ENT	+		-	-	-	+		-	≤2	≤1	2
36ENT	-		-					-	≤2	≤1	4
37ENT	-		-					-	≤2	≤1	1
38ENT	-		-					-	8	>8	>8
39ENT	+		-	-	-	+		-	≤2	≤1	1
40ENT	-		-					-	2	≤1	≤1
41ENT	-		-					-	2	≤1	≤1
42ENT	+		-	+	-	-		-	4	≤1	≤0.5
43ENT	-		-					-	≤2	≤1	>4
44ENT	-		-					-	≤2	≤1	1
45ENT	-		-					-		2	≤1
46ENT	-		-					-	≤2	≤1	4
47ENT	-		Compatible KPC					-	≤2	≤1	2
48ENT	-		Compatible KPC					-	≤2	≤1	1
49ENT	-		Compatible KPC					-	≤2	≤1	2
50ENT	-		-					-	≤2	≤1	>4

Aislamiento	Test fenotípico			PCR			CMI (mg/L)				
	BLEE	AmpC	Carbapenemasa	Bla-CTX-M	bla-SHV	bla-TEM	AmpC	Carbapenemasa	IMI	MER	ERT
Citrobacter spp.											
51CB	+		-	+	-	-		-	≤1	2	1
52CB	-		Compatible OXA-48					OXA-48	≤1	2	1
Morganella spp.											
53MOR	-		-					-	8	≤1	≤0.5
54MOR	-		-					-	8	≤1	≤0.5
55MOR	-		-					-	8	≤1	≤0.5
56MOR	-		-					-	8	≤1	≤0.5
55MOR	-		Compatible OXA-48					-	8	≤1	≤0.5
Serratia spp.											
58SER	-		-					-	8	≤1	≤0.5
59SER	-		-					-	4	≤1	1
60SER	-		Compatible KPC y MBL					-	≤2	4	2
61SER	-		Compatible KPC y OXA-48					-	≤2	≤1	>
Proteus spp.											
62PROT		-	-				LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	-	8	≤1	≤0.5
63PROT			-					-	8	≤1	≤0.5

NP: No Procede; ND: No disponible; IMI: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem

Anexo 3. Distribución de CMI para *Enterobacteriaceae* incluidas en el estudio (n=88)

Antibiótico (rango testado, mg/L)	Aislados	Puntos de corte EUCAST $\leq S / > R$	Número de aislados con CMI (mg/L)							ND	%S	
			≤ 0.5	≤ 1	≤ 2	4	8	16	32			> 32
Imipenem ($\leq 1 / > 8$)	<i>E. coli</i>	$\leq 2 / > 8$		9	5	1	1					87
	<i>Klebsiella spp.</i>		5	11		1	1				89	
	<i>Enterobacter spp.</i>		4	23		1	1				93	
	<i>Citrobacter spp.</i>		2									
	<i>Morganella spp.</i>			3	2	7					25	
	<i>Serratia spp.</i>			5	1						83	
	<i>Proteus spp.</i>						4				0	
	<i>Providencia spp.</i>					1					0	
Meropenem ($\leq 1 / > 8$)	<i>E. coli</i>	$\leq 2 / > 8$		12	1		1				2	93
	<i>Klebsiella spp.</i>		9	3	4	1	1				3	66
	<i>Enterobacter spp.</i>		23	1		1	1					82
	<i>Citrobacter spp.</i>		2									100
	<i>Morganella spp.</i>		12									100
	<i>Serratia spp.</i>		5		1							83
	<i>Proteus spp.</i>		4									100
	<i>Providencia spp.</i>		1									100
Ertapenem ($\leq 0.5 / > 8$)	<i>E. coli</i>	$\leq 0.5 / > 1$		9	7							0
	<i>Klebsiella spp.</i>		1	4	4	2	7(>4)					5
	<i>Enterobacter spp.</i>		5	12	5	3	3(>4)	1				17
	<i>Citrobacter spp.</i>			2								0
	<i>Morganella spp.</i>		11				1(>4)					91
	<i>Serratia spp.</i>		1	1	3		1(>4)					16
	<i>Proteus spp.</i>		4									100
	<i>Providencia spp.</i>		1									100

Antibiótico (rango testado, mg/L)	Aislados	Puntos de corte EUCAST ≤S/>R	Número de aislados con CMI (mg/L)								ND	%S
			≤0.5	≤1	≤2	4	8	16	32	>32		
Amikacina (≤8/>32)	<i>E. coli</i>	≤8/>16					14(≤8)			2		87
	<i>Klebsiella spp.</i>						16(≤8)	1		1		88
	<i>Enterobacter spp.</i>						23(≤8)	1	2		3	79
	<i>Citrobacter spp.</i>						2(≤8)					100
	<i>Morganella spp.</i>						12(≤8)					100
	<i>Serratia spp.</i>						5(≤8)			1		83
	<i>Proteus spp.</i>						3(≤8)	1				75
	<i>Providencia spp.</i>						1(≤8)					100
Tobramicina (≤2/>8)	<i>E. coli</i>	≤2/>4			11	1	1	3(>8)				68
	<i>Klebsiella spp.</i>				8	1	1	8(>8)				44
	<i>Enterobacter spp.</i>				24			5(>8)				82
	<i>Citrobacter spp.</i>				2							100
	<i>Morganella spp.</i>				8			4(>8)				66
	<i>Serratia spp.</i>				3	2		1(>8)				50
	<i>Proteus spp.</i>				2	2						50
	<i>Providencia spp.</i>							1				0
Gentamicina (≤2/>8)	<i>E. coli</i>	≤2/>4			13			3(>8)				81
	<i>Klebsiella spp.</i>				10	1		7(>8)				55
	<i>Enterobacter spp.</i>				23	1		4(>8)			1	79
	<i>Citrobacter spp.</i>				2							100
	<i>Morganella spp.</i>				8			4(>8)				66
	<i>Serratia spp.</i>				4	1		1(>8)				66
	<i>Proteus spp.</i>				2			2(>8)				50
	<i>Providencia spp.</i>							1(>8)				0

Antibiótico (rango testado, mg/L)	Aislados	Puntos de corte EUCAST ≤S/>R	Número de aislados con CMI (mg/L)								ND	%S
			≤0.5	≤1	≤2	4	8	16	32	>32		
Ciprofloxacino (≤0.5/>2)	<i>E. coli</i>	≤0.5/>1	4			12(>2)						25
	<i>Klebsiella spp.</i>		3	1	2	12(>2)					16	
	<i>Enterobacter spp</i>		20	1		8(>2)					69	
	<i>Citrobacter spp.</i>		1			1(>2)					50	
	<i>Morganella spp</i>		8	2	2						66	
	<i>Serratia spp</i>		1		1	4(>2)					16	
	<i>Proteus spp</i>		1		1	2(>2)					25	
	<i>Providencia spp.</i>				1						0	
Colistina (≤2/>4)	<i>E. coli</i>	≤2/>2			15					1	93	
	<i>Klebsiella spp.</i>				18						100	
	<i>Enterobacter spp</i>				24		2(>4)			3	82	
	<i>Citrobacter spp.</i>				2						100	
	<i>Morganella spp</i>						12 ^a (>4)				0	
	<i>Serratia spp</i>						6 ^a (>4)				0	
	<i>Proteus spp</i>						4 ^a (>4)				0	
	<i>Providencia spp.</i>						1 ^a (>4)				0	

S, sensible; R, resistente, ND, no disponible, ^a : Resistencia intrínseca.

Celdas coloreadas en verde son aislados sensibles, en naranja son intermedios y en rojo son resistentes.

