



ugr

Universidad
de **Granada**

TESIS DOCTORAL

**Caracterización clínica, epidemiológica y factores de riesgo para la
infección/colonización por *Enterobacterales* productores de carbapenemasa**

(Clinical, epidemiological characterization and risk factors for infection / colonization by
carbapenemase-producing *Enterobacterales*)

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD
PÚBLICA**

Carmen Gabriela Soria Segarra, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Carmen Gabriela Soria Segarra
ISBN: 978-84-1117-081-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71419>

El Dr. **José Gutiérrez Fernández**, Catedrático de Universidad del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, certifica:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización clínica, epidemiológica y factores de riesgo para la infección/colonización por *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa**” que presenta Carmen Gabriela Soria Segarra ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada:

Granada, a 25 abril 2021

Fdo: **José Gutiérrez Fernández**

Resumen

Objetivo: Realizar una caracterización microbiológica, clínica, epidemiológica y de los factores de riesgo de la infección/colonización por *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas en Ecuador (EPC), en Ecuador y en un hospital de España, con especial atención a *K. pneumoniae*.

Metodología: Para determinar la colonización por EPC, se obtuvo semanalmente frotis perineales e inguinales de pacientes ingresados en 7 unidades de cuidados intensivos, entre febrero y abril de 2016, en Guayaquil, Ecuador. Para el procesamiento, se utilizó el protocolo de laboratorio del CDC y CHROMOMagar mSuperCARBA™ y PCR para confirmar carbapenemasas. El análisis genotípico se realizó mediante MLST y electroforesis de campo pulsado (PFEG). Se realizó análisis univariado y multivariado para determinar riesgo, así como análisis de coste. En un Hospital de Granada, España, se incluyeron pacientes con aislamientos positivos para *Klebsiella pneumoniae bla_{KPC-3}* ST 258, detectados entre octubre 2015 y marzo 2017; la sensibilidad antimicrobiana se determinó usando MicroScan y difusión en agar. Se usó PCR para codificar a los genes productores de carbapenemasas y MLST para la relación genética entre los aislados. En el hospital Virgen de las Nieves de Granada, España, se realizó un estudio transversal, retrospectivo de pacientes hospitalizados entre enero del 2016 y diciembre del 2019. Los aislamientos fueron caracterizados mediante MicroScan y espectrometría de masas, aplicando los puntos de corte EUCAST 2018. La detección de carbapenemasas se realizó mediante PCR y secuenciación Sanger; se asignó el secuenciotipo mediante MLST. La relación genética entre los aislados se hizo mediante PFEG usando las enzimas *Xba*I, *Spe*I o *Ap*aI.

Resultados: En Ecuador, el agar mSuper CARBA™ mostró una sensibilidad del 93,05% y especificidad del 96,21% para la detección de EPC. Se incluyeron 665 pacientes, 255 colonizados/infectados por EPC y una prevalencia del 37,67%. *K. pneumoniae bla_{KPC}* fue el microorganismo predominante. ST 258 fue el más frecuente. Los factores de riesgo independientes para la adquisición de EPC fueron: estancia prolongada en UCI ($p < 0,01$), traqueotomía ($p < 0,01$), hospitalización previa ($p < 0,01$) y uso de vancomicina ($p < 0,01$) y de macrólidos ($p < 0,01$). En España se incluyeron 23 individuos con aislamientos de KPC-3 ST258, estos sólo fueron sensibles a gentamicina ($\text{CMI} \leq 2 \text{ mg/l}$), tigeciclina ($\text{CMI} \leq 1 \text{ mg/l}$) y colistina ($\text{CMI} \leq 2 \text{ mg/l}$). El gen *bla_{KPC-3}* estaba flanqueado por las secuencias de inserción Kpn6 y Kpn7 dentro Isoforma del transposón Tn4401a. En el estudio de colonización de bacterias gram-negativas resistentes a carbapenémicos (BRC), realizado en el hospital Virgen de las Nieves, en Granada, se detectaron 308 (10,7%) frotis rectales (FR) y 50 (8,9%) frotis faríngeos (FF) positivos. El FR mostró una sensibilidad del 85%, especificidad del 100%, VPP 100% y VPN 97% para la detección de colonización. De los pacientes con tomas simultáneas de FR y FF, 41(40,6%) tuvieron positividad en ambos frotis, 45(44,6%) sólo en FR y 15 (14,9%) sólo en FF. En el 81,3%(n=13) de los episodios la colonización precedió a la infección ($p < 0,001$; χ^2) y en todos en los que se conservó la información de pulstotipo los aislados de las muestras clínicas y de los frotis fueron similares.

Conclusiones: El agar mSuper CARBA™ es una alternativa útil y asequible para la detección de EPC.. Existe una alta prevalencia de EPC en las UCIs en Guayaquil, Ecuador y *K. pneumoniae bla_{KPC}* es el microorganismo más frecuente. El uso de macrólidos y vancomicina se deben considerar como nuevos factores de riesgo para adquirir EPC. A su vez, se comunica por primera vez un brote de *K. pneumoniae* productor KPC-3 ST 258 en España. La probabilidad de predecir la infección a través del colonizado por BRC en diferentes muestras clínicas es factible, teniendo el FR una mayor sensibilidad para detectar colonización.

Palabras claves: resistencia a carbapenémicos, carbapenemasas, bacterias gram-negativas, colonización, *Klebsiella pneumoniae*.

Abstract

Objective: To carry out a microbiological, clinical, epidemiological characterization and the risk factors of infection / colonization by carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) in Ecuador and a hospital in Spain.

Methodology: To determine colonization by CPE, weekly perineal and inguinal swabs were obtained from patients admitted to 7 intensive units, between February and April 2016, in Guayaquil, Ecuador. We used the CDC laboratory protocol and CHROMOMagar mSuperCARBA™ and PCR to confirm carbapenemases. Genotypic analysis was performed by MLST and pulsed field electrophoresis (PFEG). Univariate and multivariate analysis were performed to determine risk, as well as cost analysis. In a Hospital in Granada, Spain, patients with positive isolates for *K. pneumoniae bla_{KPC-3}* ST 258, detected between October 2015 and March 2017, were included, antimicrobial sensitivity was determined using MicroSan and agar diffusion. PCR was used to encode the carbapenemase producing genes and MLST for the genetic relationship between the isolates. A cross-sectional, retrospective study of hospitalized patients between January 2016 and December 2019, was carried out. The isolates were characterized by MicroScan and mass spectrometry, applying the EUCAST 2018 cut-off points. The detection of carbapenemases was performed by PCR and Sanger sequencing; Sequenciotype was assigned by MLST. The genetic relationship between the isolates was made by PFEG using the enzymes XbaI, SpeI or ApaI.

Results: In Ecuador, MSuper CARBA™ agar showed a sensitivity of 93,05%, specificity of 96,21% for the detection of CPE. 665 patients were included, 255 colonized / infected by CPE and a prevalence of 37,67%. *K. pneumoniae bla_{KPC}* was the predominant organism. ST 258 was the most frequent. The independent risk factors for the acquisition of CPE were prolonged stay in the ICU ($p < 0,01$), tracheostomy ($p < 0,01$), previous hospitalization ($p < 0,01$), use of vancomycin ($p < 0,01$) and macrolides ($p < 0,01$). In Spain, 23 individuals with isolates of KPC-3 ST258 were included; these were only sensitive to gentamicin ($MIC \leq 2$ mg/l), tigecycline ($MIC \leq 1$ mg/l) and colistin ($MIC \leq 2$ mg/l). The *bla_{KPC-3}* gene was flanked by the Kpn6 and Kpn7 insertion sequences within the Isoform of the Tn4401 a transposon. In the study of colonization of gram-negative carbapenem-resistant bacteria (BRC), 308 (10,7%) positive (rectal swab) RS and 50 (8,9%) positive (pharyngeal swab)) PS were detected. RS had a sensitivity of 85%, specificity of 100%, PPV 100% and NPV 97% to detect colonization. Of 101 patients with simultaneous RS and PS intake, 41 (40,6%) had positivity in both smears, 45 (44,6 %) only in RS and 15 (14,9%) only in PS. In 81.3% (n=13) of the episodes, colonization preceded infection ($p < 0,001$; χ^2) and in all the isolations which the pulsotype was kept, the clinical samples were similar to the swabs.

Conclusions: MSuper CARBA™ agar is a useful and affordable alternative for the detection of CPE . There is a high prevalence of CPE in ICUs in Guayaquil, Ecuador, *K. pneumoniae bla_{KPC}* is the most frequent microorganism. The use of macrolides and vancomycin should be considered as new risk factors for acquiring CPE. An outbreak of *K. pneumoniae* producer KPC-3 ST 258 is reported for the first time in Spain. The probability of predicting infection through the colonized by BRC in different clinical samples is feasible, with the RS having a higher sensitivity to detect colonization.

Key words: carbapenems resistance, carbapenemases, gram-negative bacteria, colonization, *K. pneumoniae*.

*A los pacientes que día a día mueren por una Infección Asociada a la
Atención en Salud*

Les ofrezco mis agradecimientos a mi familia, por su paciencia, amor y tiempo. A mi tutor, Dr. José Gutiérrez Fernández, por sus acertadas observaciones y por haber compartido su conocimiento. A las instituciones universitarias de Guayaquil y Granada, por habernos permitido esta oportunidad. Al personal de Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves por su ayuda en la realización de este trabajo y al Laboratorio de Tipado Molecular de Andalucía del Programa PIRASOA por el estudio genético de los aislados clínicos.

Listado de abreviaturas

ANI: identidad nucleótida promedio, por sus siglas en inglés

FB: ácido fenil borónico

APBA: ácido aminofenil borónico por sus siglas en inglés

BCT: prueba Blue-Carba

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido

BRC: bacterias gram-negativas resistentes a carbapenémicos

CAZ: ceftazidima

CDC: Centro de Control y Prevención de Enfermedades, por sus siglas en inglés

CMI concentración mínima inhibitoria

CLAV: clavulánico

CLSI: Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico, por sus siglas en inglés

CLX: cloxacilina

CSI: secuencia conservada de inserción y deleción, por sus siglas en inglés

Ctv: carotovoricina

DDH:hibridización ADN-ADN, por sus siglas en inglés

DBO: diazabicyclooctanonas

DPA: ácido dipicolínico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERC: *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos

EPC: *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas

EUCAST : Comité Europeo en Susceptibilidad Antimicrobiana, por sus siglas en inglés

FEP: cefepima

GGDC: calculadora de distancia genoma-genoma, por sus siglas en inglés

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

MALDITOF: espectrometría de masas asistida por matriz de ionización asistida por desorción láser a tiempo de vuelo, por sus siglas en inglés

MBL: Metalobetalactamasa

MDROs: microorganismos multidrogoresistentes

MHT: prueba de Hodge modificada

MLSA: análisis de secuencia multilocus de proteínas múltiples, por sus siglas en inglés

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: proteínas fijadoras de penicilinas, por sus siglas en inglés.

PC: productor de carbapenemasa

PCD: prueba de combinación de discos

PDS: prueba de doble sinergia

POCP: porcentaje de proteínas conservadas

RMN: resonancia magnética nuclear

T1SS: sistema de secreción tipo I, por sus siglas en inglés

WGS: secuencia entera del genoma, por sus siglas en inglés

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	19
1.1	<i>Características moleculares y propiedades generales de los Enterobacterales</i>	22
1.2	<i>Mecanismos de resistencia antimicrobiana a los β-lactámicos</i>	29
1.3	<i>Epidemiología de los Enterobacterales resistentes a carbapenémicos</i>	40
1.4	<i>Detección de resistencia a los β-lactámicos</i>	51
2	JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	67
3.	METODOLOGÍA	71
2.1	<i>De los objetivos 1, 2 y 4</i>	73
2.2	<i>Del objetivo 3</i>	79
2.3	<i>Del objetivo 5</i>	82
3	RESULTADOS	87
3.1	<i>Evaluación del medio de mSuperCARBA™ agar para la detección de Enterobacterales productores de carbapenemasas</i>	89
3.2	<i>Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por Enterobacterales productores de carbapenemasas, y su caracterización molecular en Guayaquil, Ecuador</i>	95
3.3	<i>Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por K. pneumoniae productoras de KPC, y su caracterización molecular, en un brote de una ciudad media española</i>	102
3.4	<i>Incidencia y factores de riesgo relacionados con la infección/colonización de Enterobacterales productores de carbapenemasa en unidades de cuidados intensivos</i>	107
3.5	<i>Impacto clínico de la colonización por bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en pacientes de un Hospital de una ciudad media española</i>	110
4	DISCUSIÓN	119
4.1	<i>Evaluación del medio de mSuperCARBA™ agar para la detección de Enterobacterales productores de carbapenemasas</i>	121
4.2	<i>Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por Enterobacterales productores de carbapenemasas, y su caracterización molecular en Guayaquil, Ecuador</i>	123
4.3	<i>Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por K. pneumoniae productoras de KPC, y su caracterización molecular, de un brote de una ciudad media española</i>	125
4.4	<i>Incidencia y factores de riesgo relacionados con la infección/colonización de Enterobacterales productores de carbapenemasa en unidades de cuidados intensivos</i>	130
4.5	<i>Impacto clínico de la colonización por bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en pacientes de un Hospital de una ciudad media española</i>	132
5	CONCLUSIONES	137
6	BIBLIOGRAFIA	141
7	PUBLICACIONES DERIVADAS	181

1 INTRODUCCIÓN

El orden “*Enterobacteriales*” es un grupo de bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* (1), cuya taxonomía fue revisada y analizada en el año 2016 (2). Estos microorganismos habitan en diferentes nichos ecológicos, como tierra, agua y vegetación y forman parte de la flora intestinal normal de los animales, incluyendo el ser humano. Su presencia como reservorio en aguas residuales municipales y hospitalarias ha sido estudiada especialmente en el caso de los *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas (3).

Estas bacterias causan una variedad de enfermedades en el ser humano que incluyen más del 70% de las infecciones del tracto urinario e infecciones intestinales. Algunos organismos son considerados patógenos primarios como *Salmonella* serotipo Typhi (asociada a enfermedades alimentarias) (4), especies de *Shigella* (causantes de diarrea en lugares con inadecuado saneamiento de las aguas) (5) y *Yersinia pestis* (causante de la conocida plaga transmitida por las pulgas) (6), todos estos microorganismos siempre se han relacionado con enfermedad humana cuando se presentan en muestras clínicas, mientras que otros (como ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*) son miembros de la flora comensal y causan infecciones oportunistas. Un tercer grupo de *Enterobacteriales* agrupa a aquellos que normalmente son organismos comensales, con funciones específicas (7) y que llegan a ser patógenos cuando adquieren genes de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad.

Las infecciones por *Enterobacteriales* pueden ser originados desde un reservorio animal (por ejemplo especies de *Salmonella*, especies de *Yersinia*), por un portador humano (especies de *Shigella*, *Salmonella* Typhi) o través de la diseminación de microorganismos endógenos (por ejemplo, *E. coli* a través de la perforación de la cavidad intestinal) (8).

El orden *Enterobacteriales* contiene 60 géneros, incluido *Chania* (1)(9) y está conformado por casi 250 especies que se colocan en su mayoría dentro de una única familia *Enterobacteriaceae*. La última clasificación basada en la reconstrucción filogenética de proteínas del núcleo, proteínas ribosomales, análisis de secuencias multilocus de proteínas, análisis de similitud de todo el genoma y la identificación de las secuencias de inserción, incluye la existencia de siete familias, a saber: *Budviciaceae*, *Morganellaceae*, *Hafniaceae*, *Yersiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Erwiniaceae* y *Enterobacteriaceae* (1)

1.1 Características moleculares y propiedades generales de los *Enterobacterales*

Familia *Enterobacteriaceae*: Clado *Enterobacter-Escherichia*

Los géneros que pertenecen a este clado son muy diversos e incluyen *Atlantibacter*, *Buttiauxella*, *Cedeea*, *Franconbacter*, *Kluybera*, *Kosakonia*, *Lecleria*, *Lelliottia*, *Mongrovibacter*, *Pluralibacter*, *Raoultella*, *Shinwella*, *Siccibacter*, *Trabulsiella* *Salmonella*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella* y *Yokenella* (Figura 1), siendo *E. coli* el más conocido (10). Esta agrupación de géneros se ha etiquetado como el clado *Enterobacter-Escherichia* basados en los árboles filogenéticos obtenidos del análisis de la proteína ribosomal, el análisis de secuencia multilocus de proteínas (MLSA, por sus siglas en inglés) y en el gen del ARNr 16S. Se han identificado 21 secuencias conservadas de inserción y delección (CSI, por sus siglas en inglés) compartidas, las cuales constituyen características distintivas de los miembros del clado y proporcionan evidencia de que los miembros de este clado forman un agrupamiento filogenético coherente. Las CSI constan de tres aminoácidos insertos en la proteína NADH: ubiquinona-oxidoreductasa (subunidad M), que está presente en todas las especies pertenecientes a este grupo, y ausentes en otros homólogos de los "*Enterobacterales*"(1).

Desde el año 2005, se han descrito 28 nuevos géneros y 200 nuevas especies, además de la reclasificación de ciertos microorganismos basados en su secuenciación y resultados clínicos, un ejemplo es el caso de *Klebsiella aerogenes* (11), mostrándonos así un comportamiento que aún falta conocer y estudiar.

La familia *Enterobacteriaceae* puede pensarse de manera similar al clado. Los miembros agregados a este grupo a lo largo de los años comparten una serie de características comunes, incluidos los fenotipos (oxidasa negativa, ECA positiva, nitrato reductasa), hábitats (tracto gastrointestinal) y patrones de enfermedades (diarrea, sepsis, infecciones del tracto respiratorio). También se recuperan de diversas muestras clínicas y de una variedad de medios selectivos y de agares usados en el laboratorio (12).

Los miembros de esta familia son bacilos gram negativos de tamaño moderado (0.1x a 1.0 x1.0 a 6.0 μm), no formadores de esporas que comparten un antígeno común. Todos los miembros pueden crecer rápidamente, aeróbica y anaeróbicamente (anaerobios facultativos), en una variedad de medios no selectivos (por ejemplo, el agar sangre) y selectivos (por ejemplo,

agar MacConkey). Tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa, reducen nitratos, y son catalasa positivos y oxidasa negativos. La ausencia de la actividad citocromo oxidasa es una característica importante, ya que puede ser medida rápidamente con una prueba simple y es usada para distinguir a los *Enterobacterales* de otros bacilos gram negativos fermentadores o no fermentadores (por ejemplo, *Vibrio*, *Pseudomonas*) (8).

La apariencia de estas bacterias en los medios de cultivo ha sido utilizada para diferenciar a los miembros comunes de los *Enterobacterales*. Un método es el uso del agar hierro y triple azúcar, que se utiliza a menudo para ayudar a diferenciar salmonelas y shigellas de otras bacterias gramnegativas entéricas (13), otro es la fermentación de la lactosa (detectada por cambio en los colores en los medios que contienen lactosa tales como el agar MacConkey) que permite diferenciar los patógenos entéricos que no fermentan lactosa o que lo hacen lentamente (por ejemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* que son colonias incoloras en el agar MacConkey) de las que fermentan lactosa (por ejemplo, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, y *Serratia* que forman colonias rosado púrpura en el agar MacConkey) (8)(13). La resistencia a las sales biliares en algunos medios selectivos también ha sido usada para separar los patógenos entéricos (por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*) de los organismos comensales que son inhibidos por las sales biliares (por ejemplo, gram positivos y algunas bacterias gram negativas presentes en el tracto gastrointestinal). En este sentido, el uso de medios de cultivo que fermenten la lactosa y la resistencia a las sales biliares son pruebas rápidas de detección de patógenos en las muestras con diarrea donde diferentes microorganismos pueden estar presentes. Algunos *Enterobacterales* tales como *Klebsiella* tienen características mucoides, húmedas, amontonadas, viscosas con cápsulas prominentes (8), pueden aparecer hipermucoides en infecciones del torrente sanguíneo e hipomucoides en infecciones del tracto urinario (14).

Familia *Erwinaceae*: Clado *Erwinia-Pantoea*

La familia *Erwinaceae* contiene el género tipo *Erwinia*, y los géneros *Buchnera*, *Pantoea*, *Paseolibacter*, *Tatunela* y *Wigglesworthia*. Este género denominado el clado *Erwinia-Pantoea*, exhibe una estrecha asociación con los miembros del clado *Enterobacter-Escherichia*. Se han identificado 12 CSI que son características distintivas únicas del clado *Erwinia-Pantoea* y 6 CSI adicionales que tienen características compartidas con *Enterobacter-Escherichia* (1).

Estas son bacterias catalasa positiva, oxidasa negativa y no producen indol o hidrógeno de disulfuro. La mayoría de las especies son positivas para Voges Proskauer, a excepción de *Erwinia toletana*, *Erwinia. typographi* y algunos aislados de *Erwinia oleae*. (1). El 70% de estas bacterias se encuentran de forma natural en la naturaleza y muestran resistencia a los antimicrobianos, de manera que se ha incentivado el estudio de los fagos de los géneros *Erwinia* y *Pantoea* como tratamiento antibacteriano alternativos (15).

Los géneros *Erwinia* y *Pantoea* son un grupo bien estudiado de bacterias patógenas de insectos y plantas que además pueden causar patologías en seres humanos, (como por ejemplo, *Erwinia* que es capaz de producir artritis séptica (16)), lo cual ha llevado a que se los haya considerado como posibles agentes de bioterrorismo (15).

Familia *Pectobacteriaceae*: Clado *Pectobacterium-Dickeya*

La familia *Pectobacteriaceae* contiene el género tipo *Pectobacterium* y los géneros *Brenneria*, *Dickeya*, *Lonsdalea* y *Sodalis*. Se describen cuatro CSI que son compartidas por *Brenneria*, *Dickeya*, *Lonsdalea*, *Pectobacterium* y *Sodalis* que proporcionan evidencia de la ascendencia única de este grupo de especies (1).

Históricamente *Pectobacterium* ha sido encontrada en las regiones tropicales, mientras que *Dickeya solani* ha causado grandes problemas en las plantaciones de gran parte de Europa (17). Los miembros de la familia producen ácido a partir de la N-acetilglucosamina y son negativos para arginina dihidrolasa, ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa. Estas bacterias son catalasa positiva, oxidasa negativa y no producen disulfuro de hidrógeno.

Los miembros de los géneros *Dickeya*, *Pectobacterium* y *Brenneria* son importantes bacterias patógenas de las plantas que dañan su pared extracelular y causan enfermedades en las plantaciones de papa (18), arroz, maíz, crisantemo y calla lily (17).

Familia *Yersiniaceae* - Clado *Yersinia-Serratia*

La familia *Yersiniaceae* contiene los géneros *Chania*, *Ewingella*, *Rahnella*, *Rouxiella* y *Serratia*, conocida como el clado *Yersinia-Serratia*, el género tipo es *Yersinia*. Se han identificado tres CSI que comparten características distintivas de los miembros del clado *Yersinia-Serratia*, proporcionando evidencia de que los miembros de estos géneros comparten un ancestro único (1). En el año 2020, se describió un nuevo género con el nombre *Chimaeribacter* (19). Se han detectados dos nuevas especies de *Serratia*, estas son: *Serratia*

nevei y *Serratia bockelmannii* (20), ciertas especies como *S. marcescens*, *S. rubidaea* y *S. surfactantfaciens* han mostrado tener propiedades importantes en el desarrollo de biosurfactantes con actividades antimicrobianas y antitumorales (21). *Yersinia* contiene el agente causante de la peste, una enfermedad que condujo a una de las pandemias más devastadoras de la historia de la humanidad, el estudio de la filogenia de este microorganismos emerge de los estudios paleo-genómicos de su antiguo ADN, que ha permitido conocer los determinantes de virulencia y las estrategias bacterianas para sobrevivir a la respuesta inmunitaria de los mamíferos, la vacunación y el diagnóstico (6).

Estas bacterias son móviles, catalasa-positivas y no producen disulfuro de hidrógeno. Forman un grupo monofilético distinto en el genoma y se pueden distinguir de todas las demás bacterias por tres secuencias conservadas de inserción (1).

Familia *Hafniaceae*- Clado *Hafnia-Edwardsiella*

La familia *Hafniaceae* contiene el género tipo *Hafnia* y los géneros *Edwardsiella* y *Obesumbacterium*. Los miembros de la familia *Hafniaceae* forman un clado monofilético distinto al agruparse en el genoma y en los árboles filogenéticos pueden distinguirse de todas las demás bacterias por cuatro CSI (1). Los géneros *Edwardsiella*, *Hafnia* y *Obesumbacterium* son patógenos menores de animales y humanos y forman una agrupación filogenética distinta, denominada clado *Hafnia-Edwardsiella*, en el árbol filogenético basado en el genoma, la proteína ribosomal y el MLSA (figura 1). La generación de secuencias completas del genoma y de 19 CSI para las cepas *Hafnia*, revelan que esta ha sufrido reordenamientos genéticos masivos, con la posesión de diversos perfiles relacionados con virulencia en ambas especies de *Hafnia*, incluido el sistema de secreción macromolecular, T1SS, Flagellum 1, Tad pilus y T6SS-1 (22), con lo cual a parte de la especie *H. alvei* se han incluido una nueva especie como *H. paralvei* (23). El género *Edwardsiella* compila cinco especies: *E. tarda*, *E. hoshinae*, *E. ictaluri*, *E. pisciida* y *E. anguillarum*, algunas de estas especies son patógenos importantes para los peces (24).

Estos miembros son catalasa-positivos, oxidasa negativos y negativos para lisina descarboxilasa, pueden crecer en MacConkey y son capaces de reducir el nitrato(1) .

Familia *Morganellaceae*- Clado *Proteus-Xenorhabdus*

La familia *Morganellaceae* contiene el género tipo *Morganella* y los géneros *Arsenophonus*, *Cosenzaea*, *Moellerella*, *Photorhabdus*, *Proteus*, *Providencia* y *Xenorhabdus*. En el árbol filogenético basado en la proteína ribosomal y el MLSA, los géneros *Arsenophonus*, *Moellerella*, *Morganella*, *Photorhabdus*, *Proteus*, *Providencia* y *Xenorhabdus* forman una agrupación monofilética, conocida como el clado *Proteus-Xenorhabdus*. Se han identificado siete CSI con características compartidas de los miembros del clado *Proteus-Xenorhabdus*. Estos CSI proporcionan evidencia que apoya la inferencia de los árboles filogenéticos basados en el núcleo del genoma, proteína ribosómica y MLSA, en que los miembros del clado *Proteus-Xenorhabdus* forman un clado monofilético derivado de un ancestro común único (1).

Estas bacterias son oxidasa negativa y negativa para arginina descarboxilasa (1), causantes de infecciones nosocomiales y del tracto urinario de forma oportunista (25). El género *Cosenzae* consiste en la especie *Cosenzae myxofaciens*, aunque existen nuevas propuestas taxonómicas para este género basadas en las similitudes de los genes de ARNr 16S (26).

Los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son un grupo de bacterias simbióticas asociadas con nematodos entomopatógenicos del género *Sterinernema*, con actividades sinérgicas que aseguran la reproducción y proliferación de los nematodos y las bacterias (27).

Familia *Budviciaceae* - Clado *Budvicia*

La familia *Budviciaceae* contiene el género tipo *Budvicia* y los géneros *Leminorella* y *Pragia*. Los miembros de la familia *Budviciaceae* forman un grupo monofilético distinto en los árboles multigenéticos y se pueden distinguir de todas las demás bacterias por nueve CSI (1).

Los miembros de esta familia son catalasa positivos, oxidasa negativos y negativos para indol, arginina dihidrolasa, ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa, cuya característica distintiva es la producción de sulfuro de hidrógeno y son incapaces de crecer en los medios de cianuro de potasio (1). La temperatura óptima de crecimiento para el crecimiento de *Leminorella* es de hasta 42°, la cual la diferencia de *Budvicia* spp. por su motilidad, utilización de tartrato, aclaramiento de tirosina y la imposibilidad de crecer a 42°C (28).

Leminorella tiene tres especies basadas en la hibridización de ADN, estas son *Leminorella grimontii*, *Leminorella richardii* y *Leminorella* sp., afectan usualmente a los adultos causando infecciones del tracto urinario, infecciones del sitio quirúrgico, bacteremia, peritonitis, infecciones de piel y partes blandas (29). El género *Pragia* contiene una sola especie *P. fontium*, descrita en 1988 (28).

En la figura 1 se muestra la distribución de secuencias conservadas de delección e inserción identificados dentro del orden *Enterobacterales* y sus familias (1).

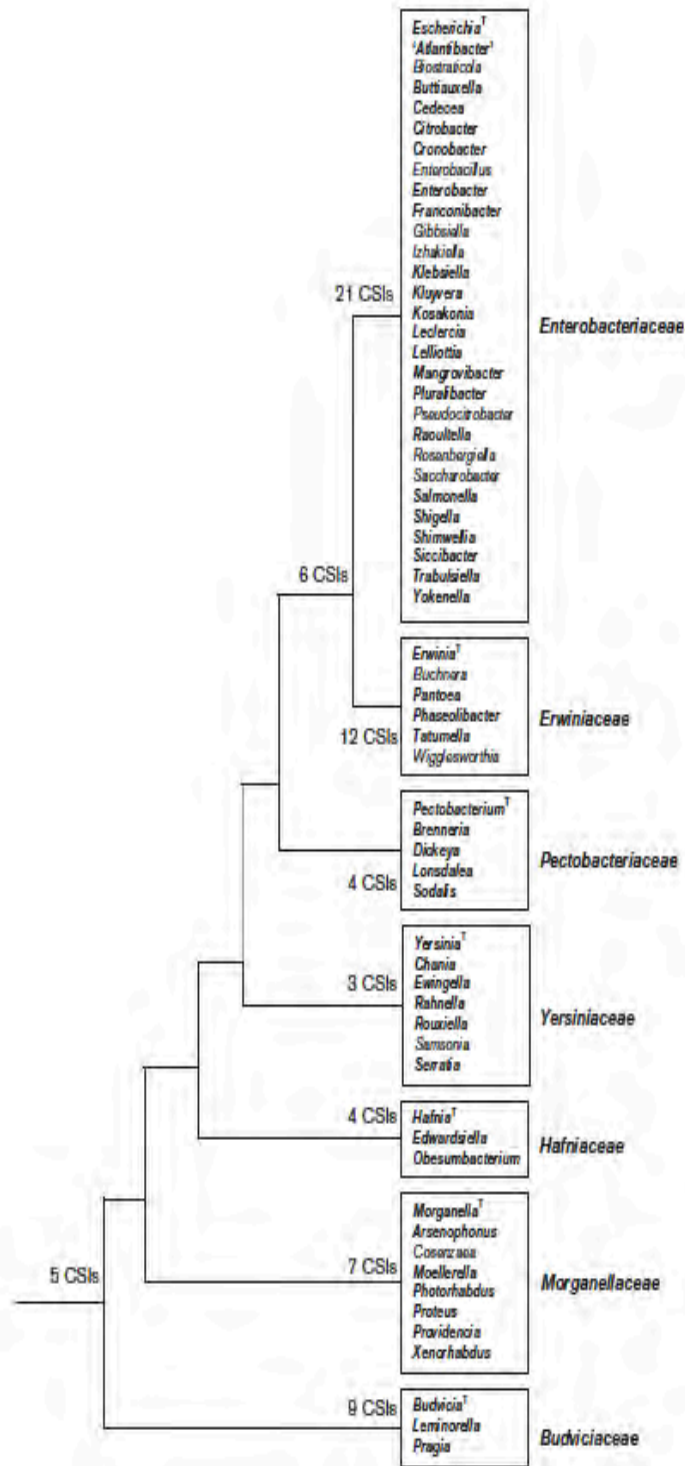


Figura 1. Resumen de la distribución de secuencias conservadas de delección e inserción identificados dentro del orden *Enterobacteriales* y sus familias (1).

1.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana a los β -lactámicos

El problema de las resistencias a β -lactámicos está causada por dos factores: los antibióticos, que generan una selección de aquellas bacterias capaces de sobrevivir a la acción de estos, y los determinantes genéticos de resistencia que presentan las bacterias seleccionadas.

Dentro del grupo de bacterias gram-negativas podemos encontrar cuatro mecanismos principales de resistencia a los antibióticos:

- a) **Sobreexpresión de bombas de eflujo.** Las bombas de eflujo son unas proteínas transmembrana ubicuas en este dominio. Estas bombas expulsan los antibióticos fuera de la bacteria, por lo que, al disminuir significativamente su concentración intracitoplasmática y periplasmática, confieren resistencia antimicrobiana(30).
- b) **Modificación de las dianas de acción.** Este mecanismo impide o dificulta la acción del antibiótico. Se puede completar con las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr23S (macrólidos) y de las enzimas que son proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). Una de las modificaciones más frecuentes es en las proteínas PBP, como es el caso de *Neisseria* spp. y *Haemophilus influenzae* que presentan PBPs híbridas (31).
- c) **Disminución de la permeabilidad de membranas.** La pérdida o modificación de porinas es uno de los casos más frecuentes en las resistencias a antimicrobianos. Aunque no es de los mecanismos más potentes, al aparecer junto a otros puede tener un efecto fatal. Uno de los ejemplos más representativos es la pérdida de la porina OprD en *Pseudomonas*, lo que le confiere resistencia a carbapenémicos (32).
- d) **Modificación enzimática de los antibióticos.** Existe una gran variedad de enzimas que tienen la capacidad de modificar los antimicrobianos, pero si nos referimos a antibióticos β -lactámicos, las principales enzimas con actividad frente a este grupo son las β -lactamasas, que incluso pueden presentarse como resistencia intrínseca (33).

Esta revisión, se centrará en el estudio de las β -lactamasas, que son enzimas con un limitado rango de estructuras moleculares encontradas en diversas fuentes bacterianas. Su parecido se basa en su habilidad de hidrolizar compuestos químicos que contienen un anillo β -lactámico (34). Si bien, las β -lactamasas son enzimas que existían aún antes de la presencia de

la selección antimicrobiana, de acuerdo a análisis filogenéticos, se estima que las serine- β -lactamasas tienen dos años billones de años de antigüedad y los plásmidos que codifican genes OXA y que fueron movilizados desde cromosomas, aproximadamente aparecieron hace millones de años (35).

Las β -lactamasas se volvieron clínicamente importantes a partir de la resistencia en *Staphylococcus aureus* por la enzima PC1 (codificada por el gen *blaZ*) que comprometió rápidamente la eficacia de la penicilina. Esto y la exitosa lucha contra los organismos productores de PC1 a través de la introducción de meticilina anunciaron el comienzo de una "carrera armamentista" entre los químicos medicinales y la evolución bacteriana que continúa hasta el día de hoy y que ha visto como la introducción de nuevos β -lactámicos ha llevado a la aparición de nuevas β -lactamasas, tanto por mutación de familias previamente conocidas como por diseminación de genes que codifican nuevas enzimas. Una complicación adicional es la creciente prevalencia de aislados que expresan múltiples β -lactamasas, a menudo codificadas en plásmidos de multirresistencia (36).

Actualmente existen dos sistemas de clasificación de las β -lactamasas, uno basado en su secuencia de aminoácidos y se lo conoce como la clasificación de Ambler. El otro sistema que toma en cuenta el sustrato y sus perfiles de inhibición, de manera que se puede agrupar las enzimas correlacionándolas con su fenotipo en aislamientos clínicos, y se la conoce como la clasificación funcional de Bush-Jacobi-Medeiros (37). En la clasificación funcional el grupo 1 comprende las cefalosporinas que se clasifican como de la clase C, de acuerdo a la clasificación de su estructura molecular; las de grupo 2 tienen serina en su sitio activo y comprenden a las de clase A y D; y las del grupo 3 comprenden las metallo- β -lactamasas y corresponden a la clasificación molecular B (38).

Enterobacterales productores de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE)

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se encuentran como mecanismo de resistencia en bacilos gram negativos, y causan el 19% de las infecciones asociadas a la atención en salud anualmente (39). Estas enzimas, tienen limitadas opciones terapéuticas, ya que hidrolizan la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo los compuestos de oximino- β -lactámicos (cefuroxina, cefalosporinas de cuarta generación y aztreonam), pero no las cefamicinas ni los carbapenémicos. La mayoría de las BLEEs pertenecen a la clase A de Ambler de las β -lactamasas y de acuerdo a la clasificación de Bush-Jacoby al grupo 2 (40), son

inhibidas por los inhibidores β -lactámicos (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) y por la diazabiciclotanonas (avibactam) (39) (41).

La BLEEs son enzimas adquiridas, codificadas por genes en plásmidos. El nivel de expresión y las propiedades de una enzima, y la co-presencia de otros mecanismos de resistencia (otras β -lactamasas, eflujo activo y alteración de la permeabilidad) resulta en una gran variedad de fenotipos de resistencia observados entre los aislados positivos para BLEE (41).

Las enzimas de clase A comprenden las β -lactamasas más ampliamente distribuidas y estudiadas e incluyen PC1, responsable de la resistencia a penicilina en *S. aureus*. Dentro de las enzimas de la clase A se encuentran: TEM (llamado así por el paciente Temoneira), la primera β -lactamasa transmitida por plásmidos identificada en bacterias gram-negativas y activa contra aminopenicilinas y cefalosporinas básicas; SHV (variante sulfhidrido, una enzima con actividad similar a TEM, originalmente identificada en el cromosoma de *K. pneumoniae* y posteriormente movilizada en plásmidos) (42); CTX-M (cefotaximasa, una enzima intrínsecamente activa frente a cefotaxima y que es la más prevalente a nivel mundial) (39); y KPC (carbapenemasa de *K. pneumoniae*). La clave del éxito de enzimas de las familias TEM, SHV y CTX-M ha sido su diseminación en plásmidos y otros elementos genéticos móviles, a través de una variedad de patógenos gram negativos, particularmente las *Enterobacterales*, y su capacidad para expandir su espectro de actividad a medida que se introducen nuevos antimicrobianos en la clínica. El primer informe de resistencia mediada por SHV a cefalosporinas de tercera generación fue en 1983 con el aislamiento y caracterización de bla_{SHV-2} codificada en plásmidos, de ahí en adelante se han publicado varias variantes, hasta 25 de ellas encontradas exclusivamente en *K. pneumoniae* y cuatro en *E. coli* (42). Así, la adquisición de mutaciones puntuales que permiten a TEM y SHV hidrolizar oximinocefalosporinas, como cefotaxima y ceftazidima, ha generado el denominado fenotipo de “espectro extendido” (betalactamasas de espectro extendido o BLEE). Las enzimas CTX-M, que poseen alguna actividad inherente contra algunos de esos sustratos, también acumulan mutaciones para extender su actividad y proporcionar resistencia a una gama ampliada de β -lactámicos (36). La familia CTX-M apareció en los años 80s e incluye más de 220 enzimas diferentes; se divide en cinco grupos, a saber, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y los grupos CTX-M-25. La variante CTX-M-15, del grupo CTX-M-1. es la más prevalente en el mundo (39) (43) (44), seguida por las TEMs, SHVs y en menor extensión las PER, VEB y las variantes GES (45). Esta situación ha llevado a un mayor uso de carbapenémicos con la consiguiente aparición de resistencia por las carbapenemasas, evidenciada no solamente en el ser humano, sino en los

sistemas de evacuación de los hospitales, donde se convierte en un reservorio importante de estos microorganismos (46).

Enterobacterales productores de β -lactamasa AmpC

Las enzimas AmpC son enzimas codificadas por los cromosomas de varias especies bacterianas y define a una clase de enzimas que pertenece a la clase molecular C de Ambler y al grupo 1 de Bush-Jacoby (40); tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas (incluida la tercera generación, pero generalmente no las de cuarta generación) y monobactames (47). La temocilina es altamente estable entre la mayoría de las β -lactamasas y mantiene su actividad *in vitro* contra los *Enterobacterales* productores BLEE y AmpC (48). En general, las enzimas de tipo AmpC son poco inhibidas por los inhibidores clásicos de BLEE, especialmente ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero sí por las cefalosporinas de cuarta generación (49)(41).

Las AmpCs se encuentran como enzimas de resistencia, codificadas por genes cromosomales (cAmpCs), en algunas especies de *Enterobacterales*, pero también se pueden encontrar adquiridas como plásmidos (pAmpCs); esto representa dos situaciones distintas desde el punto de vista clínico y microbiológico(48). En el caso de *E. coli*, esta porta naturalmente una AmpC mediada por cromosomas, pero a diferencia de otros *Enterobacterales*, este gen no es inducible. En *E. coli*, la producción de AmpC está regulada por un mecanismo promotor y atenuador que dan lugar a enzimas constitutivas de bajo nivel y que por lo tanto permiten el uso de antibióticos β -lactámicos para tratar estas infecciones, siempre y cuando no existan otros mecanismos de resistencia. Varias mutaciones en la región promotora / atenuadora de *E. coli* pueden causar hiperexpresión constitutiva de cAmpC. Estas cepas de *E. coli* pueden volverse resistentes a cefamicinas, penicilinas de amplio espectro o incluso 3GC, lo que dificulta diferenciar estas cepas fenotípicamente de la producción de la enzima pAmpC (50).

La principal característica de las cAmpC está representada por el nivel variable de expresión de los genes AmpC en las diferentes especies, siendo esta expresión constitutiva o inducible. Cuando la expresión es inducible, al exponerse a β -lactámicos pueden actuar como inductores haciendo clínicamente relevante los mecanismos de resistencia (47). Por definición, la expresión inducible es reversible, pero ciertas cepas de cAmpCs pueden fácilmente desarrollar mutantes, en el cual la expresión se desreprime de manera estable y finalmente da

como resultado una expresión constitutiva (también denominadas “mutantes desreprimidos”)(48) (41).

Se ha descrito más de 20 AmpC diferentes mediadas por plásmidos: la primera se describió en 1989, en América Latina en la década de los 90, en un aislamiento de *K. pneumoniae* y que fueron denominadas FOX-1, desde entonces se han observado a nivel mundial como resultado de la transferencia horizontal de plásmidos que codifican AmpC y la expansión clonal (49). Hay varios linajes de genes pAmpC, que se originan a partir de genes AmpC cromosomales portados por varias especies gram-negativas y que se encuentran en al menos cinco grupos filogenéticos, entre ellos, el grupo *Enterobacter* (MIR, ACT), el grupo *Citrobacter freundii* (CMY- 2-like, LAT, CFE), el grupo *Morganella morganii* (DHA), *Hafnia alvei* (ACC) y el grupo *Aeromonas* (CMY-1-like, FOX, MOX). Las más prevalentes y ampliamente diseminadas son las enzimas similares a CMY-2, aunque las β -lactamasas similares a DHA inducibles y algunas otras también se han extendido ampliamente (48).

Enterobacterales productoras de carbapenemasas

El desarrollo de la resistencia a los carbapenémicos es uno de los escenarios más preocupantes a nivel mundial, ya que se elimina uno de los antimicrobianos con mayor espectro (47). La resistencia a los carbapenémicos está ligada a varios mecanismos, como ya hemos dicho con anterioridad, además de la producción de carbapenemasas, existen otros mecanismos asociados a resistencia como la disminución de la permeabilidad debido a alteración de la regulación de porinas y posiblemente también a las proteínas fijadores de penicilina, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o enzimas AmpC (41)(51).

β -lactamasas de clase A

Las β -lactamasas de clase A, son las β -lactamasas más prevalentes en el mundo de las bacterias gram-negativas multirresistentes (52), por lo que se han convertido en un área de investigación de interés actual dada su relevancia clínica que se refiere a las interacciones de estas enzimas con los carbapenémicos, antimicrobianos que fueron introducidos en el año 1985 en forma de imipenem (combinado con cilastatina que es un inhibidor de la dipeptidasa renal que evita su degradación *in vivo*) y que poseen una potente actividad antimicrobiana a través de la inhibición de las PBP y la capacidad de acilar y formar acilenzimas de larga duración con la mayoría de las serinas β -lactamasas (52) (36). Los seis tipos de carbapenemasas de clase A

y que corresponden al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush-Jacoby (37), incluyen: GES (β -lactamasas de espectro extendido de Guyana), SME (enzima de *Serratia marcescens*), SHV (β -lactamasa con sulfidrilo variable), KPC (carbapenemasa de *K. pneumoniae*), IMI/NMC-A (imipenemasa/metallocarbapenemasa) y SF (carbapenemasa de *Serratia fonticola*) (37). Sin embargo, las β -lactamasas más importantes capaces de hidrolizar los carbapenémicos; en el caso de la clase A, son las enzimas KPC, que ahora tienen distribución mundial (36) y son transmitidas por plásmidos. SME/IMI/NMC-A son codificadas cromosómicamente y el gen *bla*_{GES} se inserta dentro del integrón clase 1 en un plásmido de *P. aeruginosa* (37).

Las enzimas KPC comprenden 265-269 aminoácidos y hasta la fecha se han detectado 73 variantes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#KPC>). Estas enzimas presentan altos niveles de resistencia a penicilina, cefalosporinas y variable a carbapenem, pero no son inhibidos por los inhibidores de betalactamasas como el clavulanato, tazobactam y sulbactam (53). Constan de dos subdominios y su plegamiento es similar al observado en otras β -lactamasas de clase A, como SME, SHV y TEM19. Un subdominio es alfa helicoidal, mientras que el otro contiene una hoja β de cinco hebras, flanqueada por alfa hélices. La hendidura que se encuentra entre los subdominios, alberga el sitio activo que incluye los residuos 70 y 66, esencial para la catálisis (54).

Las β -lactamasas de clase A, incluida la KPC-2, hidrolizan el enlace amida en los antibióticos β -lactámicos mediante pasos de secuencias de acilación y desacilación. El residuo catalítico Ser70 ataca el carbono carbonilo del anillo β -lactámico dando como resultado la ruptura del enlace amida y la formación de un intermedio covalente acil-enzima (52) (55). Posteriormente, Glu166 activa una molécula de agua catalítica para atacar el carbono carbonilo de la acil-enzima que conduce a la hidrólisis del enlace éster entre Ser70 y el fármaco. La desacilación regenera la enzima activa y libera el fármaco inactivado (55).

β -lactamasas de clase B

Las metallo- β -lactamasas (MBL) de clase B de Ambler y clase 3 de Bush-Jacoby (37), dependen de la interacción con el zinc, y son particularmente problemáticas ya que tienen un potencial de transmisión horizontal, y tienen amplias propiedades hidrolíticas que afectan a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos exceptuando monobactams (56) (37).

Las metalo- β -lactamasas se clasifican en tres subclases (B1, B2 y B3) de acuerdo con la secuencia de alineamientos y coordinación de zinc, siendo el nivel de identidad entre los grupos del 20% o menos. Las subclases B1 y B3 necesitan dos iones de zinc en el sitio activo,

coordinados para la actividad enzimática y tienen un amplio espectro de acción incluyendo carbapenémicos (57) (37). La clase B1 muestra resistencia a todos los β -lactámicos, excepto monobactam, mientras que las de clase B2, muestran actividad directa exclusivamente contra los carbapenémicos. Independientemente de la clase, las MBLs no son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam o avibactam (58). La subclase B1 incluye el mayor número de miembros clínicamente relevantes como imipenemasa (IMP), metalo- β -lactamasa codificada por integrones de Verona (VIM), Nuevo Metalo- β -lactamasa de Delhi (NDM), metalo- β -lactamasa de São Paulo (SPM), imipenemasa alemana (GIM), imipenemasa de Seúl (SIM), metalo- β -lactamasa de Kyorin (KHM), imipenemasa australiana (AIM), imipenemasa holandesa (DIM) e imipenemasa de Florencia (FIM), y la codificación cromosómica BcII (*Bacillus cereus*), CcrA (*Bacteroides fragilis*), Bla2 (*Bacillus anthracis*), IND (*Chryseobacterium indologenes*), BlaB (*Elizabethkingia meningoseptica*), CGB-1 (*Chryseobacterium petróleo*), TUS-1 (*Myroides odoratus*), MUS-1 (*Myroides odoratimimus*), JOHN-1 (*Flavobacterium johnsoniae*), EBR-1 (*Empedobacter brevis*), SFB-1 (*Shewanella frigidimarina*) y SLB (*Shewanella livingstonensis*)(36)(37). La subclase B2 tiene un ion activo, mientras que la unión al segundo ión de zinc inhibe su actividad catalítica (57). Estas MBL están codificadas cromosómicamente y tienen un perfil hidrolítico preferencial para carbapenémicos, pero no para las penicilinas y cefalosporinas. Esta subclase incluye CphA (*Aeromonas hydrophila*), ImiS, AsbM1 (*Aeromonas veronii*) y SFH-1 (*S. fonticola*) (36) (57). Las enzimas de la subclase B3 son binucleares dependientes del zinc, como la subclase B1, pero poseen preferencia de hidrólisis a las cefalosporinas. La subclase B3 incluye enzimas codificadas cromosómicamente que son L1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), Mbl1b (*Caulobacter crescentus*), CAU-1 (*Caulobacter vibrioides*), THIN-B (*Janthinobacterium lividum*), FEZ-1 (*Legionella gormanii*), GOB (*E. meningoseptica*), BJP- (*Bradyrhizobium japonicum*), SMB-1 (*S. marcescens*) y Trípoli metalo- β -lactamasa (TMB)(36)(37). Entre las metalo- β -lactamasas, VIM y NDM son las más frecuentes en el mundo y de estas comunicadas en América Latina y el Caribe a la fecha son IMP, VIM, NDM y SPM (59). NDM-1 ha sido aislada en la India y posteriormente diseminada a Europa y Estados Unidos a través de turistas, hay estudios que sugieren que los plásmidos que contienen bla_{NDM} también poseen otros determinantes de resistencia, como a las quinolonas y metilasas 16SrRNA que confieren resistencia a los aminoglucósidos) (56).

La estructura tridimensional de las metalo- β -lactamasas muestra un dominio “ $\alpha\beta/\beta\alpha$ ” de cuatro capas, con un zona central de iones de Zn (60). Durante muchos años, desde su identificación en 1966, las MBL se consideraron principalmente de interés bioquímico, más

que clínico, pero esta situación ha cambiado al darse cuenta de que varias de las enzimas de la subclase B1, en particular NDM en *Enterobacterales* y VIM en organismos no fermentadores, como *P. aeruginosa*, se están diseminando ampliamente en elementos genéticos móviles. De hecho, el grado de diseminación de NDM-1 en una variedad de soportes genéticos ha llevado a su descripción como un “gen epidémico” y a su reconocimiento como un participante importante en la diseminación de la resistencia de los carbapenémicos en *Enterobacterales*. Por el contrario, las enzimas de las subclases B2 y B3, con algunas excepciones, están restringidas a los cromosomas de bacterias gram-negativas. La enzima L1 de *S. maltophilia*, un organismo altamente resistente capaz de infectar sólo a pacientes gravemente comprometidos, es la más relevante desde el punto de vista clínico (36).

β -lactamasas de clase D

Las enzimas OXA de clase D de Ambler, pertenecientes al grupo 2d de la clase funcional de Bush-Jacoby (37), son las más diversas y las menos entendidas de todas las β -lactamasas, fueron reconocidas en los años 60 y 70s y son un grupo de enzimas que incluye más de 790 miembros (61)(37). Estas enzimas confieren resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y la mayoría no son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas, ni EDTA. Ciertas enzimas OXA hidrolizan carbapenémicos (CHDLs) (37) y se han encontrado en especies de *Acinetobacter* y *Enterobacterales*, en estos últimos se ha comunicado la presencia de OXA-23 y OXA-48 (37)(62). La expresión mejorada de los genes *bla*_{OXA} se asocia a menudo con secuencias de inserción (por ejemplo, ISAbal) que proporcionan un promotor adicional que conduce a la resistencia a carbapenémicos o a la disminución en su susceptibilidad (59).

A pesar de que muchos miembros son cromosómicos, la diseminación de cefalosporinas transmitidas por plásmidos en *P. aeruginosa*, y más recientemente en *A. baumannii* y en *Enterobacterales* (particularmente *K. pneumoniae*), ha aumentado la importancia clínica de esta clase. La reciente identificación de enzimas OXA en una variedad de especies gram positivas es una muestra más de la amplia distribución y diversidad que tienen estas enzimas (36).

Las β -lactamasas tipo OXA hidrolizan los antibióticos β -lactámicos a través de la carboxilación del anillo activo de lisina y usan esta lisina carboxilada para activar y anclar el sitio activo de la serina (36) (61).

En el año 2010, Poirel, dividió a las β -lactamasas OXA en cuatro grupos. El grupo I son las β -lactamasas de clase D de espectro estrecho que no tienen una actividad significativa contra las cefalosporinas o los carbapenémicos y consta de OXA-1, OXA-2 y OXA-101. El

grupo II son las β -lactamasas adquiridas de espectro extendido que hidrolizan ciertas cefalosporinas de espectro extendido (especialmente ceftriaxona y cefepima), entre ellas se encuentran OXA-3, OXA-15, OXA-21, OXA-32, OXA-34, OXA-36 y OXA-53. El grupo III son las β -lactamasas que hidrolizan los carbapenémicos, pero que no hidrolizan de manera significativa las cefalosporinas de espectro extendido, un grupo importante son las OXA-23, que con causa importante de resistencia en *Acinetobacter*. El Grupo IV forma parte de los cromosomas de las bacterias gram negativas e incluye las enzimas OXA-51 del complejo *Acinetobacter baumannii* (61)(62).

Inhibidores de β -lactamasas

Junto con las mejoras en los propios β -lactámicos, las combinaciones de β -lactámicos sensibles con los inhibidores de β -lactamasas representan la principal estrategia para combatir la resistencia mediada por β -lactamasas. Desde el descubrimiento y desarrollo del ácido clavulánico, el mundo vio una disminución en la producción de nuevas moléculas hasta la llegada 10 años después del avibactam y varbobactam (63). En los últimos años, este proceso ha dado sus frutos, con representantes de dos nuevas clases de inhibidores y otros compuestos y combinaciones en desarrollo (36).

Se realizará un comentario breve sobre los avances de los nuevos inhibidores de las β -lactamasas. El principal de ellos es el avibactam, una nueva diazabicyclooctanona (DBO), de las cuales avibactam (anteriormente NXL-104) fue el progenitor y el primero en llegar a la clínica usado en combinación con la oximinocefalosporina ceftazidima (63). Avibactam es una betalactamasa no β -lactámica basado en una estructura de núcleo bicíclico, que es capaz de acilar el sitio activo de serina β -lactamasas de forma reversible (64). Esto contrasta con otras clases de inhibidores previos (basados en β -lactámicos), donde la acilación es seguida por eventos que finalmente conducen a una inhibición irreversible, esta diferencia mecanicista contribuye a que avibactam sea eficaz para proporcionar protección contra las β -lactamasas cromosómicas y plasmídicas (65). Avibactam es un potente inhibidor de β -lactamasas de clase A, seguidas por las de la clase C y D (63)(65), en combinación con ceftazidima están aprobados para infecciones intraabdominales, infecciones del tracto urinario adquiridas en el hospital y neumonías asociadas al ventilador. Los puntos de corte de ceftazidima-avibactam se reportan con una concentración de avibactam de 4 μ g/ml. Avibactam también se ha desarrollado en conjunto con el monobactam aztreonam, el cual proporciona también actividad contra las MBL (VIM, NDM, IMP) (63)(65)(66).

El éxito de avibactam también ha estimulado el desarrollo de diazabicyclooctane (DBO) alternativos, de los cuales un compuesto es relebactam, el cual se encuentra en conjunto con el imipenem. Relebactam tiene actividad contra las carbapenemasas clase A de Ambler, incluyendo KPC y la clase C, y a diferencia de avibactam es más estable contra KPC-2 y KPC-3 y lo es menos contra las carbapenemasas OXA-48(63), al tener un anillo de piperidina en el lado carboxamida de la cadena (65). EUCAST 2021, muestra punto de corte de 2mg/L con una concentración fija de relebactam de 4mg/L (63)(67). En estos compuestos, los puntos de diferencia ocurren en los sustituyentes C2, C3 y C4, que en algunos casos resulta además de una débil actividad antibacteriana, que surgen a través de la inhibición de PBP, para complementar su acción inhibidora de la β -lactamasas (36).

Una segunda generación de DBO es el zidebactam, que posee un mecanismo de acción dual que incluye la habilidad de unirse con el PBP2 de los gram negativos y la posibilidad de inhibir a las β -lactamasas de clase A y C de Ambler, así como BLEEs, AmpCs y MBLs. Zidebactam está siendo desarrollado junto con cefepima, sirviendo el zidebactam como un potenciador β -lactámico. El compuesto mejora la actividad del cefepima mediante la unión complementaria de las PBP (la cefepima inhibe a PBP-1a y PBP-3, mientras que el zidebactam inhibe a PBP-2) (63) (65). *Proteus* spp. positivo al indol, *Acinetobacter* y *S. marcescens* muestra resistencia intrínseca a zidebactam (65).

La resistencia de los *Enterobacteriales* a ceftazidima/avibactam es relativamente baja (<2,6%), mientras que la resistencia en *P. aeruginosa* puede llegar a ser del 4-8% (68). Aunque esta cifra puede ser a ser del 24,7% en los microorganismos resistentes a carbapenémicos. En el caso específico de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos la resistente puede ser del 16,7% al 21% y en *E. coli* 71,4% (68)(69).

Los compuestos a base de boronato representan un segundo escalón para el desarrollo de inhibidores de β -lactamasas. La propensión del boro a adoptar una geometría tetraédrica le permite de manera transitoria formar un enlace covalente con el residuo de serina catalítica de CTX-M-15 y AmpC (70), este enlace covalente imita el estado de transición tetraédrico en la acilación/desacilación y la unión da como resultado la desactivación rápida de la enzima serina β -lactamasa (71)(72), esta unión de naturaleza reversible, significa que el inhibidor no se hidroliza sino que se recicla después del proceso de diacilación, regenerando moléculas capaces de interactuar con la enzima libre (72). Más recientemente, sin embargo, el desarrollo de boronatos cíclicos como inhibidores de amplio espectro de serina β -lactamasas ha dado lugar a la introducción en la clínica a la combinación de meropenem con el vaborbactam, este último un farmacóforo cíclico de ácido borónico (71). Vaborbactam inhibe de forma potente

las β -lactamasas de clase A, pero la actividad no se extiende a OXA enzimas o MBL, pero si a BLEE y las carbapenemasas clase C (36)(63). Meropenem penetra la membrana externa de las paredes celulares e inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Se une a varias PBP, en el caso de *E. coli* PBP-2, PBP-3 y PBP-4 (72). Varbobactam ha sido desarrollado junto con meropenem, el primero potencia al actividad de meropenem en hasta 5 veces, la CMI para meropenem-varbobactam usa una concentración de varbobactam de 8 μ g/ml contra las *Enterobacteriaceae* (63) (70). Ha sido aprobado para su uso en infecciones del tracto urinario y pielonefritis aguda (65).

Genes de carbapenemasa en *K. pneumoniae*

Los diferentes genes de carbapenemasas que circulan dentro de *K. pneumoniae* a menudo son transportados por estructuras móviles, incluidos plásmidos y transposones, y por lo tanto pueden propagarse eficientemente a diferentes miembros de la familia *Enterobacterales* (73). El transposón Tn4401 es la principal estructura genética que mejora la propagación de genes de tipo *bla*_{KPC} en diferentes plásmidos, pero su transposición no es muy eficiente. El Tn4401 es de 10 kb de longitud, está delimitado por dos repeticiones invertidas imperfectas de 39 pb, y contiene un gen de transposasa *tnpA*, una resolvasa *tnpR*, y dos secuencias de inserción, ISKpn6 e ISKpn7. La asociación de Tn4401 con *bla*_{KPC} y otros determinantes de resistencia a antibióticos proporcionan una manera fácil de propagación de las carbapenemasas, incluso en ausencia de selección por un carbapenémico (51). Se han descrito ocho isoformas de Tn4401. Las isoformas a, c, d y e difieren entre sí por deleciones río arriba de *bla*_{KPC}, de 99pb, 215pb, 68 pb y 255 pb, respectivamente, en comparación con la isoforma b que no presenta deleción (73). En 2017, se informó una nueva isoforma, denominada Tn4401h, que presenta una deleción entre los genes *istB* y *bla*_{KPC} y fue identificada en *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, mostrando mayor resistencia a meropenem, ertapenem y cefepima (74).

El gen *bla*_{OXA-48} se encuentra en el transposón Tn1999. La difusión actual de *bla*_{OXA-48} es, por lo tanto, debido principalmente al plásmido epidémico de tipo IncL / M (pOXA-48a) que demostró ser altamente transferible y se encuentran presente en África del Norte, Medio Este y Europa (62)(51)(75)(61). En el caso de *bla*_{OXA-181} y *bla*_{OXA-232} se encuentra el elemento de inserción ISEcp1, el cual está localizado en el Tn2013 e InX3 y son endémicos del subcontinente Indio y ciertos países del África Sub-Sahariana (61)(76). Los genes MBL (por ejemplo, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}) se encuentran en diferentes tipos de plásmidos de amplio rango de huéspedes (por ejemplo, IncA / C, IncN) con varias características genéticas

diferentes; *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* generalmente se encuentra en estructuras de integrones de clase I ubicadas dentro del transposón estructuras que potencian su difusión. Por el contrario, los genes *bla_{NDM}* están asociados con estructuras genéticas en mosaico, incluyendo secuencias de inserción (por ejemplo, ISAbal), pero el mecanismo exacto que conduce a su adquisición en plásmidos permanece desconocido (51).

Los clones de alto riesgo

Los clones de alto riesgo se definen como clones con una distribución global, que muestran una capacidad mejorada para colonizar, propagar y persistir en una variedad de nichos. Tienen flexibilidad para acumular e intercambiar genes de resistencia y virulencia con otras bacterias. Tales clones son una poderosa fuente para la propagación de componentes genéticos de resistencia antimicrobiana (es decir, genes, integrones, transposones y plásmidos). El hábitat de *K. pneumoniae* no se limita a los seres humanos, sino que se extiende al entorno ecológico, que incluye aguas superficiales, aguas residuales y suelo. La capacidad de algunos aislados, para sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente a temperaturas extremas, desempeñan papeles importantes en la transferencia horizontal de determinantes de resistencia de drogas a otras bacterias, actuando como donantes eficientes, un ejemplo es *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (por ejemplo, *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*) (51). La enzima KPC está presente en más de 100 ST diferentes, pero la pandemia KPC se debe principalmente a la propagación de miembros del complejo clonal (CC) 258 con el ST258 y las variantes ST11, ST340 y ST512 (73). Dentro de los aislados de *K. pneumoniae* existen diversos ST comunicados como los más comunes, tales como ST101, ST395, ST15, ST147 y en *E. coli* ST 38 y ST410, estos últimos asociados con la dispersión de OXA-48, OXA-181, OXA-232 y OXA-2014 (61).

1.3 Epidemiología de los *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), considera a los *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos como una amenaza urgente a la salud pública dado su aumento en la prevalencia y resistencia a varios antibióticos. Estos microorganismos son difíciles de tratar por tener altos niveles de resistencia antimicrobiana, asociándose a una alta mortalidad (77) (78). Los *Enterobacteriales* resistentes a un mayor espectro de antimicrobianos, incluyendo carbapenémicos, fueron comunicados desde el año

2001 (79), desde ahí ha existido una amplia diseminación en Estados Unidos y otros países (80).

Los costes económicos asociados a estos microorganismos son amplios, especialmente debido a su incremento en los últimos años. En Estados Unidos, dependiendo del tipo de infección, la media de coste de una infección hospitalaria por ERC varió de \$ 22.484 a \$ 55.031 y en la comunidad de \$ 37.778 a \$ 83.512. Una densidad de incidencia de 2,93 por 100.000 habitantes en los Estados Unidos (9418 infecciones) costaría a los hospitales alrededor de \$275 millones y a la sociedad \$ 553 millones, lo cual es una cifra mayor a los estimado anualmente para muchas de las enfermedades crónica y agudas (77).

En Estados Unidos, el porcentaje de ERC en hospitales de agudos ha disminuido del 8,8% en 2006 a 10,6% en el 2009 y a 3,1% en el 2015. Durante los primeros nueve meses del 2017, entre los 4 442 aislados de ERC, un 32% fueron productores de carbapenemasa. Entre los aislados productores de carbapenemasa, el 15, 5% expresaron carbapenemasas tipo KPC (88%). El microorganismos más frecuentemente encontrado fue *Klebsiella* (65%) (79).

En Europa, ha existido un aumento alarmante de las bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos en la última década. La media ponderada para la población en los aislamientos resistentes a carbapenémicos en el 2015 fue de 17,8% para *P. aeruginosa*, 8,1% para *K. pneumoniae* y 0,1% para *E. coli*, observándose una tendencia al aumento en *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos entre los años 2012- 2015, especialmente en Croacia, Rumania y España. Los países con las tasas más altas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos son Grecia, Italia y Rumania (78). En China, el primer comunicado de *bla*_{NDM} involucró un *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en cuatro pacientes de diferentes provincias, de ahí en adelante se ha encontrado en la mayoría de las especies de *Enterobacterales*. Zhang y col, en el año 2017, comunicaron que, en China, el 90% de los *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos poseían *bla*_{KPC-2} y *bla*_{NDM}, y pertenecían a *K. pneumoniae* ST131 y *E. coli* ST167. La mayoría de los plásmidos que portaban *bla*_{NDM} pertenecían a IncX3 y contienen una estructura central común, *bla*_{NDM}-*bla*_{MBL}-trfF(81).

La mortalidad asociada a las bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos es alta. Un metaanálisis que evaluó la mortalidad atribuible a infecciones por ERC encontró que entre el 26-44% de las muertes fueron debidas a la resistencia a los carbapenémicos, siendo

dos veces mayor el número de muertes entre los infectados por ERC que entre los pacientes con *Enterobacterales* sensibles a carbapenémicos. Un estudio observacional en siete países latinoamericanos encontró que la mortalidad atribuible a bacteriemias por ERC fue significativamente mayor que en los pacientes infectados por patógenos sensibles a carbapenémicos. En el centro de control de enfermedades de Europa, se comunica una mortalidad entre el 30-70% y superior al 50% de los pacientes con bacteriemias por ERC (78). En España, un estudio que recolectó la información de 82 hospitales, mostró 903 pacientes infectados por microorganismos multirresistentes, de cuales 117 murieron durante el primer mes, indica que al año deben existir 35.4000 pacientes fallecidos por microorganismos multirresistentes (82).

Epidemiología de las carbapenemasas en España

El problema de la resistencia a los carbapenémicos en *Enterobacterales* radica en una serie de factores que están favoreciendo su aparición, persistencia y rápida dispersión, no sólo en el contexto clínico, sino también en zonas urbanas y en la agricultura (83). La mayor prevalencia de transporte fecal y co-colonización con *Enterobacterales* productores de carbapenemasas, la dispersión de clones de alto riesgo en MDROs (microorganismos multidrogoresistentes), la presencia de co-resistencia a otros antimicrobianos, incluyendo la resistencia a la colistina y ahora, la aparición de determinantes de la resistencia al nuevo inhibidor de β -lactámicos y sus combinaciones son los principales factores que impulsan esta tendencia (82).

En Europa, el programa EuSCAPE en el año 2019, realizó una encuesta para determinar la aparición de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas en los hospitales europeos, mostrando que la producción a carbapenemasas es la principal causa de resistencia a los carbapenémicos, se demostró además que el 70% de los aislados positivos se concentran en cuatro ST y sus derivados, a saber 11, 15, 101, 258/512, acotándose además que la propagación intrahospitalaria de estos microorganismos es la más frecuente (83). Por las mismas razones, la complejidad en la distribución de carbapenemasas en *Enterobacterales* en España ha aumentado a lo largo de los últimos años produciéndose en los años 2010 brotes esporádicos hospitalarios, hasta reportar transmisión interregional autóctona (84) .

La primera detección de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC) en este país se asoció con casos esporádicos de metalo β -lactamasas tipo VIM en Barcelona en el 2003 y publicada en el 2005, y hace referencia a un aislamiento de *K. pneumoniae* en un

paciente con infección de vías urinarias (85). El primer brote de NDM en España se produjo en el año 2005, encontrándose el gen *bla*_{VIM-1} en todos los aislamientos (86). Entre 2005 hasta la fecha se han comunicado brotes locales en diferentes hospitales de la zona de Madrid y Granada por las carbapenemasas VIM y KPC en pacientes con o sin antecedentes de viajes al extranjero (87)(86)(88). En el año 2009, la Red Española para la investigación en enfermedades infecciosas (<https://www.reipi.org/>) desarrolló un estudio de vigilancia que involucró 35 hospitales, mostrando una prevalencia menor al 0,2% de aislamientos de EPC, siendo todos productores de β -lactamasas de la clase B (VIM-1 e IMP-22)(82). Se produjo la detección del primer caso importados de NDM en 2010 y la aparición de casos extrahospitalarios sin el contacto sanitario previo (82) y que ha continuado hasta hoy con brotes locales y portadores intestinales de *Enterobacterales* productores de OXA-48, OXA-245, OXA-181 (89) (90) (91), siendo uno de sus factores determinantes para su persistencia la co-colonización de carbapenemasas, especialmente en *K. pneumoniae* y *E. coli* (92). De igual manera se han comunicado casos de aislados de *K. oxytoca* productores de VIM, OXA-48, KPC-2 , KPC-3 y NDM-1, incluso con coproducción de dos diferentes carbapenemasas en este microorganismo (93) y en *K. pneumoniae* (94) .

Actualmente la presencia de EPC es endémica en España, principalmente debida a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, siendo VIM-1 la carbapenemasa más frecuente (60%), seguida por OXA-48 (37,5%), KPC-2 (3,7%) y KPC-3 (2,5%); de acuerdo con el MLST, el más frecuente es ST2 (93). Hasta el momento la MBL predominante en España es la VIM (95). El gen *bla*_{OXA-40} ha sido detectado en España, siendo portado en cromosomas o plásmidos (62). En el año 2016, se describe el primer caso de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa KPC-3 ST258 en un paciente con infección de vías urinarias que no tiene registro de viajes al exterior (96).

El estudio EuSCAPE publicado en el año 2017, encontró una prevalencia de *K. pneumoniae* OXA- 48 del 77,8%, VIM 13,3% y KPC 8,9% , siendo los ST más prevalentes ST15 (14,3%), ST11 (26,7%), ST405 (13,3%), ST147 (10%) y ST258 (3,3%) (97). Se ha informado la presencia de *C. freundii* con coproducción de genes OXA-48 y VIM-1 localizados en el cromosoma y en el plásmido InCHI2, pertenecientes al clon ST169 (98). En el año 2018, se realiza el primer comunicado de OXA-48 en las especies de *Kluybera* en un hospital universitario de Madrid (99) y se hace en 2020 el comunicado de la presencia de VIM-1, OXA-48 y KPC-3 en *Enterobacter* spp. (100).

Otros factores que alimentan la aparición y dispersión de la EPC son los clones de alto riesgo. Estos clones MDROs de alto riesgo son la causa de múltiples brotes en toda España

como el descrito en Córdoba, el cual se originó en un paciente transferido de un hospital italiano, llegando a existir una mortalidad de 30% debido a *K. pneumoniae* ST512 KPC-3 resistente a cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos, tobramicina, amikacina, fluoroquinolonas y colistina. Existe además un importante porcentaje de aislados de EPC en muestras clínicas en pacientes admitidos a UCI. Esto se demostró en un reciente estudio multicéntrico realizado en España en 8 hospitales, con un 23,1% de BLEE productoras *Klebsiella* spp. y 20% de *Klebsiella* productora de carbapenemasas spp.. Estos aislados también mostraron altas co-resistencias a antimicrobianos no β -lactámicos (82).

Epidemiología de las carbapenemasas en Latinoamérica y el Caribe

Las publicaciones existentes de estos microorganismos en estos países son altas, así como mortalidad. Se han notificado principalmente carbapenemasas de clase A en varios miembros de la familia *Enterobacterales*. Dentro de esta clase de enzimas, solo se han informado NMC-A, KPC, GES y BKC en América Latina y el Caribe (59). El estudio SMART realizado entre los años 2008 y 2014 muestra a América Latina como una de las regiones con mayor prevalencia de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, siendo en ese entonces Puerto Rico el país que reportaba el mayor número de casos (7,5%), y la carbapenemasa tipo KPC la más prevalente, presente en ese entonces en Argentina, Brasil, Colombia y Puerto Rico (101).

a) La clase A de carbapenemasas

El primer informe latinoamericano de una bacteria productora de KPC tuvo lugar en Medellín, Colombia en el 2005, aislada de dos pacientes ingresados en dos unidades distintas, sin un linaje parecido al que en ese momento circulaba en Estados Unidos (102). En 2006, *Citrobacter freundii* resistente a imipenem fue aislado de uno de estos centros y se descubrió que los centros albergaban *bla*_{KPC-2}. En el año 2008, se produjo un brote en un hospital de tercer nivel en Colombia, cuyo caso índice se identificó en un paciente proveniente de Israel para un trasplante hepático, el aislado era *K. pneumoniae* productora de KPC-3. El clon era indistinguible de un clon productor de KPC-3 descrito previamente en múltiples brotes en Israel. La investigación de este aislado colombiano llevó a la demostración del primer brote de carbapenemasas en América Latina (103), después de esa publicación se determinó que los aislamientos pertenecían al clon ST512, el cual se integra al complejo clonal ST258 (49).

Durante el año 2020 se realizó el primer comunicado de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC-3 ST11 en cuatro aislados en la ciudad de Manizales, Colombia (104).

La diseminación activa de KPC-2 y KPC-3 ha sido demostrada en varios miembros de *Enterobacterales* en Colombia, a saber, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *K. ornithinolytica* y *K. oxytoca*, alcanzando tasas de producción de KPC de 13– 86% entre los aislados no susceptibles a carbapenémicos, estando KPC -3 principalmente asociado con ST258 y el ST512 asociado con KPC-2 (105)(106).

Las enzimas KPC también han estado presentes en Brasil desde el 2006. La primera KPC (KPC-2) en este país se identificó de forma retrospectiva en aislados de *K. pneumoniae* recolectados en hospital de Sao Paulo y Florianópolis (107)(108), y desde entonces, una amplia dispersión de genes *bla*_{KPC} ha ocurrido en todo el país y muchos otros casos han sido comunicados incluyendo KPC-2 detectados en *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *S. marcescens* and *C. freundii* (109)(110). Los estudios de epidemiología molecular han revelado la diseminación predominante del complejo clonal CC258, encontrándose más de 23 secuenciotipos, el 45% de ellos pertenecientes al CC258 (111) y otros pertenecientes al ST437(112). Asimismo, gran diversidad clonal se ha informado para productores de KPC-2 que no corresponden a *K. pneumoniae* en Brasil. La variante KPC-3 ha sido comunicada ocasionalmente en Brasil. Aunque *K. pneumoniae* es el productor de KPC predominante en la mayor parte del país, *Enterobacter* spp. se han encontrado como el principal productor de KPC en el sur de Brasil. El primer informe latino de *Proteus mirabilis* productor de KPC-2 fue realizado en Recife, Brasil (59). Un informe del año 2020 también muestra la presencia de *bla*_{NDM-1} y *bla*_{KPC-2} en *P. mirabilis* y *S. marcescens* en este mismo país (113).

En Argentina, la primera detección de KPC (KPC-2) ocurrió en 2006 en un paciente lúpico con trasplante renal coinfectado con *K. pneumoniae* y *C. freundii* (114). Entre 2008-2009, se informaron 77 aislados productores de KPC-2 en 30 hospitales de cuatro regiones de Argentina, en su mayoría se encontraron *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *E. coli* y *S. marcescens*(115). Varios estudios demostraron la mayor incidencia de diseminación clonal de *K. pneumoniae* ST258 que alberga el gen *bla*_{KPC-2}, también se ha descrito aislados de KPC-3 de *K. pneumoniae*.

En Puerto Rico, el primer brote hospitalario causado *K. pneumoniae* KPC ocurrió en el 2008, en el que las variantes KPC-2 y -8 fueron identificados. *E. coli* productora de KPC se encontró más tarde en este país en 2009, y en el año 2019 se realiza el comunicado de una *K. pneumoniae* portadora del gen *bla*_{KPC-2} ST 307 (116).

En Venezuela, *K. pneumoniae* productora de KPC y *E. cloacae* se describieron por primera vez entre 2009 y 2010; actualmente KPC-2 es la variante KPC que ha sido predominantemente identificada en *K. pneumoniae* incluido también *Enterobacter* spp., *E. coli*, *K. oxytoca* y *C. freundii* (117). El gen *bla*_{KPC-2} localizado en un Tn440Ib se informó en los clones de *K. pneumoniae* ST11, ST15, ST833, ST1272, ST1857, ST1859 y ST1860(118).

En México, los primeros brotes de *K. pneumoniae* productores de KPC-3 y KPC-2 se identificaron en 2010 y entre 2012 y 2013, respectivamente; todos los aislamientos de estos brotes mexicanos pertenecían al clon pandémico ST258, que es parte de el CC292. Asimismo, en 2011, KPC se detectó por primera vez en Chile en una *K. pneumoniae* aislado de un paciente que había viajado desde Italia y en Uruguay en dos pacientes infectados por *K. pneumoniae* productora de KPC-2 (ST258)(119).

En Cuba se reportaron tres aislados de muestras clínicas con *K. pneumoniae* que portaban *bla*_{KPC-2} (ST1271, CC29) de pacientes sin antecedentes de viajes previos (120).

En Chile, la carbapenemasa KPC-2 es la más frecuentemente aislada (121)(122), en el año 2020, se informa el primer aislamiento de *S. marcescens* coproductora de KPC-2 y SRT-2(123). Se han detectado aislados de *K. pneumoniae* productoras de KPC en Panamá desde el 2011; KPC-3 parece ser la variante predominantemente identificada hasta ahora (59).

El primer aislado clínico de *K. pneumoniae* productor de KPC identificado en Perú fue en el 2013 en el Hospital Arzobispo Loayza, posteriormente se han identificado carbapenemasas en *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *C. freundii*, siendo la carbapenemasas tipo KPC más frecuente en *Enterobacterales*, los aislamientos han ocurrido en su mayoría en la capital de Perú (124). La primera descripción de un miembro del CC258 (ST340) fue informada en un gen *bla*_{KPC-2} en el año 2020 (125) .

En Ecuador, la primera detección de *K. pneumoniae* portadora de la carbapenemasa tipo KPC-2 se dio en la ciudad de Azogues, en el año 2010, aislado de un paciente con un absceso subgaleal (126). En los años subsecuentes ha existido una expansión clonal y brotes asociados a estos microorganismos en Ecuador, encontrándose predominantemente *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-5}, y el pulstipo predominante ST258, junto con otros 19 secuenciotipos ya comunicados, en el caso de ST258 presente en el plásmidos pKpQIL (80)(89)(127)(128)(129).

b) La Clase B de carbapenemasas

IMP no se identificó en América Latina hasta 2003, cuando se aislaron IMP-6 e IMP-1 en *A. baumannii* y *K. pneumoniae* aislados, respectivamente, en Brasil. Después de eso, se

informó IMP-1 en otros aislados clínicos de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, y *P. putida* en todo el país. El primer informe latinoamericano de una metalo- β -lactamasa de un aislado de *Providencia rettgeri* fue una IMP-1 identificado en 2005 en Brasil, así como el primer informe para América Latina de una *E. coli* bla_{IMP} ST648 ocurrió en el año 2019 (130), también se ha reportado bla_{IMP-1} en *C. Freundii* perteneciente a In1312 (131) y *P. mirabilis* portador de bla_{IMP-1} transmitida por integrones, con la coproducción de bla_{KPC-2} (132)

En México, desde el año 2008, se comunicaron aislados de IMP-15, IMP-18 (133) en un aislado de *K. oxytoca*. En Argentina, IMP-8 fue comunicado en *E. cloacae* y *E. coli* (134)(135), en el año 2011 se comunica el primer aislado de *S. marcescens* bla_{VIM-16} (136). Las carbapenemasas de tipo IMP se han descrito en aislamientos de *Enterobacterales* de Perú y Venezuela (124)(137).

En Colombia, solo un aislado clínico se ha encontrado que *P. rettgeri* portador de bla_{IMP} (138). En Ecuador, hasta marzo del 2021, no se ha realizado informes de la presencia de carbapenemasas tipo IMP ni en seres humanos ni en granjas avícolas (139). Tampoco se encontraron comunicados de IMP en Costa Rica ni en Puerto Rico (140) (100).

En América Latina y el Caribe existen pocos informes de VIM en *Enterobacterales*. Desde 2005 en México, se ha comunicado la presencia de aislamientos VIM-2 en algunos aislados de *E. cloacae* y *K. oxytoca*; VIM-23 tiene se ha descrito en *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *C. freundii* y *E. aerogenes* (141) (133). Además, VIM-24 y VIM-2 se han informado en un par de aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. rettgeri* respectivamente, en Colombia (138) (142). En Argentina, un aislado de *P. rettgeri* que expresa VIM-2 y siete *S. marcescens* que expresan VIM-16 fueron comunicados en 2011 y 2013, respectivamente (59). Venezuela comunicó la primera descripción de bla_{VIM} en *K. pneumoniae* entre los años 2009 y 2010 y desde entonces ha existido un mayor número de casos, los cuales se reportan en un hospital de tercer nivel, donde la prevalencia de las carbapenemasas tipo VIM llega a ser del 14,53% entre los ERC (143).

El primer informe de NDM-1 en América Latina ocurrió en Guatemala en el año 2011 y provino de dos aislamientos de *K. pneumoniae* pertenecientes al ST17 (144). Posteriormente, en Colombia se informa de un brote nosocomial de *K. pneumoniae* productora de NDM-1 ST1043 en una unidad neonatal durante los años 2011-2012 (145). Desde entonces, diversos aislados de *Enterobacterales* productores de NDM-1 se han comunicados cada vez más en Colombia incluyendo *K. pneumoniae*, *P. rettgeri*, *E. coli*, *M. morgani* y *S. fonticola* (146).

En Uruguay, NDM-1 se identificó inicialmente en aislados de *P. rettgeri* en el 2012, de ahí en adelante se observan varias publicaciones sobre la presencia de NDM-1 en *C. freundii* y *K. pneumoniae*, siendo la NDM-1 la carbapenemasa de mayor prevalencia (147)(148) .

En Paraguay, en el año 2012, se informó de aislados de *A. baumannii* y *A. pittii* que portaban *bla*_{NDM-1}. Además, en el mismo año, un aislado de *A. baumannii* productor de NDM-1 fue comunicado en Honduras. En México se han reportado NDM-1 en todas las regiones geográficas desde el 2013, NDM-1 ha sido comunicada en aislados clínicos de *P. rettgeri*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae* en México. En *Enterobacterales*, el gen NDM-1 fue encontrado en los plásmidos INfcFII (Yp) (149) (141).

En Brasil, en el año 2013, se realizó el primer informe de NDM proveniente de *P. rettgeri* aislado en la ciudad de Porto Alegre, luego de eso casos esporádicos se han descrito en *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *M. morgani*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *C. freundii* en diferentes regiones de Brasil (110) (150) (151), siendo su frecuencia del 50% entre los productores de carbapenemasas, número mucho mayor que la carbapenemasa tipo KPC (108) .

En 2014, se informó NDM-1 en un aislado de *K. pneumoniae* en Chile, siendo la tercera carbapenemasa en frecuencia luego de KPC en este país (122). Posteriormente, en Argentina se identificó NDM-1 en dos aislados genéticamente relacionados de *P. rettgeri* (152). Una publicación de Dretler, y col, del año 2020, muestra que la prevalencia de NDM en Nicaragua entre los *Enterobacterales* llega a ser del 60% (153). Se ha informado NDM-1 en una cepa de *E. coli* extraintestinal en Cuba (154), en dos aislados de *K. pneumoniae* de Jamaica (155) y Guadalupe, Antillas Francesas y en dos aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* en Venezuela, incluso informándose la copresencia de genes *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM} en *K. pneumoniae* (117) (156). Finalmente, *P. mirabilis* productor de NDM, *P. rettgeri*, *E. coli* y *K. pneumoniae* se han detectado en Perú, siendo *bla*_{NDM} la carbapenemasa más frecuente en este país (124). La coexpresión de otros determinantes de la resistencia a carbapenémicos se ha descrito en unos pocos aislamientos que producen NDM, incluyendo KPC en *K. pneumoniae* de Colombia, KPC-2 en *Enterobacter* spp. de Brasil y OXA-23 en *A. baumannii* de Colombia (59). En el año 2019 se realizó el primer comunicado de NDM-1 en *K. pneumoniae* en un paciente chileno introducido desde Brasil (157).

c) La Clase D de carbapenemasas

En América Latina y el Caribe, OXA-48 (variantes OXA-48, OXA-163, OXA-247 y OXA-370) se han detectado en diversas especies de *Enterobacterales* en Argentina, Brasil y

Colombia. Se ha informado la presencia de OXA-48 en aislados de *K. pneumoniae* en Argentina y en *K. oxytoca* de Colombia. En 2008, OXA-163, una variante de OXA-48 con menor actividad carbapenémica, pero una mayor actividad contra las beta-lactamasas de espectro extendido, fue descrita en Buenos Aires, Argentina en un aislado de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (158). En el año 2013, se informa en Buenos Aires la aparición en un mismo paciente de la variante *bla*_{OXA-247} en *K. pneumoniae* en un paciente previamente infectado con *K. pneumoniae bla*_{OXA-163} (158). Por otro lado, una nueva variante de OXA-48, la OXA-370 fue descrita en Brasil en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *K. oxytoca*, lo cual demuestra un alto poder de diseminación (159). En Chile, en el año 2019, se informa el primer aislado de OXA-379 en una *K. pneumoniae*, aislamiento relacionado con el arribo de un paciente proveniente de Brasil (157).

En Ecuador, el año 2016, se comunicó el primer caso de *K. pneumoniae* ST 308 que porta el gen *bla*_{OXA-48} de un paciente proveniente de un hospital Ucraniano (160), esta situación pone de manifiesto una vez la importancia del control de los microorganismos multirresistentes y su transmisión intercontinental, así como el control e informe de este tipo de carbapenemasas en Ecuador

Complejo Clonal 258: Secuenciotipo 258

La velocidad a la que se ha diseminado globalmente la resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae* es motivo de alarma en la comunidad médica en general. Hasta la fecha, *bla*_{KPC} se ha encontrado en más de 100 ST diferentes, pero esta pandemia es impulsada principalmente por la propagación de aislados de *K. pneumoniae* KPC que son miembros del complejo clonal 258 (CC258). El CC258 (cuyo miembro fundador es el ST292) consta del ST258 como , y en menor medida los ST11, ST340 y ST512, que son variantes de un solo locus de ST258 (161) (162) (163). *K. pneumoniae* ST258 es un prototipo de un clon de alto riesgo y los estudios relacionados sobre su epidemiología, reordenamiento genético, y la evolución de este clon exitoso han proporcionado información sobre la propagación mundial de la resistencia antimicrobiana (51). ST 11 se ha reportado en muchos países, en relación con enzimas como KPC en Taiwán, Japón, China, NDM en Australia, Grecia, Tailandia, Polonia, Ucrania, Egipto, Bulgaria, Alemania, Irán y OXA-48 en Taiwán e Irán(164).

*K. pneumoniae bla*_{KPC} se identificó por primera vez en un ST258 en el año de 1996 al sur de los Estados Unidos. En 2009, el Centro para la Prevención y Enfermedades de Estados

Unidos, en colaboración con investigadores de Israel, realizaron tipificación de secuencia multilocus de *K. pneumoniae* con *bla*_{KPC} y ST258 entre los aislamientos recolectados en el área de Nueva York. Con el paso del tiempo, se detectó ST258 en regiones geográficamente diversas de los Estados Unidos, y en 2009, se hizo evidente que el ST258 fue el clon predominante en el país, siendo responsable del 70% de los aislamientos de *K. pneumoniae* con *bla*_{KPC} obtenidos de diferentes puntos del país (165)(166). Informes globales de ST258 entre los aislados de *K. pneumoniae* con *bla*_{KPC} en países como Grecia, Noruega, Suecia, Italia, Polonia, Canadá, Brasil, Corea, sugieren que este ST ha caracterizado los clones internacionales de MDROs de alto riesgo, mostrando endemidad (51)(162). El ST258 también muestra su predominancia en América Latina, se ha asociado a brotes y en algunos países como Colombia, Ecuador, Argentina ha sido considerado endémica, lo que sugiere que la diseminación de estas cepas puede deberse entre otras causas, a la transmisión entre el paciente y el personal de salud y entre los hospitales (80)(87)(106)(115)(127)(167)(165). En el estudio EuSCAPE, se comunicó la diseminación global del clon epidémico ST258/512 (83).

El análisis filogenético del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de los aislados por ST258 mostró que *K. pneumoniae* ST258 pertenece a dos linajes bien definidos llamados clados I y II. La divergencia genética de estos dos clados ocurrió en un área de 215 kb que incluía el material genético utilizado en la cápsula de polisacáridos (cps), un importante factor de virulencia para *K. pneumoniae*. El mismo grupo luego comparó las estructuras genéticas de las regiones cps y distribución de SNP en los genomas centrales de ST258 clados I y II con los de otros ST de *K. pneumoniae* (es decir, ST11, ST442 y ST42). Kreiswirth y sus colegas encontraron un 1,1- Área de Mbp en ST258 clado II que es idéntica a la de ST442, mientras el resto del genoma ST258 era homólogo al de ST11. Esto indica que ST258 clado II es un híbrido o clon cruzado que fue creado por un gran evento de recombinación entre ST11 y ST442. Posteriormente, los investigadores han identificado las mismas regiones cps en ST42 y ST258 en el clado I. La semejanza de las áreas que rodean las regiones cps de los clados I y II en el ST42 y el ST258 indican que el clado I ST258 evolucionó del clado II ST258 por el reemplazo de la región cps del ST42 (51). El clado I está asociado con KPC-2, mientras que el clado II está asociado con KPC-3 (163) (168) que ha mostrado evolución a lo largo del tiempo (168).

Complejo clonal 258: Otros secuenciotipos del clon ST258

El ST11, está estrechamente relacionado con el ST258 y es el principal ST entre aislados de *K. pneumoniae* que albergan *bla*_{KPC} de Asia, especialmente en China, y están asociados a

alta mortalidad por la adquisición de un plásmido de hipervirulencia, que demuestra el potencial evolutivo de estos clones(166)(169), El ST11 se ha descrito en América Latina y se ha asociado con enzimas de tipo NDM en países como la República Checa, Suiza, Tailandia, Australia, el Estados Unidos, Emiratos Árabes Unidos y Grecia, siendo responsable de brotes nosocomiales en los dos últimos países. ST11 con *bla*_{OXA-48} se ha identificado recientemente en España. Otros ST también pertenecientes a CC258 con *bla*_{KPC} comunicados en Colombia (ST512), Italia (ST512), Israel (ST5), Brasil (ST11, ST437) (51) (110) (170). En el año 2017, se hace el primer comunicado de *K. pneumoniae* ST340 en Perú (125). La presencia de un clon hipervirulenta en Brasil asociado al ST16 fue descrito en el año 2020, con una mortalidad del 95% (162). Otros clones descritos constituyen el ST379, ST412, ST512, ST340, ST437 (110)(166). En España se ha comunicado la presencia de ST11 en OXA-48 en *K. pneumoniae* y *E. coli* (171).

Otros secuenciotipos

K. pneumoniae ST147 es un clon emergente de alto riesgo que fue identificado en Grecia y se ha asociado con *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC} en ese país. Este ST global también se ha asociado con *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-181} en varios países, incluyendo Suiza, Irak, Canadá, Reino Unido, India y Italia. ST14, ST25 y ST340 con *bla*_{NDM-1} se han identificado en India, Kenia y Omán, y ST405 con OXA-48 ha sido identificados en España (51). Entre los genes NDM, existe una variedad de clones de alto riesgo. NDM ha sido encontrada en cepas de *E. coli* ST131, ST 617 y ST410 se ha encontrado en otros tipos de *E. coli*, pero son menos frecuentes que la ST167 (57). En el 2020, Su y col, reportaron un brote de KPC-2 en *K. pneumoniae* ST76 y ST375 ambos productores de un cepa hipervirulenta resistente a los carbapenémicos en China (172). Brasil reporta la presencia del gen *bla*_{NDM-1} en ST16, ST17, ST39 (110).

1.4 Detección de resistencia a los β-lactámicos

1.4.1 Detección de carbapenemasas en los *Enterobacteriales*

Cribado de la producción de carbapenemasa

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa pueden estar bajo del punto de corte clínico. Sin embargo, el punto de corte epidemiológico (PCE) definido por el EUCAST (Comité Europeo en Susceptibilidad Antimicrobiana, por sus siglas en inglés) puede ser usado para detectar a los productores de carbapenemasa (67). Meropenem ofrece el mejor comportamiento entre sensibilidad y especificidad en términos de detectar productores de carbapenemasa. Ertapenem es el carbapenémico más sensible, pero tiene una baja especificidad, especialmente en especies como *Enterobacter* spp., debido a su escasa estabilidad para las BLEEs y las β -lactamasas AmpC en combinación con la pérdida de las porinas(41). Los valores de corte apropiados para la detección de productores de carbapenemasa se muestran en la Tabla 1 (173). Debido a que se ha detectado sólo una sensibilidad reducida a carbapenémicos, es necesario completar los estudios con métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas, entre los cuales están las pruebas de combinadas de discos, ensayos colorimétricos basados en hidrólisis de carbapenémicos, y los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (41)(174)(175), para la detección fenotípica de las carbapenemasas es necesario tener en cuenta el perfil hidrolítico general de cada una de sus clases, incluida la epidemiología local y el microorganismo que se pretende detectar (176).

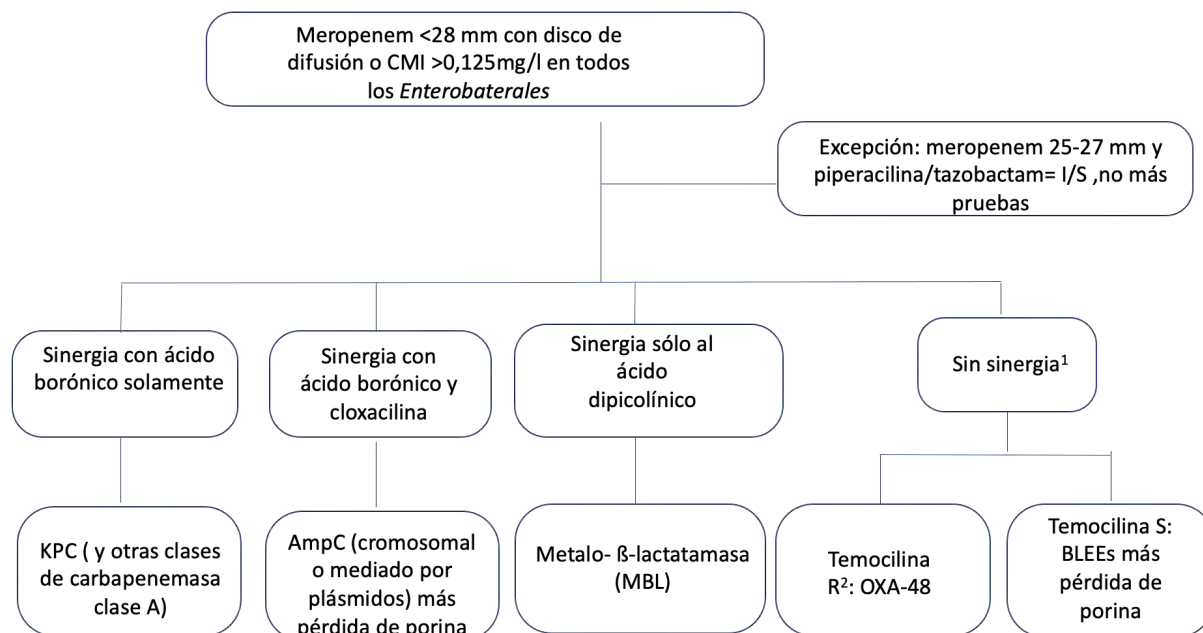
Tabla 1. Interpretación de antibiograma (de acuerdo con la metodología EUCAST)(173)

Carbapenémicos	CMI (mg/L)		Puntos de corte de halo de inhibición, disco 10 μ g	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
Meropenem	≤ 2	> 8	≥ 22	< 16
Ertapenem	$\leq 0,5$	$> 0,5$	≥ 25	< 25
Imipenem	≤ 2	> 4	≥ 22	< 17

Pruebas combinadas de disco

Los métodos combinados de discos fue la primera prueba fenotípica y actualmente está comercialmente disponibles por diferentes fabricantes (por ejemplo: equipo de confirmación diagnóstico KPC+MBL (Rosco Diagnostica) o el juego de discos para la detección de carbapenemasa MATDISCSTM (MAST Diagnostic)) (177). El disco contiene varios

inhibidores \pm meropenem, entre los cuales están el ácido fenilborónico (AFB) que inhibe las carbapenemasas clase A, además de otras β -lactamasas tales como las AmpC el ácido dipicolínico y el ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) que inhiben las carbapenemasas clase B, sobre todo, OXA-48 (41)(177). Se ha sugerido también la combinación de EDTA y AFB en un solo disco para la detección de carbapenemasas KPC y MBL (177). La cloxacilina, la cual inhibe las β -lactamasas AmpC, ha sido adicionada a las pruebas para diferenciar entre la hiperproducción AmpC más porinas y la producción de carbapenemasas. La desventaja principal de estos métodos es que pueden requerir hasta 18 horas (en la práctica una incubación de toda la noche), por lo cual los métodos nuevos de detección rápida se han introducido rápidamente. En la figura 2 se muestra el algoritmo para la detección de carbapenemasas (41).



¹ La combinación de varias carbapenemasas también puede contribuir a que no haya sinergia, p. Ej. MBL y KPC en combinación. Las pruebas moleculares suelen ser necesarias en tales casos.

²La resistencia a temocilina de alto nivel (> 128 mg/l, diámetro de zona <11 mm) es un marcador fenotípico de OXA-48

Figura 2. Algoritmo para la detección de carbapenemasas (41).

El algoritmo de la Tabla 2 diferencia entre metalo-β-lactamasas, carbapenemasas de clase A, carbapenemasas de clase D y no carbapenemasas (BLEE y / o AmpC más pérdida de porina). Los estudios se pueden hacer con el método de difusión en disco de EUCAST (Rosco) para organismos no fastidiosos. Las pruebas deben configurarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante (41).

Actualmente no hay inhibidores disponibles para enzimas similares a OXA-48. La adición del disco de temocilina de alto nivel resistencia (CMI> 128 mg/l) se ha propuesto como un marcador fenotípico para los agentes productores de carbapenemasa tipo OXA-48. Sin embargo, este marcador no es específico, ya que también aparece en las MBL o KPC. De manera que el uso de temociclina debe ser combinado con otros marcadores(41)(177), como avibactam para una mejor detección de enzimas OXA-48, así como la combinación de piperacilina-tazobactam con temociclina para la detección de los productores de OXA-48 (177).

El uso de la prueba de Hodge modificada no se recomienda actualmente como único método, ya que los resultados son difíciles de interpretar, la especificidad es baja y, en algunos casos, la sensibilidad también es subóptima. Algunas modificaciones recientes en la técnica

han sido descritas pero son engorrosas para utilizar en los laboratorios clínicos de rutina aunque no resuelven todos los problemas de sensibilidad y especificidad (41).

Tabla 2. Interpretación de las pruebas fenotípicas de carbapenemasas por métodos de difusión con disco (41).

β -lactamasas	Sinergia observada como aumento en halo de inhibición (mm) con disco de 10 μ g de meropenem				Temociclina CMI>128mg/L o halo de inhibición <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Variable ¹
KPC	-	+	-	-	Variable ¹
MBL+KPC ²	Variable	Variable	+	-	Variable ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	Si
AmpC+ pérdida porina	-	+	-	+	Variable ¹
BLEE+pérdida porina	-	-	-	-	No

Abreviaturas: MBL = metalo- β -lactamasa, KPC = *K. pneumoniae* carbapenemasa, DPA = dipicolínico ácido, EDTA = ácido etilendiaminotetraacético, APBA = ácido aminofenil borónico, AFB = ácido fenil borónico, CLX = cloxacilina.

¹ La prueba de susceptibilidad a temociclina se recomienda sólo en los casos en los que no se detecta sinergia, con el fin de diferenciar entre BLEE + pérdida de porina y enzimas similares a OXA-48. Cuando otras enzimas están presentes la susceptibilidad es variable y no proporciona ninguna indicación adicional de la β -lactamasa presente.

² Hay un informe que apoya el uso de discos comerciales que contienen inhibidores dobles (DPA o EDTA más APBA o PBA), pero falta información. Esta combinación confiere un alto nivel de resistencia a los carbapenémicos.

Pruebas bioquímicas colorimétricas

Están basadas en la hidrólisis enzimática del anillo β -lactámico de los carbapenémicos en presencia de la actividad carbapenemasa, llevando a un descenso en el pH y con el consecuente cambio de color de un indicador de pH (el rojo fenol en Carba NP o azul bromotimol en Blue-CARBA) (177)(178)(179).

La prueba Rapidec CarbaNP (Biomérieux SA, Marcy l'Etoile, France) es una prueba rápida para la detección de hidrólisis de carbapenémicos, que da lugar a un cambio de pH que resulta en un cambio de color de rojo a amarillo con una solución de rojo fenol en aproximadamente 5 minutos, y en la mayoría de los casos con 30 minutos de incubación es suficiente para obtener un franco cambio de color (178). La prueba ha sido validada con colonias bacterianas cultivadas en placas de agar Mueller-Hinton, placas de agar sangre, placas de agar tripticasa de soja y la mayoría de los medios selectivos utilizados en la detección de productores de carbapenemasas, con un especificidad y sensibilidad del 100% (41)(178). No debe realizarse con colonias bacterianas cultivadas en placas de agar Drigalski o McConkey. Varias publicaciones indican una alta sensibilidad y especificidad del método, mientras que

una publicación detectó problemas de sensibilidad que puede llegar a ser de hasta un 21% para aislados con un fenotipo mucoso y para algunos *Enterobacteriales* productores de OXA-48 (41)(61). No obstante, existen algunos problemas de interpretación en la lectura de cambio de color, con resultados dudosos, que dan una cierta proporción (3-5%) de resultados no interpretables (41). Con CarbaNP no se tiene una guía del tipo de carbapenemasa implicado. El tiempo requerido para el cambio de color puede variar de acuerdo con la carbapenemasa involucrada, pudiendo ser de 30 minutos o menos si es KPC, una hora si es NDM, VIM y si es OXA-48 más de una hora (177)(180).

Un derivado de la prueba CarbaNP, la prueba Blue-Carba (BCT) (Britania) es una prueba rápida (<2 h) de detección de la producción de carbapenemasas. Se basa en la hidrólisis *in vitro* de imipenem, por colonias bacterianas con inoculación directa, sin lisis previa, que se detecta por cambios en el pH, revelados por el indicador azul de bromotimol (azul a verde / amarillo o verde a amarillo). En una evaluación realizada por Pasteran et al, encontraron que la prueba tenía una excelente sensibilidad para las enzimas de clase A y B, pero inferior para la detección de enzimas OXA-48 (41). Ha mostrado tener sensibilidades y especificidades similares a CarbaNP, y presenta ciertas ventajas: a) protocolo más simple al usar de forma directa colonias (en vez de extractos bacterianos), b) reduce significativamente el costo por reacción, tomando en cuenta el uso de Tienam (10 veces más barato que la fórmula de imipenem monohidratada) y la presencia del buffer, el cual es usado para obtener extractos bacterianos, y c) la validación de la prueba para la detección de carbapenemasas tipo OXA-48 (179)(181).

Una tercera prueba es la β Carba test TM (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), muestra una sensibilidad del 89,4% y una especificidad del 97,8% para la mayoría de las carbapenemasas (182), también se puede realizar en <2 h y se realiza mezclando de 1 a 3 colonias. Las lecturas deben realizarse después de un máximo de 30 min de incubación. El cambio de color de amarillo a naranja, rojo o morado indica una reacción positiva. Se debe tomar en cuenta que el tiempo de incubación de los aislados productores de OXA-48 puede ser mayor que los 30 minutos sugeridos por el fabricante (41)(182). En otra evaluación, la prueba β -Carba TM mostró un excelente comportamiento para detectar EPC, y especialmente OXA-48, llegando a tener una sensibilidad del 100% y especificidad del 98,9% (183). Sin embargo, la capacidad para detectar otras carbapenemasas de clase A debe verificarse más a fondo, ya que se han producido algunos resultados falsos positivos con otras β -lactamasas, como la sobreproducción de β -lactamasa K1 en *K. oxytoca* (41)(183).

Método de inactivación de carbapenémicos

El principio de este método es detectar la hidrólisis enzimática incubando un carbapenémico con una suspensión bacteriana. La prueba de inactivación de carbapenémicos utiliza discos de prueba de susceptibilidad a antibióticos, como sustratos. Después de dos horas de incubación con un disco de meropenem, este se coloca en un agar inoculado con *E. coli* ATCC 25922. La inactivación enzimática bacteriana no permite la formación de halos, mientras que la ausencia de actividad carbapenemasa implicará que habrá un halo, indicando que meropenem no ha sido hidrolizado. La prueba de inactivación de carbapenémicos ha tenido un rendimiento variable en diferentes estudios, pero sigue siendo una posible alternativa, aunque el valor predictivo negativo de la prueba aún no está claro. Una de las principales desventajas de esta técnica es que requiere generalmente al menos 18-24 horas para obtener los resultados (41)(61)(184). La prueba se interpreta de la siguiente manera: los diámetros del halo de inhibición de 6-10 mm son comunicados como positivos para la producción de carbapenemasas, de 11-19 mm son resultados intermedios y ≥ 20 mm son considerados negativos para la producción de carbapenemasas (184). La CMI detecta de forma inequívoca todas las cepas productoras de KPC, NDM, VIM, IMP u OXA-48, pero falla en la detección de algunas cepas de carbapenemasas GES-6, lo cual puede deberse a la baja actividad hidrolítica de las enzimas contra los carbapenémicos. Otra limitación es que no distingue entre los diferentes tipos de carbapenemasas (177). Dentro de sus ventajas se muestra la simplicidad del protocolo y que no requiere reactivos especiales para su realización (181).

Los compuestos químicos con propiedades de inhibición específicas para enzimas similares a OXA-48 aún no están disponibles para uso clínico. Las enzimas similares a OXA-48 confieren una resistencia de alto nivel a la temocilina, por lo que en sitios donde existe una alta prevalencia de estas se sugiere utilizar los puntos de corte de piperacilina/tazobactam (≥ 16 mm) y temocilina (≥ 12 mm) para descartar la presencia de estas carbapenemasas (185)(186). Las pautas de EUCAST recomiendan que, en ausencia de sinergia para KPC, AmpC y MBL, la resistencia a la temocilina de alto nivel (> 128 $\mu\text{g} / \text{ml}$ o un diámetro de la zona del disco de < 11 mm) sugiere la presencia de enzimas similares a OXA-48. Sin embargo, EUCAST recomendó que la presencia de enzimas similares a OXA-48 se confirme con otros métodos (41). De ahí que ciertos autores recomiendan que se realicen pruebas moleculares para confirmar la presencia de enzimas similares a OXA-48 (61).

Ensayo de yodo -almidón

Basado en la hidrólisis de carbapenem, el ensayo de yodo-almidón se ha comercializado recientemente como Carbapenembac Metalo® (PRO-BAC do Brasil). El ensayo consiste en tiras impregnadas con 100 µg de imipenem y almidón que se inoculan con la cepa en estudio y luego se incuban durante diez minutos. Luego, se agrega una solución de yodo y después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, se pueden leer los resultados: un cambio de color de oscuro a claro es indicativo de la presencia de carbapenemasa. Se ha encontrado un 100% de sensibilidad y especificidad en la detección de *Enterobacterales* productores de KPC, incluido MBL, cuya sensibilidad es superior al 90% (177)(187).

Detección de la hidrólisis de carbapenémicos con MALDI-TOF

El principio es detectar en un dispositivo de espectrometría de masas (MALDI TOF) la disminución o desaparición de ciertos picos específicos de carbapenémicos en un espectrómetro de masas cuando una suspensión bacteriana se incubaba previamente con el carbapenémico. Los espectros se miden entre 160 y 600 m/z (41). Varios estudios han encontrado una sensibilidad y especificidad del 99% y 99% respectivamente (188)(189), especialmente para la detección de KPC y NDM (190)(191), para el grupo de enzimas OXA-48 presenta una sensibilidad del 76% aproximadamente (192). Para corregir este problema, se puede agregar NH₄HCO₃ a la reacción, y con lo cual se mejora la sensibilidad de OXA-48 hasta en un 98%, incluso pudiendo detectar mayor número de productores de carbapenemasa que la prueba Carba NP (192). Se ha determinado también que ha sido capaz de detectar la desestructuración de la tetraciclina Tet (X) que confiere resistencia de elevado nivel a tigeciclina en *E. coli* y *A. baumannii* (193). Una ventaja importante es que la detección en menos en el pelletización en menos de 20 minutos y la detección de la hidrólisis de una hora para las *K. pneumoniae* productora de KPC, permitiendo la detección de carbapenemasas en un máximo de 4,5h (189). Una de las desventajas del MALDI-TOF es que debe modificarse, en comparación a lo que se utiliza para la determinación de especies (41), además de que se necesita el equipo, y personal entrenado lo cual aumentaría los costos de manera importante de este sistema de detección (188).

Ensayos de inmunocromatografía

El ensayo de flujo lateral inmunocromatográfico se basa en captura inmunológica de epítomos de carbapenemasas (NG-test CARBA5, BIOTECH), enzimas que ha demostrado tener resultados conflictivos en los sistemas automatizados debido a los bajos niveles de CMI (194). El ensayo inmunocromatográfico utiliza nanopartículas de oro coloidal unidas a una membrana de nitrocelulosa dentro de un dispositivo de flujo lateral. El principio de la prueba es que el anticuerpo monoclonal anti-carbapenemasa somete la enzima y la identifica. El ensayo tarda alrededor de cuatro minutos y ha sido evaluado tanto desde colonias y de frascos de hemocultivo (41), muestra una sensibilidad y especificada del 100% para la detección de carbapenemasas tipo OXA-48, pero tiene la desventaja de un costo mayor que los ensayos fenotípicos que muestran menor sensibilidad (195). Un estudio presentado por Wokeun y col, muestra una sensibilidad del 97,8% y especificidad del 100% para la detección de carbapenemasas tipo OXA-48, VIM, KPC, NDM (196).

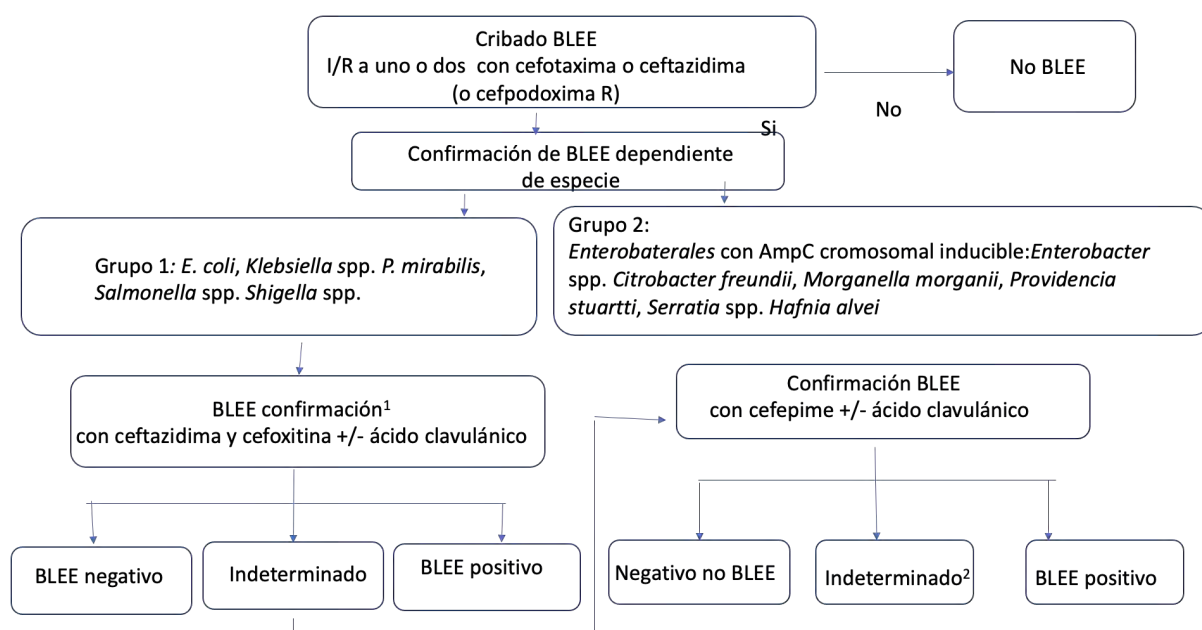
Detección para la resistencia de BLEEs en *Enterobacterales*

En diversos países, la detección y caracterización de las BLEEs están recomendadas o son mandatorios para el control de las infecciones, especialmente para toma de medidas de prevención que incluyen el aislamiento oportuno del paciente (176). La estrategia para la detección de BLEE en *Enterobacterales* está basada en un indicador de no susceptibilidad para las oximino-cefalosporinas, seguidas por las pruebas de confirmación fenotípica (y en algunos casos genotípica) (41). Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y muestran co-resistencia a otras antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas (176).

Se recomienda un punto de corte de >1mg/l para cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefpodoxima de acuerdo con EUCAST y CLSI (Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico, por sus siglas en inglés) (41)(197). Cefpodoxima es el indicador más sensible de cefalosporinas para la detección de la producción de BLEEs y puede ser utilizado para cribado. En la tabla 3 (173) se muestra el cribado para la detección de BLEEs en *Enterobacterales* y en la figura 3 su algoritmo (41).

Tabla 3. Métodos de cribado para BLEEs en *Enterobacterales* (173)

Antibiótico	Dilución en agar	Difusión por disco
Cefotaxima/ceftriaxona y ceftazidima		
Cefotaxima (5µg) o Ceftriaxona (30 µg) y Ceftazidima (10 µg)	CMI 1mg/L	Zona de inhibición <21 mm
Cefpodoxima (10µg)	CMI>1mg/L	Zona de inhibición <23 mm
		Zona de inhibición <22 mm
		Zona de inhibición <21 mm



1 si se ha probado cefoxitina y tiene una CMI > 8 mg/l, realice la prueba de confirmación de cefepime +/- ácido clavulánico 2 No se puede determinar como positivo o negativo (por ejemplo, si una tira de difusión de gradiente no se puede leer debido al crecimiento más allá del rango MIC de la tira o no hay una sinergia clara en las pruebas de sinergia de disco combinado y disco doble). En la confirmación con cefepime +/- ácido clavulánico aún es indeterminada, se requieren pruebas genotípicas.

Figura 3. Algoritmo para la detección de BLEEs (41).

Cribado de BLEE en *Enterobacterales*

A. Cribado en *Enterobacterales* del grupo 1 (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp., *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) Los métodos recomendados para el cribado de BLEE en los *Enterobacterales* del grupo 1 son la dilución en caldo, dilución en agar, difusión en disco o un sistema automatizado. Se requiere que ambos cefotaxima (o ceftriaxona) y ceftazidima se utilicen como cefalosporinas indicadoras, ya que puede haber grandes diferencias en las CMI de cefotaxima (o ceftriaxona) y ceftazidima para diferentes productores de aislamientos de BLEE aislamientos. El algoritmo para el cribado y los métodos de confirmación fenotípica de BLEE para el grupo 1 se describen en la Figura 3 y la Tabla 3 (41).

B. Cribado en *Enterobacterales* del grupo 2 (*Enterobacter* spp, *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, *Hafnia alvei*) para los *Enterobacterales* del grupo 2, se recomienda que el cribado de BLEE se realice de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para las *Enterobacterales* del grupo 1 (Figura 3 y Tabla 3). Sin embargo, un mecanismo muy común de resistencia a las cefalosporinas es el cromosoma desreprimido. AmpC β -lactamasa en estas especies. Dado que la cefepima es estable a la hidrólisis de AmpC, se puede utilizar en pruebas fenotípicas con ácido clavulánico (41).

Existen además métodos que han demostrado el crecimiento diferencial de bacterias gram-negativas, especialmente BLEEs y carbapenemasas, como el ChromID BLEE, que demuestra la relevancia clínica de este medio, ya que los *Enterobacterales* BLEE fueron susceptibles al imipenem, los microorganismos productores de carbapenemasas crecieron alrededor del disco de imipenem y *E. faecium* resistente a vancomicina fueron aislados de este medio (198)(199).

Métodos de confirmación fenotípica

Existen hasta el momento cuatro métodos fenotípicos recomendados y que están basados en la inhibición *in vitro* de la actividad de las BLEEs por ácido clavulánico, la prueba de combinación de discos (PCD), la prueba de doble sinérgica (PDS), el gradiente de BLEEs, y la prueba de microdilución en caldo(41).

Prueba de combinación en discos

Se usan discos que contienen sólo cefalosporina (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) y se aplican en combinación con ácido clavulánico, los cuales pueden ser suplementados con ácido borónico. La prueba resulta positiva si el diámetro de la zona de inhibición es ≥ 5 mm de largo con o sin el ácido clavulánico (43). Existen además pruebas donde se ha incorporado el aztreonam más el ácido clavulánico, mostrando una sensibilidad del 95,7%, llegando a ser del 100% en los productores de AmpC (43).

Prueba de sinergia con doble disco

Los discos que contienen cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) se aplican a las placas junto al disco con ácido clavulánico (amoxicilina-ácido clavulánico). Consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazidima (30 μ g) cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g) y aztreonam (30 μ g). La ampliación de alguno de estos halos de inhibición manifiesta la producción de BLEE (200).

La distancia entre los discos es crítica y se ha encontrado que 20 mm de centro a centro son óptimos para discos de cefalosporina de 30 μ g (41).

Microdilución en caldo

La microdilución del caldo se realiza con caldo Mueller-Hinton, ajustado por cationes, que contiene diluciones dobles de cefotaxima, ceftazidima y cefepima, en concentraciones que oscilan entre 0,25 a 512 mg/l, con y sin ácido clavulánico, a una concentración fija de 4 mg/l. La prueba es positiva si se observa una reducción ≥ 8 veces en la CMI de cualquiera de las cefalosporinas combinadas con ácido clavulánico, en comparación con la CMI de la cefalosporina sola; de lo contrario, el resultado de la prueba se interpreta como negativo(41).

Confirmación fenotípica mediante Etest®

Suele ser un método más cómodo, pero menos económico, se usa un conjunto de tiras de Etest (ESBL CT/CTL, TZ/TZL, PM/PML) que contienen una concentración creciente de cefalosporina correspondiente (cefotaxima, ceftazidima o cefepima), por un lado, y una

concentración creciente de la misma cefalosporina asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4 ug/ml), por el otro. Si se observan colonias en los halos de inhibición, el valor de la CMI deberá determinarse observando cuál es la CMI a la que todas las mutantes han sido inhibidas (200). No es útil para la determinación de la CMI a cefalosporinas(41).

Prueba bioquímica colorimétrica

El desarrollo de pruebas basadas en la detección bioquímica, es interesante (45). La prueba BLEE NDP (Normand/Dortet/Poirel) (Sterile India, New Delhi, India) se describió por primera vez en 2012 y utiliza cefotaxima como antimicrobiano indicador, con tazobactam como inhibidor. Se realiza en placas de 96 pocillos o en tubos separados. El cambio de color de rojo a amarillo se considera como prueba positiva. La prueba también se ha utilizado directamente en muestras de pacientes (41)(201), con una sensibilidad del 76-93% y especificidad del 100% (202), con un tiempo de duración de 20 minutos y de 1 hora en el 93,6% de los aislados (201).

La prueba β -LACTA (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France), se basa en la detección de la hidrólisis de una cefalosporina cromogénica HMRZ-86 (45) durante 15 minutos tanto en estudios de aislados como en muestras clínicas (203), dando una coloración rojiza, primeramente utilizada en orina y muestras de sangre (204). En un estudio realizado por Hasso y col, en hemocultivos la prueba β -LACTA muestra una sensibilidad del 100%,y una especificidad del 97.8%) (203). Jiménez-Guerra y col, evaluaron un método rápido para la detección de la sensibilidad de cefotaxima en Enterobacterales, a partir de una prueba *in house*, la cual mostró una sensibilidad del 98%, especificidad del 97%, valor predictivo negativo del 100% y valor predictivo positivo del 78%. Esta prueba estuvo basada en el cambio de color (205). Esta prueba tiene un bajo valor predictivo positivo ya que detecta los hiperproductores de AmpC, las carbapenemasas Clase A, y las carbapenemasas tipo OXA-48 de la clase D y con una menor eficacia los productores de carbapenemasas de la clase B (204)(45).

Ensayo de flujo lateral

Han mostrado su utilidad como pruebas confirmadas para la detección de la resistencia antimicrobiano, especialmente en la detección de β -lactamasas en gram negativos. Proveen una resultado rápido, fácil y fiable en pocos minutos de colonias aisladas directamente en medios selectivos o de los discos de difusión de los antibiogramas(39). El inmunoensayo de flujo lateral, NG-Test CTX-M MULTI, ha sido capaz de detectar el 100% de los productores de

CTX-M que crecieron en muestras clínicas, una de sus desventajas es que hasta el 13% de las variantes más prevalentes en el mundo podrían no ser detectadas como TEM-, SHV- (39).

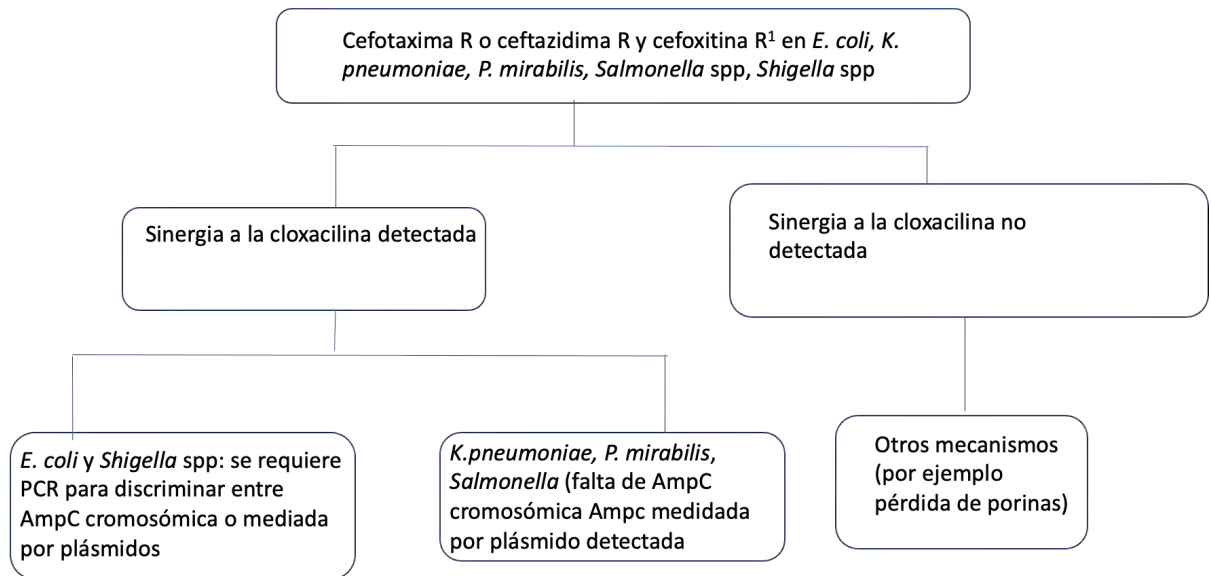
Confirmación genotípica

Para la confirmación genotípica de la presencia de genes BLEE existen varias posibilidades, que van desde PCR y secuenciación hasta secuenciación del genoma completo, seguida de un mapeo de genes de resistencia. También hay diferentes microarrays disponibles (41), el cual ha mostrado tener una especificidad del 100% y sensibilidad del 100% para BLEE (TEM, SHV y CTX-M) (206).

Métodos para la detección de las AmpC adquiridas

Los aislamientos no susceptibles a las cefalosporinas de espectro extendido en combinación con la resistencia a cefoxitina se observan como productores posibles de AmpCs plasmídicas adquiridas (207). Por lo que, una CMI de cefoxitina >8 mg/l combinada con resistencia fenotípica a ceftazidima y / o cefotaxima se pueden utilizar como criterios fenotípicos para la investigación de producción de AmpC en el grupo 1 de *Enterobacterales* (50) Esta estrategia no detectará el raro tipo ACC-1 que no hidroliza cefoxitina (208). Cabe señalar que cefoxitina la resistencia también puede deberse a la deficiencia de porinas (41).

El ácido borónico es también un inhibidor eficiente de *K. pneumoniae* carbapenemasas, mientras que la cloxacilina no lo es, por lo que la cloxacilina puede ser utilizada como un inhibidor más específico para AmpC (207). Los datos de sensibilidad y especificidad dependiendo de la prueba utilizada pueden ser del 96 al 100% respectivamente (41). Sin embargo, para *E. coli*, las pruebas de confirmación de AmpC muestran dificultades para discriminar entre AmpC e hiperproducción constitutiva del AmpC cromosómico, por lo que se han propuestos algoritmos usando CMI de cefotaxima >6 mg/L para identificar *E. coli* pampC-positiva y CMI de 0.5mg/L para discriminar entre las AmpC-hiperproductoras y las no hiperproductoras (207). En la figura 4 se muestra el algoritmo para la detección de AmpC.



¹La cefoxitina "R" se define aquí por CMI >8 mg/l o diámetro de zona <19 mm. Para cefotaxima y ceftazidima "R" es el resultado obtenido utilizando los puntos de corte actuales de EUCAST. La investigación de aislamientos no sensibles a cefotaxima y ceftazidima es un enfoque con mayor sensibilidad, pero menor especificidad en comparación con centrarse en aislados resistentes a cefoxitina. AmpC también puede estar presente en aislados con una prueba de BLEE positiva (sinergia del ácido clavulánico). Para los laboratorios que no analizan cefoxitina, la susceptibilidad a cefepima junto con resistencia a cefotaxima y / o ceftazidima es otro indicador fenotípico de AmpC, aunque menos específico.

Figura 4. Algoritmo de detección para AmpC (41).

2 JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La presencia de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos constituye un problema a nivel mundial, dada su alta mortalidad y los altos costes asociados a la atención de estos pacientes. A pesar de esto, en los países en vías de desarrollo, como Ecuador, existe escasa información sobre los datos de resistencia por estos microorganismos. En el caso de este país, la OMS muestra información parcial proporcionada por la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana, que contiene datos de ciertas instituciones y provincias del país, pero no incluyen a muchos de los hospitales de Guayaquil, situación que dificulta la interpretación de nuestra realidad.

Por eso sería útil, obtener datos de la epidemiología local de Guayaquil, además de determinar las características moleculares de los aislados de KP-KPC circulantes, situación desconocida hasta el momento, así como conocer los factores de riesgo asociados a la colonización/infección por estos microorganismos multidrogosresistentes. Todo esto contribuirá a entender y determinar la situación epidemiológica en relación a este microorganismo, de manera que se puedan elaborar estrategias para afrontar a esta bacteria emergente; y así contribuir a la salud de los ecuatorianos acorde con el tercer objetivo del Plan Nacional del Buen Vivir (<http://ftp.eeq.com.ec/upload/informacionPublica/2013/PLAN-NACIONAL-PARA-EL-BUEN-VIVIR-2013-2017.pdf>), el cual a través de las políticas 3.2b, 3.2c, 3.2m busca mejorar la calidad de vida a través de la investigación de perfiles epidemiológicos de enfermedades emergentes o de notificación obligatoria para prevenir su propagación y planificar la prevención.

De igual manera, España ha visto un incremento de los casos de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, pero el seguimiento a lo largo de varios años, y de otras bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos, no ha sido determinado, de ahí mostrar la importancia de estos hallazgos en un hospital de tercer nivel de Andalucía, de la ciudad de Granada, proporcionarían una mejor comprensión de la epidemiología de estos microorganismos en España.

Hipótesis

Existe una alta incidencia de infecciones/colonización por aislados de *Enterobacterales* productores de carbapenemasa en la ciudad de Guayaquil y en un Hospital de Granada, estando asociadas al uso de dispositivos invasivos, uso de antimicrobianos y larga estancia hospitalaria como factores de riesgo.

Objetivo general

Realizar una caracterización microbiológica, clínica, epidemiológica y de los factores de riesgo de la infección/colonización por *Enterobacterales* productores de carbapenemasas, con especial atención a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC.

A través de los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

1. Evaluar el medio de mSuperCARBA™ agar para la detección de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas.
2. Determinar la situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por *Enterobacterales* productores de carbapenemasas, y su caracterización molecular, en pacientes de unidades de cuidados intensivos de una ciudad grande de Ecuador.
3. Determinar la situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por *K. pneumoniae* productoras de KPC, y su caracterización molecular, en pacientes de un brote de una ciudad media española.
4. Describir la incidencia y factores de riesgo relacionados con la infección/colonización de *Enterobacterales* productores de carbapenemasa en unidades de cuidados intensivos.
5. Analizar el impacto clínico de la colonización por bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en pacientes de un Hospital de una ciudad media española.

3. METODOLOGÍA

2.1 De los objetivos 1, 2 y 4

Se desarrolló un estudio prospectivo multicéntrico, entre febrero a abril del 2016, en el cual se incluyeron pacientes de siete unidades de cuidados intensivos de adultos, de la ciudad de Guayaquil, Ecuador.

Selección de los pacientes y tipo de estudios

Se seleccionaron los pacientes mayores de 18 años que ingresaron a las unidades de terapia intensiva a los cuales se les realizó tomas de frotis rectales al ingreso, en aquellos pacientes que tenían factores de riesgo conocidos para carbapanemasas, y a partir de las 48 horas y posteriormente de forma semanal ,a todos los pacientes hospitalizados en la UCI.

Definición de variables

Los casos fueron definidos como pacientes infectados o colonizados que tuviesen cultivos positivos para EPC. Los portadores asintomáticos fueron considerados como casos colonizados. Los controles fueron seleccionados de los pacientes que estuvieron durante el mismo periodo en la misma institución y que no hubiesen tenido cultivos positivos para EPC. Cuando se encontró más de un cultivo positivo, se tomó en cuenta el primer resultado.

Para el estudio de factores de riesgo se incluyeron las siguientes variables: (1) datos sociodemográficos, (2) presencia de comorbilidades, (3) índice de gravedad de la enfermedad, para cual se utilizó la escala APACHE II, (4) estado de inmunosupresión, (5) presencia de dispositivos invasivos, (6) hospitalización reciente (incluidas las unidades de cuidados prolongados), (7) exposición de antimicrobianos en los 90 días previos al cribado de EPC.

Dentro de las comorbilidades se incluyó: falla renal, enfermedad cardiovascular, malignidad, diabetes mellitus, enfermedad neurológica, enfermedad crónica pulmonar, enfermedad del tejido conectivo, para/hemi/cuadriplejía. Se definió como estado de inmunosupresión el ser positivo para el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), neutropenia con conteo absoluto de neutrófilos de <500 ces/ μ l al momento del cultivo de vigilancia, recibir esteroides (equivalente al menos 16 mg de prednisona por día por al menos 5 días consecutivos) al momento de la obtención del cultivo de vigilancia, recibir quimioterapia o radioterapia o factor de necrosis tumoral en los 3 meses precedentes, historia de trasplante de médula ósea o de órganos sólidos. El fallo renal fue definido como leve con un valor de

creatinina sérica de 1,5-2 veces más alta que el valor basal o severo si este valor excediera 2 veces el valor basal o si el paciente se encontraba en diálisis peritoneal o hemodiálisis.

Se incluyeron los siguientes dispositivos invasivos a ser registrados en la hoja de datos: catéter venoso central, drenajes externos, sonda vesical fijadores externos, tubos de traqueotomía o gastrostomía. La hospitalización reciente fue definida como: ingreso durante más de 48 horas en unidades de cuidados de agudo, geriátricos durante los últimos 12 meses, que hayan recibido cuidado de heridas en casa, o que hayan estado recibiendo hemodiálisis o diálisis peritoneal. Se incluyó a su vez los pacientes vivos y fallecidos por EPC durante el periodo de estudio.

Para la definición de infecciones se utilizó el protocolo del CDC.

Técnicas de recolección de datos

La recolección de datos y los frotis rectales semanales fueron llevados a cabo por estudiantes de enfermería y medicina previamente capacitados y supervisados por los investigadores. Se realizó revisión de las historias clínicas de los pacientes para la búsqueda de los factores de riesgo, así como preguntas al familiar más cercano.

Medidas de control

Todos los pacientes con *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos (ERC) fueron colocados en aislamiento de contacto de acuerdo con los protocolos de las instituciones. Se utilizó clorhexidina al 4% para la higiene diaria del paciente y no se realizó cohorte del personal. El personal de la salud que estaba a cargo del cuidado de los pacientes con precauciones de contacto utilizó guantes y batas para toda interacción con un paciente potencialmente infectado o colonizado con ERC. El equipo de la unidad recibió capacitaciones en higiene de mano y aislamiento. las unidades fueron limpiadas profundamente con dos productos de desinfección diaria, monopersulfato de potasio y/o peróxido de hidrógeno.

Cultivos de vigilancia microbiológica

Se utilizó el medio Amies para el transporte de las muestras hasta los laboratorios. Todas las muestras fueron procesadas por el método del CDC en el Laboratorio Clínico “Sosegar” (209). Las mismas fueron suspendidas en 5ml de caldo de agar tripticasa soya (OXOID™), al que posteriormente se le adicionó un disco de 10 µg de ertapenem (OXOID™). El caldo fue incubado en una atmósfera de 35 C durante 24h. Luego del periodo de

incubación, se inoculó 100 μ l de la suspensión en agar MacConkey II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) (209), lo cual fue incubado en una atmósfera de 35 C durante 24h. El procesamiento en agar mSuper CARBA™ (SC) (CHROMagar™) fue realizado en el Laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” (INSPI). El hisopo fue colocado en el agar de acuerdo con las instrucciones del fabricante (\leq 72 horas de preparación) e incubado en una atmósfera de 35 C durante 24 h.

Identificación bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana

De acuerdo con las recomendaciones del CDC, se consideraron como colonias presuntivas de producción de carbapenemasas aquellas que crecieron como lactosa positiva. Adicionalmente, se consideraron las colonias lactosa negativas (diagnóstico de Hardy). En el agar SC, de acuerdo con las instrucciones del fabricante se estudiaron las colonias rojas como *E. coli*, y el azul metálico como coliformes y otras colonias Gram negativas incoloras. Todas las posibles colonias positivas para EPC y que fueron cultivadas en ambos agares, se identificaron por el sistema API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). Se utilizaron discos de difusión para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (210), se usó imipenem (IMP) 10 μ g y meropenem (MER) 10 μ g. Los aislados resistentes a carbapenémicos (ERC) y las no resistentes fueron definidas de acuerdo con los puntos de corte del CLSI(197). Los aislados con ERC fueron las que tenían halos de inhibición de \leq 22 mm y las no resistentes a carbapenémicos fueron las que tenían halos de inhibición de \geq 23 mm(210).

Detección fenotípica de los mecanismos de resistencia

Se estudiaron todas las ERC con la prueba de Hodge modificada (MHT) (210). Para la detección de serincarbapenemasas, se utilizó la prueba de discos combinando meropenem con/sin ácido fenilborónico (AFB) (Liofilchem) y para detectar metalobetalactamasas se utilizó imipenem con/sin EDTA (Liofilchem), tal y como se ha descrito con anterioridad (211)(212). La producción de carbapenemasas se confirmó si eran positivos tanto la prueba de MHT y las pruebas combinadas de discos con AFB y EDTA. Las ERC con una MHT negativa o indeterminada y/o una prueba combinada de disco negativa, fueron también probadas con un método de inactivación de carbapenémicos (mCMI) (213) y MHT con agar Mueller Hinton (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) suplementado con 250 mg/ml de sal de cloxacilina sódica (MHT-C) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y un disco de meropenem

(10 ug) de acuerdo con protocolos descritos previamente(214). Los aislamientos con CMI negativa y MHT-C fueron definidos como ERC no productoras de carbapenemasas (ERC-no PC). Estos aislamientos fueron estudiados para la producción de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y AmpC. Se definió como fenotipo BLEE en *Enterobacterales* a la observación de un efecto sinérgico entre cefepima (FEP 30ug), cefotaxima (CTX 30 ug) y ceftazidima (CAZ 30ug) y amoxicilina/ácido clavulánico (CLAV 20ug/10ug), el cual fue colocado a 15 mm del centro para centrar a CAZ, FEP y CTX(215). En los aislamientos ERC-no PC el fenotipo AmpC se consideró si se observó un efecto de sinergia con el método de doble disco con ertapenem (ERT 10 *epag*) y el disco de ácido fenilborónico (300 ug) (AFB) (método Kirby Bauer con discos de ERT y AFB colocados en 15 mm del centro al centro del agar Mueller Hinton suplementado con 250 mg/ml de sal sódica de cloxacilina) (215).

Las aislados de *E. coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 fueron usadas como controles de calidad.

Detección molecular de carbapenemasa

Todos los ERC fueron subcultivados en agar tripticasa de soya (OXOID™) durante 24 horas a 35 ° C en atmósfera de aire. El ADN se extrajo utilizando el Kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se evaluó la calidad del ADN analizando la proporción de absorbancia a 260 nm / 280 nm. Se utilizó un protocolo de cadena de polimerasa multiplex para detectar los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{NDM} (214). La extracción de ADN se realizó por métodos comerciales de columna y se utilizaron los reactivos para la PCR en las siguientes concentraciones: taq polimerasa 0.75 U, MgCl 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM y 0.2 uM de cada cebador en un volumen final de 25 µl. Los cebadores utilizados fueron: KPC-5-F AACAAGAATATCGTTGATG -3, KPC-R 5-AGATGATTTTCGAGCCTTA-5, 18 . La visualización se realizó en gel de agarosa al 2%, obteniendo un producto de 916 pares de bases. Segundo set de primers utilizados (214): KPC-F CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG , KPC-R CTTGTCATCCTTGTTAGGCG. Los reactivos para la PCR en las siguientes concentraciones: taq polimerasa 1 U, MgCl 1.5 mM, dNTPs 0.125 mM y 1 uM de cada cebador en un volumen final de 25µl. La visualización se realizó en gel de agarosa al 2% en TAE 1x, obteniendo un producto de 798 pares de bases.

Análisis de clonalidad

A los aislados de *K. pneumoniae bla*_{KPC} positiva, una por cada paciente, se les realizó el análisis de clonalidad con la técnica de ERIC-PCR, que se describe a continuación. Ninguna otra carbapenemasa fue estudiada. Una cadena de cada patrón electroforético obtenido con ERIC-PCR fue analizado con electroforesis de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) y la enzima de restricción XbaI (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). PFGE fue realizado con un (Bio-RA) CHEF DR III Sistem a 6V.Cm, 14 C, 120 C incluido ángulo, con un tiempo inicial de 6,76 s a un tiempo final de 35,8 s a 15 para 18h. El análisis de clonalidad se realizó por el *software Bionumerics Versión 7,1*, y el análisis de similitud fue desarrollado con el coeficiente de Dice. Los dendogramas relacionados fueron generados con el método UPGMA (parámetro de optimización 1.5 y tolerancia 2% para ERIC-PCR y 1,8% para PFGE). Los aislados con similitud de $\geq 80\%$ fueron asignadas al mismo grupo en ERIC-PCR y PFGE. La reacción se realizó con las siguientes concentraciones en un volumen final de 25 μ l, 2,5 U de Taq polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 250 μ M de dNTPs, primers 0,4 μ M de cada uno y 100 ng de ADN. Se utilizaron los siguientes primers descritos por Versalovic (216). ERIC1R 5-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3 , ERIC 2 5-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3

Determinación del secuencia tipo por metodología MLST (Multilocus sequence typing)

El MLST se realizó por el protocolo definido por el Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). La asignación del ST fue realizada con la base de *Klebsiella* MLST (<http://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Interpretación de los resultados

Una EPC aislada con alguna de las dos metodologías y confirmada molecularmente, se consideró como un resultado positivo verdadero. Un verdadero resultado negativo se definió cuando no se recuperó ningún EPC con ninguno de los dos métodos estudiados. Muestras con *Enterobacterales* sensibles a carbapenémicos o EPC no PC fueron considerados como resultados falsos positivos. Si una metodología recuperara un CPE molecularmente confirmado y el otro no, consideramos la muestra como falso negativo. Los resultados discordantes se definieron como aquellos que mostraban un resultado diferente con respecto a la positividad o

negatividad de la muestra o el tipo o número de ECP aislado en una de las dos metodologías. La concordancia se definió como tener el mismo resultado con el dos metodologías.

Análisis de coste

El coste de cada método se calculó en dólares estadounidenses con valores al 2016. El sueldo del tecnólogo de laboratorio se estimó en \$ 7.5 por hora, basado en un salario mensual de \$140 (escala de remuneración de los funcionarios del servicio público del Ecuador) (217).

Análisis estadístico

Para evaluar la sensibilidad y especificidad se utilizó Microsoft Office Excel 365.2015 por frecuencias y porcentajes. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos (VPP, VPN), la precisión diagnóstica, la razón de verosimilitud positiva y negativa de cada método fueron calculados. El acuerdo entre las dos pruebas se estableció con los índices de Cohen y Kappa. El índice Kappa se interpretó de la siguiente manera: 0,01-0,20 concordancia deficiente; 0,21-0,40 concordancia justa; 0,41-0,60 concordancia moderada; 0,61-0,80 buena concordancia; y 0,81 -1, muy buena concordancia (218). La significancia estadística se calculó con la prueba de Chi cuadrado de Pearson y los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Se utilizó el programa R para el análisis de los datos. La prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar las variables categóricas y la T-Student o la prueba U- MannWhitney para las continuas. Se analizó multicolinealidad a través de los coeficientes de correlación de Pearson y los factores de inflación de la varianza para el modelo de regresión logística. La inferencia fue conducida a través de la prueba de Wald con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ y con un intervalo de confianza (IC) de 95% para los Odds Ratio.

Aprobación del Comité de ética

Esta parte del estudio fue aprobada por el comité de ética de la Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Cada paciente o familiar cercano firmó un consentimiento informado

2.2 Del objetivo 3

Población de estudio

Se recopilaron de forma consecutiva los datos clínico-epidemiológicos y microbiológicos de las infecciones producidas en todos los pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 detectados entre octubre de 2015 y marzo de 2017 (18 meses) en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, que asiste a una población de alrededor de 440.00 individuos de la provincia de Granada, en el sur de la comunidad autónoma andaluza. Los aislamientos fueron identificados usando el sistema MicroScan (Beckman Coulter, USA) y espectrometría de masas (MaldiTof®, Bruker Daltoni GmbH, Alemania). La resistencia fue caracterizada usando el sistema de MicroScan con una determinación subsecuente de carbapanemasa, si era aplicable, por medio de la prueba NG-carba, Biotech NB, Francia. Los resultados fueron confirmados por el laboratorio Andaluz de Biología Molecular del programa española PIRASOA, Los datos clínicos-epidemiológicos se recopilaron a través de la historia clínica digital para su posterior evaluación y se analizaron los factores de riesgo para la adquisición de la infección por este microorganismo.

Datos clínico-epidemiológicos

Se recogieron datos sobre la adquisición comunitaria/hospitalaria, estancia media de los pacientes y los días de hospitalización previa al momento de la detección de *K. pneumoniae* KPC-3/ST258. En nuestro hospital, en el momento de presentación de estos aislados de *K. pneumoniae*, se hizo investigación de portadores, cuando fue posible, a través del estudio en frotis rectal.

Se especificó el tipo de habitación (individual, doble o triple) en la que se encontraba cada paciente en el momento de la detección. Se realizó un seguimiento estrecho, a posteriori, de cada paciente, identificando las distintas habitaciones ocupadas durante el ingreso para analizar la transmisión de la cepa en este brote. Se analizaron distintos intervalos de tiempo: el tiempo transcurrido desde la petición analítica hasta la detección de la bacteria produciendo

carbapenemasa, así como el tiempo transcurrido entre la obtención del resultado microbiológico y la instauración de las medidas preventivas habituales.

Se analizó si los pacientes habían presentado aislamientos previos por *K. pneumoniae* KPC-3/ST258, y además se indicó si se había evaluado el estado de colonización intestinal concomitante y la persistencia de la colonización transcurridos 30 días. Para ello se tomaron muestras sistemáticas de vigilancia de frotis rectal de los pacientes y sus contactos, que fueron sembradas en medios selectivos para bacterias productoras de carbapenemasas (CHROMID® CARBA SMART, BioMerieux, España), incubadas durante 48 horas, e identificándose las colonias mediante Maldi-TOF, con posterior determinación de la carbapenemasa (NG-Test Carba, NG Biotech, Francia). En cuanto a la mortalidad se indicaron los fallecimientos ocurridos durante el ingreso y el tiempo transcurrido desde la detección de *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 y la fecha de la muerte.

Entre los posibles factores de riesgo para la infección por *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 se registró si los pacientes habían sido sometidos a manipulación urológica la semana previa; si eran portadores de sonda urinaria permanente o sometidos a sondaje provisional para la recogida de la muestra de orina. Se especificó el tiempo transcurrido con la misma sonda vesical, el uso de procedimientos intervencionistas (técnicas quirúrgicas, técnicas endoscópicas, y la presencia de catéter central, sonda nasogástrica o sonda PEG), la estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos, el uso de ventilación mecánica (invasiva y no invasiva), la administración de antibioterapia durante más de 48 horas la semana previa, focalidad infecciosa, criterios de sepsis mediante escalas qSOFA/SOFA y el Índice de Charlson, como escala de gravedad. Además, se recopilaron los siguientes factores asociados a inmunosupresión: presencia de neutropenia, neoplasia, quimioterapia en el mes previo, trasplante y tratamiento con corticoides (>10 mg/día de prednisona o equivalente durante más de 2 semanas) (219). Se identificó la presencia de insuficiencia renal mediante la estimación del filtrado glomerular (FG) a partir de la concentración de creatinina sérica, la edad y el sexo por la ecuación CKD-EPI expresada en ml/min/1,73 m². En función del FG se categorizó como insuficiencia renal leve, moderada o grave, así como la necesidad de terapia renal sustitutiva(220). Finalmente, se analizó la presencia de las siguientes patologías asociadas: diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular, deterioro cognitivo previo, o serología positiva a VIH.

Intervenciones de control de las infecciones

Se implantaron las siguientes medidas de control cuando se detectaron los aislamientos: implementación de precauciones de contacto, incluyendo en este caso habitación individual de uso exclusivo para los pacientes en el que se ha aislado, reforzamiento de la higiene de manos, hoja de información al paciente, uso correcto y apropiado de dispositivos invasivos, limpieza de la habitación y eliminación de residuos y estudio de contactos.

Estudio microbiológico

Los aislados obtenidos en el laboratorio de Microbiología del hospital, a través de los cultivos de las muestras en los procesos clínicos o en los estudios de colonización dirigidos, se remitieron al centro de referencia de Andalucía (PIRASOA) para realizar la caracterización microbiológica de los aislados. La procedencia de los 41 aislados, procedentes de muestras clínicas indicativas de infección y/o colonización, 1 o 2 por sujeto, en las que se realizó el estudio de sensibilidad a los antibióticos fue: 11 (26,8%) de orinas, 21 (51,2%) de frotis rectal (para estudios de colonización de pacientes o de contactos), 4 (9,7%) de hemocultivos, 3 (7,3%) de líquido abdominal y 2 (4,8%) de otras muestras. El estudio de sensibilidad se realizó utilizando paneles NegCombo 44 de MicroScan system® (Beckman-Coulter Inc., Alcobendas, Madrid, Spain), así como difusión en agar con discos de ertapenem, meropenem e imipenem. Para la interpretación de las categorías clínicas se utilizaron los puntos de corte de EUCAST 2018(41). Se estudió la hidrólisis de imipenem con la técnica β -Carba Test (BioRad, Alcobendas) y el efecto de inhibidores (ácido dipicolínico, ácido borónico y cloxacilina) sobre la actividad de meropenem mediante difusión con disco (Rosco, Barcelona, España) (41). La detección de genes de carbapenemasas se estudió mediante PCR con cebadores específicos de los grupos KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48 y posterior secuenciación Sanger (221).

Se seleccionó un aislado por paciente para tipado molecular, excepto por los dos morfotipos de una muestra de biopsia (un total de 24), utilizando secuenciación masiva Illumina MiSeq 300-bp (WGS) con una media de cobertura de 75, ensamblando de novo el resultado con CLC Workbench 9.01.1 (Qiagen, Las Rozas, Madrid, España). La anotación de determinantes de resistencia se realizó mediante Resfinder y la base de datos integral de resistencia a antibióticos (CARD). Para estudiar el entorno genético del *bla*_{KPC-3}, se anotaron los elementos móviles (35639 bp, cobertura 30%) donde se encontraba dicho gen *bla* con la aplicación on-line MARA, determinando la isoforma según la secuencia previa al gen (222).

Tipado molecular

La asignación de secuenciotipo se realizó mediante MLST ((25). La relación entre los aislados se estudió mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/pfge.asp>) usando la enzima de restricción XbaI. Se generaron dendogramas utilizando la aplicación Fingerprinting 3.0 (Applied Mathematics), utilizando el índice de Dice y una tolerancia de posición de banda del 1% para la comparación de perfiles genéticos. Los aislados con menos de 3 bandas de diferencia (que correspondía a >94% de similitud) se asignaron al mismo pulsotipo.

Consideraciones éticas

El protocolo del estudio se llevó a cabo con arreglo a la Declaración de Helsinki y las consideraciones éticas de la investigación epidemiológica. Debido al carácter no intervencionista del estudio, ya que el material biológico se utilizó sólo para el diagnóstico estándar de infecciones, siguiendo las prescripciones de los médicos sin ninguna investigación adicional a los procedimientos rutinarios, no se recabó el consentimiento informado del paciente para el análisis integrado de los resultados, según lo señalado por las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud en seres humanos de la Organización Mundial de la Salud. No se realizó muestreo adicional ni modificación del protocolo diagnóstico de rutina por el laboratorio. Se realizaron los análisis de datos utilizando una base de datos completamente anónima, donde los sujetos fueron identificados sólo mediante el Número Único de Historia de Salud de Andalucía (NUHSA) y sustituidos por episodios infecciosos diferentes, si es que lo hubo. La entidad que concedió el permiso para acceder y utilizar los datos fue la Unidad de Gestión Clínica de Microbiología Clínica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, España

2.3 Del objetivo 5.

Se realizó un estudio transversal y retrospectivo de los pacientes adultos ingresados en los servicios de Medicina Interna y sus Especialidades, unidades de cuidados intensivos (general y cardiaca), y Cirugía General y sus Especialidades del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada durante enero del 2016 hasta diciembre del 2019. No se establecieron criterios de exclusión en la población. Este hospital presta asistencia especializada a un conjunto poblacional de 460.000 habitantes aproximadamente. Para el estudio de colonización,

se estudiaron microbiológicamente las bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos (BRC) de todos los FR y FF recibidos entre enero de 2016 y diciembre de 2019 (2.892 FR y 556 FF) para estudio de “posible episodio de colonización por BRC”, mediante una muestra de FR, con o sin FF, por episodio. Para el estudio de la relación entre colonización e infección, dentro del grupo anterior, se seleccionaron, entre enero de 2016 y julio de 2019, los episodios donde el estudio de FR y FF precedió o coincidió al estudio de un “posible episodio de infección”, mediante muestras clínicas de diferentes localizaciones que fueron estudiadas mediante procedimientos habituales, también se recuperó la información sobre el tratamiento antibiótico recibido. Para la investigación de las BRC aisladas se utilizaron procedimientos descritos(199). De forma resumida, las muestras se sembraron en el medio de cultivo selectivo CHROMID® ESBL (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), incubando a 37°C en aerobiosis 48 h. Los aislamientos se identificaron con el sistema MicroScan (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) y espectrometría de masas (Maldi-Tof®, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Se caracterizó la resistencia mediante el sistema MicroScan utilizando paneles NegCombo 44, interpretado de acuerdo con los puntos de corte clínicos definidos por el EUCAST (67), con posterior determinación de carbapenemasa, si correspondía, mediante la prueba colorimétrica Neo-Rapid CARB Kit® (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) e inmunocromatografía (NG5-Test Carba, NG Biotech, Guipry-Francia, para detección de KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48-like enzimas; y OXA-23 K-Set, Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica). Los aislados identificados en muestras de frotis y clínicas que fueron resistentes a carbapenémicos se enviaron al Laboratorio de Referencia para el tipado molecular de patógenos nosocomiales y detección genotípica de mecanismos de resistencia a antimicrobianos de interés sanitario del programa PIRASOA, localizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Virgen Macarena en Sevilla.

Estudio microbiológico de los microorganismos productores de carbapenemasas

Se investigó la sensibilidad a ertapenem, imipenem y meropenem mediante difusión con discos en Mueller Hinton agar y los resultados fueron interpretados de acuerdo con los puntos de corte clínicos definidos por EUCAST (67). La inhibición de la actividad carbapenemasa (173) se estudió mediante difusión con discos, usando discos de meropenem, meropenem/ác. borónico, meropenem/ác. dipicolínico y meropenem/cloxacilina, además de un disco de temocilina (Rosco Diagnostica). La detección de genes de carbapenemasas se estudió mediante PCR con cebadores específicos y posterior secuenciación Sanger. Todos los aislados

fenotípicamente productores de carbapenemasa fueron analizados por secuenciación masiva (Illumina Inc, San Diego, CA, Estados Unidos) para estudiar todos los determinantes de resistencia y el MLST. Para el análisis de las secuencias se utilizó el software CLC Genomics Workbench, v10 (Qiagen). Para la detección de los determinantes de resistencia se usaron las bases de datos ResFinder ((10)) and CARD databases (<https://card.mcmaster.ca/>) y para el MLST la base de datos MLSTfinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

El estudio genotípico de la relación clonal entre los aislados fue reevaluado mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), usando las enzimas *Xba*I (*Enterobacteriales*), *Spe*I (*Pseudomonas* spp y *Stenotrophomonas maltophilia*) or *Apa*I (*Acinetobacter* spp.) de acuerdo con las especies. Los aislados que diferían en 2 o más bandas en el análisis por PFGE fueron asignados a diferentes pulstipos. Para establecer los patrones de bandas los geles fueron analizados con el software Fingerprinting 2.0 (BioRad). La tolerancia y la optimización de la posición de la banda se fijaron en 1%. Se utilizó un método de agrupación por pares no ponderados con un algoritmo de agrupación de media aritmética (UPGMA) para generar un dendrograma y el coeficiente de Dice para medir la similitud genética entre los aislados. Los patrones de PFGE con una similitud $\geq 90,0\%$ se consideraron como el mismo grupo con aislados estrechamente relacionados.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, calculando frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas. Se aplicó la prueba chi-cuadrado de Pearson para analizar la asociación entre colonización e infección. Se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para el análisis de la validez de sus pruebas diagnósticas se midió sensibilidad y especificidad. Los datos se analizaron con el software IBM SPSS Statistics 19.

Consideraciones éticas

El protocolo del estudio se llevó a cabo con arreglo a la Declaración de Helsinki y las consideraciones éticas de la investigación epidemiológica. Debido al carácter no intervencionista del estudio, ya que el material biológico se utilizó sólo para el diagnóstico estándar de infecciones, siguiendo las prescripciones de los médicos sin ninguna investigación adicional a los procedimientos rutinarios, no se recabó el consentimiento informado del paciente para el análisis integrado de los resultados, según lo señalado por las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud en seres humanos de la

Organización Mundial de la Salud. No se realizó muestreo adicional ni modificación del protocolo diagnóstico de rutina por el laboratorio. Se realizaron los análisis de datos utilizando una base de datos completamente anónima, donde los sujetos fueron identificados sólo mediante el Número Único de Historia de Salud de Andalucía (NUHSA) y sustituidos por episodios infecciosos diferentes, ocurridos al menos con 6 semanas de diferencia del anterior, si es que lo hubo. La entidad que concedió el permiso para acceder y utilizar los datos fue la Unidad de Gestión Clínica de Microbiología Clínica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, España.

3 RESULTADOS

3.1 Evaluación del medio de mSuperCARBA™ agar para la detección de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas.

Se procesaron 950 hisopados correspondientes a 605 pacientes (1 a 6 muestras por paciente y una media de 2 por paciente). Obtuvimos 633 resultados negativos y 317 resultados positivos (228 pacientes), detectando un total de 330 EPC. Doscientos sesenta y nueve muestras se recuperaron usando el método del CDC, y 292 mediante el método SC (Tabla 4 y 5). Trece muestras tenían más de un EPC, 12 fueron detectadas con el mSuper CARBA™ (CHROMagar™), y uno con el método CDC). El método mSuperCARBA™ fue estadísticamente más sensible (p 0,003) que el del CDC, lo que nos permitió detectar más de un EPC en las muestras estudiadas.

La carbapenemasa predominante fue KPC (92,24%). La carbapenemasa NDM se detectó en el 5,75% de las muestras, mientras que OXA-48 en ninguna.

Tabla 4. Resultados obtenidos por dos métodos en muestras con un *Enterobacterial* productor de carbapenemasa

Tabla 1. Resultados obtenidos por dos métodos en muestras con un EPC			
Microorganismo	Número (%)	Resultado Concordante	Resultado Discordante
<i>K. pneumoniae</i> KPC	277(90,78)	224	53 (25 CDC+/SC-) (27 CDC-/SC +)
<i>E. aerogenes</i> KPC	4(1,31)	4	0
<i>E. cloacae</i> KPC	7(2,30)	2	5 (CDC - / SC +)
<i>E. coli</i> KPC	1(0,32)	1	0
<i>K. oxytoca</i> KPC	3(0,98)	2	1 (CDC - /SC +)
<i>P. mirabilis</i> NDM	13(4,27)	0	13 (CDC - /SC +)
Total	304	233	72

Método CDC; SC: agar mSuperCARBA™; (+) positivo; (-) negativo

Tabla 5. Resultados obtenidos por dos métodos en muestras con más de un *Enterobacter* productor de carbapenemasa

	Método CDC		Método SC	
	Microorganismo 1	Microorganismo 2	Microorganismo 1	Microorganismo 2
28098V	<i>E. cloacae bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	<i>E. cloacae bla KPC</i>	-
27037M	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>E. cloacae bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27920L	<i>E. cloacae bla KPC</i>	-	<i>E. cloacae bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27902N	Negativo	-	<i>E. coli bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27411R	<i>E. coli bla KPC</i>	-	<i>E. coli bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27405J	Negativo	-	<i>E. coli bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
28001S	<i>E. coli blaKPC</i>	-	<i>E. coli bla KPC</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27301G	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>P. mirabilis bla NDM</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27306M	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>P. mirabilis bla NDM</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27046P	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>P. mirabilis bla NDM</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27302P	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>P. mirabilis bla NDM</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27303V	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>P. mirabilis bla NDM</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>
27694V	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>	-	<i>P. mirabilis bla NDM</i>	<i>K. pneumoniae bla KPC</i>

Concordancia

El 91,05% (865) de los resultados fueron concordantes. Se observó una concordancia considerable entre los dos métodos para la detección de EPC (índice Kappa 0,9. Intervalo de confianza 0,75 – 0,84). Se encontró la mejor concordancia para la variante KPC (índice Kappa 0,87. Intervalo de confianza 0,82 – 0,90) y no hubo acuerdo en absoluto para NDM detección (índice Kappa 0). Las muestras con resultados discordantes pertenecían a 63 pacientes (incluidos aquellos con más de un CPE), de los cuales 37 (58,73%) tenían más de una muestra recogida durante el estudio 168 período. Once pacientes (31 muestras) tuvieron resultados discordantes más de una vez y pudieron ser corroborado (Tabla 6.).

Tabla 6. Resultados discordantes en pacientes con más de una muestra

	Total de muestras/ No de muestras con resultados repetidos discordantes	Resultados discordantes CDC/SC
<i>Paciente 1</i>	5/2	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 2</i>	5/3	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 3</i>	3/2	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 4</i>	5/2	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 5</i>	3/3	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 6</i>	4/4	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 7</i>	5/2	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 8</i>	2/2	Negativo / <i>K. pneumoniae</i> KPC
<i>Paciente 9</i>	3/3	Negativo / <i>P. mirabilis</i> NDM
<i>Paciente 10</i>	4/4	Negativo / <i>P. mirabilis</i> NDM*
<i>Paciente 11</i>	4/4	Negativo / <i>P. mirabilis</i> NDM*

CDC: método CDC SC agar mSuperCARBATM; *Dos muestras de cada paciente tuvo *K. pneumoniae* KPC en el método del CDC y *P. mirabilis* NDM y *K. pneumoniae* KPC en el método SC

Resultados falsos positivos y negativos

Se obtuvieron 24 (2,52%) resultados falsos positivos con agar SC, de los cuales 14 fueron ERC no PC, y 10 fueron susceptibles a imipenem y meropenem. Con el método del CDC obtuvimos 198 (20,84%) resultados falsos positivos, de los cuales 6 fueron aislados en ERC no PC, y 192 muestras tuvieron *Enterobacterales* con susceptibilidad a imipenem y meropenem (129 *E. coli*, 54 *K. pneumoniae* y 9 *E. cloacae*). El mecanismo de resistencia a carbapenémicos más frecuentemente detectado en aislamientos sin EPC fueron β -lactamasas de espectro extendido combinado con mutaciones porinas. Se obtuvo 22 (2,31%) resultados falsos negativos con el SC. Mientras que obtuvimos 47 (4,94%) resultados falsos negativos con el método CDC (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de las muestras de *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos no productores de carbapenemasas clasificadas como falsas positivas

<i>Microorganismos</i>	Código de Laboratorio	Método del CDC	Método SC	IMP (mm)	MER (mm)
<i>K. pneumoniae</i> AMP C+mutación de porinas	27111T	Negativo	Positivo	28	23/16
<i>K. pneumoniae</i> AMPC+mutación de porinas	27416T	Negativo	Positivo	24	19
<i>K. pneumoniae</i> AMPC+mutación de porinas	27740T	Negativo	Positivo	20	18
<i>K. aerogenes</i> AMP C+mutación de porinas	25428C	Positivo	Negativo	23	17
<i>K. aerogenes</i> AMP C+mutación de porinas	25729C	Positivo	Negativo	16	18
<i>E. cloacae</i> AMP C+mutación de porinas	28384A	Negativo	Positivo	13	23
<i>E. cloacae</i> AMP C+mutación de porinas	27909R	Negativo	Positivo	6	12
<i>K. pneumoniae</i> BLEE+mutación de porinas	25339R	Positivo	Positivo	24	14
<i>K. pneumoniae</i> BLEE+mutación de porinas	28736Z	Positivo	Positivo	15	17
<i>K. pneumoniae</i> BLEE+mutación de porinas	25337Z	Positivo	Positivo	18	17
<i>K. pneumoniae</i> BLEE+mutación de porinas	26745P	Negativo	Positivo	25	20
<i>K. pneumoniae</i> BLEE+mutación de porinas	27104A	Positivo	Positivo	22	13
<i>K. pneumoniae</i> BLEE+mutación de porinas	27185A	Negativo	Positivo	25	17
<i>E. coli</i> BLEE+mutación de porinas	26422S	Negativo	Positivo	25	17

Método CDC; SC: agar mSuperCARBATM;IM: imipenem; MER: meropenem

Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y precisión de diagnóstico:

El método mSuper CARBATM muestra los mejores resultados en todas las estadísticas análisis (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de los análisis estadísticos

	Método CDC		SC	
	%	(IC)	%	(IC)
Sensibilidad	84,7%	(80,3 - 88,3)	93,05%	(89,6-95,3)
Especificidad	68,9%	(65,2 - 72,3)	96,21%	(94,4-97,5)
Valor predictivo positivo (VPP)	57,3%	(52,8 - 61,7)	92,4%	(88,9-94,8)
Valor predictivo negativo (VPN)	90,1%	(87,1 - 92,5)	96,5%	(94,8-97,7)
Exactitud diagnóstica	74,1%	(71,2 - 76,6)	95,2%	(93,6-96,4)

Método CDC; SC: agar mSuperCARBATM;IC: intervalo de confianza

Análisis de costes

Este estudio mostró que el método CDC era más caro que el SC (CDC \$ 10.307,92 vs. SC \$ 8.990,72). Aunque se estimó un mayor coste en el total de los suministros utilizados para el SC (SC: \$ 8.477,32 versus CDC: \$ 7.866,21) el coste de laboratorio del tiempo del técnico aumentó el total del coste del método CDC (CDC: \$ 2.441,71 vs SC: \$ 513,40), esto debido principalmente por la falta de especificidad, ya que el 39.91% del coste del método del CDC fue usado para trabajar muestras con resultados falsos positivos (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de coste

Método	Minutos	Valor unitario (\$ US)	SUPER CARBA			
			Muestras positivas(n:292)	Muestras negativas (n:634)	Falsos positivos: CSE (n: 10)	Falsos positivos: ERC-PC (n: 14)
Método CDC, Caldo MacConkey	12	0,58				
Agar Cromogénico	1	3,62	1057,04	2295,08	36,2	50,68
Sistema de Identificación Api 20E	3	14,5	4234		145,00	\$203,00
Prueba de susceptibilidad Imipenem-Meropenem	1	0,59	172,28		5,9	8,26
Método fenotípico confirmatorio (disco de ácido borónico/disco Edta)	1	0,71	207,32			9,94
Test de Hodge	2	0,15	43,80			2,1
Método de inactivación de carbapenemasas (tiempo de incubación excluido)	2	0,28				3,92
Test de Hodge con cloxacilina	5	0,2				2,8
Total			5714,44	2295,08	187,1	280,7
Costo total insumo					8477,2	
Tiempo del tecnólogo		0,13			513,4	
COSTOS TOTALES					8990,72	

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades; ERC: *Enterobacteriales* reresistentes a carbapenémicos; PC: productor de carbapenemasa ESC: *Enterobacteriales* se

3.2 Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas, y su caracterización molecular en Guayaquil, Ecuador.

Prevalencia de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas y características de los pacientes

Se incluyeron 148 camas de cuidados intensivos de cuatro hospitales privados y tres públicos. Tres de los hospitales no contaban con laboratorio de microbiología, por lo que sus muestras microbiológicas fueron procesadas en laboratorios externos a la unidad de salud. En la Tabla 10 se muestra la información detallada de los hospitales participantes.

Tabla 10. Prevalencia de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas y características de los hospitales participantes

Código del hospital	Nivel de atención	Tipo de atención	No Camas Hospitalarias*	Días de hospitalización*	Número de egresos*	No Camas UCI	Laboratorio de Microbiología	No de aislamientos ERC blaKPC (%)
1	Tercer nivel	Privada	101	27781	7656	15	Si	17 (6,8%)
2	Tercer nivel	Pública	117	17313	2068	4	SI	5 (2,0%)
3	Tercer nivel	Pública	598	262181	24205	85	SI	181 (71,0%)
4	Segundo nivel	Privada	18	7583	2464	8	No	6 (2,4%)
5	Tercer nivel	Pública	126	46360	9583	18	No	12 (4,7%)
6	Segundo nivel	Privada	34	7627	2018	9	No	24 (9,4%)
7	Tercer nivel	Privada	101	25280	5570	9	Si	10 (3,9%)
Total			1095	394125	53564	148		255

* Fuente: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INEC 2014, UCI: unidad de cuidados intensivos, KPC: *K.pneumoniae* carbapenemasa

Se incluyeron 677 pacientes. Doscientos cincuenta y cinco pacientes (37,67%, 255/677) tenían al menos un *Enterobacterial* productor de carbapenemasa. Doscientos ocho pacientes fueron colonizados por EPC y cuarenta y siete (18,43%) tenían al menos una IAAS. Treinta y un pacientes tenían una infección invasiva y cuatro pacientes tenían más de una infección. La distribución de las IAAS fue: infecciones del sitio quirúrgico (n=14,26; 92%), neumonía asociada al ventilador mecánico (n=14,26; 92%), infecciones de las vías urinarias asociadas a catéter urinario (n=6,11; 54%), infección primaria del torrente sanguíneo (n=5,9; 62%), infecciones por úlceras por presión (n=4,7; 69%), infecciones en piel quemada (n=4,7; 69%), infecciones de piel y tejidos blandos (n=3,5; 77%) y un caso de neumonía intrahospitalaria (1,92%). Treinta y tres pacientes (70%) fueron colonizados antes de la infección. La mediana de tiempo desde el ingreso hasta la detección del ECP fue de 15,36 días (2-191 días). Las características clínicas del paciente se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes en las Unidades de Cuidados Intensivos. Guayaquil-Ecuador

VARIABLES	EPC positiva (n = 255)	EPC negativa (n = 422)	OR (95% IC)	valor P
Sexo (M)	155 (60,78%)	241 (57,11%)		0,34701
Promedio edad (año)	53,68(+/-19,81)	55,11(+/-20,52)		0,18506
APACHE II	16,16(+/-8,42)	13,42 (+/-8,61)		0,00003
Transferido	117 (45,88%)	126 (29,86%)	1,99 (1,44-2,75)	0,00003
Estancia en UCI(+/-SD)	25,15(+/-25,08)	11,78 (+/-10,05)		0,00000
Tiempo de estadía en UCI (+/-SD)	34,33(+/-26,8)	20,45(+/-23,01)		0,00000
Mortalidad	95 (37,25%)	106 (25,12%)	1,77 (1,27-2,48)	0,00081
Diagnóstico de admisión				
Falla renal	32 (12,55%)	40 (9,48%)	1,37 (0,84-2,24)	0,20925
Cáncer	4 (1,57%)	13 (3,08%)	0,5 (0,16-1,55)	0,2231
Diabetes mellitus	11 (4,31%)	21 (4,98%)	0,86 (0,41-1,82)	0,69384
Fallo renal crónico	31 (12,16%)	82 (19,43%)	0,57 (0,37-0,9)	0,01391
Enfermedad neurológica	61 (23,92%)	82 (19,43%)	1,3 (0,9-1,9)	0,16546
Enfermedad crónica pulmonar	3 (1,18%)	13 (3,08%)	0,37 (0,11-1,33)	0,11403
Enfermedad del tejido conectivo	3 (1,18%)	2 (0,47%)	2,5 (0,41-15,06)	0,30091
Quemadura	19 (7,45%)	8 (1,9%)	4,17 (1,8-9,66)	0,00034
Inmunosupresión				
VIH	5 (1,96%)	14 (3,32%)	0,58 (0,21-1,64)	0,30035
Neutropenia (<500 cel/ul)	0 (0%)	0 (0%)		
Uso de esteroides(>20 mg prednisona/15 días)	6 (2,35%)	5 (1,18%)	2,01 (0,61-6,65)	0,24408
Quimioterapia en los últimos 3 meses	0 (0%)	3 (0,71%)		
Trasplante de órganos sólidos	1 (0,39%)	1 (0,24%)	1,66 (0,1-26,62)	0,71847

APACHE II: score de evaluación aguda y fisiológica y salud crónica, EPC: *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa, UCI: unidad de cuidados intensivos, OR: Odds Ratio

La insuficiencia cardíaca crónica ($p = 0,01$) y las quemaduras ($p = 0,00$) se asociaron significativamente con la EPC. Otros diagnósticos de ingreso no mostraron significación estadística. Las quemaduras y las enfermedades del tejido conectivo tuvieron valores de OR más altos (4,31 y 2,58, respectivamente). Las comorbilidades tampoco se asociaron con la adquisición de EPC ($p > 0,05$), con excepción de las enfermedades del tejido conectivo ($p = 0,02$) y paraplejía, hemiplejía o tetraplejía ($p = 0,04$).

Los dispositivos asociados con EPC son: ventilación mecánica (OR:3,07; IC95% 2,11-4,48; $p = 0,0$), catéter venoso central (OR:2,76; IC95% 1,71-4,45; $p=0,0$), sonda urinaria (OR:4,03; IC95% 1,52-6,19; $p=0,0$), gastrostomía (OR:2,41; IC95% 1,3-4,45; $p=0,0$), traqueotomía (OR:5,09; IC95% 3,47-7,48; $p=0,0$), sonda nasogástrica (OR:2,57; IC95% 1,76-3,76; $p = 0,0$), catéter de hemodiálisis (OR:2,01, IC95% 1,2-3,4, $p=0,0$), cirugía (OR:1,82, IC95% 1,33-2,49; $p=0,0$) y nutrición parenteral (OR:2,05; IC95% 1,47-2,86; $p = 0,0$). Los dispositivos no asociados con las infecciones asociadas a la atención en salud fueron:

traqueostomía (OR:0,4; IC 95% 0,21-0,76; p = 0,0), cirugía (OR:0,16; IC 95% 0,06-0,38; p=0,0) y nutrición parenteral (OR:0,47; IC 95% 0,25-0,9; p=0,02) .

En lo que respecta a la administración de antimicrobianos encontramos que: el 43,57% de la población recibió vancomicina, 37,07% carbapenémicos, 30,43% piperacilina/tazobactam, 15,21% cefalosporinas, 13,45% fluoroquinolonas, 2,66% aminoglucósidos, 4,60% macrólidos y 0,74% aztreonam. Los carbapenémicos (OR:3,06; IC95% 2,2–4,24; p=0,0), vancomicina (OR:3,57; IC95% 2,58–4,94; p=0,0) y macrólidos (OR:2,75; IC95% 1,31–5,77; p=0,0) estuvieron asociados a la adquisición de EPC, mientras que ampicilina/sulbactam (OR:1,17; IC95% 0,83-1,65; p=0,37), cefalosporina (OR: 0,96; IC95% 0,62-1,48; p=0,35), fluoroquinolonas (OR:0,88; IC95% 0,56-1,4; p=0,59), aminoglucósido (OR:0,47; IC95% 0,15-0,17; p=0,17), piperacilina/tazobactam (OR:2,75; IC95% 1,24; p=0,2) y aztreonam (OR:0,41; IC95% 0,05-3,7; p=0,41) no mostraron significación estadística. Las condiciones clínicas asociadas con colonización e infección se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones clínicas asociadas con la infección por *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas en Unidades de Cuidados Intensivos. Guayaquil-Ecuador

VARIABLES	Colonizado (n = 255)	Infectado (n = 422)	OR (95% IC)	valor p
Sexo (M)	123 (59,13%)	32 (68,09%)		0,25634
Promedio edad (año)	54,34+/-19,98	50,74+/-18,96		0,18506
APACHE II	16,05+/-8,38	16,64+/-8,68		0,00003
Transferido	90 (43,27%)	27 (57,45%)	0,56 (0,3--1,07)	0,07813
Estancia UCI(+/-SD)	24,35+/-26,66	28,72+/-16,08		0,00000
Tiempo de hospitalización(+/-SD)	34,03+28,3	35,64+/-19		0,00000
Mortalidad	74 (35,58%)	21 (44,68%)	0,68 (0,36-1,3)	0,24366
Diagnóstico de admisión				
Falla renal crónica	31 (12,16%)	82 (19,43%)	0,57 (0,37-0,9)	0,01391
Enfermedad neurológica	61 (23,92%)	82 (19,43%)	1,3 (0,9-1,9)	0,16546
Quemadura	19 (7,45%)	8 (1,9%)	4,17 (1,8-9,66)	0,00034

APACHE II: score de evaluación aguda y fisiológica y salud crónica: OR: Odds Ratio

Aislamientos bacterianos y caracterización de carbapenemasas

Se obtuvieron un total de 1146 frotis inguinales y perineales (rango 1 a 6 por paciente; mediana 2). Se utilizó el método SuperCarba Chromoagar y el del CDC para los cultivos microbiológicos de 950 muestras (605 pacientes). En ciento sesenta y seis muestras se utilizó el método del CDC como técnica para el procesamiento de cultivos debido a limitaciones económicas. El mecanismo de resistencia a carbapenémicos más frecuentemente encontrado fue la producción de carbapenemasas ($n = 255$), en 27 pacientes se aisló *Enterobacterales* no productores de carbapenemasas.

El tipo de carbapenemasa predominantemente identificado fue KPC (91,72%), seguido de NDM (2,65%). No se encontraron OXA-48, IMP o VIM. El microorganismo que albergó bla_{KPC} fue con mayor frecuencia *K. pneumoniae* ($n = 249$), seguido de *E. cloacae* ($n = 8$), *K. aerogenes* (antes *E. aerogenes*) ($n = 4$), *E. coli* ($n = 4$) y *K. oxytoca* ($n = 1$). NDM estuvo presente solo en *P. mirabilis*. La Tabla 13 muestra el mecanismo molecular de la resistencia a carbapenemasas y el genotipo de carbapenemasa detectado. Cincuenta y siete patrones electroforéticos se distribuyeron en veintidós grupos de 174 aislados de *K. pneumoniae* bla_{KPC} por ERIC-PCR (Figura 5). PFGE identificó siete grupos entre 108 aislamientos analizados (incluidos 57 patrones de ERIC-PCR y 51 aislamientos no incluidos en ERIC-PCR). Se detectaron predominantemente dos grupos de PFGE utilizando un punto de corte del 80% de similitud en las unidades hospitalarias estudiadas. El grupo A ($n = 45$; 17 subtipos) y el grupo B ($n = 40$; 7 subtipos) incluyeron el 41,67% y el 37,03% de los aislamientos, respectivamente. El resto de los aislados se distribuyeron en el grupo C ($n = 1$; 2 subtipos), D ($n = 15$; 6 subtipos), F ($n = 1$), G ($n = 2$) y J ($n = 4$; 2 subtipos) (Figura 6). En la Fig.7 se presentan datos detallados de los subtipos de conglomerados.

Tabla 13. Mecanismos de resistencia de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas (EPC) y *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos no productores de carbapenemasa (ERC-no PC)

Especie	EPC Carbapenemase Genotype			ERC no PC	
	KPC	NDM	Total	BLEE+ alteración de porinas	AmpC+alteración de porinas
<i>K.pneumoniae</i>	249	0	249	9	4
<i>K.aerogenes</i>	4	0	4	0	1
<i>K.oxytoca</i>	1	0	1	0	0
<i>E. coli</i>	4	0	4	2	0
<i>E. cloacae</i>	8	0	8	1	1
<i>P. mirabilis</i>	0	8	8	0	0

EPC= *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa. ERC no-PC: *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos no productores de carbapenemasas; KPC= *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. NDM=New Delhi metallo-beta-lactamase. BLEE= β -Lactamase de Espectro Extendido

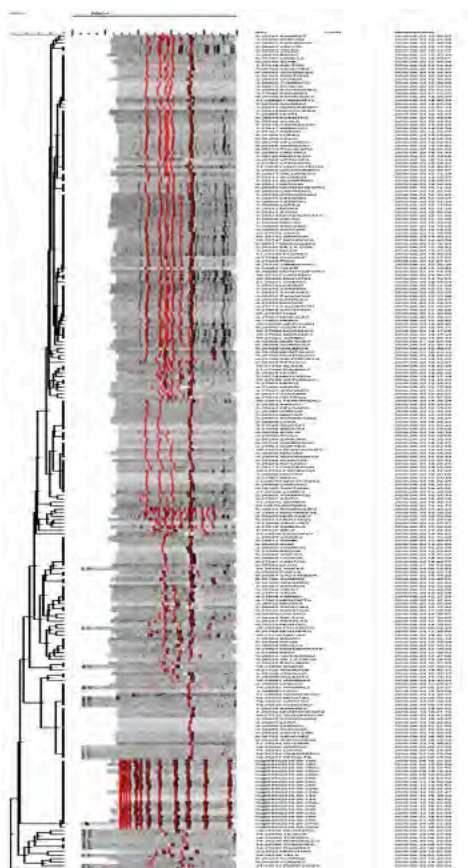


Figura 5. Dendrograma de resultados de ERIC-PCR para los aislamientos de *K. pneumoniae*. La escala del inicio representa la distancia genética entre los aislamientos

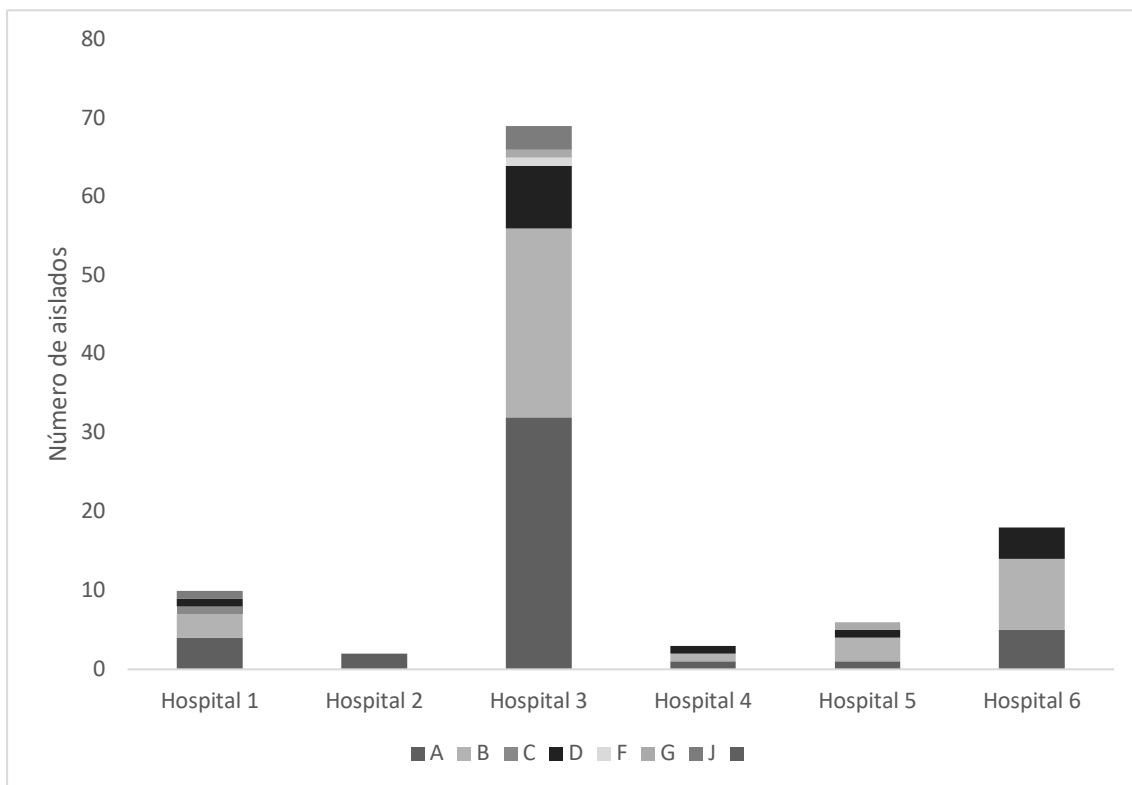


Figura 6. Distribución de Patrones electroforéticos.

Se obtuvieron veintidós secuenciotipos (ST) de 37 aislamientos estudiados. El ST 258 (n = 5) fue el ST predominante encontrado; otros ST fueron ST 512 (n = 3) y ST 45 (n = 3). Los tipos de secuencia 25, 35, 39 y 307 tenían dos aislados cada uno. Dieciocho aislamientos pertenecían a ST 1, 34, 36, 37, 42, 54, 70, 151, 231, 526, 628, 659 y ST 1040, cada ST con un aislado. Cuatro *K. pneumoniae* bla_{KPC} no se tipificaron de acuerdo con la base de datos MLST, por lo tanto, se deben realizar más estudios. bla_{KPC-2} estaba presente en ST-258, ST512 y ST 45. No se realizaron otros estudios en aislamientos que albergaban bla_{NDM} y en los otros ST debido a limitaciones económicas.

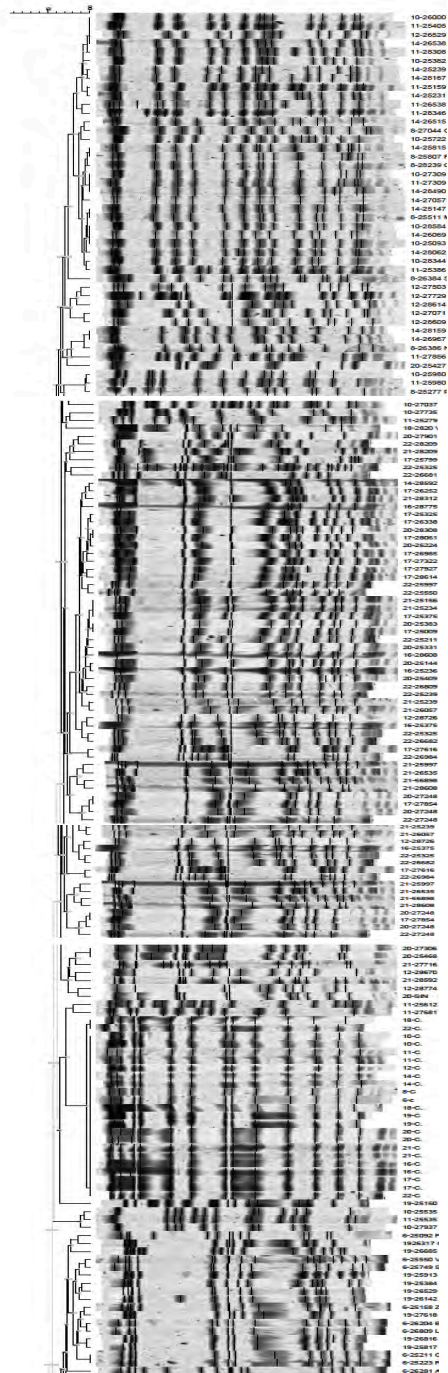


Figura 7. Dendrograma con los resultados de PFEG para los aislamientos de *K. pneumoniae*. La escala de arriba representa la distancia genética entre los aislados.

3.3 Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por *K. pneumoniae* productoras de KPC, y su caracterización molecular, en un brote de una ciudad media española.

Entre octubre del 2015 y marzo 2017, se estudiaron 23 pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 tratados en el Hospital Virgen de las Nieves: 17 (74%) presentaron infección y 6 (26%) colonización a nivel intestinal. Dos individuos colonizados fueron excluidos del análisis clínico-epidemiológico debido a que presentaban historias clínicas incompletas, por lo tanto, el análisis incluyó 17 pacientes infectados y 4 colonizados. En la Tabla 14 se muestran las características clínicas de estos.

Tabla 14. Características clínicas y epidemiológicas de los 23 sujetos con *K. pneumoniae* productora de KPC-3 ST258 en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada

Características	N(%)
Sexo femenino	14 (66,7)
Edad media*	77,19 (11,18)
Escala de Charlson*	7 (2,8)
Comorbilidades	
Insuficiencia renal	15 (65,22)
Cardiopatía isquémica	10 (47,6)
Insuficiencia cardíac	10 (4,6)
Evento cerebrovascular	19 (71,4)
Diabetes	6 (28,6)
Uso de corticosteroids	8 (38,1)
Deterioro cognitivo	9 (42,9)
Uso de >10 mg corticosteroides durante >15 días	8 (38,1)
Neutropenia severa	1 (4,8)
Transplante de órgano sólido	1 (4,8)
Media de días de internación previos al aislamiento*	31,67
Presencia de dispositivos invasivos	
Sonda vesical	16 (76,2)
Catéter venoso central	4 (19,0)
Sonda nasogástrica	5 (23,8)
Sonda de gastrostomía endoscópica	1 (4,8)
Ventilación mecánica	1 (4,8)
Cirugía	7 (33)
Antibióticos para bacilos gram negativos recibidos	17 (81)
Mortalidad asociada	12 (57,2)
*media (DS)	

Todos los casos fueron diagnosticados por primera vez en nuestro Hospital. Los 17 pacientes tuvieron distintas infecciones con al aislamiento de *K. pneumoniae* KPC-3/ST258: 10/17 (58,8%) infección urinaria (7 sólo del tracto urinario y 3 con sepsis), 3/17 (17,6%) neumonía y 4/17 (23,5%) peritonitis asociadas a infección de la herida quirúrgica. En 15 de los 21 sujetos estudiados se aisló, previo al aislamiento de *K. pneumoniae* KPC-3/ST 258, al menos uno de los siguientes microorganismos: *P. aeruginosa* 16,7% (5/30), *E. coli* 13,3% (4/30), *Candida albicans* 10,0% (3/30), *A. baumannii* 6,7% (2/30), *K. aerogenes* 6,7% (2/30), *Enterococcus faecalis* 6,7% (2/30), *Candida glabrata* 6,7% (2/30), *S. marcescens* 6,7% (2/30),

Staphylococcus aureus oxacilin sensible 3,3% (1/30), *S. aureus* oxacilin resistente 3,3% (1/30), *Morganella morganii* 3,3% (1/30), *Enterococcus faecium* 3,3% (1/30), *Mycobacterium avium-intracellulare complex* 3,3% (1/30), *Stenotrophomonas maltophilia* 3,3% (1/30), *Streptococcus dysgalactiae* 3,3% (1/30) y *K. pneumoniae* BLEE 3,3% (1/30). El 100% de los sujetos recibió antimicrobianos antes del aislamiento de los aislados: el 39,1% meropenem, el 30,4% ceftriaxona, el 17,4% moxifloxacino, el 17,4% ertapenem, el 17,4% piperacilina/tazobactam, el 13,0% ciprofloxacino, el 8,6% levofloxacino, el 8,6% amoxicilina/ácido clavulánico, el 8,6% amikacina, el 8,6% ceftazidima, el 4,3% gentamicina y el 4,3% cefepima.

El tiempo medio transcurrido entre la petición del cultivo y la detección de *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 fue de $2,57 \pm 1,86$ días. El tiempo medio transcurrido desde la detección de esta hasta la instauración de las medidas preventivas fue de $2,19 \pm 1,77$ días.

En cuanto a la mortalidad, 12/17 (70,6%) pacientes fallecieron durante el ingreso hospitalario, de los cuales 11 fallecieron a los 30 días siguientes a la infección (cinco en los primeros 15 días y seis entre los primeros 15 y 30 días luego de la detección). Se encontraron cuatro casos de bacteriemia por *K. pneumoniae* KPC-3/ST258, de los cuales 2/4 (50%) fallecieron, las causas de muerte estuvieron atribuidas al microorganismo aislado. Todos los pacientes recibieron tigeciclina. Respecto al foco de esa bacteriemia los dos fallecidos presentaron una bacteriemia asociada a catéter frente a los dos supervivientes que presentaron una bacteriemia asociada a foco urinario.

El Departamento de Medicina Preventiva no catalogó inicialmente estos aislamientos como episodios de brote. En cuanto al tipo de habitación en la que se encontraban los pacientes en el momento del diagnóstico: 11/21 (52,4%) procedían de habitaciones individuales, 7/21 (33,3%) de habitaciones dobles y 3/21 (14,3%) de habitaciones triples. De estos 21 pacientes se objetivó que 10 (47,6%) habían coexistido en la misma habitación; y 16 (76,2%) habían coexistido en la misma planta y/o habían sido tratados por personal sanitario de un mismo servicio. Se investigó la colonización intestinal en 15 de los 21 sujetos, siendo positiva en el 100% de ellos; la colonización persistió hasta 30 días después en 6 de los 7 pacientes en los cuales se realizó su búsqueda. En 16/21 (77,7%) sujetos se consiguió el aislamiento de la cepa en más de una muestra clínica.

Características microbiológicas de los aislados

Todos los aislamientos de los 23 pacientes (se analizó un aislamiento por paciente, excepto en un caso que se recuperaron dos morfotipos de una muestra de biopsia) fueron resistentes a amoxicilina/clavulánico (>16/8 mg/l), piperacilina/tazobactam (>64/8 mg/l), cefotaxima (>32 mg/l), ceftazidima (>16 mg/l), cefepima (>16 mg/l), ertapenem (>1 mg/l), meropenem (>8 mg/l), ciprofloxacina (>2 mg/l), levofloxacino (>4 mg/l), amikacina (>32 mg/l) y tobramicina (>8 mg/l). Diez y seis (66,7%; 16/24) aislados fueron intermedio a imipenem (8 mg/l) y cefoxitina (16 mg/l). Dos (8,3%; 2/24) aislados fueron sensibles a fosfomicina (\leq 32 mg/l) y 3 (12,5%; 3/24) a trimetoprim-sulfametoxazol (\leq 2/38 mg/l). Destacó la sensibilidad a gentamicina (\leq 2 mg/l), tige ciclina (\leq 1 mg/l) y colistina (\leq 2 mg/l) en todos los aislados.

Se analizó genéticamente un aislamiento por paciente, excepto en un caso que se recuperaron dos morfotipos de una muestra de biopsia. Todos los aislados pertenecían al secuenciotipo ST258. Mediante *Xba*I PFGE se distinguieron 5 pulsotipos (A-E) (Figura 8).

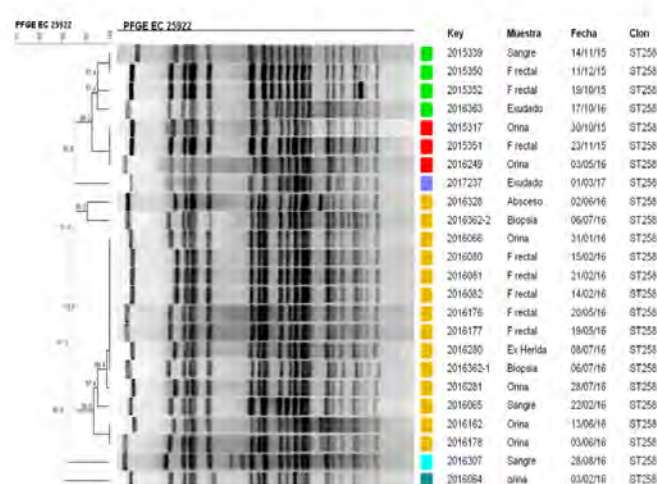


Figura 8. Dendogramas de los perfiles genéticos de los aislados clínicos y su secuenciotipo.

Un pulsotipo inicial incluyó 7 aislados (A), un segundo pulsotipo 14 aislados (B) y 3 pulsotipos posteriores con 1 caso cada uno (C-E). Los dos aislados recuperados de la muestra de biopsia pertenecieron al mismo pulsotipo, observándose 1 banda de diferencia. Se detectó KPC-3 y TEM-1 en todos los aislados. El gen *bla*_{KPC-3} se encontraba flanqueado por las secuencias de inserción *Kpn6* y *Kpn7* dentro del transposón *Tn4401* isoforma a (Figura 9).

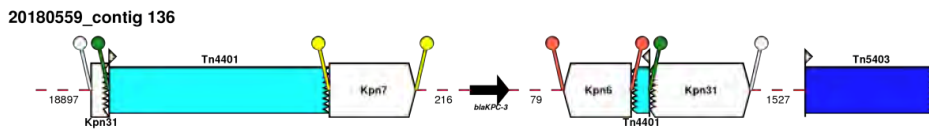


Figura 9. Representación gráfica del entorno genético de KPC-3.

La distribución temporal de los pacientes se muestra en la figura 10, destacando que algunos pacientes, con aislados clínicos genéticamente diferentes, estuvieron antes en otras instituciones sanitarias (2016064-línea verde-; 2016307- línea marrón), pero el paciente 2017237- línea morada- no, aunque su estancia en el nuestro centro fue superior a 4 meses.

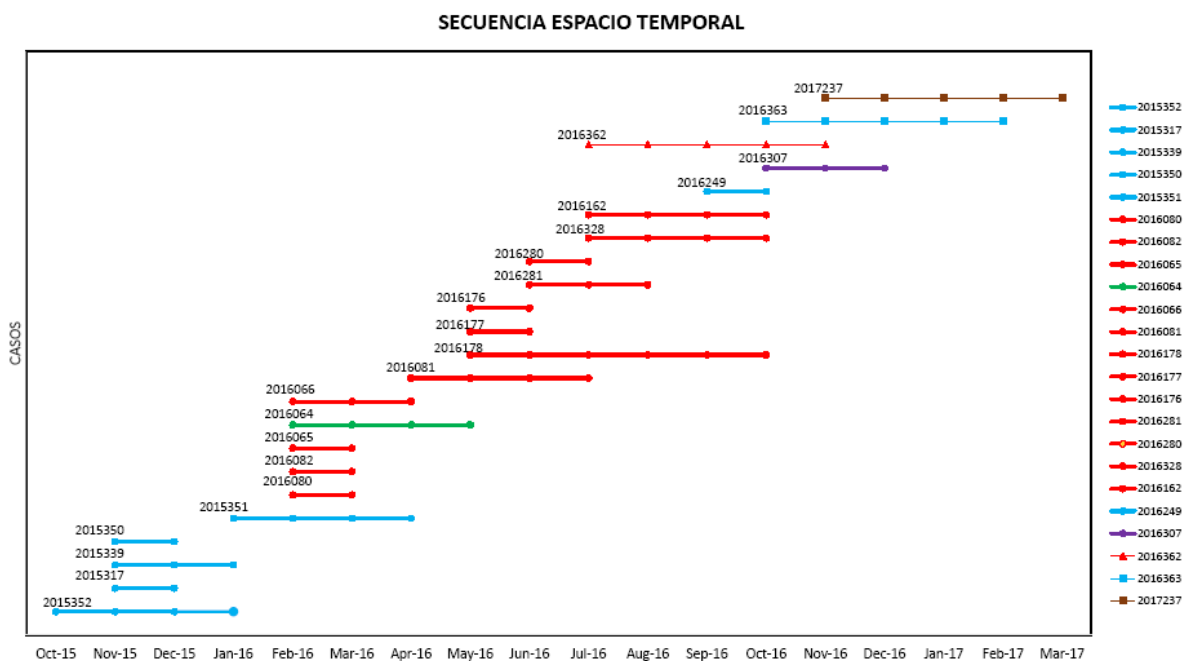


Figura 10. Distribución de los pacientes a lo largo del periodo de estudio.

3.4 Incidencia y factores de riesgo relacionados con la infección/colonización de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa en unidades de cuidados intensivos

De los 640 pacientes incluidos en el estudio, 233 (36,4%) tenían al menos una muestra positiva para EPC. *K. pneumoniae* se identificó en el 90.65% (n = 223), *P. mirabilis* en el 2,85% (n = 7), *E. cloacae* en el 2,44% (n = 6), *E. coli* en el 1.63% (n = 4), *K. aerogenes* en el 1.2 % (n = 3) y *K. oxytoca* en el 1.22% (n = 3) de los casos. Algunos pacientes tenían más de un tipo de *Enterobacteriales*. Los tipos de carbapenemasas fueron *K. pneumoniae* carbapenemasa (KPC) (97,15%, n = 239) y la metalo-beta-lactamasa Nueva Delhi (NDM) (2,84%, n = 7). Las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes y el uso de antimicrobianos se proporcionan en la Tabla 15.

Tabla 15. Características clínicas y análisis univariado de los factores de riesgo para *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa

Característica	EPC (n = 233)	No EPC (n = 407)	RR (95% IC)	valor p
Sexo femenino	90 (33,7%)	177 (66,3%)		0,23
Edad (± IQR)*	56,00+/-29,50	56,00+/-29,50		0,04
APACHE II score (± RIQ)*	16,00+/-12,00	16,00+/-12,00		<0,01
Transferido	108 (47,2%)	121 (52,8%)	1,55 (1,27-1,89)	<0,01
Estancia en UCI (± RIQ)	21,00+/-22,00	9,00+/-9,00		<0,01
Estancia hospitalaria (± RIQ)	27,00+/-23,50	16,00+/-15,00		<0,01
Mortalidad	83 (44,1%)	105 (55,9%)	1,33 (1,08-1,64)	<0,01
Procedimientos invasivos				
Ventilación Mecánica	192 (82,76%)	246 (60,44%)	2,20 (1,64-2,96)	<0,01
Catéter Venoso Central	211 (90,56%)	317 (77,89%)	2,03 (1,38-3,00)	<0,01
Catéter Urinario	224 (96,14%)	363 (89,19%)	2,25 (1,23-4,11)	<0,01
Gastrostomía	25 (10,73%)	19 (4,67%)	1,63 (1,23-2,15)	<0,01
Traqueostomía	97 (41,63%)	51 (12,53%)	2,37 (1,97-2,85)	<0,01
Tubo Nasogástrico	190 (81,55%)	265 (65,11%)	1,8 (1,35-2,39)	<0,01
Catéter de Hemodiálisis	34 (14,59%)	30 (7,39%)	1,54(1,19-1,98)	<0,01
Nutrición Parenteral	89 (38,2%)	101 (24,82%)	1,46 (1,19-1,79)	<0,01
Cirugía	135 (57,94%)	176 (43,24%)	1,45(1,18-1,79)	<0,01
Catéter Peritoneal	2 (0,86%)	10 (2,46%)		0,16
Catéter Periférico	93 (39,91%)	170 (41,77%)		0,65
Diagnóstico de Ingreso				
Quemadura	15 (6,44%)	7 (1,72%)	1,93 (1,43-2,63)	<0,01
Inmunosupresión	5 (2,15%)	20 (4,91%)		0,08
Falla renal	27 (11,59%)	39 (9,58%)		0,42
Enfermedad Cardiovascular	31 (13,3%)	81 (19,9%)	0,92 (0,56-1,51)	0,03
Malignidad	4 (1,72%)	13 (3,19%)		0,26
Diabetes Mellitus	11 (4,72%)	21 (5,16%)		0,81
Enfermedad Neurológica	58 (24,89%)	79 (19,41%)		0,1
Enfermedad Pulmonar Crónica	3 (1,29%)	13 (3,19%)		0,14
Comorbilidades				
Falla renal	31 (13,3%)	36 (8,85%)		0,08
Enfermedad Cardiovascular	87 (37,34%)	172 (42,26%)		0,22
Malignidad	7 (3%)	18 (4,42%)		0,34
Diabetes Mellitus	61 (26,18%)	88 (21,62%)		0,18
Enfermedad Neurológica	26 (11,16%)	43 (10,57%)		0,82
Enfermedad Pulmonar Crónica	8 (3,43%)	15 (3,69%)		0,87
Para/hemi/quadruplejia	2 (0,86%)	13 (3,19%)		0,87
Enfermedad del Tejido Conectivo	5 (2,15%)	2 (0,49%)	1,98 (1,23-3,20)	0,05
Inmunosupresión	11 (4,72%)	22 (5,41%)		0,7
Antimicrobianos utilizados previo aislamiento				
Ampicilina/sulbactam	72 (30,9%)	105 (25,8%)		0,17
Cefalosporinas	159 (68,24%)	170 (41,77%)		0,93
Aztreonam	1 (0,43%)	4 (0,98%)		0,44
Fluorquinolona	28 (12,02%)	57 (14%)		0,48
Piperacilina/tazobactam	74 (31,76%)	115 (28,26%)		0,35
Aminoglucósidos	4 (1,72%)	13 (3,19%)		0,27
Trimetoprim/sulfametoxazole	11 (4,74%)	14 (3,44%)		0,41
Carbapenémicos	159 (48,3%)	170 (51,7%)	2,03 (1,62-2,56)	<0,01
Metronidazol	14 (6,03%)	25 (6,14%)		0,96
Línezolid	11 (4,74%)	15 (3,69%)		0,42
Vancomicina	145 (62,23%)	130 (32,02%)	2,18 (1,76-2,7)	<0,01
Macrólidos	17 (7,3%)	12 (2,95%)	1,66 (1,19-2,29)	0,01

EPC: *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa, APACHE II: score de Evaluación de Salud Fisiológica Aguda y Crónica, UCI: unidad de cuidados intensivos

* Mediana , RIQ rango intercuartil

Los factores de riesgo de infección o colonización por EPC antes del ingreso actual en pacientes que dieron positivo después del ingreso al estudio incluyeron: hospitalización previa (RR 1,44; IC 95% 0,86-1,58; p <0.01), uso de procedimientos invasivos (RR 1,17; IC 95% 0,86– 1,58; p = 0,33), hemodiálisis (RR 1,05; IC 95% 0,60-1,83; p = 0,87), hospitalización en unidades de cuidados prolongados (RR 0,6; IC 95% 0,13-3,75; p = 0,63), inmunosupresión (RR 0,85; 95 % IC 0,49-1,47; p = 0,54) y uso de antimicrobianos (RR 1,18; 95% IC 0,91-1,54; p = 0,23) (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis multivariado de los factores de riesgo de colonización/infección de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas

Características	qOR (IC 95%)	valor p
Larga estancia en UCI	1,05 (1,03-1,08)	<0,01
Traqueostomía	3,52 (1,90-6,75)	<0,01
Hospitalización 3 meses antes del ingreso	2,07 (1,17-3,71)	<0,01
Administración de vancomicina	3,31 (2,02-5,18)	<0,01
Administración de macrólidos	3,31 (1,43-7,86)	<0,01

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

3.5 Impacto clínico de la colonización por bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en pacientes de un Hospital de una ciudad media española.

Tasa de colonización por bacterias gram-negativas resistentes a carbapenémicos

Se determinó que la tasa de colonización por BRC fue del 10,38% (358 frotis positivos de un total de 3448 frotis), encontrándose una colonización por *A. baumannii* del 2,4% (155/3.448), *Enterobacterales* del 4,5% (84 frotis positivos/3448), *S. maltophilia* del 1,8% (62/3.448) y *P. aeruginosa* del 1,7 % (57/3.448), mostrándose un aumento de la frecuencia a lo largo de los años de estudio siendo del 10,9% en el año 2016; 11,3% en el 2017; 12,6% en el 2018 y 9,1% en el 2019.

Entre los positivos se detectaron 308 FR (86,03%) y 50 (13,97%) FF, de un total de 3448 frotis estudiados. En la tabla 17 se exponen las BRC detectadas. En los FR los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas del grupo OXA-48 correspondieron a 19 *Klebsiella pneumoniae*, 4 *Escherichia coli*, 3 *Citrobacter freundii*, 2 *Enterobacter cloacae* y 1 *Raoultella ornithinolytica*; los del grupo KPC a 18 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii* y 1 *K. oxytoca*; los del grupo VIM a 8 *K. oxytoca*, 6 *E. cloacae*, 4 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii* y 1 *R. ornithinolytica*; los del grupo IMP correspondieron a 2 *K. pneumoniae* y los del grupo NDM a 6 *K. pneumoniae* y 1 *E. coli*. En los FF la carbapenemasa del grupo OXA-48 correspondió a 1 *K. pneumoniae* y del grupo VIM a 2 *K. oxytoca* y 1 *K. pneumoniae*. Para determinar la rentabilidad de las muestras, en 490 episodios con estudios de colonización, de 389 pacientes, se tomaron FR y FF simultáneamente. De ellos resultaron 101 (20,6%) episodios positivos, para uno o dos frotis. En la tabla 18 se indican los resultados obtenidos en estos episodios, siendo el FR la principal muestra para su recuperación, excepto para *S. maltophilia* que se recuperó en mayor medida en el FF. El FR para detectar colonización mostró una sensibilidad (S) del 85%, especificidad (E) del 100%, valor predictivo positivo (VPP) 100% y valor predictivo negativo de 97%, mientras que el FF mostró una S: 55%, E: 100%, VPP 100% y VPN: 91%.

Tabla 17. Bacterias gram-negativas resistentes a carbapenémicos aisladas en frotis rectal y

Microorganismos aislados en frotis rectales							
n=308 (10,7%)							
Año	Enterobacterales productores de carbapenemasas n=80 (25,9%)				<i>P. aeruginosa</i> n=53 (17,2%)		
	OXA n=29 (36,3%)	KPC n=20 (25,0%)	VIM n=22 (27,5%)	IMP n=2 (2,5%)	NDM n=7 (8,8%)	VIM n=8 (15,1%)	IMP n=2 (3,8%)
2016	0	13	1	0	0	0	0
2017	3	3	10	0	0	0	0
2018	2	1	8	2	0	3	24
2019	24	3	3	0	7	5	21
Total	308						
Microorganismos aislados en frotis faríngeos							
n=50 (8,99%)							
Año	Enterobacterales productoras de carbapenemasas n=4 (8,00%)				<i>P. aeruginosa</i> n=4 (8,00%)		
	OXA n=1 (25,0%)	KPC	VIM n=3 (75,0%)	IMP	NDM	VIM n=2 (50,0%)	IMP n=2 (50,0%)
2016	0	0	0	0	0	0	0
2017	0	0	3	0	0	0	0
2018	0	0	0	0	0	0	2
2019	1	0	0	0	0	2	0
Total	50						

Tabla 18. Microorganismos aislados simultáneamente en frotis rectal (FR) y faríngeo (FF)

Microorganismo	Aislado en	Aislado sólo	Aislado sólo	Total
	FR y FF	en FR	en FF	
	No (%)	No (%)	No (%)	
<i>A. baumannii</i>	10 (50%)	7 (35%)	3 (15%)	20
<i>P. aeruginosa</i>	5 (55.56%)	3 (33.3%)	1 (1.1%)	9
<i>E.cloacae</i>	0 (0.0%)	3 (100%)	0 (0.0%)	3
<i>E. coli</i>	1 (9.1%)	10 (90.91%)	0 (0.0%)	11
<i>K.oxytoca</i>	3 (60.0%)	2 (40.0%)	0 (0.0%)	5
<i>K.pneumoniae</i>	14 (43.8%)	17 (53.1%)	1 (3.13%)	32
<i>S. maltophilia</i>	8 (38.1%)	3 (14.3%)	10 (47.62%)	21
Total	40 (49.60%)	25 (24.75%)	36 (35.64%)	101

Relación entre los microorganismos de frotis y muestras clínicas

Entre enero del 2016 y julio del 2019 se investigaron 2.272 muestras para el estudio de BRC, que incluyeron 1.647 (72,5 %) FR, 370 (16,3%) FF, 103 (4,5 %) muestras respiratorias, 74 (3,3 %) orinas, 31 (1,4%) frotis de piel, 29 (1,3 %) exudados de herida, 11 (0,5%) hemocultivos, 3 (0,1%) dispositivos intravasculares, 2 (0,1 %) exudados de partes blandas y 2 (0,1%) líquidos ascíticos, de un total 1.525 pacientes en los que se hizo estudios de colonización con o sin muestras de infección. El 16,4% (n=446) de las muestras fueron positivas y el 84,2% (n=2.280) negativas. La mayor parte de los positivos correspondieron a estudios de colonización, con un 89,3% (n=383) de muestras positivas.

Se detectaron 61 pacientes infectados y 63 infecciones, ya que dos pacientes presentaron dos tipos diferentes de infección. La infección del tracto urinario ocurrió en 24 (38,1%) pacientes, la neumonía nosocomial en 22 (34,9%), sepsis en 11 (17,5%), infección de piel y partes blandas en 4 (6,4%), fascitis necrotizante en 1 (1,6%) y peritonitis en 1 (1,6%). En la Tabla 19 se muestran las especies bacterianas con el grupo de carbapanemasa, no se incluyen 3 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos por alteración en la porina OprD.

De los 61 pacientes infectados, se recuperó la información sobre el tratamiento antibiótico recibido en 49 (80,3%), de los cuales a 46 (93,9%) pacientes se les administró antimicrobianos previo al diagnóstico de la infección por BRC y 3 (6,1%) no recibieron ningún antimicrobiano previo. En 26 (15,9%) pacientes se utilizó carbapenémicos, en 21 (12,9%) inhibidores de betalactamasas, en 20 (12,3%) oxazolidinonas, en 18 (11,0%) trimetoprim/sulfametoxazol, en 15 (9,2%) cefalosporinas de amplio espectro, en 15 (9,2%)

fluoroquinolonas, en 11 (6,7%) colistina, en 8 (4,9%) daptomicina, en 8 (4,9%) aminoglucósidos, en 4 (2,4%) penicilinas, en 4 (2,4%) tigeciclina, en 3 (1,8%) macrólidos, en 3 (1,8%) ceftazolano/tazobactam, en 2 (1,2%) vancomicina, en 2 (1,2%) fosfomicina, en 1 (0,6%) ceftazidima/avibactam, en 1 (0,61%) doxiciclina, y en 1 (0,61%) rifampicina.

Tabla 19. Número de aislados por tipos de carbapenemasas en muestras clínicas

Genotipo de carbapenemasas	Microorganismos n=60				
	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>A. baumannii</i>	<i>Enterobacterales</i>		
			<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. oxytoca</i>
KPC	0	0	8	0	0
OXA	1	9	8	0	0
VIM	3	0	2	10	3
IMP	11	0	0	2	0
NDM	1	0	0	0	0
Total	16	9	18	12	3

En 26 episodios infecciosos se solicitó FR, con o sin FF. Hubo correspondencia de los aislamientos en las muestras clínicas y FR y/o FF en 16 (61,5 %) episodios de los 26. En 13 (81,3%) de estos la colonización precedió a la infección, existiendo asociación entre infección y colonización ($p < 0,001$), y las BRC aisladas fueron: 4 (21,1%) *K. pneumoniae*, 3 (15,8%) *A. baumannii*, 2 (10,5%) *K. oxytoca*, 2 (10,5%) *E. cloacae*, 1 (5,3%) *P. aeruginosa* y 1 (5,3%) *E. coli*. En todos los casos se aisló el microorganismo en FR y en 3 (23,1%) en FF, además. En la Tabla 20 se muestran los aislamientos productores de carbapenemasas en muestras clínicas y en frotis. En los 3 episodios restantes en los que la infección precedió a la colonización, se estudió una muestra clínica simultánea al estudio colonización y se aislaron 1 *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 en orina y FR; 1 *K. pneumoniae* OXA-48/ST308 en orina y FR; y 1 *P. aeruginosa* IMP-16/ST253 en muestra respiratoria y FR. En la figura 11 se reflejan las imágenes de las comparaciones que se han podido realizar en los 4 episodios disponibles, y en todos los casos los aislados de las muestras clínicas y de los frotis han sido idénticos o muy similares. No se dispone de las imágenes del pulsotipo de todos los aislados indicados anteriormente.

Tabla 20. Tipo de microorganismo productor de carbapenemasa detectado en muestra clínica y tipo de frotis

Microorganismo	Tipo de muestra	Tipo de frotis	Tipo de carbapenemasa	ST
<i>A. baumannii</i>	respiratoria	rectal	OXA-23	2
<i>A. baumannii</i>	respiratoria	rectal y faringoamigdalar	OXA-58	2
<i>A. baumannii</i>	orina	rectal	OXA-23	2
<i>E. cloacae</i>	sangre y orina	rectal	VIM-1	78
<i>E. cloacae</i>	orina	rectal	VIM-1	78
<i>K. oxytoca</i>	respiratoria	rectal y faringoamigdalar	VIM-1	36
<i>K. oxytoca</i>	sangre	rectal y faringoamigdalar	VIM-1	36
<i>K. pneumoniae</i>	orina	rectal	KPC-3	258
<i>K. pneumoniae</i>	orina	rectal	VIM-1	525
<i>K. pneumoniae</i>	respiratoria	rectal	OXA-48	307
<i>K. pneumoniae</i>	orina	rectal	KPC-3	258
<i>E. coli</i>	orina	rectal	VIM-1	128
<i>P. aeruginosa</i>	líquido ascítico	rectal	IMP	348

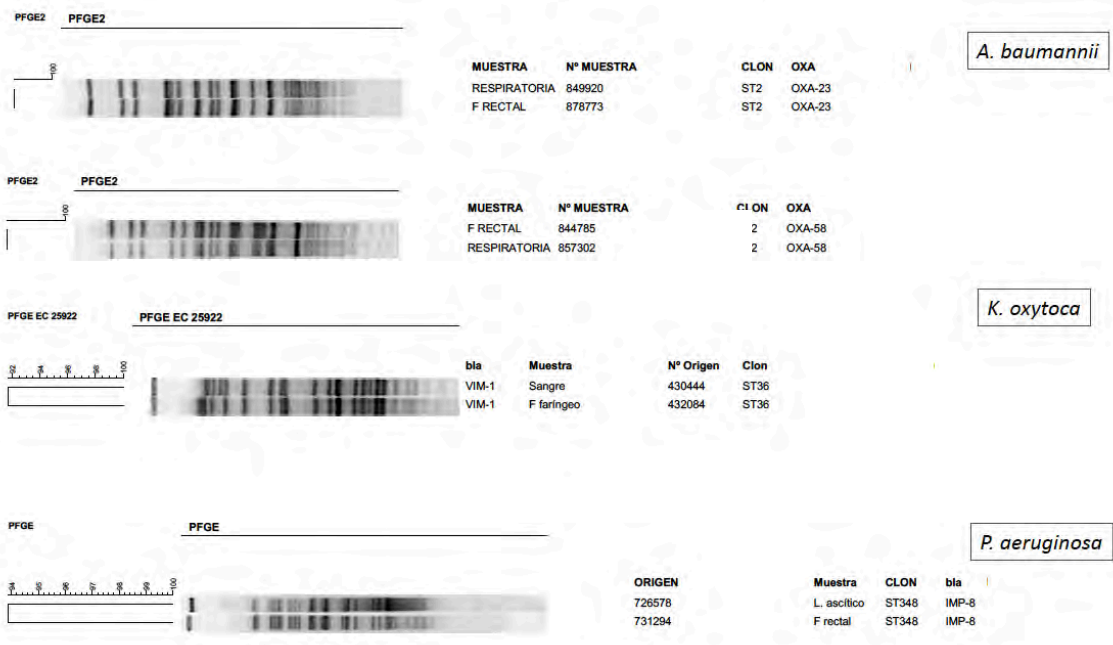


Figura 11. Dendrogramas de los perfiles genéticos de los aislados y su secuenciotipo.

En 5 (19,2%) episodios de los 26, las muestras de colonización fueron negativas. Estas muestras clínicas positivas fueron: 1 respiratoria con *A. baumannii* OXA-23/ST2 y FR negativo; 1 muestra de orina con *K. pneumoniae* OXA-48/ST307 y FR negativo, 2 exudados de herida, uno con *A. baumannii* OXA-23/ST2 con FR y FF negativos y otro *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 con FR negativo; y 1 hemocultivo con *P. aeruginosa* IMP-16/ST253 con FR negativo.

En 5 (19,2 %) episodios de los 26 no hubo correspondencia entre las BRC de las muestras clínicas y los frotis de colonización. Los microorganismos aislados en estos episodios fueron: 1 *A. baumannii* OXA-23/ST2 en muestra respiratoria, con *A. baumannii* OXA-58/ST2 en FR; 1 *A. baumannii* OXA-23/ST2 en orina, con un FR con *A. baumannii* OXA-58/ST2; 1 *C. freundii* VIM-1 en muestra respiratoria y *K. oxytoca* VIM-1/ST36 en FR; 1 *E. cloacae* VIM-1/ST78 en hemocultivo y *S. maltophilia* en FR; y 1 *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 en exudado de herida con FR negativo.

4 DISCUSIÓN

4.1 Evaluación del medio de mSuperCARBA™ agar para la detección de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas

Una de las principales estrategias para evitar la transmisión de EPC en entornos sanitarios es la rápida detección de sus portadores intestinales. Para que esta estrategia tenga éxito, el método utilizado debe ser preciso y tener buenos tiempos de respuesta. En este estudio, la sensibilidad del agar SC para la detección de EPC (KPC & NDM) fue mayor que la sensibilidad del método CDC (93,05% frente a 84,7%). Sin embargo, es menor que lo comunicado por García-Fernández et al, en 2016 (100%), donde se utilizaron 210 hisopos rectales de pacientes colonizados con EPC con carbapenemasas NDM, KPC y OXA-48 (223).

La sensibilidad comunicada por otros autores también es mayor para el agar SC, García-Quintanilla y col, en 2017, demostraron una sensibilidad y especificidad del 100% para este medio cuando se probó en 113 aislados de *Enterobacteriales* que incluían KPC, NDM, VIM, IMP e incluso OXA-48, cuando se comparó con el agar SUPERCARBA no comercial (214). No obstante, estos estudios utilizaron principalmente aislados previamente caracterizadas y no muestras de pacientes(223)(214). La menor sensibilidad obtenida en este estudio podría deberse a el uso del mismo hisopo para los dos procedimientos. Además, ha se ha informado previamente que el enriquecimiento de la muestra en caldo que se realiza con el método CDC, aumenta la sensibilidad de las metodologías(126).

Se encontró que la sensibilidad del método CDC era relativamente alta (84.7%), a pesar de su incapacidad para detectar NDM carbapenemasa y la dificultad para detectar más de una EPC en la misma muestra (índice de acuerdo Kappa 0). La alta sensibilidad es probablemente debido al predominio de KPC carbapenemasa (94,24%) en las muestras analizadas. Esto está de acuerdo con otros autores que informan 98.8% de sensibilidad al procesar muestras de hisopos rectales con carbapenemasa KPC (224). Sin embargo, un metaanálisis publicado en 2016 (78), muestra la falta de sensibilidad de este método en comparación con vigilancia. No obstante, este método todavía se utiliza habitualmente debido a sus bajos costes (170).

La literatura describe especificidades que van del 49.6% al 100% (225)(226) para el método del CDC. La especificidad informada en este trabajo se debió principalmente al alto número de falsos positivos obtenidos, la mayoría (96.96%) fueron aislamientos que no fueron clasificados como EPC según nuestra definición (resistencia a imipenem y meropenem), sin embargo, se desconoce el mecanismo de resistencia implícito en estos aislamientos y su susceptibilidad a ertapenem, una limitación de este estudio, sin embargo, existe una mínima

posibilidad de que estos aislados alberguen una carbapenemasa similar a OXA-48, que confiere CMI más bajas a carbapenémicos, ya que hasta el momento no se han comunicado en Ecuador, además se ha descrito que la presencia de carbapenemasas tipo OXA-48 son poco comunes en aislados con susceptibilidad al imipenem (101). Es importante recalcar, que se ha demostrado que el agar mSuperCARBA™ tiene mejor sensibilidad para la detección de OXA-48 (227).

La especificidad de SC fue del 96.21%, superior al método CDC y otros métodos descritos en otros estudios que han utilizado hisopados rectales (209). Sin embargo, es importante enfatizar que la especificidad variará dependiendo de la epidemiología local, de la presencia de enzimas BLEE y AmpC como mecanismo que causan la resistencia a los carbapenémicos. En este trabajo, las BLEE con mutaciones de porinas (70%, N: 10) predominó en aquellas ERC que no produjeron carbapenemasas.

La comparación de la sensibilidad y la especificidad entre diferentes estudios es complicada de analizar debido a las limitaciones de cada uno, las diferencias en los métodos y la falta de un método de referencia. Además, el EPC predominante en los hisopados dependerá de la epidemiología, lo cual dificulta la extrapolación de los resultados a otros contextos. Tuvimos un buen acuerdo (índice Kappa 0,79) para la detección de ECP y casi concordancia perfecta para la detección de carbapenemasa KPC (índice Kappa 0,87). Los resultados discordantes en 27 muestras podrían deberse a que el límite de detección del agar SC es 10 UFC / ml (228), más bajo que el método CDC. No se observó acuerdo para la detección de NDM carbapenemasa (índice Kappa 0).

El agar SC tuvo mejores valores predictivos positivos y negativos (VPP: 92.4% VPN: 96.5%) que el método CDC (VPP 57% VAN 90.1%). Aunque el método CDC está descrito como un método más asequible (229), su bajo VPP ocasiona un trabajo técnico adicional para confirmar los aislamientos sospechoso, lo cual hace este protocolo más costoso. En consecuencia, aumenta la carga de trabajo en el laboratorio, prolonga el tiempo de respuesta, y el tiempo que el paciente necesita permanecer en aislamiento (229)(230).

Ecuador importa reactivos de laboratorio lo que aumenta los costes de las pruebas y limita las opciones, teniendo que recurrir a menudo a pruebas menos específicas y no comerciales. En este estudio, utilizamos la prueba de Hodge modificada, que tiene una especificidad moderada, pero que es barata y estuvo recomendada en el CLSI hasta 2017 (210)(215)(197). La selección de la prueba más barata es una práctica común en Ecuador. Sin embargo, sugerimos que las pruebas para la vigilancia de EPC debe basarse en datos epidemiológicos locales y después del análisis de costes.

4.2 Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas, y su caracterización molecular en Guayaquil, Ecuador.

Los EPC constituyen una amenaza para la salud pública a nivel mundial, esto debido a sus altos niveles de resistencia antimicrobiana que conllevan a altas tasas de mortalidad (78). En Ecuador, la primera infección causada por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2 fue comunicada en 2013 (126), y desde entonces, se observa una rápida diseminación de este microorganismo en todo el país (231). El presente estudio revela una alta prevalencia de EPC (37,7%) en la ciudad de Guayaquil la cual es mucho mayor que la comunicada en países desarrollados (232)(224) y países latinoamericanos, como Argentina o Brasil, que representan una prevalencia del 25%. (59)(170). Es necesario hacer notar que este trabajo se centró en las UCI, donde se espera que la prevalencia sea mayor que en otras unidades debido a la complejidad y puntajes de APACHE II más altos de los pacientes ingresados y que la carbapenemasa más frecuentemente aislada fue *K. pneumoniae bla_{KPC}* (91,72%).

Los EPC estuvieron asociados con una exposición previa a carbapenémicos, vancomicina, macrólidos y a la presencia de dispositivos invasivos y cirugía, así como con quemaduras al ingreso.

Este estudio mostró tasas de mortalidad más altas en pacientes colonizados o infectados con EPC que en aquellos pacientes que no portaban este microorganismo, no demostró diferencias en mortalidad entre los pacientes colonizados y los infectados con EPC. Estos resultados difieren de los informados por otros autores, donde la duración de la estancia en la UCI se consideró un factor de riesgo independiente para fallecer, pero no la colonización por KPC (233)(234). La colonización es un factor de riesgo bien conocido para un desenlace fatal; un estudio realizado en unidades de cuidados intensivos griegos mostró que los pacientes colonizados con EPC tienen un riesgo 1,79 veces mayor de morir que los pacientes no colonizados(235). La monitorización de portadores activos se ha implementado con éxito en estrategias multifactoriales destinadas a limitar la propagación de la EPC (236), y debe considerarse como parte de un esfuerzo regional coordinado para reducir la EPC endémica.

Estudios previos han demostrado una asociación entre la infección por *K. pneumoniae* productora de KPC y la duración de la hospitalización, el uso de catéteres venosos centrales, la estancia en la UCI y la exposición a agentes antimicrobianos específicos de amplio espectro,

como carbapenémicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y penicilina, así como someterse a cirugía (237). Los macrólidos y la vancomicina no se han considerado factores de riesgo en otros estudios y, hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que muestra una asociación entre estos antimicrobianos, las quemaduras y EPC. La presencia de EPC en pacientes quemados, puede deberse a que estos suelen tener estancias prolongadas y, en ocasiones, requieren múltiples procedimientos quirúrgicos, que podrían haber aumentado el riesgo de infección por KPC. Las infecciones del sitio quirúrgico, consideradas las más importantes asociadas a la atención médica, tuvieron la mayor ocurrencia, lo que sugiere que los hospitales deben enfatizar las estrategias de higiene de manos, la esterilización de instrumentos quirúrgicos y la desinfección de quirófanos.

La prevalencia de EPC fue mayor en los hospitales de tercer nivel que los de segundo nivel, lo que podría explicarse por la gravedad y complejidad de los pacientes ingresados. Existe poca información publicada sobre este tema, la mayoría de los datos están relacionados con estudios realizados en hospitales individuales más que en diferentes tipos de instituciones (235)(236)(237)(238). En tres de los hospitales incluidos en el estudio, los diagnósticos de EPC se realizaron a través de laboratorios externos. Ningún hospital estaba realizando cultivos de vigilancia semanales en el momento en que se llevó a cabo el estudio, y ambas situaciones podrían contribuir a las altas tasas de prevalencia y dar lugar a una notificación limitada de los brotes. Varios brotes nosocomiales, la mayoría de las veces debidos a *K. pneumoniae*, se han comunicado en los Estados Unidos, Colombia, Argentina, Grecia, Italia, Polonia, China e Israel (239). Las bacterias productoras de KPC se consideran endémicas en determinadas partes del mundo, como Colombia, y son causas importantes de infecciones nosocomiales adquiridas (51). En Ecuador, la carbapenemasa que ha sido comunicada con mayor frecuencia es KPC_2 (240)(224). Teniendo en cuenta nuestros resultados, KPC-2 podría ser endémico en nuestra ciudad. Es importante resaltar que hasta este estudio no se había detectado OXA en nuestros hospitales, a diferencia de otros países que comunicaron esta carbapenemasa como la más frecuente (239). El análisis PFGE mostró una circulación clonal de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, con diseminación intra e interhospitalaria en las unidades de cuidados intensivos de la ciudad de Guayaquil. ST 258 fue el tipo de secuencia más frecuente reconocido, y estos resultados son similares a los presentados por Benavides et al. en las muestras estudiadas del Instituto Nacional de Investigaciones del Ecuador y de otras regiones del mundo (241). ST 25 ha sido descrito previamente por Tamayo et al. en nuestro país (242). Es importante señalar que ST512, 45, 35, 307, 1, 34, 36, 37, 42, 54, 70, 151, 231, 526, 628, 695 y 1040 se comunicaron por primera vez en Ecuador.

El corto período de seguimiento, así como la imposibilidad de confirmar el genotipo de la carbapenemasa en muestras clínicas, son las principales limitaciones de este estudio. El agar cromogénico se utilizó en la mayoría de las muestras, pero no todas, por lo que los resultados de las carbapenemasas como OXA-48 o NDM pueden ser engañosos debido a la baja sensibilidad del método CDC (243).

4.3 Situación clínica-epidemiológica de la infección/colonización por *K. pneumoniae* productoras de KPC, y su caracterización molecular, de un brote de una ciudad media española.

Presentamos el primer brote en España producido por el clon internacional de *K. pneumoniae* ST258/KPC-3. Este se precedió a una reciente comunicación del primer aislamiento de esta misma *K. pneumoniae* (20) en este país y tras lo cual se desencadenó un aumento del número de casos por esta cepa en nuestro medio. En esta primera paciente, los antecedentes relevantes que se pudieron constatar fueron los dos episodios de ingreso hospitalario previo, los tratamientos antibióticos recibidos con fluoroquinolonas y betalactámicos no carbapenémicos previos a la detección de la bacteria y el sondaje al que fue sometida en ambas ocasiones. Sin embargo, no existían antecedentes de viajes fuera de la localidad donde tenía su domicilio habitual, ni estancias previas documentadas en otros hospitales o residencias con anterioridad al caso descrito (tampoco se constataron estos factores de riesgo para familiares, convivientes, ni personal sanitario relacionado con el caso). Además, puesto que no se detectaron aislamientos previos de esta cepa en otros pacientes de nuestro hospital, no se pudo establecer una relación epidemiológica.

La mayoría de los casos de nuestro estudio tuvieron factores de riesgo asociados a la hospitalización prolongada, comorbilidades y administración previa de antimicrobianos. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que han evaluado los factores de riesgos asociados a la adquisición de infecciones por *K. pneumoniae* con KPC, siendo de los más importantes el uso de cefalosporinas de tercera o cuarta generación (245). Un factor de riesgo que con poca frecuencia se ha comunicado es la asociación con procedimientos quirúrgicos, lo cual se encontró en hasta un 33% de los pacientes estudiados. Este hecho es un aspecto que debe ser debatido más intensamente, especialmente en aquellos pacientes quirúrgicos que requieren tiempos prolongados de hospitalización (237).

En este trabajo, si bien no hubo una búsqueda sistemática y amplia de portadores, todos los contactos de pacientes positivos con *K. pneumoniae* KPC-3 ST258 fueron positivos, lo que coincide con la transmisión observada en brotes producidos por este microorganismo(246).

Consistente con trabajos previos, se encontraron altos porcentajes de co-resistencia en los aislados clínicos, dejando como posibilidades terapéuticas en muchos casos sólo a colistina, gentamicina, ceftazidima/avibactam y tigeciclina(239)(118).

En lo que respecta a la presencia del gen *bla*_{KPC}, nuestros aislamientos mostraron sólo la presencia de KPC-3 en el clon ST258. El gen *bla*_{KPC} se ha podido detectar en múltiples aislamientos clínicos y se han encontrado hasta 23 variantes, siendo la más frecuente KPC-2 en países como Colombia, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela (237)(126) y KPC-3 en Europa (247). No obstante, aunque el gen *bla*_{KPC} se ha aislado más frecuentemente en *K. pneumoniae* ST 258, también puede encontrarse en otras especies de bacilos gram-negativos (248). Existen trabajos previos en España sobre la diseminación de KPC-3 en *K. pneumoniae*, los cuales han ocurrido especialmente por los clones ST512, ST348 y ST388 (249), aunque esta no ha demostrado ser un aislamiento frecuente en nuestro país, a diferencia de en otras EPC (250). En nuestra área próxima, previa al brote, se había producido un brote por el clon *K. pneumoniae* ST512/KPC-3 por un caso importado de Italia (249).

KPC-3 también se ha sido asociada a otros microorganismos, como *E. cloacae* ST114 en un brote producido en una unidad de quemados en Estados Unidos, cuya transmisión estuvo asociada al transposón móvil *Tn440Ib* (171). Los estudios del entorno genético de *bla*_{KPC} indican que su movilidad y diseminación se deben al transposón *Tn440I*, relacionado a *Tn3*. *Tn440I* es un elemento de 10 Kb, que está delimitado por dos secuencias repetidas invertidas de 39 pb y alberga los genes de transposasa y resolvasa y dos secuencias de inserción, ISKpn6 y ISKpn7, además del gen *bla*_{KPC-2} (237). Se han descrito siete isoformas (a-g) de *Tn440I*, las cuales difieren por polimorfismos localizados arriba del gen *bla*_{KPC} (248). Esta región incluye el promotor *bla*_{KPC}, por lo tanto, las variaciones en esta zona influyen en el nivel de expresión del ARN mensajero de *bla*_{KPC}. Este transposón ha sido identificado en aislados de diferentes lugares geográficos y de diferentes secuenciotipos en *Enterobacterales* y *Pseudomonas* spp.(251). En nuestro trabajo encontramos las secuencias Kpn6 y Kpn7 dentro del transposón *Tn 440I* isoforma a. La isoforma “b” ha sido más frecuentemente encontrada en Venezuela, Estados Unidos, Colombia y Brasil (237).

K. pneumoniae ST258 ha emergido como un problema clínico notable a mediados del año 2.000 en Estados Unidos y ha sido el ST encontrado principalmente en este país (252), de igual manera en el presente trabajo el clon ST258 fue el predominante, lo que muestra

diferencias con los hallazgos mostrados por Oteo y col., donde los ST más prevalencias en 83 hospitales de España durante el año 2013, diferentes al nuestro, fueron el ST11 y ST405 para *K. pneumoniae* (239). En la figura 12 se muestra el ST de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas aislados en España.

Con esta reciente descripción nos planteamos si se trata de entidades de reciente emergencia tras la adquisición de determinantes de resistencia o si ya constituían un grupo mayoritario previo con múltiples episodios de adquisición de mecanismos de resistencia que sirven de vehículo a su diseminación.

Tras analizar las características de los dos pacientes fallecidos se objetivó que la presencia de bacteriemia por *K. pneumoniae* KPC/ST258 tuvo una clara implicación sobre su pronóstico y morbimortalidad. Si comparamos a los 4 pacientes con bacteriemia comprobamos que el esquema antimicrobiano fue similar en los 4 casos y todos recibieron tigeciclina. Respecto al foco de esa bacteriemia la infección ligada a catéter mostró un peor pronóstico. Por otro lado, da la impresión de que hemos tenido 5 introducciones diferentes del clon, como si estuvieran evolucionando en otro lugar, y a partir de ese sitio estuviera siendo introducido cada variante (pacientes con las líneas verde y marrón).

Finalmente, aunque no se controló el uso de los carbapenémicos en los servicios donde se detectaron los casos, la planificación y el diseño de las actuaciones para el control y prevención de infecciones por multirresistentes debería considerar, además, el impacto de los clones prevalentes o emergentes en la evolución de las resistencias de estas especies. Estas actuaciones pueden resultar, además, útiles para el desarrollo de métodos diagnósticos, terapéuticos y de vacunas para combatir las infecciones por *K. pneumoniae* multirresistentes (252).

En el caso que nos ocupa el Departamento de Medicina Preventiva de nuestro hospital no catalogó la presencia de estos aislamientos como brote, debido al largo tiempo transcurrido entre los aislamientos y el desconocimiento de algunos casos a tiempo real. El que no se encontrara un reservorio por este Departamento no excluye su existencia, aunque difícil de detectar, más cuando desde marzo de 2017 no parece haber habido ningún caso nuevo.

Una limitación de nuestro trabajo es el carácter retrospectivo del mismo que ha dificultado y limitado la recogida de la información de los pacientes afectados.

En conclusión, se muestra la presencia de *K. pneumoniae* productora de KPC-3 del clon ST258 en un hospital de tercer nivel durante un periodo de 18 meses, cuya adquisición estuvo asociada al uso previo de antimicrobianos y colocación de dispositivos invasivos. También se muestra una alta mortalidad en los pacientes estudiados, siendo los aislados sensibles sólo a colistina,

tigeciclina y gentamicina. Este trabajo muestra una vez más la necesidad de contar con colaboración local, regional y nacional para continuar con programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana, así como reforzar los programas de uso racional de antibióticos y control de infecciones en las instituciones a nivel mundial.

KPC-3, ST 384-388 (253),VIM-1, ST 29, ST 688-ST253, ST163 (82); OXA-48, ST 405 (239), OXA-48,ST11; VIM-1, ST54; NDM-1,ST101; IM-1 ST54-SHV-12, NDM-1, ST101, NDM-ST 437, OXA-48, ST 11, ST 405, ST 305 (254); VIM-1, ST 15 (239) KPC 2, ST 101; OXA 48-ST 846 (239), NDM-7, ST437 (255),VIM-1, OXA-48, KPC, NDM, ST15 y ST11 (256),ST 11, ST15,ST405 (257).

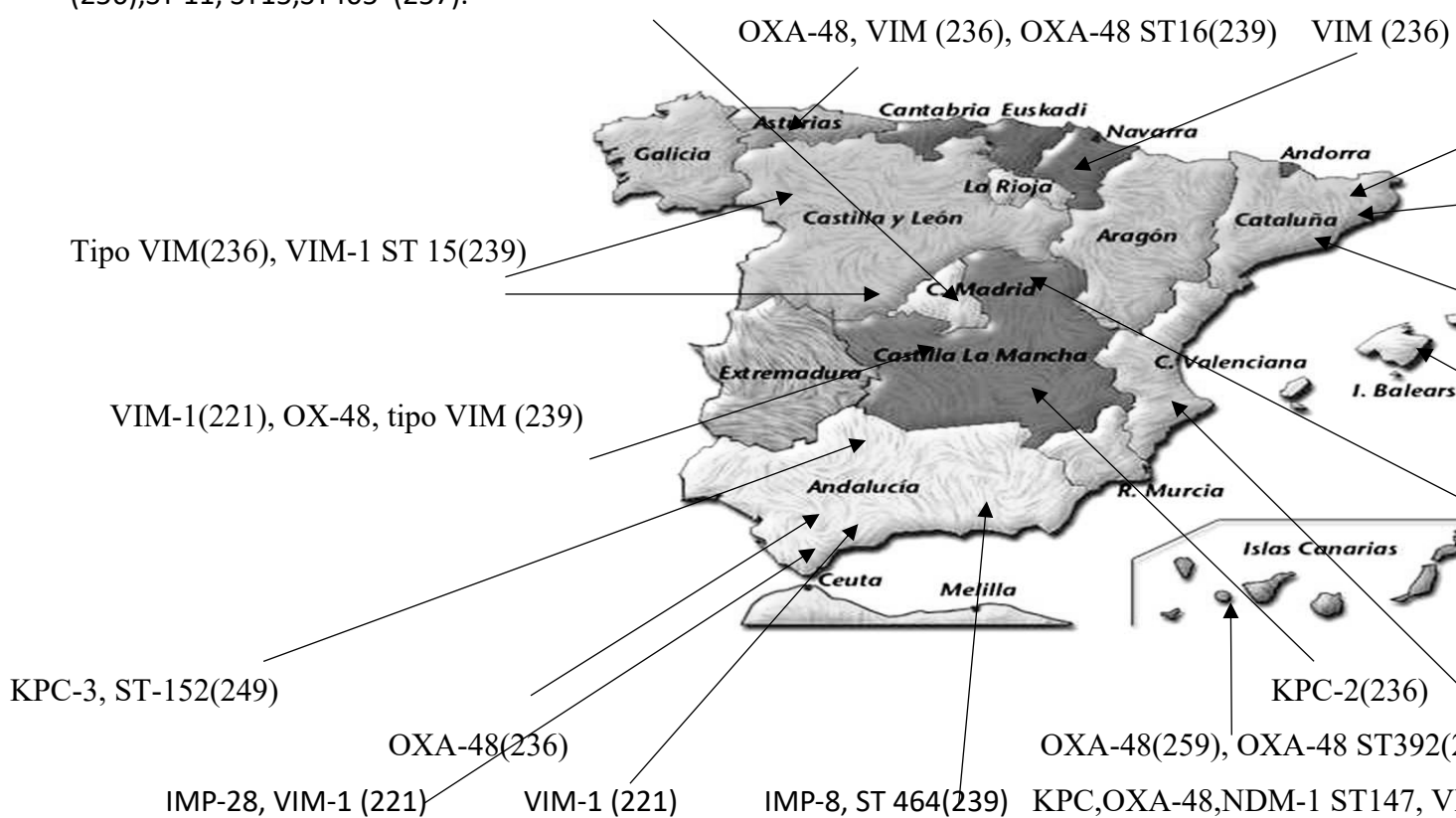


Figura 12. Secuenciotipos de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas descri

4.4 Incidencia y factores de riesgo relacionados con la infección/colonización de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa en unidades de cuidados intensivos.

Los estudios prospectivos destinados a identificar factores de riesgo de colonización / infección por EPC en pacientes de países en desarrollo son escasos. La incidencia y prevalencia de EPC varía entre regiones geográficas. Estudios anteriores han mostrado valores que van desde el 0.6% en Asia al 35.2% en Uganda. En este estudio, observamos una incidencia del 36.4%, superior a la de otros países de América del Sur, como Brasil (80)(260).

La duración de la estancia en la UCI y el uso de dispositivos invasivos contribuyen a la infección por EPC (261)(219), de acuerdo con los resultados de este estudio. La traqueotomía fue el único dispositivo invasivo asociado con la colonización / infección por EPC en nuestro análisis multivariado, lo cual es inconsistente con los resultados de algunos estudios previos(233) (262). Por lo tanto, sobre este punto, son necesarios estudios adicionales que tengan como resultado final la presencia de una neumonía asociada al ventilador mecánica.

Los carbapenémicos, las fluoroquinolonas, las penicilinas antipseudomónicas y las cefalosporinas de amplio espectro han mostrado que aumentan el riesgo de colonización por KPC (261), pero en el presente trabajo no pudimos confirmar esta hipótesis, ya que posiblemente, las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de amplio espectro no se utilizan con frecuencia en los hospitales estudiados; por lo tanto, un número limitado de pacientes recibió estos antimicrobianos, lo que pudo haber dificultado el análisis estadísticos.

Obtuvimos dos resultados inesperados: i) la administración de vancomicina que aumentó al doble la colonización por EPC y ii) la presencia de macrólidos como factor de riesgo. La vancomicina induce cambios drásticos y consistentes en el microbiota intestinal humana, con una disminución de bacterias gram-positivas (principalmente *Firmicutes*) y un aumento compensatorio de bacterias gram-negativas. Es importante destacar que varios géneros pertenecientes al filo *Proteobacteria* (es decir, *Escherichia / Shigella* y *Klebsiella*) aumentan después de la administración de vancomicina (263)(264). Este efecto podría explicar la detección de EPC en pacientes de UCI expuestos a un ciclo corto de tratamiento con vancomicina. La identificación de macrólidos como factores de riesgo puede explicarse por el hecho de que el tratamiento con azitromicina puede aumentar la selección de genes de resistencia a macrólidos en el microbioma intestinal (265), que actúa como un importante reservorio de varios genes de resistencia. En *Enterobacteriales* se han identificado diferentes

mecanismos subyacentes a la resistencia a macrólidos, algunos de los cuales pueden transferirse entre microorganismos a través de elementos genéticos móviles. Los mecanismos transferibles de resistencia a macrólidos (TMMR) están presentes en estructuras genéticas que también incluyen resistencia a β -lactámicos; por ejemplo, el plásmido IncH1 de *C. freundii*, que también podría estar involucrado en la extrusión de macrólidos, puede albergar el gen *bla_{NDM-1}* (266). Se necesitan estudios detallados de estos mecanismos de resistencia para comprender mejor la relación entre macrólidos y EPC.

El descubrimiento del uso de macrólidos como factor de riesgo tiene implicaciones críticas, ya que la claritromicina es un tratamiento de primera línea en la neumonía adquirida en la comunidad grave y la vancomicina se incluye como parte del tratamiento empírico del choque séptico y la neutropenia febril de alto riesgo (267). Otro macrólido, la azitromicina, se consideró inicialmente para el tratamiento de la neumonía relacionada con COVID-19 y los efectos colaterales de este fármaco deben tratarse con cuidado durante la pandemia (268). Nuestros resultados confirman un informe de la Organización Mundial de la Salud en 2017, que sugiere que el uso de estos medicamentos debe ser priorizado para el monitoreo como parte de un programa apropiado de administración de antimicrobianos (267); este último es escaso en países en desarrollo, como Ecuador. Por tanto, se sugiere revisar los tratamientos antimicrobianos empíricos recomendados en función de los procesos de enfermedades infecciosas de cada paciente y mejorar nuestro conocimiento de las propiedades epidemiológicas clínicas y moleculares, así como de los mecanismos de resistencia, son objetivos clave.

Los pacientes colonizados o infectados con EPC en nuestro estudio tuvieron una tasa de mortalidad significativamente mayor que la de los controles. Este es un hallazgo importante, ya que la mayoría de los estudios se han centrado en la infección y su relación con mayores tasas de mortalidad. En un estudio, la colonización no aumentó la mortalidad en la UCI, mientras que la infección por KPC sí lo hizo (233). Nuestros hallazgos requieren más investigación para su validación y destacan la importancia de la identificación y el aislamiento tempranos (269).

La dificultad para obtener información confiable sobre la exposición a los antimicrobianos y el uso de procedimientos invasivos fuera de los centros de estudio fue una limitación de nuestro estudio. No recopilamos información sobre otros microorganismos e infecciones relacionadas, lo que podría resultar en un sesgo de selección. Finalmente, el corto período de estudio y la combinación de variables relacionadas con la colonización y la

infección podrían haber afectado la identificación de los factores que determinan el paso de la colonización a la infección.

4.5 Impacto clínico de la colonización por bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en pacientes de un Hospital de una ciudad media española.

Las BRC constituyen una amenaza importante para la salud pública, debido especialmente a la falta de alternativas terapéuticas y la posibilidad de generar brotes (270). Actualmente, los cultivos de vigilancia son recomendados para identificar las BRC de manera que se puedan realizar acciones directas y evitar su diseminación (271). La presencia de colonizados por MDROs puede llegar a ser hasta el 96.5%, dependiendo de la población estudiada, comprendiendo las bacterias gram-negativas un 24.6% (79). Si bien el presente trabajo no muestra una tasa elevada de aislamientos de BRC, estos han ido en aumento desde el 2016 a 2019, lo que guarda relación con la presencia de brotes por KPC descritos (87). En nuestro trabajo en el 2019 existió una disminución en la tasa de colonización, aunque el número de muestras positivas aumentó, lo que puede deberse a que se duplicó el número de estudios de colonización solicitados, lo que demuestra el interés producido en la institución por los estudios de vigilancia. El frotis rectal mostró una alta sensibilidad para la detección de BRC, y es el método sugerido para los estudios de tamizaje de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (230). El FF mostro sensibilidad baja, pero un valor predictivo negativo muy elevado, lo cual puede deberse al elevado número de sujetos que no estaban colonizados.

La incidencia de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos han mostrado un aumento en los últimos diez años en España, las carbapenemasas predominantes son las de clase D (OXA-23,-24 y -58) y el ST 2 (272). situación similar a la encontrada en el presente trabajo. La detección de este microorganismo, tanto en FR como FF, muestra variaciones importantes. A nivel de la faringe es del 23% - 82%, mientras que en el recto es del 14%-74% (270)(273)(274). Nuestro trabajo demuestra que la presencia de este microorganismo en ambas localizaciones tiene porcentajes similares, pero la colonización rectal se anticipó con más frecuencia a la infección.

Las tasas de aislamientos clínicos de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas son del 1,7% en España (270) y del 2% en datos de colonización (275), las mismas pueden variar del 13,4% al 73,1% dependiendo del país (80)(79)(276)(277)(278)(279), los microorganismos predominantemente encontrados *K. pneumoniae* y *E. coli* (277). En este

trabajo la tasa de colonización se encuentra dentro de los valores estimados para España, y se muestra que la detección de estos microorganismos en FR juega un papel preponderante, incluso pudiendo predecir la infección. La colonización aumenta 5 veces el riesgo de muerte y el riesgo de bacteremias en pacientes sometidos a trasplantes alogénicos de médula ósea (277)(278)(280). La muestra ideal para la detección de colonizados parece ser la rectal, y así lo determinan la mayoría de los estudios de colonización (80)(79)(279), incluido el nuestro.

La tasa de aislados de *Pseudomonas* spp. multirresistentes oscila entre el 1,9% y el 30% a nivel mundial, incluyendo hospitales españoles (270)(79). Las cifras de este estudio se muestran dentro de las esperadas, aunque llama la atención que aparece un número importante de casos a partir del año 2018, con la presencia de carbapenemasas ya comunicadas en España, pero el 21% de los infectados por *Pseudomonas* presentó inactivación de la OprD. Esto es de especial importancia ya que se puede considerar un potencial uso de antibióticos como ceftolozano/tazobactam para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* extremadamente resistentes (281). Se detectó la presencia de clones de alto riesgo como el ST175 (281), el clon ST348 comunicado en este trabajo, no ha sido descrito con anterioridad en España. La detección de colonización para *P. aeruginosa* muestra que la orina, los frotis nasofaríngeos y el recto son lugares frecuentes de colonización (271)(282)(283), en este trabajo predominó la colonización intestinal.

La colonización por *S. maltophilia* se ha encontrado en el tracto respiratorio superior en pacientes traqueostomizados (284), la cavidad oral del 17% de pacientes con trasplante de sangre del cordón umbilical (285) y del 6,9 % en pacientes con trasplantes alogénicos de células madre (280). Estos hallazgos son de gran importancia, porque estuvieron relacionados con una mayor mortalidad y a un aumento en el número de infecciones incluso no relacionadas con *S. maltophilia*. (280). En este trabajo fue llamativa la detección de portadores faríngeos de *S. maltophilia*, sin que se presentase ninguna infección por este microorganismo, pero sí colonización con *A. baumannii*, e infección con *E. cloacae*. La presencia *S. maltophilia* podría tener un efecto inmunomodulador favoreciendo las infecciones por otros agentes en pacientes inmunocomprometidos (286), el cual puede verse potenciado por el hecho de su efecto co-colonizador que lleva a la emergencia de resistencia antimicrobiana, al portar esta especie plásmidos o transposones de resistencia que facilitan la diseminación de integrones a otras especies bacterianas (287). En lo que respecta la rentabilidad de la muestra, si bien se pudo detectar en recto como en faringe, la detección de esta última es mayor al realizar las comparaciones entre los dos frotis.

La elección del tipo de muestra para la detección de colonizados es importante, los resultados nos muestran que dependiendo del tipo de microorganismo predomina un sitio diferente de colonización. Sin embargo, la muestra clínica exacta para la vigilancia activa de BRC sigue sin estar definida (283). Dependiendo del tipo de estudio, microorganismo y población estudiada, la presencia de *Acinetobacter* spp. en la orofaringe, de los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en el recto y *P. aeruginosa* en orina, parecen ser los lugares más frecuentes de colonización (271)(283). Nuestros resultados muestran que hubiéramos perdido la detección de *S. maltophilia* si sólo hubiésemos considerado las muestras de recto.

La colonización se sabe que es un factor de riesgo para infección y la supervivencia de los pacientes (270)(278)(280). Existe un porcentaje de pacientes cuyos estudios de colonización pueden resultar negativos o con microorganismos colonizantes diferentes a los causantes de infección (276)(278). Las causas de estas situaciones pueden ser diversas, en este trabajo pudieron deberse a que se tomaron muestras tras detectarse la infección, con lo cual los antimicrobianos usados pudieran haber eliminado el microorganismo. También existe la posibilidad de fallos en los aislamientos a pesar de los cambios en los puntos de corte del EUCAST, los cuales no han sido diseñados con fines de vigilancia epidemiológica sino para diagnóstico clínico (209); los métodos utilizados pueden no ser lo suficientemente sensibles al existir microorganismos en bajas concentraciones en los sitios de cultivo (288). La detección de OXA-48, encontrada en dos de los aislamientos clínicos con muestra de cultivo de colonización negativo, podría deberse a que esta enzima presenta baja actividad β -lactamasa cuando no está acompañada de otra β -lactamasa de espectro extendido y su capacidad de hidrolizar carbapenémicos es menor que la de otros grupos de carbapenemasa, por lo que se pudo haber producido falta de sensibilidad a la hora de detectar carbapenemasas del grupo OXA-48. Hay que señalar que también el uso de sistemas automatizados con MicroScan, o la espectrometría de masas MALDITOF han demostrado producir resultados falsos negativos (209).

Las infecciones más frecuentes detectadas fueron las del tracto urinario, neumonía nosocomial, infección de piel y partes blandas y sepsis (80)(289). Los antimicrobianos utilizados de forma previa a la detección de la infección en estos episodios han sido asociados en la literatura con la presencia de carbapenemasas, como son los carbapénemicos, inhibidores de beta-lactamasas, cefalosporinas de amplio espectro y fluorquinolonas (80). No se ha descrito la asociación entre el uso previo de oxazolidinonas o trimetoprim/sulfametoxazol y la presencia de BRC observada en algunos de nuestros pacientes, los cuales posiblemente producen

alteración de la microflora intestinal que facilitaría la presencia emergente de estas bacterias o podrían estar colonizando al paciente antes de la ingesta antibiótica, situación que puede requerir futuros estudios.

El uso de los pulsotipos ha sido estudiado en profundidad para conocer e investigar brotes, existe evidencia que el mismo clon pudo haberse hallado en dos sitios de un mismo paciente (288), pero las publicaciones que comprueben este tipo de asociación son escasas.

Este trabajo presenta una serie de limitaciones, en primer lugar, es un estudio retrospectivo, que no implicó la toma sistemática y secuencial de muestras de colonización en un solo paciente, ni tampoco de varias muestras de frotis en un mismo paciente, por lo que la presencia de otras localizaciones de colonización podría estar infraestimada, por lo que se sugiere estudios prospectivos para demostrar la rentabilidad de las muestras. Otra limitación, es que no fue posible determinar los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la infección, de manera que podamos justificar la presencia de cultivos negativos o discordantes asociados al uso de antibióticos.

5 CONCLUSIONES

1. El agar mSuper CARBATM es un método de diagnóstico de laboratorio robusto, útil y asequible para la detección de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en programas de vigilancia en regiones con alta prevalencia, particularmente cuando hay varios en circulación.
2. Existe alta prevalencia de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales de Guayaquil, Ecuador, particularmente de *Klebsiella pneumoniae bla_{KPC}* ST 258. La identificación de los alelos de KPC en otros pulsotipos puede ayudar a explicar las vías de diseminación y cómo controlar su diseminación.
3. Se describe la presencia, en España, de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC-3 del clon ST258, en un hospital de tercer nivel, durante un periodo de 18 meses, cuya adquisición estuvo asociada al uso previo de antimicrobianos, teniendo tres opciones terapéuticas, tigeciclina, colistina y ceftazidima/avibactam, y una elevada mortalidad. La presencia de diferentes pulsotipos detectados se debió a introducciones diferentes del clon en nuestro medio, lo que refuerza la importancia de los estudios de vigilancia microbiológica de los aislados multirresistentes.
4. La traqueotomía, así como la administración de vancomicina y macrólidos, son factores de riesgo para la adquisición de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas.
5. El frotis rectal fue la principal muestra para la recuperación de bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos, así como mostró una mayor sensibilidad, excepto para *S. maltophilia* que se recuperó en mayor medida en el frotis faríngeo. Por lo tanto, los estudios de colonización siempre deben incluir el frotis rectal, aunque la detección de colonización proveniente de muestras de diferentes localizaciones da mayor rentabilidad a la positividad en los portadores. Además, la probabilidad de predecir la infección a través de la colonización por bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos es alta.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S. Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(12):5575–99.
2. McAdam A. Enterobacteriaceae? Enterobacterales? What Should We Call Enteric Gram-Negative Bacilli? A Micro-Comic Strip. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 [citado el 26 de abril de 2021];58(2). Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/58/2/e01888-19>
3. Cahill N, O'Connor L, Mahon B, Varley Á, McGrath E, Ryan P, et al. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? *Sci Total Environ*. 2019;672:618–24.
4. Jazeela K, Chakraborty A, Karunasagar I, Deekshit VK. Nontyphoidal Salmonella: a potential anticancer agent. *J Appl Microbiol*. 2020;128(1):2–14.
5. Baker S, The HC. Recent insights into Shigella: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(5):449–54.
6. Demeure CE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern A-S, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun*. 2019;20(5):357–70.
7. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(3):473–93.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. 836 p.
9. Ee R, Madhaiyan M, Ji L, Lim Y-L, Nor NM, Tee K-K, et al. *Chania multitudinisentens* gen. nov., sp. nov., an N-acyl-homoserine-lactone-producing bacterium in the family Enterobacteriaceae isolated from landfill site soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(6):2297–304.

10. Sy B, Tree J. Small RNA Regulation of Virulence in Pathogenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 [citado el 15 de abril de 2021];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7873438/>
11. Wesevich A, Sutton G, Ruffin F, Park L, Fouts D, Fowler V, et al. Newly Named *Klebsiella aerogenes* (formerly *Enterobacter aerogenes*) Is Associated with Poor Clinical Outcomes Relative to Other *Enterobacter* Species in Patients with Bloodstream Infection. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 [citado el 16 de abril de 2021];58(9). Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/58/9/e00582-20>
12. Janda M, Abbott S. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clin Microbiol Reviews*. 2021;34(2):e00174-20.
13. Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology, Twenty-Eighth Edition*.
14. Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA, Zagieboylo AP, Li L, Pironti A, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Med*. 2020;26(5):705–11.
15. Thompson D, Casjens S, Sharma R, Grose J. Genomic comparison of 60 completely sequenced bacteriophages that infect *Erwinia* and/or *Pantoea* bacteria. *Virology*. 2019;535:59–73.
16. Bonnet I, Bozzi B, Fourniols E, Mitrovic S, Soulier-Escrihuela O, Brossier F, et al. *Erwinia billingiae* as Unusual Cause of Septic Arthritis, France, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(8):1587–9.
17. Carstens AB, Djurhuus AM, Kot W, Jacobs-Sera D, Hatfull GF, Hansen LH. Unlocking the Potential of 46 New Bacteriophages for Biocontrol of *Dickeya Solani*. *Viruses*. 2018;10(11):621.
18. Cigna J, Dewaegeneire P, Beury A, Gobert V, Faure D. A gapA PCR-sequencing Assay for Identifying the *Dickeya* and *Pectobacterium*. *Plant Dis*. 2017;101(7):1278–82.

19. Rossi A, Fisher MA. Characterization of six clinical isolates of *Chimaeribacter* gen. nov., a novel genus related to the Yersiniaceae family and the three species *Chimaeribacter arupi* sp. nov., *Chimaeribacter coloradensis* sp. nov, and *Chimaeribacter californicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(4):2703–12.
20. Cho G-S, Stein M, Brinks E, Rathje J, Lee W, Suh SH, et al. *Serratia nevei* sp. nov. and *Serratia bockelmannii* sp. nov., isolated from fresh produce in Germany and reclassification of *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* Ajithkumar et al. 2003 as a later heterotypic synonym of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*. *Syst Appl Microbiol.* 2020;43(2):126055.
21. Clements T, Ndlovu T, Khan S, Khan W. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(2):589–602.
22. Yin Z, Yuan C, Du Y, Yang P, Qian C, Wei Y, et al. Comparative genomic analysis of the *Hafnia* genus reveals an explicit evolutionary relationship between the species *alvei* and *paralvei* and provides insights into pathogenicity. *BMC Genomics.* 2019;20(1):768.
23. Ramos-Vivas J. Microbiology of *Hafnia alvei*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;38 Suppl 1:1–6.
24. Buján N, Balboa S, L Romalde J, E Toranzo A, Magariños B. Population genetic and evolution analysis of controversial genus *Edwardsiella* by multilocus sequence typing. *Mol Phylogenet Evol.* 2018;127:513–21.
25. Bandy A. Ringing bells: *Morganella morganii* fights for recognition. *Public Health.* 2020;182:45–50.
26. Behrendt U, Wende S, Kolb S, Ulrich A 2021. Genome-based phylogeny of the genera *Proteus* and *Cosenzaea* and description of *Proteus terrae* subsp. *terrae* subsp. nov. and *Proteus terrae* subsp. *cibarius* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021;71(3):004651.

27. Dreyer J, Malan AP, Dicks LMT. Bacteria of the Genus *Xenorhabdus*, a Novel Source of Bioactive Compounds. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [citado el 18 de abril de 2021];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03177/full>
28. Snopková K, Sedlář K, Bosák J, Chaloupková E, Sedláček I, Provazník I, et al. Free-Living *Enterobacterium Pragia fontium* 24613: Complete Genome Sequence and Metabolic Profiling. *Evol Bioinforma*. 2017;13:1176934317700863.
29. Sharma D, Patel A, Soni P, Shastri S, Singh R. Leminorella sepsis in very low birth weight neonate as cause of neonatal mortality. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. 2017;30(9):1057–9.
30. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(2):254–67.
31. Pérez D. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*. 1998;22:57–67.
32. Trias J, Nikaido H. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem*. 1960;15680–4.
33. Martínez-Martínez L, Calvo J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2010;28:25–31.
34. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e01076-18, /aac/62/10/e01076-18.atom.
35. Barlow M, Hall BG. Phylogenetic Analysis Shows That the OXA β -Lactamase Genes Have Been on Plasmids for Millions of Years. *J Mol Evol*. 2002;55(3):314–21.
36. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*. 2019;431(18):3472–500.
37. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020;8(1):13.

38. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
39. Bernabeu S, Ratnam KC, Boutal H, Gonzalez C, Vogel A, Devilliers K, et al. A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacterales from Culture Plates and Positive Blood Cultures. *Diagnostics* [Internet]. 2020 [citado el 10 de abril de 2021];10(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7600033/>
40. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. el 28 de enero de 2020;8(1):13.
41. Giske C, Martinez-Martinez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance [Internet]. EUCAST; 2017 [citado el 21 de noviembre de 2020]. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
42. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [citado el 27 de abril de 2021];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01374/full>
43. Thomson GK, Ayaz M, Lutes K, Thomson KS. An Improved Extended-Spectrum- β -Lactamase Detection Test Utilizing Aztreonam plus Clavulanate. *J Clin Microbiol*. 2018;56(1):6.
44. Peirano G, Pitout JDD. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*. 2019;79(14):1529–41.
45. Demord A, Poirel L, D'Emidio F, Pomponio S, Nordmann P. Rapid ESBL NP Test for Rapid Detection of Expanded-Spectrum β -Lactamase Producers in Enterobacterales. *Microb Drug Resist*. 2020;mdr.2020.0391.

46. Zhang L, Ma X, Luo L, Hu N, Duan J, Tang Z, et al. The Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing Bacteria from Hospital Sewage, Treated Effluents and Receiving Rivers. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(4):1183.
47. Aguilera-Alonso D, Escosa-García L, Goycochea-Valdivia WA, Soler-Palacín P, Saavedra-Lozano J, Rodrigo C, et al. Documento de posicionamiento de la Asociación Española de Pediatría-Sociedad Española de Infectología Pediátrica (AEP-SEIP) sobre el tratamiento de las infecciones por bacterias multirresistentes. *An Pediatría*. 2019;91(5):351.e1-351.e13.
48. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*. 2019;47(3):363–75.
49. Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*. 2019;39:199–220.
50. Coolen JPM, den Drijver EPM, Kluytmans JAJW, Verweij JJ, Lamberts BA, Soer JACJ, et al. Development of an algorithm to discriminate between plasmid- and chromosomal-mediated AmpC β -lactamase production in *Escherichia coli* by elaborate phenotypic and genotypic characterization. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(12):3481–8.
51. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873–84.
52. Pemberton OA, Noor RE, Kumar M. V. V, Sanishvili R, Kemp MT, Kearns FL, et al. Mechanism of proton transfer in class A β -lactamase catalysis and inhibition by avibactam. *Proc Natl Acad Sci*. 2020;117(11):5818–25.
53. Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(6):13.

54. Galdadas I, Lovera S, Pérez-Hernández G, Barnes MD, Healy J, Afsharikho H, et al. Defining the architecture of KPC-2 Carbapenemase: identifying allosteric networks to fight antibiotics resistance. *Sci Rep*. 2018;8(1):12916.
55. Mehta S, Furey I, Pemberton O, Boragine DM, Chen Y, Palzkill T. KPC-2 β -lactamase enables carbapenem antibiotic resistance through fast deacylation of the covalent intermediate. *J Biol Chem [Internet]*. 2021 [citado el 27 de abril de 2021];296. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)00148-9/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)00148-9/abstract)
56. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics*. 2019;8(3):122.
57. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):45.
58. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- β -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother [Internet]*. 2020 [citado el 20 de abril de 2021];64(10). Disponible en: <https://aac.asm.org/content/64/10/e00397-20>
59. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(3):277–97.
60. Parveen S, Amit K, Asad UK. Structure, Function of Serine and Metallo- β -lactamases and their Inhibitors. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(2):130–44.
61. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev [Internet]*. 2019 [citado el 21 de abril de 2021];33(1). Disponible en: <https://cmr.asm.org/content/33/1/e00102-19>
62. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):24–38.
63. Monogue ML, Nicolau DP. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of β -lactamase inhibitors: are we missing the target? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(8):571–82.

64. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018;78(6):675–92.
65. Karaiskos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019;15(2):133–49.
66. Nichols WW, Newell P, Critchley IA, Riccobene T, Das S. Avibactam Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Targets. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 [citado el 25 de abril de 2021];62(6). Disponible en: <https://aac.asm.org/content/62/6/e02446-17>
67. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]. 2020. Disponible en: <http://www.eucast.org>
68. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:18–27.
69. Pogue JM, Bonomo RA, Kaye KS. Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam, or Both? Clinical and Formulary Considerations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2019;68(3):519–24.
70. Tehrani KHME, Martin NI. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: an update. *MedChemComm*. 2018;9(9):1439–56.
71. Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 2018;38(4):444–61.
72. Shoulders BR, Casapao AM, Venugopalan V. An Update on Existing and Emerging Data for Meropenem-Vaborbactam. *Clin Ther*. 2020;42(4):692–702.
73. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Rev Chil Infectol*. 2017;34(5):476–84.

74. Cheruvanky A, Stoesser N, Sheppard A, Crook D, Hoffman PS, Weddle E, et al. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 [citado el 28 de abril de 2021];61(6). Disponible en: <https://aac.asm.org/content/61/6/e00025-17>
75. Argente M, Miró E, Martí C, Vilamala A, Alonso-Tarrés C, Ballester F, et al. Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2019;37(2):82–8.
76. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2019 [citado el 28 de abril de 2021];33(1). Disponible en: <https://cmr.asm.org/content/33/1/e00102-19>
77. Bartsch SM, McKinnell JA, Mueller LE, Miller LG, Gohil SK, Huang SS, et al. Potential economic burden of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the United States. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(1):48.e9-48.e16.
78. World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. [Internet]. 2017 [citado el 19 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493061/>
79. Woodworth KR, Walters MS, Weiner LM, Edwards J, Brown AC, Huang JY, et al. Vital Signs : Containment of Novel Multidrug-Resistant Organisms and Resistance Mechanisms — United States, 2006–2017. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2018;67(13):396–401.
80. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-González A, Gutiérrez-Fernández J. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units in Ecuador: Results from a multicenter study. *J Infect Public Health*. 2020;13(1):80–8. Disponible en: [10.1016/j.jiph.2019.06.013](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.013)

81. Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Strains in China. *EBioMedicine*. 2017;19:98–106.
82. Sánchez-López J, Cantón R. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32:27–31.
83. the EuSCAPE Working Group, the ESGEM Study Group, David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4(11):1919–29.
84. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens M, Monnet D, Albiger B, et al. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance* [Internet]. 2019 [citado el 25 de abril de 2021];24(9). Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123>
85. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413–31.
86. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007;45(9):1171–8.
87. Soria-Segarra C, González-Bustos P, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Rojo-Martín MD, Fernández-Sierra MA, et al. Tracking KPC-3-producing ST-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristics. *Mol Biol Rep*. 2020;47(2):1089–97. Disponible en: [10.1016/j.jiph.2019.06.013](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.013)

88. Curiao T, Morosini M, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque T, et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1608–14.
89. Machuca J, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Mora-Navas L, Mediavilla-Gradolph C, López-Rodríguez I, et al. OXA-48-Like-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Spain in 2014–2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(1):8.
90. Gato E, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Rumbo-Feal S, Martínez-Gutián M, Beceiro A, et al. Draft Genome Sequences of Two Epidemic OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Isolated during a Large Outbreak in Spain. *Genome Announc [Internet].* 2018 [citado el 25 de abril de 2021];6(13). Disponible en: <https://mra.asm.org/content/6/13/e00026-18>
91. Díaz-Agero Pérez C, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, Hernandez Garcia M, Ruiz-Garbajosa P, Aranaz-Andrés JM, et al. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open.* 2019;9(3):e024879.
92. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Navarro-San Francisco C, Baquero F, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, et al. Intestinal co-colonization with different carbapenemase-producing Enterobacteriales isolates is not a rare event in an OXA-48 endemic area. *EClinicalMedicine.* 2019;15:72–9.
93. Pérez-Vazquez M, Oteo-Iglesias J, Sola-Campoy PJ, Carrizo-Manzoni H, Bautista V, Lara N, et al. Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016–2017. *Antimicrob Agents Chemother [Internet].* 2019 [citado el 21 de abril de 2021];63(6). Disponible en: <https://aac.asm.org/content/63/6/e02529-18>
94. Fuster B, Salvador C, Tormo N, García-González N, Gimeno C, González-Candelas F. Molecular epidemiology and drug-resistance mechanisms in carbapenem-resistant

- Klebsiella pneumoniae* isolated in patients from a tertiary hospital in Valencia, Spain. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:718–25.
95. Duin D van, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017;8(4):460–9.
96. Solórzano-Puerto A, Esteva-Fernández D, Oteo-Iglesias JM, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. A propósito de un nuevo caso de infección del tracto urinario por *klebsiella pneumoniae* (ST258) productor de KPC-3 en España. *Archivos Españoles de Urología: Detalle del Artículo. Arch Esp Urol*. 2016;69(7):437–40. Disponible en: https://aeurologia.com/article_detail.php?aid=79732479e8d77a13c78b743f26dcecb4be8ad027
97. Esteban-Cantos A, Aracil B, Bautista V, Ortega A, Lara N, Saez D, et al. The Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Population Is Distinct and More Clonal than the Carbapenem-Susceptible Population. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4):e02520-16, e02520-16.
98. Lalaoui R, Djukovic A, Bakour S, Hadjadj L, Sanz J, Salavert M, et al. Genomic characterization of *Citrobacter freundii* strains coproducing OXA-48 and VIM-1 carbapenemase enzymes isolated in leukemic patient in Spain. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):167.
99. Hernández-García M, León-Sampedro R, Pérez-Viso B, Morosini MI, López-Fresneña N, Díaz-Agero C, et al. First Report of an OXA-48- and CTX-M-213-Producing *Kluyvera* Species Clone Recovered from Patients Admitted in a University Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(11):10.
100. Mateos M, Hernández-García M, Del Campo R, Martínez-García L, Gijón D, Morosini MI, et al. Emergence and Persistence over Time of Carbapenemase-Producing Enterobacter Isolates in a Spanish University Hospital in Madrid, Spain (2005-2018). *Microb Drug Resist*. 2020;
101. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Badal RE, Young K, Motyl MR, et al. In Vitro Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates

- Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. Munson E, editor. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1638–49.
102. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2880–2.
 103. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;17(1):52–6.
 104. Garcia-Fulgueiras V, Zapata Y, Papa-Ezdra R, Ávila P, Caiata L, Seija V, et al. First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. 2020;52(3):211–6.
 105. Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, et al. Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(3):277–9.
 106. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, et al. A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(1):332–42.
 107. Mamizuka E, Lincopan N. Early Dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009 [citado el 24 de abril de 2021];53(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687248/pdf/0089-09.pdf>
 108. Vivas R, Dolabella SS, Barbosa AAT, Jain S, Vivas R, Dolabella SS, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2020 [citado el 24 de abril de 2021];53.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0037-86822020000100321&lng=en&nrm=iso&tlng=en

109. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of Klebsiella pneumoniae Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3579–83.
110. Raro OHF, da Silva RMC, Filho EMR, Sukiennik TCT, Stadnik C, Dias CAG, et al. Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC-2 or blaNDM-1. *Front Microbiol.* 2020;11:1563.
111. Aires CAM, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Silveira MC, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Population Structure of KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Isolated from Surveillance Rectal Swabs in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2020;26(6):652–60.
112. Rodrigues G, Bueno M, Cerdeira L, Lincopan N, lenne S, Souza TA, et al. Draft genome sequences of KPC-2- and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae ST437 isolated from a clinical sample and urban rivers in Sao Paulo, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;16:74–5.
113. Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF da, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis and Serratia marcescens clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;21:255–61.
114. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1178–80.
115. Gomez S, Pasteran F, Faccione D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, et al. Clonal dissemination of Klebsiella pneumoniae ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(10):1520–4.

116. Rojas R, Macesic N, Tolari G, Guzman A, Uhlemann A-C. Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 in Traveler Returning from Puerto Rico to Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2019 [citado el 24 de abril de 2021];25(8). Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/8/17-1730_article
117. Gomez-Gamboa L, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Sánchez-Perez A, Reyna-Flores F, Perozo-Mena A, et al. Molecular and genetic characterization of carbapenemase-producing bacteria in Venezuela. *J Chemother*. 2019;31(6):349–53.
118. Falco Restrepo AD, Velásquez Nieves MA, Takiff H. Molecular characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in a Public Hospital in Caracas, Venezuela. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2017;35(7):411–6.
119. Álvarez VE, Campos J, Galiana A, Borthagaray G, Centrón D, Márquez Villalba C. Genomic analysis of the first isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* from Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;15:109–10.
120. Quiñones D, Hart M, Espinosa F, Garcia S, Carmona Y, Ghosh S, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing KPC-2 carbapenemase in Cuba. *New Microbes New Infect*. 2014;2(4):123–6.
121. Carrasco-Anabalón S, Vera-Leiva A, Quezada-Aguiluz M, Morales-Rivera MF, Lima CA, Fernández J, et al. Genetic Platforms of blaCTX-M in Carbapenemase-Producing Strains of *K. pneumoniae* Isolated in Chile. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [citado el 24 de abril de 2021];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00324/full#B31>
122. Wozniak A, Paillavil B, Legarraga P, Zumarán C, Prado S, García P. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of KPC in clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(2):131–3.
123. Quezada-Aguiluz M, Lincopan N, Cerdeira L, Fuga B, Silva F, Barrera B, et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant KPC-2 and SRT-2 co-producing *Serratia*

- marcescens strain isolated from a hospitalised patient in Chile. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;21:1–2.
124. Angles-Yanqui E, Huaranga-Marcelo J, Sacsquispe-Contreras R, Pampa-Espinoza L. Panorama de las carbapenemasas en Perú. *Rev Panam Salud Pública.* 2020;44:1.
125. Horna G, Velasquez J, Fernández N, Tamariz J, Ruiz J. Characterisation of the first KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 from Peru. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;9:36–40.
126. Zurita J, Alcocer I, Ortega-Paredes D, Barba P, Yauri F, Iñiguez D, et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013;1(4):229–30.
127. Reyes J, Cárdenas P, Tamayo R, Villavicencio F, Aguilar A, Melano RG, et al. Characterization of blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Mobile Genetic Elements from Outbreaks in a Hospital in Ecuador. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2020;
128. Prado-Vivar MB, Ortiz L, Reyes J, Villacis E, Fornasini M, Baldeon ME, et al. Molecular typing of a large nosocomial outbreak of KPC-producing bacteria in the biggest tertiary-care hospital of Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:328–32.
129. Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *Braz J Infect Dis.* 2020;24(3):231–8.
130. Wink PL, Almeida EK, Crispim MN, Lima-Morales D de, Zavascki AP, Barth AL. First report of IMP-1 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Latin America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020;41(8):997–8.
131. Matsumura Y, Peirano G, Motyl MR, Adams MD, Chen L, Kreiswirth B, et al. Global Molecular Epidemiology of IMP-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4):e02729-16, e02729-16.

132. Ramos AC, Cayô R, Carvalhaes CG, Jové T, Silva GP da, Sancho FMP, et al. Dissemination of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Clones Carrying a Novel Integron-Borne blaIMP-1 in a Tertiary Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 [citado el 24 de abril de 2021];62(2). Disponible en: <https://aac.asm.org/content/62/2/e01321-17>
133. Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Deshpande LM, Sader HS, Castanheira M. Dissemination of a blaVIM-2-Carrying Integron Among Enterobacteriaceae Species in Mexico: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb Drug Resist.* el 20 de febrero de 2009;15(1):33–5.
134. Elena A, Cejas D, Magariños F, Jewtuchowicz V, Facente A, Gutkind G, et al. Spread of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Harboring an IncA/C 1 Plasmid Encoding IMP-8 and Its Recruitment into an Unrelated MCR-1-Containing Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(6):e02414-17.
135. De Belder D, Faccone D, Tijet N, Melano RG, Rapoport M, Petroni A, et al. Novel class 1 Integrons and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *Infect Genet Evol.* 2017;54:374–8.
136. Nastro M, Monge R, Zintgraff J, Vaulet LG, Boutureira M, Famiglietti A, et al. First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(7):617–9.
137. Sacsquispe-Contreras R, Bailón-Calderón H. Identification of carbapenem-resistant genes in enterobacteria from peruvian hospitals, 2013-2017. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2018;35(2):259–64.
138. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014. *Biomédica.* 2017;37(4):473–85.

139. Sánchez-Salazar E, Gudiño ME, Sevillano G, Zurita J, Guerrero-López R, Jaramillo K, et al. Antibiotic resistance of Salmonella strains from layer poultry farms in central Ecuador. *J Appl Microbiol.* 2020;128(5):1347–54.
140. Molina-Mora JA, Chinchilla-Montero D, García-Batán R, García F. Genomic context of the two integrons of ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* AG1: A VIM-2-carrying old-acquaintance and a novel IMP-18-carrying integron. *Infect Genet Evol.* 2021;89:104740.
141. Duran-Bedolla J, Bocanegra-Ibarias P, Silva-Sanchez J, Garza-González E, Morfín-Otero R, Hernández-Castro R, et al. Genetic characterization of multiple NDM-1–producing clinical isolates in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;94(2):195–8.
142. Piza-Buitrago A, Rincón V, Donato J, Saavedra SY, Duarte C, Morero J, et al. Genome-based characterization of two Colombian clinical *Providencia rettgeri* isolates co-harboring NDM-1, VIM-2, and other β -lactamases. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):345.
143. Gomez-Gamboa L, Perozo-Mena A, Bermudez-Gonzalez J, Villavicencio C, Villasmil J, Ginestre MM, et al. Detection of carbapenemase-producing bacteria in a public healthcare center from Venezuela. *J Infect Dev Ctries.* 2021;15(01):163–7.
144. Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1795–7.
145. Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, Martínez de la Barrera L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1957–60.
146. Ordóñez-Díaz KM, LeynerEstupiñán J, Alzate JA, Ordóñez-Díaz KM, LeynerEstupiñán J, Alzate JA. Metalobetalactamasa de tipo Nueva Delhi en Risaralda (Colombia): reporte de un caso. *Infectio.* 2018;22(1):55–7.
147. Papa-Ezdra R, Caiata L, Palacio R, Outeda M, Cabezas L, Bálsamo A, et al. Prevalence and molecular characterisation of carbapenemase-producing Enterobacterales in an

- outbreak-free setting in a single hospital in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;24:58–62.
148. Bado I, Papa-Ezdra R, Cordeiro N, Outeda M, Caiata L, García-Fulgueiras V, et al. Detection of qnrVC6, within a new genetic context, in an NDM-1-producing *Citrobacter freundii* clinical isolate from Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;14:95–8.
149. Alcántar-Curiel MD, Fernández-Vázquez JL, Toledano-Tableros JE, Gayosso-Vázquez C, Jarillo-Quijada MaD, López-Álvarez M del R, et al. Emergence of IncFIA Plasmid-Carrying blaNDM-1 Among *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates in a Tertiary Referral Hospital in Mexico. *Microb Drug Resist.* 2019;25(6):830–8.
150. Full Text PDF [Internet]. [citado el 24 de abril de 2021]. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-020-02030-z>
151. Barberino MG, Cruvinel S de A, Faria C, Salvino MA, Silva M de O. Isolation of blaNDM-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* 2018;22(1):47–50.
152. Pasteran F, Meo A, Gomez S, Derdoy L, Albronz E, Faccone D, et al. Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014;2(4):344–5.
153. Dretler AW, Avila J, Sandoval Lira L, García Renner M, Burger-Calderon R, Hargita MN, et al. High Rates of New Delhi Metallo- β -Lactamase Carbapenemase Genes in Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;102(2):384–7.
154. Quiñones D, Aung MS, Carmona Y, González MK, Pereda N, Hidalgo M, et al. High Prevalence of CTX-M Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes and Detection of NDM-1 Carbapenemase Gene in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Cuba. *Pathogens.* 2020;9(1):65.
155. Thoms-Rodriguez C-A, Mazzulli T, Christian N, Willey BM, Boyd DA, Mataseje LF, et al. New Delhi metallo- β -lactamase in Jamaica. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(2):183–7.

156. Martínez D, Caña L, Rodolfo H, García J, González D, Rodríguez L, et al. Characteristics of dual carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from an outbreak in Venezuela: a retrospective study. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health*. 2020;44:e50.
157. Carrasco-Anabalón S, Neto COC, Carvalho-Assef APD, Lima CA, Cifuentes M, Silva F, et al. Introduction of NDM-1 and OXA-370 from Brazil into Chile in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a single patient. *Int J Infect Dis*. 2019;81:28–30.
158. Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, Belder DD, et al. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(5):E233–5.
159. Magagnin CM, Rozales FP, Antochévis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, et al. Dissemination of blaOXA-370 gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(10):1907–10.
160. Villacís JE, Reyes JA, Castelán-Sánchez HG, Dávila-Ramos S, Lazo MA, Wali A, et al. OXA-48 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 in Ecuador. *Microorganisms*. 2020;8(3):435.
161. Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2017;215(suppl_1):S18–27.
162. Andrey D, Pereira Dantas P, Martins W, Marques De Carvalho F, Almeida LGP, Sands K, et al. An Emerging Clone, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting. *Clin Infect Dis*. 2020;71(7):e141–50.
163. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [citado el

30 de abril de 2021];7. Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00895/full>

164. Ko KS. Antibiotic-resistant clones in Gram-negative pathogens: presence of global clones in Korea. *J Microbiol.* 2019;57(3):195–202.
165. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra PM, Cienfuegos AV, Jiménez JN. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. *Biomédica* [Internet]. el 26 de mayo de 2015 [citado el 2 de mayo de 2021];35(4). Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2610>
166. Yu F, Lv J, Niu S, Du H, Tang Y-W, Pitout JDD, et al. Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenem-Resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and Hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 [citado el 30 de abril de 2021];56(9). Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/56/9/e00731-18>
167. Yauri M, Rodríguez MR, Alcocer I. Diseminación clonal de KPC-2 en *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos. *Infectio.* 2020;24(1):42.
168. Marsh JW, Mustapha MM, Griffith MP, Evans DR, Ezeonwuka C, Pasculle AW, et al. Evolution of Outbreak-Causing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 at a Tertiary Care Hospital over 8 Years. *mBio* [Internet]. 2019 [citado el 1 de mayo de 2021];10(5). Disponible en: <https://mbio.asm.org/content/10/5/e01945-19>
169. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):37–46.
170. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 2016;47:31–7.
171. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Carmen Turrientes M, Díaz-Agero C, López-Fresneña N, Bonten M, et al. Characterization of carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(11):3039–43.
172. Su S, Zhang J, Zhao Y, Yu L, Wang Y, Wang Y, et al. Outbreak of KPC-2 Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST76 and Carbapenem-resistant K2 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST375 strains in Northeast China: molecular and virulent characteristics. *BMC Infect Dis.* el 2 de julio de 2020;20(1):472.
173. The European Committee on Antimicrobial Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 10.0 [Internet]. 2020 [citado el 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
174. Bogaerts P, Berger A-S, Evrard S, Huang T-D. Comparison of two multiplex immunochromatographic assays for the rapid detection of major carbapenemases in Enterobacterales. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(6):1491–4.
175. Han R, Guo Y, Peng M, Shi Q, Wu S, Yang Y, et al. Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5, RESIST-5 O.O.K.N.V., and IMP K-Set for Rapid Detection of KPC-, NDM-, IMP-, VIM-type, and OXA-48-like Carbapenemase Among Enterobacterales. *Front Microbiol.* 2021;11:609856.
176. Calvo J, Rafael Canton, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos [Internet]. 2011. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
177. Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Infect Chemother.* 2017;23(1):1–11.
178. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503–7.

179. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281–3.
180. Muñoz C, Zumarán C, González T, Wozniak A, Castillo C, García P. Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos. *Rev Chil Infectol.* 2017;34(4):326–32.
181. Pancotto LR, Nodari CS, Rozales FP, Soldi T, Siqueira CG, Freitas AL, et al. Performance of rapid tests for carbapenemase detection among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Microbiol.* 2018;49(4):914–8.
182. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, Decré D, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β Carba Test. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3065–8.
183. Noël A, Huang T-D, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol.* 2017;55(2):510–8.
184. Aruhomukama D. Review of phenotypic assays for detection of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases: a microbiology laboratory bench guide. *Afr Health Sci.* 2020;20(3):19.
185. Huang T-D, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(2):445–50.
186. Robert J, Pantel A, Merens A, Meiller E, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H, et al. Development of an algorithm for phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the routine laboratory. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):78.

187. Cordeiro-Moura JR, Fehlberg LCC, Nodari CS, Matos AP de, Alves V de O, Cayô R, et al. Performance of distinct phenotypic methods for carbapenemase detection: The influence of culture media. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(1):114912.
188. Hong Z, Meng-Lu W, Wen-Juan F, Shi-Feng H, Ping Y. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae: A systematic review and meta-analysis | Elsevier Enhanced Reader. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;21:138–47.
189. Hoyos-Mallecot Y, Riazco C, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Gutiérrez-Fernández J, Navarro-Marí JM. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*. 2014;105:98–101. https://aurologia.com/article_detail.php?aid=79732479e8d77a13c78b743f26dcecb4be8ad027
190. Centonze AR, Bertocelli A, Savio C, Orza P, Bedenić B, Mazzariol A 2018. Evaluation of rapid KPC carbapenemase detection method based on MALDI-TOF VITEK MS spectra analysis. *J Med Microbiol*. 2018;67(10):1474–9.
191. Lasserre C, Martin LDS, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2163–71.
192. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Meropenem Hydrolysis Assay with NH₄HCO₃, a Reliable Tool for Direct Detection of Carbapenemase Activity. *J Clin Microbiol*. 2015;53(5):1731–5.
193. Cui Z-H, Zheng Z-J, Tang T, Zhong Z-X, Cui C-Y, Lian X-L, et al. Rapid Detection of High-Level Tigecycline Resistance in Tet(X)-Producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. Based on MALDI-TOF MS. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:583341.

194. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin M. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):471–3.
195. Koroska F, Göttig S, Kaase M, Steinmann J, Gatermann S, Sommer J, et al. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2017;55(3):877–83.
196. Song W, Park M-J, Jeong S, Shin DH, Kim J-S, Kim HS, et al. Rapid Identification of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae From Culture: Evaluation of the RESIST-4 O.K.N.V. Multiplex Lateral Flow Assay. *Ann Lab Med.* 2020;40(3):259–63.
197. Weinstein MP. M100-performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th edition. Place of publication not identified: Clinical and Laboratory Standards CLSI; 2018.
198. Romo-Ibañez A, Calatrava-Hernández E, Gutiérrez-Soto B, Pérez-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. High clinical impact of rapid susceptibility testing on CHROMID ESBL® medium directly from swabs. *Ann Transl Med.* 2020;8(9):604.
199. Montiel-Riquelme F, Calatrava-Hernández E, Gutiérrez-Soto M, Expósito-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Clinical Relevance of Antibiotic Susceptibility Profiles for Screening Gram-negative Microorganisms Resistant to Beta-Lactam Antibiotics. *Microorganisms.* 2020;8(10):1555. Disponible en: [10.3390/microorganisms8101555](https://doi.org/10.3390/microorganisms8101555)
200. García CS. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:12–8.
201. Deepa R, Ravichandran M, Banu ST, Sharmila R. Evaluation of Nordmann, Dortet, and Poirel test for the identification of extended spectrum betalactamase production among urinary isolates of *Escherichia coli*. *J Lab Physicians.* 2017;9(4):269–72.

202. Blanc DS, Poncet F, Grandbastien B, Greub G, Senn L, Nordmann P. Evaluation of the performance of rapid tests for screening carriers of acquired ESBL-producing Enterobacterales and their impact on turnaround time. *J Hosp Infect.* 2021;108:19–24.
203. Hasso M, Porter V, Simor AE. Evaluation of the β -Lacta Test for Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL)-Producing Organisms Directly from Positive Blood Cultures by Use of Smudge Plates. *J Clin Microbiol.* 2017;55(12):3560–2.
204. Nordmann P. Recent advances in biochemical and molecular diagnostics for the rapid detection of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae: a focus on β -lactam resistance. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(4):327–50.
205. Jiménez-Guerra G, Hoyos-Mallecot Y, Rodríguez-Granger J, Navarro-Marí J, Gutiérrez-Fernández J. Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotaxima en enterobacterias | Elsevier Enhanced Reader. *Rev Argent Microbiol.* 2016;48(4):320–4.
206. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1865–9.
207. Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli* —evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(9):1205–10.
208. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(8):1924–31.
209. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(1):1–27.

210. Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S11, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Newsl. 2016;23(6):49.
211. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. Lancet Infect Dis. febrero de 2017;17(2):153–63.
212. Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf [Internet]. [citado el 20 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>
213. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. Ledebor NA, editor. J Clin Microbiol. 2017;55(8):2321–33.
214. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(1):119–23.
215. Patel JB, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017.
216. Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJD, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Biol. 1994;5(1):25–40.
217. Ministerio de Relaciones Laborales. A-0021-2012-Escala-20-grados.pdf [Internet]. 2012 [citado el 20 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08/A-0021-2012-Escala-20-grados.pdf>
218. Cerda L J, Villarroel Del P L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Rev Chil Pediatría [Internet]. 2008 [citado el 20 de noviembre de 2020];79(1). Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062008000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=en

219. Cronin KM, Poy Lorenzo YS, Olenski ME, Bloch AE, Visvanathan K, Waters MJ, et al. Risk factors for KPC-producing Enterobacteriaceae acquisition and infection in a healthcare setting with possible local transmission: a case-control study. *J Hosp Infect.* 2017;96(2):111–5.
220. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Iii AFC, Feldman HI, Kusek JW, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. 2009;16.
221. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(2):253–9.
222. Naas T, Cuzon G, Truong H-V, Nordmann P. Role of IS Kpn7 and Deletions in blaKPC sub Gene Expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4753–9.
223. Takayama Y, Adachi Y, Nihonyanagi S, Okamoto R. Modified Hodge test using Mueller–Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of. 2015;64(7):774–7.
224. Center Control. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) [Internet]. 2015 [citado el 19 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf>
225. Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct Ertapenem Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Surveillance Swab Specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):836–41.
226. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, et al. Rapid and Direct Real-Time Detection of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} from Surveillance Samples. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3609–15.

227. Masseron A, Poirel L, Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Kessler J, Chakraborty T, et al. Ongoing dissemination of OXA-244 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in Switzerland and their detection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;97(3):115059.
228. García-Fernández S, Hernández-García M, Valverde A, Ruiz-Garbajosa P, Morosini MI, Cantón R. CHROMagar mSuperCARBA performance in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates characterized at molecular level and routine surveillance rectal swab specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(3):207–9.
229. Mathers AJ, Poulter M, Dirks D, Carroll J, Sifri CD, Hazen KC. Clinical Microbiology Costs for Methods of Active Surveillance for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing Enterobacteriaceae. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(4):350–5.
230. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? *Virulence*. 2017;8(4):417–26.
231. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Datos de Resistencia Bacteriana Ecuador-2015 [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2017/07/1-DATOS-RESISTENCIAS-2015.docx.pdf>
232. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):153–63.
233. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Sklavou C, Vamvakopoulou S, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(2):169–73.
234. Debby B, Ganor O, Yasmin M, David L, Nathan K, Ilana T, et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(8):1811–7.

235. Dautzenberg MJD, Wekesa AN, Gniadkowski M, Antoniadou A, Giamarellou H, Petrikos GL, et al. The Association Between Colonization With Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Overall ICU Mortality: An Observational Cohort Study. *Crit Care Med.* 2015;43(6):1170–7.
236. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective Multicenter Study of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae from 83 Hospitals in Spain Reveals High *In Vitro* Susceptibility to Colistin and Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406–12.
237. da Silva KE, Maciel WG, Sacchi FPC, Carvalhaes CG, Rodrigues-Costa F, da Silva ACR, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch out for surgery. *J Med Microbiol.* 2016;65(6):547–53.
238. Lübbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers UX, Ducombe T, Eckmanns T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–2-producing *K pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control.* 2014;42(4):376–80.
239. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6344–7.
240. Satán C, Tamayo R, Ushiña L, Rivera R, Villavicencio F, Salas S, et al. Carbapenemasas en Bacilos Gram Negativos, situación actual en Ecuador. 2016; IV Encuentro Internacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical.
241. Benavides E. Caracterización molecular del gn *mgrB* en *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas tipo KPC resistente a colistina en aislamientos clínicos [Internet]. 2018 [citado el 22 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14579/1/T-UCE-0008-BC015-2018.pdf>
242. Tamayo Trujillo R, Satan C, Villavicencio F, Ecuador G, Reyes J, Cardenas P, et al. Secuencias tipo de *Klebsiella pneumoniae*-KPC aisladas de muestras invasivas en Hospitales del Ecuador. En 2016.

243. Soria Segarra CI, Larrea Vera G, Berrezueta Jara MI, Arévalo Mendez M, Cujilema P, Serrano Lino M, et al. Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *New Microbes New Infect.* 2018;26:42–8. Disponible en: [10.1016/j.jiph.2019.06.013](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.013)
244. Rojo V, Vaquez P, Reyes S, Puentes L, Cervero M. Risk factors and clinical evolution of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in a university hospital in Spain. *Rev Esp Quimioter.* 2018;3:427–34.
245. Wang Q, Zhang Y, Yao X, Xian H, Liu Y, Li H, et al. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(10):1679–89.
246. Swaminathan M, Sharma S, Blash SP, Patel G, Banach DB, Phillips M, et al. Prevalence and Risk Factors for Acquisition of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in the Setting of Endemicity. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(8):809–17.
247. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Derde LPG, Bonten MJM, et al. KPC-Like Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Colonizing Patients in Europe and Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1912–7.
248. Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, et al. KPC-4 Is Encoded within a Truncated Tn 4401 in an IncL/M Plasmid, pNE1280, Isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):37–41.
249. López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, et al. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(6):538–40.
250. Kanamori H, Parobek CM, Juliano JJ, van Duin D, Cairns BA, Weber DJ, et al. A Prolonged Outbreak of KPC-3-Producing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* Driven by Multiple Mechanisms of Resistance Transmission at a Large Academic Burn Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(2):12.

251. Lema JSG. Plásmidos relacionados a blaKPC en cepas de enterobacterias chilenas productoras de carbapenemasas. [Chile]; 2017.
252. Ben Tanfous F, Alonso CA, Achour W, Ruiz-Ripa L, Torres C, Ben Hassen A. First Description of KPC-2-Producing *Escherichia coli* and ST15 OXA-48-Positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microb Drug Resist.* 2017;23(3):365–75.
253. Rodela AR, Pérez CD-A, Sagrado TS, Ruiz-Garbajosa P, López MJP, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill* [Internet]. 2012;17(7). Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20086>
254. García-Arenzana N, Redondo-Bravo L, Espinel-Ruiz MA, Borrego-Prieto P, Ruiz-Carrascoso G, Quintas-Viqueira A, et al. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Outbreak in a Medical Ward in Spain: Epidemiology, Control Strategy, and Importance of Environmental Disinfection. *Microb Drug Resist.* 2020;26:54–9.
255. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blanco V, Mingorance J, Gómez-Gil R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(2):169–73.
256. López-Dosil M, Bicschhofberge C, Sáez D, García-Picazo L. Epidemiología de la diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de media estancia en Madrid. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2017 [citado el 24 de noviembre de 2020];30. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2017/11/lopez14nov2017.pdf>
257. Ruiz-Garbajosa P, Hernández-García M, Beatobe L, Tato M, Méndez MI, Grandal M, et al. A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):348–52.

258. Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48 β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:4.
259. Madueño A, González García J, Ramos MJ, Pedroso Y, Díaz Z, Oteo J, et al. Risk factors associated with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* fecal carriage: A case-control study in a Spanish tertiary care hospital. *Am J Infect Control*. 2017;45(1):77–9.
260. Fang L, Lu X, Xu H, Ma X, Chen Y, Liu Y, et al. Epidemiology and risk factors for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonisation and infections: case-controlled study from an academic medical center in a southern area of China. *Pathog Dis*. 2019;77(4):ftz034.
261. Paño Pardo JR, Villar SS, Ramos Ramos JC, Pintado V. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2014;32:41–8.
262. Gomes C, Ruiz-Roldán L, Mateu J, Ochoa TJ, Ruiz J. Azithromycin resistance levels and mechanisms in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2019;9(1):6089.
263. Isaac S, Scher JU, Djukovic A, Jiménez N, Littman DR, Abramson SB, et al. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):128–36.
264. Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte RS, et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *J Hepatol*. 2014;60(4):824–31.
265. Doan T, Hinterwirth A, Worden L, Arzika AM, Maliki R, Abdou A, et al. Gut microbiome alteration in MORDOR I: a community-randomized trial of mass azithromycin distribution. *Nat Med*. 2019;25(9):1370–6.
266. Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and

- a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):34–9.
267. World Health Organization. WHO Model List of Essential Medicines [Internet]. 2017. Disponible en: https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/6th_EMLc2017.pdf
268. Arshad S, Kilgore P, Chaudhry ZS, Jacobsen G, Wang DD, Huitsing K, et al. Treatment with hydroxychloroquine, azithromycin, and combination in patients hospitalized with COVID-19. *Int J Infect Dis.* 2020;97:396–403.
269. Kim YK, Song SA, Lee JN, Oh M, Jo KM, Kim H-J, et al. Clinical factors predicting persistent carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients with known carriage. *J Hosp Infect.* 2018;99(4):405–12.
270. Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2017;35(10):667–75.
271. Dalben MF, Oliveira MS, Garcia CP, Lobo RD, Costa SF, Toscano CM, et al. Swab cultures across three different body sites among carriers of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species: a poor surveillance strategy. *J Hosp Infect.* 2010;74(4):395–6.
272. Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Microbiological methods for surveillance of carrier status of multiresistant bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(10):667–75.
273. Nutman A, Lerner A, Schwartz D, Carmeli Y. Evaluation of carriage and environmental contamination by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(11):949.e5-949.e7.
274. Nutman A, Lerner A, Fallach N, Schwartz D, Carmeli Y. Likelihood of persistent carriage of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* on readmission in previously identified carriers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019;40(10):1188–90.

275. Hernández-García M, Díaz-Agero C, Pérez-Viso B, Sánchez AM, López-Fresneña N, Morosini MI, et al. Implementation of contact isolation strategy for the containment of extended-spectrum β -lactamase carriers in a University Hospital positively affects the epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacterales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2020 [citado el 21 de noviembre de 2020]; Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X2030210X>
276. Kumar A, Mohapatra S, Bakhshi S, Mahapatra M, Sreenivas V, Das BK, et al. Rectal Carriage of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Menace to Highly Vulnerable Patients. *J Glob Infect Dis*. 2018;10(4):218–21.
277. Chakrabarti S. Gut Colonization with Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae adversely impacts the outcome in patients with Hematological Malignancies: Results of a prospective surveillance study. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10(1):2018025.
278. Tran D, Larsson M, Olson L, Hoang N, Le N, Khu D, et al. High prevalence of colonisation with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients admitted to Vietnamese hospitals: Risk factors and burden of disease. 2009 [citado el 21 de noviembre de 2020]; Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0163445319301574?token=EEAE77D0DDE9D594CD24119120D6D273C75B2B5727C440815BB375157EE1CDC36B3A8EE41BFAC5898CD40426C067F1B8>
279. Qu X, Wang H, Chen C, Tao Z, Yin C, Yin A, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Chinese hospitals - A five-year retrospective study. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(12):1101–7.
280. Scheich S, Reinheimer C, Brandt C, Wichelhaus TA, Hogardt M, Kempf VAJ, et al. Clinical Impact of Colonization with Multidrug-Resistant Organisms on Outcome after Autologous Stem Cell Transplantation: A Retrospective Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(9):1455–62.
281. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, et al. Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa Isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):e01589-17, e01589-17.
282. Lepelletier D, Cady A, Caroff N, Marraillac J, Reynaud A, Lucet J-C, et al. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66(1):1–6.
283. Araoka H, Kimura M, Abe M, Takahashi N, Yoneyama A. Appropriate Sampling Sites for the Surveillance of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Colonization. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(2):118–9.
284. Riva G, Garzaro M, Zaccaria T, Peruzzetto D, Cipriani R, Salonia L, et al. Nasal and Tracheal Microbial Colonization in Laryngectomized Patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2016;125(4):336–41.
285. Mizusawa M, Konuma T, Kato S, Isobe M, Shibata H, Suzuki M, et al. Clinical outcomes of persistent colonization with multidrug-resistant Gram-negative rods in adult patients undergoing single cord blood transplantation. *Int J Hematol.* 2020;111(6):858–68.
286. Waters VJ, Gómez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK, Prince A. Immunostimulatory Properties of the Emerging Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Immun.* 2007;75(4):1698–703.
287. Juhász E, Krizsán G, Lengyel G, Grósz G, Pongrácz J, Kristóf K. Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13(1):333.
288. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, et al. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1551–5.
289. Jia X-Q, Pang F, Chen J-Z, Jiang L-X. Prevalence and clinical distribution of multidrug-resistant bacteria (3537 isolates) in a tertiary Chinese hospital (January 2012–December

2013). Pathol Biol [Internet]. 2015 [citado el 10 de febrero de 2021];63(1). Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0369811414001746>

7 PUBLICACIONES DERIVADAS

- Soria Segarra C, Larrea Vera G, Barrezueta Jara M, Arevalo Méndez M Cujilema P, **Soria Segarra Ca.** Utility of mSuper CARBA for surveillance cultures of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *New Microbes and New Infections.* 2018; 26: 42-48. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.08.005>.
- **Soria-Segarra C,** Soria-Segarra Cl, Catagua-González A, Gutiérrez Fernández J. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units in Ecuador: results from a multicenter study. *J Infect Public Health.* 2020; 13 (1): 80-88. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.013>
- **Soria-Segarra C,** González-Bustos, López-Cerero, et al. Tracking KPC-3 producing St-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristic. *Mol Biol Rep.* 2020; 47 (2):1089-1097. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05203>
- **Soria-Segarra C,** Soria-Segarra Cl, Catagua-González A, Apolo-Matamoros M, Vega-Franco F, Chung-Sang M, et al. Macrolides: a novel risk factor for carbapenemase-producing Enterobacterales in intensive care units. 2021. *J Infect Develop Countr.* 2021; 15(4):584-589. Disponible en: <https://doi.org/10.3855/jidc.13319>
- **Soria-Segarra C,** Delgado-Valverde M, Serrano-García M, López-Hernández I, Navarro-María J, Gutiérrez-Fernández J. Alto riesgo de infecciones en pacientes colonizados con bacterias gram-negativas resistentes a carbapenémicos en una ciudad media española. *Rev Esp Quimioter.* 2021;34 (4). Disponible en: <https://doi.org/10.37201/reg/021.2021>

Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Cl. Soria Segarra^{1,2,3}, G. Larrea Vera³, Ml. Berrezueta Jara¹, M. Arévalo Mendez¹, P. Cujilema¹, M. Serrano Lino¹ and Ca. Soria Segarra⁴

1) Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública 'Dr Leopoldo Izquieta Pérez', 2) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil, 3) Laboratorio Clínico Sosegar and 4) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador

Abstract

Culture of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) as part of active surveillance is one of the most useful strategies for successful infection control programmes. Our objective was to compare the recently introduced CHROMagar mSuperCARBA agar for CPE detection in surveillance cultures from perineal swabs with the US Centers for Disease Control and Prevention method. Our results showed that this agar is a useful and affordable alternative (sensitivity 93.05%, specificity 96.21%, diagnostic accuracy 95.2%) to detect CPE in hospital settings. © 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Carbapenemases, chromogenic agar, *Enterobacteriaceae*, performance, surveillance cultures

Original Submission: 28 November 2017; **Revised Submission:** 16 July 2018; **Accepted:** 3 August 2018

Article published online: 11 August 2018

Corresponding author: Cl. Soria Segarra, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública 'Dr Leopoldo Izquieta Pérez', Guayaquil, Ecuador.

E-mail: claudia.soria.s@gmail.com

Introduction

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) were detected about 20 years ago in the United States and are currently a global epidemic [1]. The infections caused by these multidrug-resistant microorganisms have high rates of morbidity and close to 50% mortality, mostly due to the few therapeutic options available, such as tigecycline, polymyxins, fosfomicin and aminoglycosides [2,3].

More than 2000 genetic variants of carbapenemases have been described. The predominant enzymes are as follows: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC; serin carbapenemase, Ambler group A), New Delhi metallo- β -lactamase (NDM; metallo- β -lactamase, Ambler group B) and OXA-48 (oxacillinase, Ambler group D). KPC carbapenemase predominates in endemic countries such as Greece, Italy and Israel,

with incidences exceeding 30% [4], while Turkey and other Mediterranean countries report the OXA-48 variant as predominant [5]. NDM carbapenemase predominates in countries such as India, where it has a prevalence of 50% [6]. Regarding Latin America, KPC carbapenemase is considered endemic in some countries such as Colombia, Argentina and Brazil, while Chile only reports outbreaks caused by this microorganism. NDM variant predominates in countries such as Guatemala. However, the latter variant and OXA-48 carbapenemase are usually reported with less frequency in Latin America [7].

The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases recommend early detection to prevent the spread of CPE [8–10]. The early identification of these microorganisms is frequently carried out through rectal swab cultures. Given the fact that sensitive and specific methodologies with good turnaround times are required, several investigators have supported the use of chromogenic agars for identification [10]. The sensitivity of these agars varies according to the type of carbapenemase studied and the brand.

The CDC recommends the use of Landman's protocol for the detection of intestinal colonization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [11]. The CHROMagar mSuperCARBA agar (CHROMagar) was marketed in 2016 as an

280 nm. A previously described multiplex PCR protocol was used to detect KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM genes [17].

Interpretation of results

A CPE isolated with any of the two methodologies and molecularly confirmed was considered as a true-positive result. A true-negative result was defined when no CPE were recovered with any of the two methods studied. Samples with carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae* or CRE non-PC were considered as false-positive results. If one methodology recovered a CPE that was molecularly confirmed and the other did not, we considered the sample to be falsely negative. The discordant results were defined as any one that showed a different result regarding the positivity or negativity of the sample or the type or number of CPE isolated in one of the two methodologies. Concordance was defined as having the same result with the two methodologies.

Cost analysis

Cost of each method was calculated in US dollars at 2016 prices. Laboratory technologist charge was estimated at \$7.50 per hour, based on a monthly salary of \$1212 (scale remuneration of public service officers) [18].

Statistical analysis

We used Microsoft Office Excel 365 (2015) by frequencies and percentages. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV), diagnostic accuracy, and positive and negative likelihood ratio of each method were calculated. The agreement between the two tests was established by Cohen's kappa index. The kappa index was interpreted as follows: 0.01–0.20, poor agreement; 0.21–0.40, fair agreement; 0.41–0.60, moderate agreement; 0.61–0.80, good agreement; and 0.81–1, very good agreement [19]. Statistical significance was calculated by Pearson's chi-square test, and values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

We processed 950 swabs corresponding to 605 patients (one to six samples per patient, with a mean of two samples per patient). We obtained 633 negative results and 317 positive results (228 patients), detecting a total of 330 CPE. A total of 269 of the 317 samples were recovered using the CDC method and 292 using the SC method (Tables 1 and 2). Thirteen samples had more than one CPE, with 12 detected with the SC method and one with the CDC method. CHROMagar mSuper-CARBA was statistically more sensitive ($p 0.003$) than the CDC method, allowing us to detect more than one CPE in the samples studied.

TABLE 1 Results obtained from two methods in samples with one carbapenemase producing-*Enterobacteriaceae*

Microorganism	N (%)	Concordant result	Discordant result
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	277 (90.78)	224	53 (25 CDC ⁺ /SC ⁻ , 27 CDC ⁻ /SC ⁺)
<i>Enterobacter aerogenes</i> KPC	4 (1.31)	4	0
<i>Enterobacter cloacae</i> KPC	7 (2.30)	2	5 (CDC ⁻ /SC ⁺)
<i>Escherichia coli</i> KPC	1 (0.32)	1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> KPC	3 (0.98)	2	1 (CDC ⁻ /SC ⁺)
<i>Proteus mirabilis</i> NDM	13 (4.27)	0	13 (CDC ⁻ /SC ⁺)
Total	304	233	72

CDC, Centers for Disease Control and Prevention method; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo- β -lactamase; SC, CHROMagar mSuper-CARBA agar method.

KPC was the predominating carbapenemase (92.24%). NDM carbapenemase was also detected in 5.75% of the samples, and OXA-48 carbapenemase was detected in none.

Concordance

A total of 91.05% (865) of the results were concordant. We observed considerable agreement between the two methods for CPE detection (kappa index 0.79; 95% confidence interval, 0.75–0.84). The best concordance was found for KPC variant (kappa index 0.87; 95% confidence interval 0.82–0.90), and there was no agreement at all for NDM detection (kappa index 0).

Samples with discordant results occurred in 63 patients (including those with more than one CPE); 37 subjects (58.73%) had more than one sample collected during the study period. Eleven patients (31 samples) had the same discordant results more than once and could be corroborated (Table 3).

False-positive and -negative results

We obtained 24 (2.52%) false-positive results with the SC method, of which 14 were CRE non-carbapenem resistant and ten were susceptible to imipenem and meropenem. With the CDC method, we obtained 198 (20.84%) false-positive results, of which six were CRE non-carbapenem-resistant isolates and 192 samples had *Enterobacteriaceae* with susceptibility to imipenem and meropenem (129 *E. coli*, 54 *K. pneumoniae* and nine *Enterobacter cloacae*). The most frequent mechanism of resistance to carbapenems detected in non-CPE isolates was extended-spectrum β -lactamases combined with porin mutations.

We obtained 22 (2.31%) false-negative results with the SC method and 47 (4.94%) false-negative results with the CDC method (Table 4).

Sensitivity, specificity, PPV, NPV and diagnostic accuracy

SC showed the best results in all statistical analyses (Table 5).

TABLE 2. Results obtained from two methods in samples with more than one carbapenemase producing-*Enterobacteriaceae*

Strain	CDC		SC	
	Microorganism 1	Microorganism 2	Microorganism 1	Microorganism 2
28098V	<i>Enterobacter cloacae bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	<i>E. cloacae bla_{KPC}</i>	—
27037M	<i>Klebsiella pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>E. cloacae bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27920L	<i>E. cloacae bla_{KPC}</i>	—	<i>E. cloacae bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27902N	Negative	—	<i>Escherichia coli bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27411R	<i>E. coli bla_{KPC}</i>	—	<i>E. coli bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27405J	Negative	—	<i>E. coli bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
28001S	<i>E. coli bla_{KPC}</i>	—	<i>E. coli bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27301G	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>Proteus mirabilis bla_{NDM}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27306M	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>P. mirabilis bla_{NDM}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27046P	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>P. mirabilis bla_{NDM}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27302P	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>P. mirabilis bla_{NDM}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27303V	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>P. mirabilis bla_{NDM}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>
27694V	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>	—	<i>P. mirabilis bla_{NDM}</i>	<i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i>

CDC, Centers for Disease Control and Prevention method; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; SC, CHROMagar mSuperCARBA agar method.

TABLE 3. Discordant results in patients with more than one sample

Patient no.	Total samples/no. of samples with discordant results repeated	Discordant result, CDC/SC
1	5/2	Negative/ <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC
2	5/3	Negative/ <i>K. pneumoniae</i> KPC
3	3/2	Negative/ <i>K. pneumoniae</i> KPC
4	5/2	Negative/ <i>K. pneumoniae</i> KPC
5	3/3	Negative/ <i>K. pneumoniae</i> KPC
6	4/4	Negative/ <i>K. pneumoniae</i> KPC
7	5/2	Negative/ <i>K. pneumoniae</i> KPC
8	2/2	<i>K. pneumoniae</i> KPC/Negative
9	3/3	Negative/ <i>Proteus mirabilis</i> NDM
10	4/4	Negative/ <i>P. mirabilis</i> NDM
11	4/4	Negative/ <i>P. mirabilis</i> NDM

CDC, Centers for Disease Control and Prevention method; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; SC, CHROMagar mSuperCARBA agar method.

*Two samples of each patient had *K. pneumoniae* KPC by CDC method and *P. mirabilis* NDM and *K. pneumoniae* KPC by SC method.

Cost analysis

We found that the CDC method was more expensive than the SC method (SC \$8990.72 vs. CDC \$ 10307.92). Although the total cost of the supplies used was estimated to be higher for

the SC method (SC \$8477.32 vs. CDC \$7866.21) the cost of laboratory technologist time increased the total cost of the CDC method (SC \$513.40 vs. CDC \$2441.71), mainly due to the lack of specificity, in addition to the fact that 39.91% of the cost of the inputs of the CDC method was used to work samples with false-positive results (Table 6).

Discussion

One of the main strategies to avoid transmission of CPE in healthcare settings is prompt detection of its intestinal carriers. In order for this strategy to be successful, the method used must be accurate and have quick turnaround times.

In our study, the sensitivity of the SC method for CPE detection (KPC and NDM) was higher than that of the CDC method (93.05% vs. 84.7%). However, it is lower than that reported by García-Fernández et al. [20] in 2016 (100%), in a study that used 210 rectal swabs from patients colonized with CPE carrying NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases. Sensitivity reported by other authors is higher for the SC

TABLE 4. Sample results with non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* classified as falsely positive

Microorganism	Laboratory code	CDC	SC	Imipenem (mm)	Meropenem (mm)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AmpC + porin mutations	2711IT	—	+	28	23/16
<i>K. pneumoniae</i> AmpC + porin mutations	27416T	—	+	24	19
<i>K. pneumoniae</i> AmpC + porin mutations	27740T	—	+	20	18
<i>Enterobacter aerogenes</i> AmpC + porin mutations	25428C	+	—	23	17
<i>E. aerogenes</i> AmpC + porin mutations	25729C	+	—	16	18
<i>E. cloacae</i> AmpC + porin mutations	28384A	—	+	13	23
<i>Enterobacter cloacae</i> AmpC + porin mutations	27909R	—	+	6	12
<i>K. pneumoniae</i> ESBL + porin mutations	25339R	+	+	24	14
<i>K. pneumoniae</i> ESBL + porin mutations	28736Z	+	+	15	17
<i>K. pneumoniae</i> ESBL + porin mutations	25337Z	+	+	18	17
<i>K. pneumoniae</i> ESBL + porin mutations	26745P	—	+	25	20
<i>K. pneumoniae</i> ESBL + porin mutations	27104A	+	+	22	13
<i>K. pneumoniae</i> ESBL + porin mutations	27185A	—	+	25	17
<i>Escherichia coli</i> ESBL + porin mutations	26422S	—	+	25	17

CDC, Centers for Disease Control and Prevention method; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; SC, mSuperCARBA agar method.

TABLE 5. Results of statistical analysis

Result	CDC		SC	
	%	95% CI	%	95% CI
Sensitivity	84.7	80.3–88.3	93.05	89.6–95.3
Specificity	68.9	65.2–72.3	96.21	94.4–97.5
Positive predictive value	57.3	52.8–61.7	92.4	88.9–94.8
Negative predictive value	90.1	87.1–92.5	96.5	94.8–97.7
Diagnostic accuracy	74.1	71.2–76.6	95.2	93.6–96.4

CDC, Centers for Disease Control and Prevention method; CI, confidence interval; SC, mSuperCARBA agar method.

method as well. Garcia-Quintanilla et al. [21] in 2017 demonstrated sensitivity and specificity of 100% for this medium when they tested 113 *Enterobacteriaceae* strains, including KPC, NDM, VIM, IMP and even OXA-48 compared to noncommercial Supercarba agar. Nonetheless, these studies mostly used strains previously characterized, not patient samples [20,22]. The lower sensitivity obtained in this study could be due to the use of the same swab for the two procedures. In addition, it has been previously reported that enrichment of the sample in broth, conducted in the CDC method, increases the sensitivity of methodologies [23].

We found that the sensitivity of the CDC method was relatively high (84.7%) despite its inability to detect NDM carbapenemase and the difficulty in detecting more than one CPE in the same sample (kappa index 0). The high sensitivity is probably due to the predominance of KPC carbapenemase (94.24%) in the analysed samples. This is in agreement with other authors reporting 98.8% sensitivities when processing rectal swab samples with KPC carbapenemase [24]. However, a meta-analysis published in 2016 shows a lack of sensitivity of this method compared to other commercial agars for the

detection of CPE in surveillance rectal swab samples [4]. Nonetheless, this method is still routinely used because of its low costs [25].

The literature describes specificities ranging from 49.6% to 100% [26,27] for the CDC method. The specificity reported by us was mainly caused for the high number of false-positive results obtained; the majority (96.96%) were isolates that were not classified as CRE according to our definition (resistance to imipenem and meropenem). However, we do not know the mechanism of resistance implicit in these isolates and their susceptibility to ertapenem, which is a limitation of our study. However, there is a small chance for these isolates to harbour an OXA-48 like carbapenemase, which confers lower minimum inhibitory concentrations to carbapenems because it has not been reported in our country so far. It has been also described that the presence of OXA-48 carbapenemase is uncommon in strains with susceptibility to imipenem [28]. However, it has been shown that SC has the best sensitivity for the detection of OXA-48 [21].

The specificity of SC was 96.21%, which was better than the CDC method as well as other methods described in other studies that used rectal swabs [10]. However, it is important to emphasize that the specificity will vary depending on local epidemiology of presence of ESBL and AmpC enzymes as the mechanism causing carbapenem resistance. In our study, the ESBL with porin mutations (70%, $n = 10$) predominated in those CREs that did not produce carbapenemases.

Comparison of the sensitivity and specificity between different studies is difficult because of the limitations of each study, the differences in methods and the lack of a reference method. Additionally, the predominant CPE in swabs will depend on local epidemiology, which makes it difficult to extrapolate the results to other contexts.

TABLE 6. Cost analysis

Method	Minutes	SC				CDC				
		Unitary value (US\$)	Positive (n = 292)	Negative (n = 634)	Falsely positive, CSE (n = 10)	Falsely positive, CRE non-PC (n = 14)	Positive (n = 269)	Negative (n = 483)	Falsely positive, CSE (n = 192)	Falsely positive, CRE non-PC (n = 6)
CDC, broth–MacConkey	12	0.58					\$156.02	\$280.14	\$111.36	\$3.48
Chromogenic agar	1	3.62	\$1057.04	\$2295.08	\$36.20	\$50.68				
API 20E identification system	3	14.50	\$4234.00		\$145.00	\$203.00	\$3900.50		\$2784.00	\$87.00
Susceptibility test, imipenem/meropenem	1	0.59	\$172.28		\$5.90	\$8.26	\$158.71		\$113.28	\$3.54
Phenotypic confirmatory method (boronic acid disc/EDTA disc)	1	0.71	\$207.32			\$9.94	\$190.99			\$4.26
Hodge test	2	0.15	\$43.80			\$2.10	\$40.35			\$0.90
Carbapenemase inactivation method (incubation time excluded)	2	0.28				\$3.92				\$1.68
Hodge test with cloxacillin	5	0.20				\$2.80				\$1.20
Total			\$5714.44	\$2295.08	\$187.10	\$280.70	\$4446.57	\$280.14	\$3008.64	\$102.06
Total cost of supplies			\$8477.20				\$7866.21			
Technologist time		\$0.13	\$513.40				\$2441.71			
Total cost			\$8990.72				\$10307.92			

CDC, Centers for Disease Control and Prevention method; CRE, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; CSE, carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae*; SC, CHROMagar mSuperCARBA agar method.

We had good agreement (kappa index 0.79) for the detection of CPE and an almost perfect agreement for the detection of KPC carbapenemase (kappa index 0.87). The discordant results in 27 samples could be because the detection limit of the SC method is 10 CFU/mL [20] lower than the CDC method. There was no agreement observed for the detection of NDM carbapenemase (kappa index 0).

The SC method had the better predictive values (PPV 92.4%, NPV 96.5%) than the CDC method (PPV 57%, NPV 90.1%). Although the CDC method is described as being more affordable [25], its low PPV causes additional technical work in order to confirm suspicious isolates, which makes this protocol more expensive. As a consequence, it increases the workload in the laboratory, and lengthens the turnaround time and the time the patient needs to stay in isolation [25,29].

Ecuador imports laboratory reagents, which increases the costs of testing and limits the options, with laboratories often having to resort to less specific and noncommercial tests. In this study, we used the MHT, which has moderate specificity but is cheap; the Clinical and Laboratory Standards Institute recommended it until 2017 [14,30,31]. The selection of cheaper tests is a common practice in our country. However, we suggest that the tests for CPE surveillance should be based on local epidemiologic data after performing cost analysis.

In conclusion, the SC method is a robust, useful and affordable laboratory diagnostic method for CPE detection in surveillance programmes in regions with high CPE prevalence, particularly when several CPEs are circulating.

Acknowledgements

Supported by grants from Universidad Católica Santiago de Guayaquil (SINDE-0875-2015) and Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública 'Dr Leopoldo Izquieta Pérez' (PIS ID+I-24-2015). We thank H. Lopardo (Prof Consulto Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Consultor Honorario del Hospital de Pediatría Prof Dr. Juan P Garrahan), G. Esparza (Programa de aseguramiento de calidad PROASECAL. Profesor de microbiología, Universidad Javeriana), M. Cartelle Gestal (Harvill Lab, Center for vaccine and immunology, University of Georgia), O. Muñoz (One Health Center of Excellence and Department of Environment and Global Health, University of Florida) and J. P. Aguilar (Department of Biological Sciences, Ohio University) for critical review and CHROMagar mSuperCARBA for providing the SC used in this study.

Conflict of interest

Ca. Soria Segarra is a speaker for Merck and 3M. The other authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3:15–21.
- [2] Tzouveleki L, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:682–707.
- [3] Fraenkel-Wandel Y, Raveh-Brawer D, Wiener-Well Y, Yinnon AM, Assous MV. Mortality due to *bla*_{KPC} *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1083–7.
- [4] Grundmann H, Glasner C, Albigier B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:153–63.
- [5] Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol* 2017;17:101.
- [6] Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:350–4.
- [7] Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15:277–97.
- [8] Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl. 1):1–55.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. Facility guidance for control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). November 2015 update—CRE toolkit. Available at: <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf>.
- [10] Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:1–27.
- [11] Department of Health and Human Services; Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs. Available at: https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf.
- [12] Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:296–300.
- [13] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SuperCarba, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:214–7.
- [14] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. Twenty-sixth informational supplement. Document M100-S26.
- [15] WHONET. Protocolo de trabajo Red WHONET Argentina. 2014. revised 2015. Available at: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>.
- [16] Pierce VM, Simmer PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2017;55:2321–33.

- [17] Poiriel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119–23.
- [18] Ministerio relaciones laborales. Registro oficial. 2012. Available at: <http://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08/A-0021-2012-Escala-20-gradados.pdf>.
- [19] Cerda Lorca J, Villarroel Del PL. Evaluation of the interobserver concordance in pediatric research: the kappa coefficient. *Rev Chil Pediatr* 2008;79:54–8.
- [20] García-Fernández S, Hernández-García M, Valverde A, Ruiz-Garajosa P, Morosini MI, Cantón R. CHROMagar mSuperCARBA performance in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates characterized at molecular level and routine surveillance rectal swab specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87:207–9.
- [21] García-Quintanilla M, Poiriel L, Nordmann P. CHROMagar mSuperCARBA and RAPIDEC® Carba NP test for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90:77–80.
- [22] Amar M, Shalom O, Adler A. Comparative evaluation of a new commercial media, the CHROMagar™ mSuperCARBA™, for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88:20–2.
- [23] Heinrichs A, Nonhoff C, Roisin S, de Mendonça R, Adam AS, Dodémont M, et al. Comparison of two chromogenic media and enrichment broth for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* on screening rectal swabs from hospitalized patients. *J Med Microbiol* 2016;65:438–41.
- [24] Papadimitriou-Oliveris M, Bartzavali C, Christofidou M, Bereksi N, Hey J, Zambardi G, et al. Performance of chromID® CARBA medium for carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:35–40.
- [25] Mathers AJ, Poulter M, Dirks D, Carroll J, Sifri CD, Hazen KC. Clinical microbiology costs for methods of active surveillance for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014;35:350–5.
- [26] Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J Clin Microbiol* 2010;48:836–41.
- [27] Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, et al. Rapid and direct real-time detection of *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* from surveillance samples. *J Clin Microbiol* 2013;51:3609–15.
- [28] Karlowsky JA, Lob SH, Kzmierczak KM, Badal RE, Young K, Motyl MR, et al. *In vitro* activity of imipenem against *Enterobacteriaceae* isolates collected by the SMART Global Surveillance Program from 2004 to 2014. *J Clin Microbiol* 2017;55:1638–49.
- [29] Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who, when, and how? *Virulence* 2017;8:417–26.
- [30] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. Twenty-seventh informational supplement. Document M100-S27.
- [31] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2018. Twenty-eighth informational supplement. Document M100-S28. Wayne, PA.
- [32] Nordmann P, Girlich D, Poiriel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* using a novel screening medium. *J Clin Microbiol* 2012;50:2761–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.06477-11>. <https://jcm.asm.org/content/50/8/2761.long>.



Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units in Ecuador: Results from a multicenter study

Carmen Soria-Segarra^{a,e,*,1,2}, Claudia Soria-Segarra^{b,c,f,*,*,1}, Angel Catagua-González^d, José Gutiérrez-Fernández^e

^a Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Santiago de Guayaquil, PC, EC090615, Ecuador

^b Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, "Dr. Leopoldo Izquierda Pérez", Guayaquil, PC, EC090510, Ecuador

^c Laboratorio Clínico Sasegar, Guayaquil, EC090308, Ecuador

^d Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, EC090903, Ecuador

^e Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada-IBS, Granada, PC, 18010, Spain

^f Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil, PC, EC090112, Ecuador



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2018

Received in revised form 31 May 2019

Accepted 16 June 2019

Keywords:

Carbapenemase

Intensive care units

Prevalence

ABSTRACT

Introduction: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are of global concern due to the growing number of patients who acquire them and their association with high mortality rates. Although there are some reports of endemicity in developing countries, little is known about this microorganism, and Ecuador is not an exception. Subsequently, our objective was to clinically and molecularly characterize carbapenemase producing-*Enterobacteriaceae* in intensive care units (ICUs) in Guayaquil, Ecuador.

Methods: To determine CPE colonization, we obtained perineal and inguinal swabs from patients admitted to seven intensive-care adult units in Guayaquil-Ecuador between February and April 2016. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) laboratory protocol and chromogenic agar were used to process the cultures. Polymerase chain reaction was used to confirm carbapenemase production. Genotypic analysis was performed by Multilocus Sequence Typing (MLST) and pulsed-field electrophoresis (PFGE). Demographic and clinical data were obtained from the electronic charts and patient's relatives.

Results: Six hundred seventy-seven patients were included in the study, of whom 255 were colonized/infected by CPE. The CPE prevalence was 37.67%. Previous use of antimicrobials, use of invasive procedures and being burned at admission were associated with CPE. The most frequent infection was found after a surgical procedure. *Klebsiella pneumoniae* (n=249) was the predominant microorganism harbouring bla_{KPC}, followed by *Enterobacter cloacae* (n=8), *Klebsiella aerogenes* (n=4), *Escherichia coli* (n=4) and *Klebsiella oxytoca* (n=1). NDM was present in *Proteus mirabilis*. The strains were distributed in 19 sequence types (ST), and 10 were not reported previously in Ecuador. ST 258 was the sequence type isolated most frequently.

Conclusion: This study shows a high prevalence of CPE in ICUs, particularly *K. pneumoniae* bla_{KPC} ST 258. The identification of KPC alleles may help to understand the routes of dissemination and control spread within ICUs in Guayaquil, Ecuador.

© 2019 Published by Elsevier Limited on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Background

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are microorganisms resistant to the last resort antimicrobials for managing critically ill patients, and they have emerged as a cause of global epidemics worldwide. Therefore, the World Health Organization (WHO) has included them in a priority list for developing novel antimicrobial treatments [1].

* Corresponding author at: Av. Pdte, Carlos Julio Arosemena Tola, Guayaquil, EC090615, Ecuador.

** Corresponding author.

E-mail addresses: carmen.soria01@cu.usg.edu.ec (C. Soria-Segarra),

claudia.sorias@ug.edu.ec (C. Soria-Segarra).

¹ These authors contribute equally to the manuscript.

² Permanent address: Portofino MZ 210, Number 18, Guayaquil, EC090902, Ecuador.

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.013>

1876-0341/© 2019 Published by Elsevier Limited on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

CPE have emerged as a substantial cause of morbidity and mortality (50%) because of their limited therapeutic options [2,3], which highlights the importance of preventing their transmission in healthcare facilities [4,5]. A large variety of carbapenemases have been identified in this family, belonging to three classes of β -lactamases: The most clinically significant are KPC, IMP, VIM, NDM, and OXA-48. Most of the carbapenemases were identified in *K. pneumoniae* isolates that caused nosocomial outbreaks [6].

The CPE prevalence varies according to region and the carbapenemase type studied. Greece, Italy, and Israel are considered endemic areas for carbapenemase producing-*Klebsiella pneumoniae* (KPC), with incidences exceeding 30% [7,8]. India has a prevalence of 50% for NDM [9]. In South America, Colombia, Argentina, and Brazil have reported endemic KPC. Turkey and other Mediterranean countries have reported the OXA-48 variant as the most predominant in the region [8,10].

The National Surveillance Antimicrobial Resistance Program in Ecuador reported imipenem and meropenem resistance of approximately 1.4 and 2% in *Escherichia coli* and 20% in *K. pneumoniae* in blood samples [11].

The vast majority of these isolates are characterized genetically as multilocus sequence type 258 (ST258) and are presumed to be clonally related by descent [12]. To our knowledge, there is scarce information about the behaviour of these microorganisms studied systematically in intensive care units (ICUs) in the country; subsequently, our objective was to clinically and molecularly characterize carbapenemase producing-*Enterobacteriaceae* in ICUs in Guayaquil, Ecuador.

Material and methods

Study population

This observational prospective study was carried out in seven intensive-care adult units in Guayaquil, a city with a population of 4.5 million of inhabitants, located in Ecuador. The study period was between February and April of 2016. For surveillance purposes, inguinal and perineal swabs were performed weekly for all patients in the ICUs. The first sample was obtained 48 h after entry and on admission for those who reported previous hospitalization.

Data collection

The demographic and clinical data were collected through electronic records and the patient's relatives. The measured variables were age, sex, ICU entry date, length of the previous hospital stay, comorbidities, diagnosis on admission, acute physiology and chronic health evaluation (APACHE II) score, and the diagnosis of healthcare-associated infections (HAIs). The HAI definition was adopted from the Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta (CDC) [13]. Invasive infections were determined when an organism was isolated from a normally sterile body fluid or deep tissue [14].

Microbiological cultures

We processed samples by the CDC method, according to a previously described methodology [15], using CHROMagar mSuper CARBA™ agar (CHROMagar™, France).

All colonies suspected to harbour CPE were identified with the Api 20 E system™ (BioMérieux, France). An antimicrobial susceptibility test was performed with the disk diffusion method with 10 μ g imipenem (IMP) and 10 μ g meropenem (MER) (Liofilchem, Italy) following the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [16]. Isolates showing inhibition zones \leq 22 mm were considered carbapenem-resistant [17].

We tested all carbapenem resistance *Enterobacteriaceae* (CRE) with a microbiological inactivation method (mMIC) [18] and combined-disk tests of carbapenems with/without phenylboronic acid (PBA) and EDTA (Liofilchem, Italy) [19]. Carbapenemase production was confirmed phenotypically if the mMIC and combined-disk test with PBA or EDTA were positive.

CRE with an mMIC and/or a combined-disk negative test were also tested with a modified Hodge test in Mueller Hinton agar (Becton Dickinson, UK), which was supplemented with cloxacillin sodium salt (250 mg/100 ml) (MHT-C) (Sigma Aldrich) and a meropenem disk (10 μ g) [20]. We defined CRE non-producing carbapenemase (CRE non-PC) as the mCIM and MHT-C negatives isolates. These isolates were also studied for extended spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC production. An ESBL phenotype was defined in *Enterobacteriaceae* with a synergistic effect observed between cefepime (FEP 30 μ g), cefotaxime (CTX 30 μ g) or ceftazidime (CAZ 30 μ g) disks and an amoxicillin/clavulanic acid disk (CLAV 20 μ g/10 μ g), which was placed 15 mm from centre to centre of CAZ, FEP and CTX [19]. An AmpC phenotype was defined as CRE non-PC isolates with a synergistic effect observed with the double disk method with ertapenem (ERT 10 μ g) and phenylboronic acid disks (300 μ g) (PBA) (Kirby Bauer method with ERT and APB disks placed 15 mm from centre to centre in Mueller Hinton agar supplemented with 250 mg/ml cloxacillin sodium salt).

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 were used as quality control strains.

Every hospital's laboratory processed their clinical samples according to conventional microbiological protocols, and the strains were studied phenotypically for carbapenemase production.

Control measures

All carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*-positive patients were placed in contact precautions isolation according to the facility protocol. A 4% chlorhexidine soap was used for their daily hygiene, and no staff cohorting was performed. Healthcare personnel caring for patients on Contact Precautions wore a gown and gloves for all interactions that involved contact with the patient or potentially contaminated areas in the patient's environment. Staff working in the affected units received education seminars and attended workshops on hand hygiene and patient isolation. The units were cleaned thoroughly with two products that were also used for daily disinfection and contained potassium peroxy-monosulfate.

Molecular carbapenemase identification

The presence of the *bla*KPC, *bla*OXA-48, *bla*VIM, *bla*IMP and *bla*NDM genes were molecularly confirmed in all CPE through a multiplex polymerase chain reaction (PCR) [21].

Clonal relatedness and diversity analysis

The genetic relatedness between *K. pneumoniae bla*KPC was determined by ERIC-PCR according to the reaction conditions previously described [22]. No other carbapenemase was studied.

Next, a strain from each electrophoretic pattern obtained with ERIC-PCR was analysed with pulsed-field electrophoresis (PFGE) and the restriction enzyme XbaI (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). PFGE was performed with a (Bio-Rad) CHEF DR III System at 6V/cm, 14 °C, 120 °C included angle, with an initial switching time of 6.76 s to a final switch time of 35.38 s, 5 to 15 s for 18 h. The clonal analysis was performed with BioNumerics software version 6.1 (Applied Biosys-

tem), and the analysis of similarity was performed with the Dice coefficient. Related dendrograms were generated with the UPGMA method (optimization parameter 1.5 and tolerance 2% for ERIC-PCR and 1.8% for PFGE). The strains with similarity >= 80% were assigned to the same group in ERIC-PCR and PFGE.

Determination of KPC variant

Purification of the blaKPC PCR products was performed following the manufacturer's instructions (BigDye[®] X terminator[™] Purification kit Protocol, Applied Biosystem). Amplicons were sequenced by MACROGEN INC, Korea (http://www.macrogen.com/esp/service_sequ02.html). Sequence alignment was performed with MEGA 6 software and analysed with the "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). We included two isolates from ST 258, ST 512 and ST 45. The other ST isolates were not further analysed to determine the KPC variant.

Multilocus sequence typing

The sequence typing (ST) of the *K. pneumoniae* isolates was determined by Multilocus sequence typing (MLST) using a previously described protocol (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). The ST assignment was made with the *Klebsiella* MLST database (<http://bigsd.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Statistical analysis

Data analysis was performed using Software R version 3.5.0. The association between the CRE patients and the categorical variables was first examined using a Chi-square test. When expected cell sizes are lower than 5, we circumvent the problem using a Fisher's exact test. For both tests we set a significant level of $\alpha = 0.05$. For the first model, we studied 95% confident intervals for the odd-ratios (ORs) while for the second model, we considered a p value lower than $\alpha (0.05)$ to be statistically significant.

Ethical approval

The study was approved by the Ethics Committee of the Catholic University of Santiago de Guayaquil. An informed consent form was signed by each patient or their relative.

Results

CPE prevalence and patient characteristic

The present study included 148 intensive care beds from 4 private and 3 public hospitals. Three of the hospitals did not have

a microbiology laboratory, therefore their microbiological samples were processed in laboratories outside the health-care unit. Detailed information about participating hospitals is shown in Table 1.

In the study period, 677 patients were enrolled. Two hundred and fifty-five patients (37.67%, 255/677) had at least one carbapenemase producing-*Enterobacteriaceae*. Two hundred eight patients were colonized by CPE and forty-seven (18.43%) had at least one HAI. Thirty-one patients had an invasive infection and four patients had more than one infection. The distribution of the HAIs were: surgical site infections (n = 14, 26.92%), ventilator associated pneumoniae (n = 14, 26.92%), catheter-associated urinary tract infections (n = 6, 11.54%), primary bloodstream infections (n = 5, 9.62%), pressure ulcer infections (n = 4, 7.69%), burned wound infections (n = 4, 7.69%), skin and soft tissue infections (n = 3, 5.77%) and one case of healthcare associated pneumonia (1.92%). Thirty-three patients (70%) were colonized prior to being infected.

The median time from admission to CPE detection was 15.36 days (2–191 days). Table 2 shows the patient clinical characteristics. Chronic heart failure (p=0.01) and burns (p=0.00) were significantly associated with CPE. Other admission diagnostics did not show statistical significance. Burns and connective tissue diseases had higher OR values (4.31 and 2.58, respectively). Comorbidities were also not associated with the acquisition of CPE (p>0.05), with the exception of connective tissue diseases (p=0.02) and paraplegia, hemiplegia or quadriplegia (p=0.04). The risk factors for acquiring CPE were mechanical ventilation (OR: 3.07, IC 95% 2.11–4.48, p=0.0), central venous catheter (OR: 2.76, IC 95% 3.07, p=0.0), urinary catheter (OR: 4.03, IC 95% 1.52–6.19, p=0.0), gastrostomy (OR: 2.41, IC 95% 2.41, p=0.0), tracheostomy (OR: 5.09, IC 95% 3.47–7.48, p=0.0), nasogastric tube (OR: 2.57, IC 95% 1.76–3.76, p=0.0), haemodialysis catheter (OR: 2.01, IC 95% 1.2–3.4, p=0.0), surgery (OR: 1.82, IC 95% 1.33–2.49, p=0.0) and parenteral nutrition (OR 2.05, IC 95% 1.47–2.86, p=0.0). Approximately 43.57% of the population received vancomycin, 37.07% carbapenems, 30.43% piperacillin/tazobactam, 15.21% cephalosporins, 13.45% fluoroquinolones, 2.66% aminoglycosides, 4.60% macrolides and 0.74% aztreonam. Carbapenems (OR: 3.06, IC 95% 2.2–4.24, p=0.0), vancomycin (OR: 3.57, IC 95% 2.58–4.94, p=0.0) and macrolides (OR: 2.75, IC 95% 1.31–5.77, p=0.0) were associated with CPE. Ampicillin-sulbactam (OR: 1.17, IC 95% 0.83–1.65, p=0.37), cephalosporin (OR: 0.96, IC 95% 0.62–1.48, p=0.35), fluoroquinolones (OR: 0.88, IC 95% 0.56–1.4, p=0.59), aminoglycoside (OR: 0.47, IC 95% 0.15–0.17, p=0.17), piperacillin-tazobactam (OR: 2.75, IC 95% 1.24, p=0.2) and aztreonam (OR: 0.41, IC 95% 0.05–3.7, p=0.41) were the antimicrobial agents that do not show any statistical significance.

Clinical conditions associated with colonization and infection are shown in Table 3. Tracheostomy (OR 0.4, IC 95% 0.21–0.76, p=0.0), surgery (OR: 0.16, IC 95% 0.06–0.38, p=0.0) and parenteral nutrition (OR: 0.47, IC 95% 0.25–0.9, p=0.02) were associated with HAIs.

Table 1
Prevalence of CPE and characteristics of participating hospitals.

Hospital code	Attention level	Type of attention	No hospital bed	Hospitalization days	No hospital discharges	No ICUs beds	Microbiology laboratory	No of CPE (%)
1	Third	Private	101	27.781	7.656	15	Yes	17 (6.7%)
2	Third	Public	117	17.313	2.068	4	Yes	5 (2.0%)
3	Third	Public	598	262.181	24.205	85	Yes	181 (71.0%)
4	Second	Private	18	7.583	2.464	8	No	6 (2.4%)
5	Third	Public	126	46.36	9.583	18	No	12 (4.7%)
6	Second	Private	34	7.627	2.018	9	No	24 (9.4%)
7	Third	Private	101	25.28	5.57	9	Yes	10 (3.9%)
Total			1095	394.125	53.564	148		255

CPE: carbapenemase producing-*Enterobacteriaceae*; ICU: intensive care unit; Bla: β -Lactamase; KPC: *K. pneumoniae* carbapenemase.

Table 2
Patient characteristics in ICUs in Guayaquil-Ecuador.

Variables	CPE positive (n = 255)	CPE negative (n = 422)	OR (95% IC)	p value
Sex (M)	155 (60.78%)	241 (57.11%)		0.34701
Mean age (years) (\pm SD)	53.68 (\pm 19.81)	55.11 (\pm 20.52)		0.18506
APACHE II (\pm SD)	16.16 (\pm 8.42)	13.42 (\pm 8.61)		0.00003
Transfer	117 (45.88%)	126 (29.86%)	1.99 (1.44–2.75)	0.00003
ICU stay (\pm SD)	25.15 (\pm 25.08)	11.78 (\pm 10.05)		0.00000
Length of hospital stay (\pm SD)	34.33 (\pm 26.8)	20.45 (\pm 23.01)		0.00000
Mortality	95 (37.25%)	106 (25.12%)	1.77 (1.27–2.48)	0.00081
Admission diagnostic				
Renal failure	32 (12.55%)	40 (9.48%)	1.37 (0.84–2.24)	0.20925
Malignancy	4 (1.57%)	13 (3.08%)	0.5 (0.16–1.55)	0.22310
Diabetes mellitus	11 (4.31%)	21 (4.98%)	0.86 (0.41–1.82)	0.69384
Chronic heart failure	31 (12.16%)	82 (19.43%)	0.57 (0.37–0.9)	0.01391
Neurological disease	61 (23.92%)	82 (19.43%)	1.3 (0.9–1.9)	0.16546
Chronic lung disease	3 (1.18%)	13 (3.08%)	0.37 (0.11–1.33)	0.11403
Connective tissue disease	3 (1.18%)	2 (0.47%)	2.5 (0.41–15.06)	0.30091
Burn	19 (7.45%)	8 (1.9%)	4.17 (1.8–9.66)	0.00034
Immunosuppression				
HIV	5 (1.96%)	14 (3.32%)	0.58 (0.21–1.64)	0.30035
Use of steroids (>20 mg prednisone/15 days)	6 (2.35%)	5 (1.18%)	2.01 (0.61–6.65)	0.24408
Solid Organ Transplant	1 (0.39%)	1 (0.24%)	1.66 (0.1–26.62)	0.71847

APACHE II: acute physiology and chronic health evaluation II score, CPE: carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, ICU: intensive care unit, OR: odds ratio.**Table 3**
Clinical conditions associated with CPE infection in ICUs in Guayaquil-Ecuador.

Variables	Colonized (n = 255)	Infected (n = 422)	OR (95% IC)	P value
Sex (M)	123 (59.13%)	32 (68.09%)		0.25634
Mean age (years)	54.34 \pm 19.98	50.74 \pm 18.96		0.18506
APACHE II	16.05 \pm 8.38	16.64 \pm 8.68		0.00003
Transfer	90 (43.27%)	27 (57.45%)	0.56 (0.3–1.07)	0.07813
ICU stay (\pm SD)	24.35 \pm 26.66	28.72 \pm 16.08		0.00000
Length of hospital stay (\pm SD)	34.03 \pm 28.3	35.64 \pm 19		0.00000
Mortality	74 (35.58%)	21 (44.68%)	0.68 (0.36–1.3)	0.24366
Admission diagnostic				
Chronic heart failure	31 (12.16%)	82 (19.43%)	0.57 (0.37–0.9)	0.01391
Neurological disease	61 (23.92%)	82 (19.43%)	1.3 (0.9–1.9)	0.16546
Burn	19 (7.45%)	8 (1.9%)	4.17 (1.8–9.66)	0.00034

APACHE II: acute physiology and chronic health evaluation II score, CPE: carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, ICU: intensive care unit, OR: odds ratio.

CPE was found in all the participating hospitals. The presence of colonization/infection was significantly higher in public hospitals than in private ones ($p < 0.000$), as well as in tertiary hospitals ($p < 0.000$). The prevalence of CPE per unit is shown in Table 1.

Bacterial isolates and carbapenemase characterization

A total of 1146 inguinal and perineal swabs (range 1–6 per patient; median 2) were obtained. SuperCarba Chromoagar and the CDC method were both used for microbiological cultures of 950 specimens (605 patients). One hundred and sixty-six samples used the CDC method as the technique for culture processing due to economic limitations. Carbapenemase production was the most frequent mechanism of carbapenem resistance ($n = 255$), and CRE-non-producing carbapenemase (CP) were isolated in 27 patients.

The predominant carbapenemase type identified was KPC (91.72%), followed by NDM (2.65%). None OXA-48, IMP or VIM were found.

K. pneumoniae was the predominant microorganism ($n = 249$) harbouring bla_{KPC} , followed by *E. cloacae* ($n = 8$), *K. aerogenes* (formerly *E. aerogenes*) ($n = 4$), *E. coli* ($n = 4$) and *K. oxytoca* ($n = 1$). NDM was present only in *P. mirabilis*. Table 4 shows the molecular mechanism of carbapenem resistance and the carbapenemase genotype detected.

Fifty-seven electrophoretic patterns were distributed in twenty-two clusters from 174 isolates of *K. pneumoniae* bla_{KPC} by ERIC-PCR

Table 4
Resistance mechanism of CPE and CRE non-PC.

Species	CPE			CRE non-PC	
	Carbapenemase genotype			ESBL + porin mutations	AmpC + porin mutations
	KPC	NDM	Total		
<i>K. pneumoniae</i>	249	0	249	9	4
<i>K. aerogenes</i>	4	0	4	0	1
<i>K. oxytoca</i>	1	0	1	0	0
<i>E. coli</i>	4	0	4	2	0
<i>E. cloacae</i>	8	0	8	1	1
<i>P. mirabilis</i>	0	8	8	0	0

CPE: carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, CRE non-PC: carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* non-producing carbapenemase, KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, NDM: New Delhi metallo- β -lactamase, ESBL: extended spectrum β -lactamase.

(Fig. 1). PFGE identified seven clusters among 108 isolates analysed (including 57 patterns from ERIC-PCR and 51 isolates not included in ERIC-PCR). Two PFGE clusters were predominantly detected by using a cut-off of 80% similarity in the hospital units studied. Cluster A ($n = 45$; 17 subtypes) and cluster B ($n = 40$; 7 subtypes) included 41.67% and 37.03% of the isolates, respectively. The rest of the isolates were distributed in cluster C ($n = 1$; 2 subtypes), D ($n = 15$; 6 subtypes), F ($n = 1$), G ($n = 2$) and J ($n = 4$; 2 subtypes) (Fig. 2). Detailed data of the cluster subtypes are presented in Fig. 3.

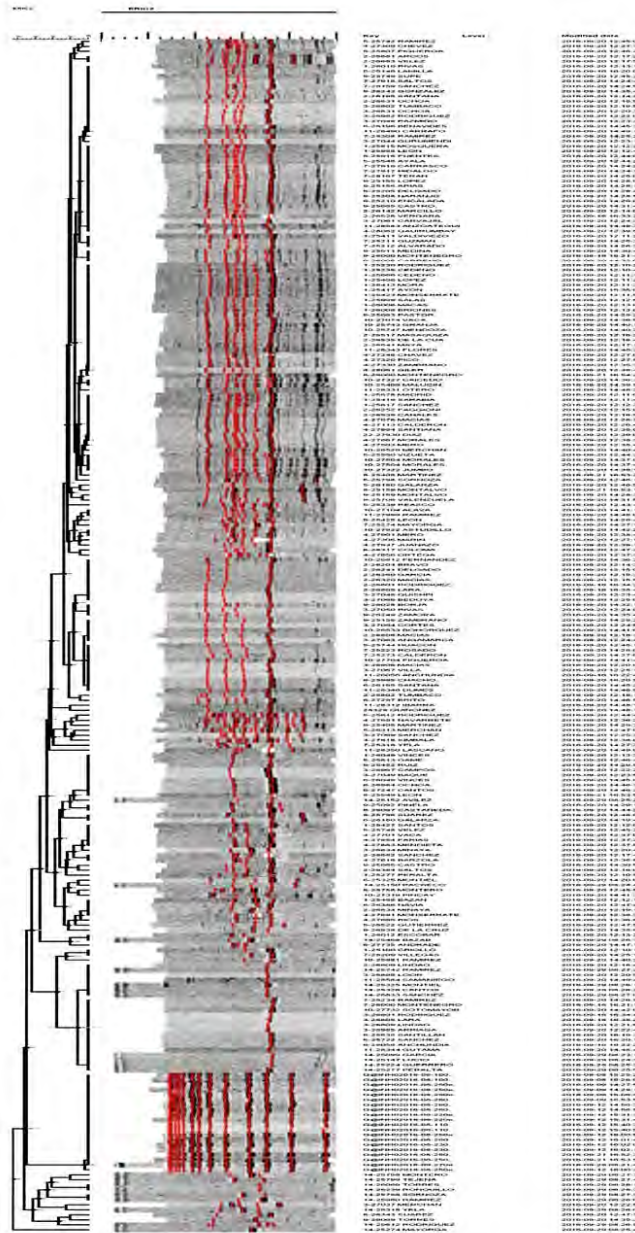


Fig. 1. Dendrogram of ERIC-PCR results for all *K. pneumoniae* isolates. The scale at the top represents the genetic distance between isolates.

Twenty-two sequence types were obtained from 37 isolates studied. Sequence type 258 (n = 5) was the predominant ST found. Other STs were ST 512 (n = 3) and ST 45 (n = 3). Sequence type 25, 35, 39, and 307 had two isolates each. Eighteen isolates belonged

to ST 1, 34, 36, 37, 42, 54, 70, 151, 231, 526, 628, 659 and ST 1040, each ST with one isolate. Four *K. pneumoniae* *bla*_{KPC} were not typed according to the MLST database, therefore more studies should be performed. *bla*_{KPC-2} was present in ST-258, ST512 and ST 45. Fur-

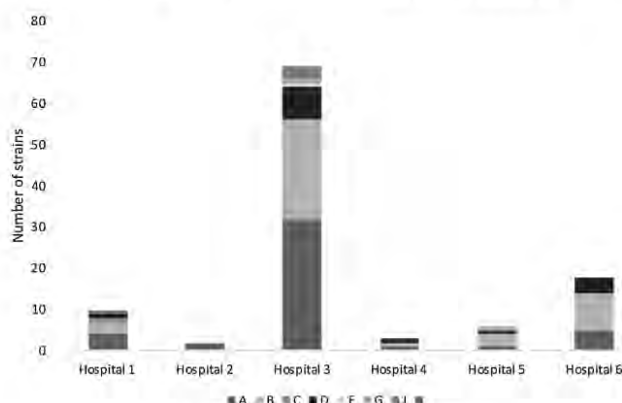


Fig. 2. Pulse-field electrophoresis patterns distribution.

ther studies in isolates harbouring *bla*_{NDM} and in the other sequence types were not performed because of economical limitations.

Discussion

CPE constitute a public health threat worldwide due to their high levels of antimicrobial resistance associated with high mortality rates [4]. In Ecuador, the first infection caused by *K. pneumoniae* with carbapenemase type KPC-2 was reported in 2013 [23], and since then, there has been rapid dissemination of the bacteria around the country [11]. During the study period, the CPE prevalence was high (37.7%). Furthermore, the presence of CPE was associated with higher morbidity and mortality rates. In our study, *K. pneumoniae* *bla*_{KPC} was the carbapenemase most frequently isolated (91.72%).

CPE was associated with prior exposure to carbapenems, vancomycin, and macrolides, as well as the presence of invasive devices and surgery. At admission, burn patients had a significant risk for acquiring CPE.

The CPE prevalence in our study was much higher than those published in developed countries [8,24] and Latin American countries, such as Argentina or Brazil, accounting for a 25% prevalence [10,25]. It is important to note that our work focused on ICUs, where the prevalence is expected to be higher than in other units because of the complexity and higher APACHE II scores of the patients admitted.

This study showed higher mortality rates in CPE colonized/infected patients than in CPE negative patients but did not demonstrate differences between CPE colonized and infected patients. These results differ from those reported by other authors, where the length of the ICU stay was considered an independent risk factor, but not KPC colonization [26,27]. Colonization is a well-known risk factor for a worse outcome; a study performed in Greek intensive care units showed that CPE colonized patients are at a 1.79 times more significant risk of dying than non-colonized patients [28]. Active carriers monitoring has been successfully implemented in multifactorial strategies aiming to limit the spread of CPE [29], and it should be considered as part of a coordinated regional effort to reduce endemic CPE.

Previous studies have demonstrated an association between KPC-producing *K. pneumoniae* infection and the length of hospitalization, use of central venous catheters, ICU stay, and exposure to specific broad-spectrum antimicrobial agents, such as carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, and penicillin, as well as

having surgery [30]. Macrolides and vancomycin have not been considered risk factors in other studies, and to our knowledge, this study is the first that shows an association between burns and CPE. These patients usually have long term stays and sometimes required multiple procedures including surgeries, which could have increased the risk of infection by KPC. Surgical site infections, considered the most important healthcare-associated infections, had the highest occurrence, suggesting that hospitals should emphasize hand hygiene strategies, sterilization of surgical instruments and the disinfection of operating rooms.

The prevalence of CPE was higher among health-care units in tertiary care clinics than in secondary care clinics, which could be explained by the severity and complexity of the patients admitted in tertiary clinics. There is little information about this topic. Most of the data are related to studies performed in single hospitals rather than in different types of institutions [28–31]. In three of the hospitals included in the study, CPE diagnostics were performed through external laboratories. No hospitals were performing weekly surveillance cultures at the time the study was carried out, and both situations could contribute to the high prevalence rates and result in limited notification of outbreaks.

Several nosocomial outbreaks, most often due to *K. pneumoniae*, have been reported in the United States, Colombia, Argentina, Greece, Italy, Poland, China, and Israel [32]. KPC producing bacteria are considered to be endemic in certain parts of the world, such as Colombia, and are important causes of nosocomial acquired infections [33]. In Ecuador, KPC-2 is the carbapenemase that has been reported most frequently [24,34]. Considering our results, KPC-2 could be endemic in our city. It is important to highlight that OXA had not been detected in our hospitals until this study, in contrast to other countries that reported this carbapenemase as the most frequent [32]. PFGE analysis showed a clonal circulation of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, with an intra- and inter-hospital spread in the intensive care units in Guayaquil city. ST 258 was the most frequent sequence type recognized, and these results are similar to those presented by Benavides et al. in the samples studied from the National Institute of Research in Ecuador and from other regions worldwide [35]. ST 25 has been described previously by Tamayo et al. in our country [36]. It is important to note that ST 512, 45, 35, 307, 1, 34, 36, 37, 42, 54, 70, 151, 231, 526, 628, 695, and 1040 are reported for the first time in Ecuador.

The short follow-up period, as well as the inability to confirm carbapenemase genotype in clinical samples, are the major limitations of this study. Chromogenic agar was used in the majority of

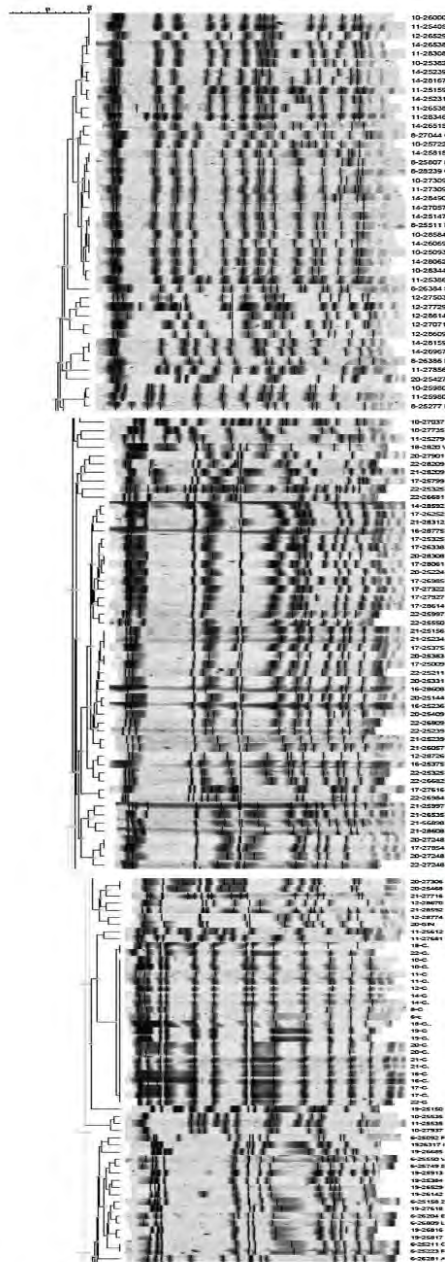


Fig. 3. Dendrogram of the PFEG results for all *K. pneumoniae* isolates. The scale at the top represents the genetic distance between isolates.

the samples, but not all of them, so results for carbapenemases such as OXA-48 or NDM could be misleading due to the low sensitivity of the CDC method [37].

Conclusion

This study shows a high prevalence of CPE in ICUs, particularly *K. pneumoniae* bla_{KPC-2} ST 258. The identification of KPC alleles in the other STs may help explain the routes of dissemination and how to control spread within hospitals in Guayaquil, Ecuador.

Funding

This work was supported by the “Universidad Católica Santiago de Guayaquil” [grant number SINDE-0875-2015, 2015] and the Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” [grant number PIS I+D+I-24-2015, 2015].

Conflict of interest

S. C. is speaker for Merck and 3M. The other authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank all the health personnel of the intensive care units involved and the staff of the microbiology laboratory for their collaboration. We would like to thank Fernando Segarra Palacios (Baptist Medical Center East) and Silvia Hidalgo (Universidad Católica Santiago de Guayaquil) for their technical English assistance and CHROMagar (France) for providing the CHROMagar mSuper Carba used in this study.

References

- [1] Knols BG, Smallegange RC, Tacconelli E, Magrini N, Kahmmerer G, Singh N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Lancet Infect Dis* 2009;9(9):535–6.
- [2] Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis* [Internet] 2006;42(Suppl. 2):S82–9 [Cited 20 September 2018].
- [3] Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(12):1099–106.
- [4] World Health Organization, 76 p. [Cited 29 October 2018]. Available from: Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259462/9789241550178-eng.pdf;jsessionid=2223F274DFE5B3ADBFE1B10DE9B13EE7?sequence=1>.
- [5] Tacconelli E, Cataldo M, Dancer S, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients [Internet]. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl. 1):1–55 [Cited 20 October 2018]. Available from: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60007-0/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60007-0/pdf).
- [6] Tanfous B, Alonso CA, Achour W, Rui-Ripa L, Torres C, BenHassen A. First description of KPC-2-producing *Escherichia coli* and ST15 OXA-48 positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2017;23(3):365–75.
- [7] Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(4):682–707.
- [8] Grundmann H, Glasner C, Albiguer B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 2016;16(1):1–11.
- [9] Khan AU, Maryam I, Zarilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol* 2017;17(1):101.
- [10] Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15(3):277–97.
- [11] Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Quito. [Cited 26 June 2018]. 13 p. Available from: “Leopoldo Izquieta Pérez.” DATOS

RESISTENCIA BACTERIANA ECUADOR–2015 [Internet]. 2015 <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2017/07/1-DATOS-RESISTENCIAS-2015.docx.pdf>.

- [12] Centers for Disease Control and Prevention (US), GA. [Cited 16 June 2016]. 24 p. Available from: CDC/NHSN surveillance definitions for specific types of infections [Internet]. 2014 <http://www.socinorte.com/wp-content/uploads/2014/06/17pscNhsNDef.current.pdf>.
- [13] DeLeo F, Chen L, Porcella S, Martens C, Kobayashi C, Porter A, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci* 2015;111(13):4988–93.
- [14] Schuchat A, Hilger T, Zell E, Farley MM, Reingold A, Harrison L, et al. Active bacterial core surveillance team of the emerging infections program network. *Emerg Infect Dis* 2001;7(1):92–9.
- [15] Centers for Disease Control and Prevention (US), GA. [Cited 4 January 2016]. 6 p. Available from: Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. and *E. Coli* from rectal swabs [Internet]. 2008 https://pdfs.semanticscholar.org/19e7/0fac8709331116ce7f37b962b976849ac5ac.pdf?_ga=2.22579192.2147041804.1548361583-298461747.1548361583.
- [16] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. M02-A11. [PA], vol. 32. Wayne, [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS; 2012.
- [17] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-sixth informational supplement M100-S26. Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS; 2016.
- [18] Pierce VM, Simmer PJ, Lonsway DR, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2017;55(8):2321–33. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01093-17>.
- [19] Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (ANLIS) [Cited 30 October 2017]. 48 p. Available from: “DR. Carlos C. Malbrán” protocolo de trabajo red/WHONET Rosario, AR [Internet]. 2017 <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>.
- [20] Takayama Y, Adachi Y, Nihonyanagi S, Okamoto R. Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J Med Microbiol* 2015;64(7):774–7. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000068>.
- [21] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70(1):119–23.
- [22] Versalovic J, Schenfelder M, De Bruijn F, Lupski J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 1994;4:25–40.
- [23] Zurita J, Alcocer I, Ortega-paredes D, Barba P, Yauri F, et al. Carbapenem-hydrolyzing b-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *J Glob Antimicrob Resist* 2013;1(4):229–30.
- [24] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Georgia [US]. [Cited 20 June 2016]. 22 p. Available from: Facility guidance for control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) [Internet]. 2015 https://www.osha.gov/SLTC/ebola/control_prevention.html.
- [25] Sampaio J, Gales AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol* 2016;47:31–7.
- [26] Papadimitriou-Olivigeris M, Marangos M, Fligou F, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factor for its development and its impact on mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:169–73.
- [27] Debby BD, Ganor O, Yasmin M, et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1811–7.
- [28] Dautzenberg MJD, Wekesa AN, Gniadkowski M, Antoniadou A, Giamarellou H, Petrikos GL, et al. The association between colonization with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit Care Med* 2015;43(6):1170–7.
- [29] Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C. Prospective multicenter study of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain: High in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(6):3406–12.
- [30] da Silva R, Maciel W, Correia F, Godoy C, Rodrigues-Costa F, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch out for surgery. *J Med Microbiol* 2016;65:547–53.
- [31] Lubbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers U, Ducomble T, Eckmank T, et al. Log-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control* 2014;42:376–80.
- [32] Oteo J, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina J, Pérez-Vásquez M, Aracil B, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(12):6344–7.
- [33] Pitout J, Nordmann B, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(10):5873–84.
- [34] Satán C, Tamayo L, Ushiña L, Rivera R, Villavicencia F, Salas S, et al. Carbapenemas en bacilos gram negativos, situación actual en Ecuador. Paper Presented at: IV Encuentro Internacional De Investigación En Enfermedades Infecciosas Y Medicina Tropical 2016.

- [35] Benavides E. Caracterización molecular del gen *mgrB* en *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemas tipo KPC resistente a colistina en aislamientos clínicos [dissertation]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2016, 91 p.
- [36] Tamayo R, Stán C, Villavicencio F, Reyes J, Cárdenas P, Villavicencio E. Secuencias tipo de *K. pneumoniae*-KPC aisladas de muestras invasivas en hospitales del Ecuador. Paper Presented at: Primer Congreso Internacional " Ecología Y Evolución De Enfermedades Transmisibles 2016.
- [37] Soria C, Vera GL, de Lourdes JM, Mendez MA, Cujilema P, Lino MS, et al. Utility of mSuper CarbaTM for surveillance cultures of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *New Microbes New Infect* 2018;26:42–8.



Tracking KPC-3-producing ST-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristics

Carmen Soria-Segarra^{1,2} · Pablo González-Bustos³ · Lorena López-Cerero⁴ · Felipe Fernández-Cuenca⁴ · María Dolores Rojo-Martín⁵ · María Amelia Fernández-Sierra⁶ · José Gutiérrez-Fernández^{5,7}

Received: 15 September 2019 / Accepted: 21 November 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

The objective of this study was to determine clinical-epidemiological characteristics of the patients and the genetic characteristics of carbapenemase KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to sequence type ST258. The eligible study population was all patients with isolates detected between October 2015 and March 2017. Clinical-epidemiological and microbiological data were gathered on risk factors associated with infection by this clone. Antimicrobial susceptibility was determined using MicroScan system and diffusion in agar. Genes encoding carbapenemases were detected using PCR and Sanger sequencing. The sequence type was assigned by MLST, and the genetic relationship among clinical isolates was determined by pulsed field electrophoresis and by analysis of the genetic environment. The study included 23 individuals with isolates of KPC-3/ST258; the mean age was 77 year, and mean stay pre-isolation was 32 days; 81% received empirical antimicrobial treatment. Isolates were only susceptible to gentamicin (CIM ≤ 2 mg/L), tigecycline (CIM ≤ 1 mg/L), and colistin (CIM ≤ 2 mg/L). The isolates belonged to ST258, with five pulse types or subgroups. All isolates showed amplification of KPC, which was identified as KPC-3 variant. Gene *bla*_{KPC-3} was flanked by insertion sequences *Kpn6* and *Kpn7* within *Tn4401* transposon isoform a. We report, for the first time in Spain, an 18-month outbreak by KPC-3-producing ST258 *K. pneumoniae*. Its acquisition was associated with a history of antimicrobial therapy, with three treatment options, and with high mortality. The detection of different pulse types is attributable to different introductions of the clone in our setting, supporting the need for multi-resistant isolate surveillance studies.

Keywords Carbapenemase · *Klebsiella pneumoniae* · Emerging infection

Introduction

Acquisition of carbapenemases-encoding genes by *Enterobacteriales*, especially by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, poses an increasing threat to public health worldwide [1]. Carbapenemase production one of the most frequent carbapenem-resistance mechanisms. These

enzymes can hydrolyze beta-lactam antibiotics, including carbapenems, reducing therapeutic options to treatments of which there is little experience (e.g., ceftazidime/avibactam) or that can be toxic (e.g., colistin). Carbapenemases are usually linked to high-risk clones, whose predominant prototype worldwide is clonal complex 258, which permit their transfer and dissemination in the environment, producing infections with high mortality and morbidity rates [1–6].

In Spain, the first isolates of carbapenemase-producing enterobacteriaceae (CPE) were detected in 2005, with a type other than carbapenemase KPC. Since then there has been a 16-fold increase in the number of isolates of these microorganisms and a fivefold increase in the number of hospitals reporting their presence [4]. Spanish isolates have largely been producers of OXA-48, VIM-1, KPC-2, IMP, and NDM-1 types of carbapenemases, and the most frequent ST associations have been ST11, 15, 405, 16, 147, 340, 437,

Carmen Soria-Segarra and Pablo González-Bustos have contributed equally to the manuscript.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05203-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José Gutiérrez-Fernández
josegf@ugr.es

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 02 December 2019

Springer

101, 464, 846, 13, 384, 388, 512, and 1235 [4, 7, 8]. KPC-3 has been detected in isolates from patients from Spanish hospitals; however, there has been no report on the presence of outbreaks related to clone ST258 in Spain, limiting our knowledge of their clinical and epidemiological impact [9]. In October 2015, our group described the only case reported to date in Spain, in a patient with urinary tract infection [10]. The objective of this study was to determine clinical-epidemiological characteristics of the patients and genetic characteristics of the isolates of *K. pneumoniae* with KPC-3 belonging to clone ST258 (*K. pneumoniae* KPC-3/ST258) from a third level hospital.

Materials and methods

Study population

The study included consecutive patients with *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 isolates detected between October 2015 and March 2017 in the *Virgen de las Nieves* University Hospital of Granada, with a catchment population of 440,000 individuals in the province of Granada (Andalusia region, Southern Spain). Isolates were identified using the MicroScan system (Beckman Coulter, USA) and mass spectrometry (Maldi-Tof®, Bruker Daltonik GmbH, Germany). Resistance was characterized using the MicroScan system with subsequent carbapenemase determination, when applicable, by the NG-Test (Carba, NG Biotech, France). Results were confirmed by the Andalusian Molecular Typing Laboratory of the Spanish PIRASOA Program. Clinical-epidemiological data of the patients and microbiological data of their infection were gathered from their computerized clinical records, followed by analysis of the risk factors for acquisition of infection by this microorganism.

Clinical-epidemiological data

Data were gathered on community/hospital acquisition, total hospital stay, and hospital stay before the detection of *K. pneumoniae* KPC-3/ST258. In our hospital, carriers of these isolates were investigated with a rectal smear whenever possible.

We specified whether the occupation of the patient's hospital room was single, double, or triple at the time of detection. A close follow-up of patients was conducted, identifying the different hospital rooms occupied to analyze the transmission of isolates during the outbreak and recording the time intervals between analysis request and detection of the carbapenemase-producing bacteria and between receipt of the microbiological result and the implementation of preventive measures.

We recorded whether patients had previously presented isolates of *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 and whether concomitant intestinal colonization and persistence of colonization after 30 days had been evaluated. Accordingly, systematic surveillance samples were taken from the rectal smear of patients and their contacts, which were incubated for 48 h in selective media for carbapenemases-producing bacteria (CHROMID® CARBA SMART, BioMerieux, Spain), identifying colonies by Maldi-TOF followed by carbapenemase determination (NG-Test Carba, NG Biotech, France). We recorded deaths during hospitalization and the time interval between *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 detection and death.

Among possible risk factors for infection by *K. pneumoniae* KPC-3/ST258, we recorded whether patients had undergone urological manipulation during the previous week and whether they were carriers of a permanent urinary catheter or had been provisionally catheterized to gather urine samples. We specified the time spent with the same vesical catheter, the use of interventionist procedures (surgical or endoscopic techniques, presence of central, nasogastric, or PEG catheter), the length of stay in the intensive care unit, the use of mechanical ventilation (invasive or non-invasive), the receipt of antibiotherapy for more than 48 h in the previous week, the infection focus, qSOFA/SOFA scale sepsis scores, and the Charlson severity index. Data were also collected on the following factors related to immune suppression: presence of neutropenia, neoplasia, chemotherapy during previous month, transplantation, and corticoid treatment (> 10 mg/day prednisone or equivalent for > 2 weeks) [11]. We identified the presence of renal insufficiency by glomerular filtration (GF) estimation from the serum creatinine concentration, age, and sex by the CKD-EPI equation expressed in mL/min/1.73 m². Based on the GF estimation, renal insufficiency was classified as mild, moderate, or severe, and the need for renal replacement therapy was evaluated [12]. The presence of the following associated diseases was recorded, including diabetes mellitus, heart failure, ischemic heart disease, cerebrovascular disease, previous cognitive impairment, or HIV-positive serology.

Interventions of infection control

Control measures implemented after detection of the isolate were: contact precautions, including a single room for the exclusive use of the patient, special hand hygiene measures, information sheet for the patient, appropriate use of invasive devices, room cleaning, elimination of residues, and the study of contacts with the patient.

Microbiological study

Isolates were referred to the reference center of Andalusia (PIRASOA) for microbiological characterizations. The

antibiotic susceptibility study was performed in 41 isolates from clinical samples with indications of infection and/or colonization, including 1 or 2 per patient: 11 (26.8%) from urine, 21 (51.2%) from rectal smear (for colonization studies of patients and contacts), 4 (9.7%) from blood culture, 3 (7.3%) from abdominal fluid, and 2 (4.8%) from other matrices. The susceptibility study used NegCombo 44 panels of the MicroScan system® (Beckman-Coulter Inc., Alcobendas, Madrid, Spain), and diffusion in agar with ertapenem, meropenem, and imipenem disks, applying EUCAST 2018 cutoff points for clinical categories [13]. Imipenem hydrolysis was studied with the β -Carba Test (BioRad, Alcobendas) and meropenem activity inhibition (by dipicolinic acid, boronic acid, and cloxacillin) using disk diffusion (Rosco, Barcelona, Spain) [13]. Carbapenemase gene detection used PCR with specific primers for KPC, NDM, VIM, IMP, and OXA-48 groups (Supplementary Table), followed by Sanger sequencing [14].

We selected one isolate per patient for molecular typing, except for the two morphotypes from one biopsy sample (total of 24), performing massive sequencing using Illumina MiSeq 300-bp (WGS) with a mean coverage of 75, de novo assembling the result with CLC Workbench 9.01.1 (Qiagen, Las Rozas, Madrid, Spain). Resistance determinants were established with Resfinder and the comprehensive antibiotic resistance database (CARD). The genetic environment of *bla*_{KPC-3} was studied by analyzing mobile elements (35,639 bp, 30% coverage) at the site of the *bla* gene with the online MARA application (<http://mara.spokade.com>), determining the isoform according to the sequence before the gene [15].

Molecular typing

ST was assigned by MLST (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). The relationship among isolates was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/pfge.asp>), using the *Xba*I restriction enzyme. Dendograms were generated with the Fingerprinting 3.0 application (Applied Mathematics), using the Dice index and 1% band position tolerance to compare genetic profiles. Isolates with a difference of < 3 bands (i.e., similarity > 94%) were assigned to the same pulse type.

Results

Between October 2015 and March 2017, 23 patients with isolates of *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 were treated in our hospital: 17 (74%) were infected and 6 (26%) colonized at intestinal level.

Two of the colonized individuals were excluded from the clinical-epidemiological analysis due to incomplete clinical records. This analysis therefore included 17 infected and 4 colonized patients. Table 1 exhibits their clinical characteristics. All patients were diagnosed for the first time in our hospital. Among the 17 patients, 10 (58.8%) had urinary tract infection (alone in 7 and with sepsis in 3), 3 (17.6%) had pneumonia, and 4 (23.5%) had peritonitis associated with surgical wound infection. All patients were treated with antimicrobials before detection of the *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 isolate: 39.1% with meropenem, 30.4% with ceftriaxone, 17.4% with moxifloxacin, 17.4% with ertapenem, 17.4% with piperacillin/tazobactam, 13.0% with ciprofloxacin, 8.6% with levofloxacin, 8.6% with amoxicillin/clavulanic acid, 8.6% with amikacin, 8.6% with ceftazidime, 4.3% with gentamicin, and 4.3% with ceftipime.

The mean time interval between culture request and detection of *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 was 2.57 ± 1.86 days. The mean delay between detection and implementation of preventive measures was 2.19 ± 1.77 days.

Out of the 12 patients (70.6%) dying in hospital, 11 died within 30 days after detection (5 in the first 15 days and 6

Table 1 Clinical and epidemiological characteristics of 21 individuals with KPC-3-producing ST258 *K. pneumoniae* in the Virgen de las Nieves Hospital of Granada

Characteristics	
Female sex	14 (66.7)
Mean age ^a	77.19 (11.2)
Charlson score ^a	7 (2.8)
Comorbidities	
Renal insufficiency	15 (71.4)
Cerebrovascular event	10 (47.6)
Ischemic heart disease	3 (14.3)
Heart failure	6 (28.6)
Diabetes	9 (42.9)
Cognitive impairment	9 (42.9)
Use of > 10 mg corticosteroids for > 15 days	8 (38.1)
Severe neutropenia	1 (4.8)
Solid organ transplantation	1 (4.8)
Median hospital stay (days) pre-isolation ^a	31.67 (29.5)
Presence of invasive devices	
Vesical catheter	16 (76.2)
Central venous catheter	4 (19.0)
Nasogastric catheter	5 (23.8)
Endoscopic gastrostomy catheter	1 (4.8)
Mechanical ventilation	1 (4.8)
Surgery	7 (33.3)
Mean no days receiving antibiotics before KPC-3 ST258 isolation ^a	17 (15.9)
Associated mortality	12 (57.2)

^aMean (SD)

in the second). Out of the four patients with bacteremia by *K. pneumoniae* KPC-3/ST258, all treated with tigecycline, two (50%) died in hospital due to this microorganism; the bacteremia was catheter-associated in the two non-survivors and derived from a urinary focus in the two survivors (currently alive).

At the time of the diagnosis, 11 (52.4%) of the patients were in single rooms, 7 (33.3%) in double rooms, and 3 (14.3%) in rooms with triple occupation. Ten (47.6%) of the patients had shared the same room; and 16 (76.2%) had been on the same floor and/or been treated by the same health staff. Intestinal colonization was investigated in 15 patients and was positive in all cases; follow-up of 7 of these patients showed persistence of the colonization for at least 30 days in 6 of them. In 16 (77.7%) of the patients, the isolate was detected in more than one clinical sample.

Microbiological characteristics of isolates

Resistance to amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, ertapenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, and tobramycin was observed for all isolates from all 23 patients

studied (one isolate per patient except for the recovery of two morphotypes from a single biopsy sample). Intermediate susceptibility to imipenem (8 mg/L) and cefoxitin (16 mg/L) was found in 16 (66.7%) of the 24 isolates studied. Susceptibility to fosfomycin (≤ 32 mg/L) was observed in 2 (8.3%) of the isolates and to trimetoprim-sulfamethoxazol ($\leq 2/38$ mg/L) in 3 (12.5%). We highlight the susceptibility to gentamicin (≤ 2 mg/L), tigecycline (≤ 1 mg/L), and colistin (≤ 2 mg/L) found for all isolates.

We selected one isolate per patient for molecular typing, except for the two morphotypes from one biopsy sample. All isolates belonged to ST258. Five pulse types (A–E) were differentiated by *Xba*I PFGE (Fig. 1 and Supplementary Figure). An initial pulse type (A) was found for seven isolates, a second pulse type (B) for fourteen isolates; and three subsequent pulse types (C–E) for one isolate each. The two isolates recovered from the single biopsy sample belonged to the same pulse type, with only one band of difference. KPC-3 and TEM-1 were detected in all isolates. Gene *bla*_{KPC-3} was flanked by insertion sequences *Kpn6* and *Kpn7* within *Tn4401* transposon isoform a (Fig. 2).

The time course distribution of patients is depicted in Fig. 3, highlighting that three patients with different pulse

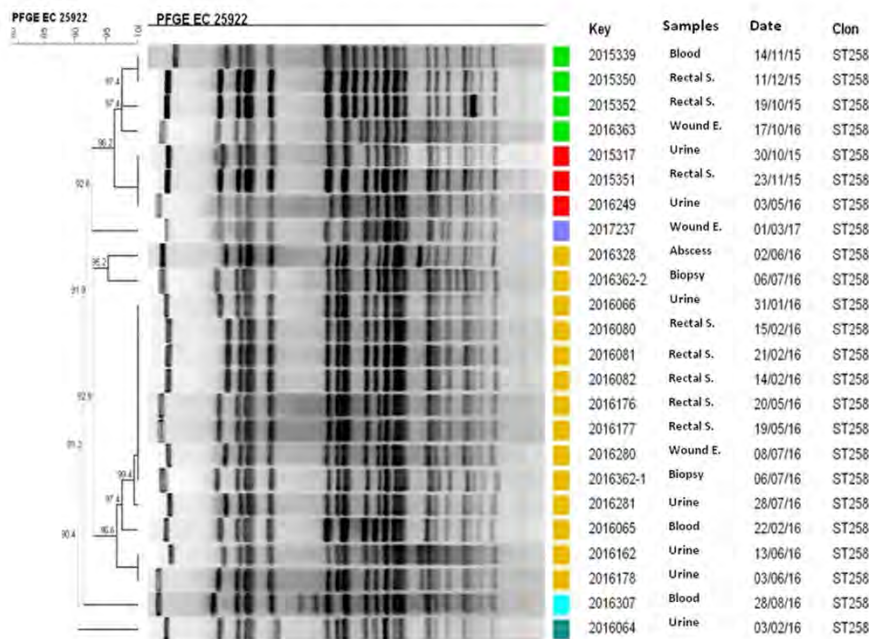
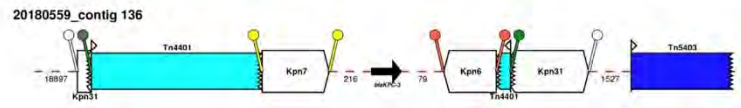


Fig. 1 Dendograms of the genetic profiles of isolates and their sequence type. Each pulse type is separated by a discontinuous line and with a color square. (Color figure online)

Fig. 2 Graphic representation of the genetic environment of KPC-3



TIME COURSE

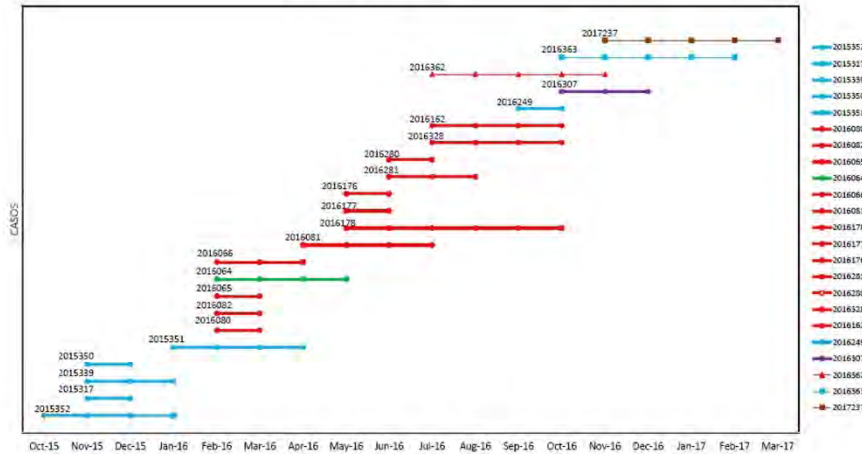


Fig. 3 Distribution of patients during the study period

types had been in other health centers (2016064-green line-; 2016307-purple line), but one (2017237-brown line) had not, although the stay of this patient in our center was > 4 months.

Discussion

We present the first report in our country of an outbreak caused by the international clone of *K. pneumoniae* ST258/KPC-3, which had first been detected in Spain in 2016 [10]. Relevant pre-detection factors in this first patient had included catheterization during two previous hospital stays and antibiotic treatment with non-carbapenem fluoroquinolones and beta-lactams. Our laboratory publishes annual surveillance reports on the susceptibility of bacteria to antibiotics (https://www.huvn.es/asistencia_sanitaria/microbiologia/mapa_microbiologico), and this was the first outbreak of infection by *K. pneumoniae* detected in our setting.

In the present study, most of the patients had a prolonged hospital stay, comorbidities, and a history of antimicrobial treatment, which have previously been identified as risk factors for the acquisition of infections by *K. pneumoniae* with

KPC, especially treatment with third- or fourth-generation cephalosporins [16]. Few data have been reported on its association with surgical procedures, which was found in around one-third of our patients, suggesting the need for further investigation of this risk factor, especially in surgical patients requiring prolonged hospitalization [17].

Although we did not conduct a wide-ranging systematic search for carriers, all known contacts of patients positive for *K. pneumoniae* KPC-3 ST258 were also positive, consistent with previous reports on the transmission of this infection in outbreaks [18].

As previously reported, the isolates showed high co-resistance percentages, leaving colistin, gentamycin, ceftazidime/avibactam, and tigecycline as the sole therapeutic options in many cases [4, 19].

With regard to the *bla*_{KPC} gene, our isolates showed only the presence of KPC-3 in clone ST258. The *bla*_{KPC} gene has been detected in multiple clinical isolates and 23 variants have been reported, most frequently KPC-2 in Colombia, Brazil, Argentina, Ecuador, and Venezuela [17, 20] and KPC-3 in Europe [21]. However, although the *bla*_{KPC} gene has been more frequently isolated in *K. pneumoniae* ST 258, it has also been found in other species of

Gram-negative bacilli [22]. Studies in Spain have reported KPC-3 dissemination in *K. pneumoniae*, especially by clones ST512, ST348, and ST388 [8], although its isolation in Spain has been infrequent, unlike other CPEs [23]. Before the present outbreak, an outbreak by clone *K. pneumoniae* ST512/KPC-3 was reported in a neighboring area, originating with a patient from Italy [8].

KPC-3 has also been associated with other microorganisms, such as *E. cloacae* ST114 in an outbreak produced in a burns unit in the USA, whose transmission was related to mobile *Tn4401b* transposon [23]. Studies of the genetic environment of *blaKPC* indicate that its mobility and dissemination are due to *Tn4401* transposon, related to *Tn3*. *Tn4401* is an element of 10 Kb, delimited by two inverted repeated sequences of 39 pb, and it houses transposase and resolvase genes and two insertion sequences, ISKpn6 and ISKpn7, besides the *blaKPC-2* gene [19]. Seven isoforms (a–g) of *Tn4401* have been reported, differentiated by polymorphisms located above the *blaKPC* gene [22]. Because this region includes the *blaKPC* promoter, variations affect the expression of messenger RNA of *blaKPC*. This transposon has been identified in isolates from different geographical locations and different STs in enterobacteria and *Pseudomonas* spp. [24]. In the present study, sequences Kpn6 and Kpn7 were found within *Tn 4401* transposon isoform a. Isoform “b” has been more frequently observed in Venezuela, USA, Colombia, and Brazil [19], although outbreaks in the United Kingdom have been associated with *Tn4401a* in isolates of *blaKPC* [25]. The carbapenemase *blaKPC3* gene has been associated with *Tn4401a* in Italy, the USA, Poland, and Spain [7, 26, 27]. This is an

important finding, because isoform a is usually linked to *blaKPC-2* and only rarely to *blaKPC-3* [7].

K. pneumoniae ST258 emerged as a serious clinical challenge in the USA mid-way through 2000 and has been the most frequently detected ST in that country, as in some Latin American and European countries [26, 28]. Likewise, ST258 was the predominant clone in the present study, whereas a study of 83 hospitals in Spain during 2013 found the most prevalent STs to be ST11 and ST405 for *K. pneumoniae* [4]. We highlight that outbreaks produced by carbapenemase-producing *K. pneumoniae* have been reported in Spain since 2007, and two ST variants (ST437 and ST340) have been associated with ST11 in the Spanish cities of Madrid, Malaga, and Alicante [4, 6, 8, 29–36] (Fig. 4).

The question arises whether these entities have recently emerged after the acquisition of resistance determinants or whether they were already a majority group, with multiple episodes of resistance mechanism acquisition serving as vehicle for their dissemination.

Analysis of the characteristics of the two patients who died from bacteremia revealed the involvement of bacteremia by *K. pneumoniae* KPC/ST258 in their prognosis (morbidity and mortality). The antimicrobial regimen was similar for all four patients with bacteremia, who all received tigecycline. The worst prognosis was for patients with catheter-associated bacteremia.

The specificity of the clonality results allowed us to establish a spatiotemporal sequence (Fig. 3) and identify possible transmission mechanisms between patients. In the majority of cases, colonized/infected patients shared the same physical space or the same health care professionals, demonstrating that preventive measures put in place were

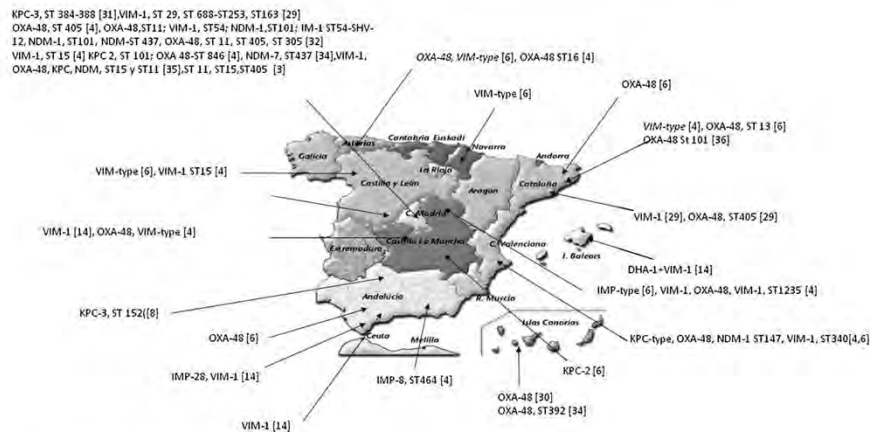


Fig. 4 Sequence types of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* reported in Spain

belated or inadequate. Various pulse types or sub-lineages appeared sequentially over time. This may be explained by the transfer of colonized patients from other centers and/or by their development during transmission in our center. Several of these patients had been in other health centers and another had a prolonged hospital stay.

Finally, although the use of carbapenems was not controlled in departments where cases were detected, the planning and design of actions to control and prevent infections by multi-resistant bacteria should also consider the impact of prevalent or emergent clones on the evolution of the resistance of these species. These actions can also be useful to develop diagnostic, therapeutic, and vaccine methods to combat infections by multi-resistant *K. pneumoniae* [25].

One limitation of our study is its retrospective character, which limited the gathering of data on these patients.

In conclusion, we report the presence for 18 months in a third-level Spanish hospital of KPC-3-producing *K. pneumoniae* of clone ST258, whose acquisition was associated with a history of antimicrobial treatment and invasive devices. The mortality rate was high in these patients, and the isolates were only susceptible to colistin, tigecycline, and gentamicin. These findings support the need for local, regional, and national collaboration to continue with antimicrobial resistance surveillance schemes and to strengthen programs for the rational use of antibiotics and the control of infections worldwide.

Funding None.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The study protocol was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. This was a non-interventional study with no additional investigation to routine procedures. Biological material was only used for standard infection diagnostics following physicians' prescriptions. No additional sampling or modification of the routine sampling protocol was performed. Data analyses were carried out using an anonymous database. For these reasons, ethics committee approval was considered unnecessary according to national guidelines. The Clinical Microbiology Clinical Management Unit of the University Hospital Virgen de las Nieves of Granada (Spain) granted permission to access and use the data.

Informed consent The study protocol was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. Data analyses were performed using an anonymous database. Therefore, approval was considered unnecessary according to the guidelines of our country (Law on Data Protection -Organic Law 15/1999 of 13 December on the protection of data of a personal nature, <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1999-23750>).


References

- Pittout J, Nordmann P, Poirel L (2015) Carbapenemase-PRZODUCING *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agent Chemother* 59:5873–5884
- Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C et al (2017) Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST 307 clone. *Microb Genom* 3(4):e000110. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000110>
- Ruiz-Garbajosa P, Hernández-García M, Beatobe Tato M, Méndez M, Grandal M (2015) A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 71:2916–2918
- Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-molina JM, Pérez-vázquez M et al (2013) Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 57:6344–6347
- Chabah M, Chems M, Zerouali K, Alloula O, Lehlmi M, Habzi A et al (2016) Healthcare-associated infections due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: bacteriological profile and risk factors. *Med Mal Infect* 46:157–162
- Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-martínez M (2015) Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3406–3412
- Curiao T, Morosini M, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque T et al (2010) Emergence of *blaKPC 3-Tn4401* associated with a pKPN3/4-like within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother* 65:1608–1614
- López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J et al (2014) Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 44:538–540
- Rojo V, Vázquez P, Reyes S, Puente Fuertes L, Cervero M (2018) Risk factors and clinical evolution of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in a university hospital in Spain. Case-control study. *Rev Esp Quimioter* 31:427–434
- Solórzano-Puerto A, Esteva-Fernández D, Oteo-Iglesias J, Navarro-Mari J, Gutiérrez-Fernández J (2016) A new case report of urinary tract infection due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) in Spain. *Arch Esp Urol* 69:437–440
- Cronin KM, Poy Lorenzo YS, Olenki ME, Bloch AE, Visvanathan K, Waters KL (2017) Risk factors from KPC-producing *Enterobacteriaceae* acquisition and infection in a healthcare setting with possible local transmission: a case control study. *J Hosp Infect* 96:111–115
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI et al (2009) A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 150(9):604–612
- EUCAST (2017) Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 1:1–43
- Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G et al (2013) Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:253–259
- Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P (2012) Role of *ISKpn7* and deletions in *blaKPC* gene expression. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4753–4759

16. Wang Q, Zhang X, Yaho H, Xian L, Li H, Chen X et al (2016) Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:1679–1689
17. Da Silva E, Glaucé W, Correia F, Godoy C, Rodrigues-Costa F, Ramos A et al (2016) Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch for surgery. *J Med Microbiol* 65:547–553
18. Swaminathan M, Sharma S, Poliansky B, Patel G, Banach D, Phillips D et al (2013) Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the setting of endemicity. *Infect Control Hosp Epidemiol* 34:809–817
19. Aura Falco, Velásquez M, Takiff H (2017) Molecular characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in a Public Hospital in Caracas, Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 35:411–416
20. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-González A, Gutiérrez-Fernández J (2019) Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units in Ecuador: results from a multicenter study. *J Infect Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.013>
21. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Derde L, Bonten M et al (2016) KPC-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* colonizing patients in Europe and Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1912–1917
22. Bryant K, Van Schooneveld T, Thapa I, Bastola D, Williams L, Safranek T et al (2013) KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/MPlasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:37–41
23. Kanamori H, Parobek C, Jualiano J, van Duin D, Cairns B, Weber D, Rutala W (2017) A prolonged outbreak of KPC-3-producing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* driven by multiple mechanisms of resistance transmission at a large academic burn center. *Antimicrob Agents Chemother*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01516-16>
24. Gesse J (2017) Plásmidos relacionados a *blaKPC* en cepas de enterobacterias chilenas productoras de carbapenemasas [tesis]. Chile p 78
25. Martin J, Phan H, Findlay J, Stoesser N, Pankhurst I, De Maio N et al (2017) Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long-and whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *J Antimicrob Chemother* 72:3025–3034
26. Chen L, Mathema B, Chavda K, DeLeo F, Bonomo R, Kreiswirth B (2014) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 22:686–696
27. Baraniak A, Izdebski R, Zabicka D, Bojarska K, Górska S, Litcracka E et al (2017) Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010–14. *J Antimicrob Chemother* 72:1610–1616
28. Tanfous F, Alonso C, Achour W, Ruiz-Ripa L, Torres C, Ben Hassen A (2017) *Escherichia coli* and ST15 OXA-48-Positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microb Drug Resist* 23:365–376
29. Sanchez-López J, Cantón R (2019) Current status of ESKAPE microorganism in Spain: epidemiology and resistance phenotypes. *Rev Esp Quimioter* 32(Suppl. 2):27–31
30. Madueño A, González García J, Ramos MJ, Pedrosa Y, Díaz Z, Oteo J, Lecuona M (2017) Risk factors associated with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* fecal carriage: a case-control study in a Spanish tertiary care hospital. *Am J Infect Control* 45:77–79
31. Robustillo Rodela A, Díaz-Agero C, Sanchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita López MJ, Monge V (2012) Euro Surveillance 17 (7):pii = 20086. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20086>
32. García-Arezana N, Redondo-Bravo L, Espinel-Ruiz MA, Borrego-Prieto P, Ruiz-Carrascoso G, Quintas-Viqueira A et al (2019) Carbapenem-resistant enterobacteriaceae outbreak in a medical ward in Spain: epidemiology, control strategy and importance of environmental disinfection. *Microb Drug Resist*. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0390>
33. European Centre for Disease Prevention and Control (2018) Carbapenemase-producing (OXA-48) *Klebsiella pneumoniae* ST392 in travelers previously hospitalized in Gran Canaria, Spain-20 July 2018
34. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blando V, Mingorance J, Gómez-Gil R, Herruzo R, Pérez-Vásquez M et al (2005) Interhospital spread of NDM-7 producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agent* 46:169–173
35. López-Dósil Bischoffberger C, Sáez D, García-Picazo L (2017) Epidemiología de la diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital comarcal y un hospital de media estancia en Madrid. *Rev Esp Quimioter* 30:458–463
36. Pitart C, Solé M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F (2011) First Outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 B-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4398–4401

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Carmen Soria-Segarra^{1,2} · Pablo González-Bustos³ · Lorena López-Cerero⁴ · Felipe Fernández-Cuenca⁴ · María Dolores Rojo-Martín⁵ · María Amelia Fernández-Sierra⁶ · José Gutiérrez-Fernández^{5,7} 

¹ Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador

² Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada-Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain

³ Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de las Nieves-Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain

⁴ Department of Microbiology and Infectious Diseases. Laboratorio de Tipado Molecular de Andalucía, Programa PIRASOA, Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain

⁵ Department of Microbiology, Hospital Universitario Virgen de las Nieves-Instituto de Investigación Biosanitaria - ibs.Granada, Avenida de las Fuerzas Armadas, 2, 18014 Granada, Spain

⁶ Department of Preventive Medicine, Hospital Universitario Virgen de las Nieves-Instituto de Investigación Biosanitaria - ibs.Granada, Granada, Spain

⁷ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Granada-Instituto de Investigación Biosanitaria - ibs.Granada, Granada, Spain

Brief Original Article

Macrolides: a novel risk factor for carbapenemase-producing *Enterobacterales* in intensive care units

Carmen Soria-Segarra^{1,2#}, Claudia Soria-Segarra^{1,2,3,4#}, Angel Catagua-González⁵, Marcia Apolo-Matamoros⁶, Franklin Vega-Franco¹, Miguel Chung-Sang^{1,6}, César Narváez-Peñaloza¹, Raquel Quijano-Grunauer⁷, José Gutiérrez-Fernández²

¹Instituto de Investigación e Innovación en Salud Integral, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador

²Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada-ibs. Granada, España

³Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Guayaquil-Ecuador

⁴Laboratorio Clínico Sosegar. Guayaquil, Ecuador

⁵Sociedad Ecuatoriana de Estadística. Quito, Ecuador

⁶Universidad de Especialidades Espíritu Santo. Samborondón, Ecuador

⁷Hospital Abel Gilbert Pontón. Guayaquil, Ecuador

Authors contributed equally to the manuscript

Abstract

Introduction: Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) have emerged as a substantial cause of morbi-mortality worldwide, with a prevalence of approximately 5% in areas with high endemicity. However, available data may not be representative of developing countries, such as Ecuador. In this study, the incidence of CPE in Ecuador and risk factors for infection/colonisation were evaluated.

Methodology: A prospective cohort study was performed from February to April 2016 in seven intensive-care units of Guayaquil, Ecuador. Samples were processed according to the Centers for Disease Control and Prevention laboratory protocol and the CHROMagar mSuper CARBA agar method. Resistance to carbapenems was defined according to Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints. A modified carbapenemase inactivation method was used to identify carbapenemase production phenotypically with molecular confirmation by multiplex polymerase chain reaction.

Results: In total, 640 patients were enrolled. The incidence of CPE was 36.4% (N = 233). A multivariate analysis indicated that several factors were associated with CPE acquisition, included a long intensive care unit stay (OR 1.05; 95% CI 1.03–1.08; $p < 0.01$), tracheostomy (OR 3.52; 95% CI 1.90–6.75; $p < 0.01$), hospitalisation 3 months prior to admission (OR 2.07; 95% CI 1.17–3.71; $p < 0.01$), vancomycin use (OR 3.31; 95% CI 2.02–5.18; $p < 0.01$), and macrolide use (OR 3.31; 95% CI 1.43–7.76; $p < 0.01$).

Conclusions: Macrolide use was a risk factor for CPE acquisition. This association should be evaluated further, especially in developing countries.

Key words: Carbapenemase; Enterobacterales; risk factors; intensive care unit.

J Infect Dev Ctries 2021; 15(4):584-589. doi:10.3855/jidc.13319

(Received 21 June 2020 – Accepted 02 November 2020)

Copyright © 2021 Soria-Segarra *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) have emerged as a substantial cause of morbi-mortality worldwide [1], with a prevalence of approximately 5% in high endemicity areas. However, these statistics may not be representative of developing countries, such as Ecuador, where CPE has shown rapid dissemination since 2010 [2-4]. Thus, the aims of this study were to determine the incidence of CPE colonisation/infection and related risk factors in patients in intensive-care units (ICUs) in Guayaquil, Ecuador.

Methodology

Study design

A prospective cohort study was performed between February and April 2016 in seven ICUs in Guayaquil, Ecuador. All admitted patients were screened with inguinal/perineal swabs weekly and upon admission if they were transferred from other institutions or had known risk factors for CPE. Patients were excluded if they were infected or colonised with CPE at enrolment [5].

Table 1. Clinical characteristics and univariate analysis of risk factors for carbapenemase-producing *Enterobacterales*.

Characteristic	CPE	Non-CPE	RR (95% CI)	p-value
	(n = 233)	(n = 407)		
Female	90 (33.7%)	177 (66.3%)		0.23
Age (± IQR)*	56.00 ± 29.50	56.00 ± 29.50		0.04
APACHE II score (± IQR)*	16.00 ± 12.00	16.00 ± 12.00		< 0.01
Transfer	108 (47.2%)	121 (52.8%)	1.55 (1.27–1.89)	< 0.01
ICU stay (± IQR) (days)	21.00 ± 22.00	9.00 ± 9.00		< 0.01
Hospital stay (± IQR) (days)	27.00 ± 23.50	16.00 ± 15.00		< 0.01
Mortality	83 (44.1%)	105 (55.9%)	1.33 (1.08–1.64)	< 0.01
Invasive procedures				
Mechanical ventilation	192 (82.76%)	246 (60.44%)	2.20 (1.64–2.96)	< 0.01
Central venous catheter	211 (90.56%)	317 (77.89%)	2.03 (1.38–3.00)	< 0.01
Urinary catheter	224 (96.14%)	363 (89.19%)	2.25 (1.23–4.11)	< 0.01
Gastrostomy	25 (10.73%)	19 (4.67%)	1.63 (1.23–2.15)	< 0.01
Tracheostomy	97 (41.63%)	51 (12.53%)	2.37 (1.97–2.85)	< 0.01
Nasogastric tube	190 (81.55%)	265 (65.11%)	1.8 (1.35–2.39)	< 0.01
Haemodialysis catheter	34 (14.59%)	30 (7.39%)	1.54 (1.19–1.98)	< 0.01
Parenteral nutrition	89 (38.2%)	101 (24.82%)	1.46 (1.19–1.79)	< 0.01
Surgery	135 (57.94%)	176 (43.24%)	1.45 (1.18–1.79)	< 0.01
Peritoneal catheter	2 (0.86%)	10 (2.46%)		0.16
Peripheral catheter	93 (39.91%)	170 (41.77%)		0.65
Admitting diagnosis				
Burn	15 (6.44%)	7 (1.72%)	1.93 (1.43–2.63)	< 0.01
Immunosuppression	5 (2.15%)	20 (4.91%)		0.08
Renal failure	27 (11.59%)	39 (9.58%)		0.42
Cardiovascular diseases	31 (13.3%)	81 (19.9%)	0.92 (0.56–1.51)	0.03
Malignancy	4 (1.72%)	13 (3.19%)		0.26
Diabetes mellitus	11 (4.72%)	21 (5.16%)		0.81
Neurological diseases	58 (24.89%)	79 (19.41%)		0.1
Chronic pulmonary disease	3 (1.29%)	13 (3.19%)		0.14
Comorbidities				
Renal failure	31 (13.3%)	36 (8.85%)		0.08
Cardiovascular diseases	87 (37.34%)	172 (42.26%)		0.22
Malignancy	7 (3%)	18 (4.42%)		0.34
Diabetes mellitus	61 (26.18%)	88 (21.62%)		0.18
Neurological diseases	26 (11.16%)	43 (10.57%)		0.82
Chronic pulmonary disease	8 (3.43%)	15 (3.69%)		0.87
Para/hemi/quadruplegia	2 (0.86%)	13 (3.19%)		0.87
Connective tissue disease	5 (2.15%)	2 (0.49%)	1.98 (1.23–3.20)	0.05
Immunosuppression	11 (4.72%)	22 (5.41%)		0.7
Antimicrobials used prior to isolation				
Ampicillin/sulbactam	72 (30.9%)	105 (25.8%)		0.17
Cephalosporins	159 (68.24%)	170 (41.77%)		0.93
Aztreonam	1 (0.43%)	4 (0.98%)		0.44
Fluoroquinolone	28 (12.02%)	57 (14%)		0.48
Piperacillin/tazobactam	74 (31.76%)	115 (28.26%)		0.35
Aminoglycosides	4 (1.72%)	13 (3.19%)		0.27
Trimethoprim/sulfamethoxazole	11 (4.74%)	14 (3.44%)		0.41
Carbapenems	159 (48.3%)	170 (51.7%)	2.03 (1.62–2.56)	< 0.01
Metronidazole	14 (6.03%)	25 (6.14%)		0.96
Linezolid	11 (4.74%)	15 (3.69%)		0.42
Vancomycin	145 (62.23%)	130 (32.02%)	2.18 (1.76–2.7)	< 0.01
Macrolide	17 (7.3%)	12 (2.95%)	1.66 (1.19–2.29)	0.01

CPE: carbapenem-producing *Enterobacterales*; APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; ICU: intensive care unit; *Median, IQR: interquartile range.

Cases were defined as symptomatic or asymptomatic patients aged ≥ 18 years with CPE colonization or infection during the study. CPE infection was defined according to an established protocol from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [6]. All asymptomatic carriers were considered colonised. Patients negative for CPE based on rectal and clinical samples and who remained negative throughout the study were considered controls. Patients were followed until discharge or death. Baseline data were collected for each individual using a questionnaire, including age, gender, diagnosis on admission, comorbidities, antimicrobial use prior to CPE isolation, and invasive devices. The ethical committee of The Catholic University of Santiago of Guayaquil approved the protocol [UCSG-CBICS-IED-2015-016]. Written informed consent was obtained from every patient or their relatives.

Microbiology

A total of 1,146 samples were collected from enrolled patients throughout the study. Samples were screened for carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (CRE) according to the CDC and CHROMagar mSuper CARBA agar (CHROMagar™) methods. CRE was defined according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints [7]. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 were used as quality control strains. A modified carbapenemase inactivation method was used to identify carbapenemase production. All CRE were subcultured on trypticase soy agar (Oxoid, Basingstoke, UK) for 24 hours at 35°C in air. DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, São Paulo, Brazil) following the manufacturer's recommendations. DNA quality was assessed by analysing the ratio of absorbance at 260 nm/280 nm. Carbapenemase production was confirmed by the detection of the *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{TEM}*, *bla_{NMP}*, and *bla_{NDM}* genes by a multiplex polymerase chain reaction, as described previously, using a thermal cycler (BioRad, Hercules, CA, USA). The reaction conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 10 min,

followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were resolved by 1% agarose gel electrophoresis at 120 V for 30 min. The gel was stained with Syber Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primers used for the reactions have been described previously [8].

Statistical analysis

Data analyses were performed using R version 3.6.2 (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019; available at: www.R-project.org). Chi-squared tests or Fisher's exact tests and Student's *t*-tests or Mann-Whitney *U* tests were used to compare categorical or continuous variables, respectively. Multicollinearity, Pearson's correlation coefficients, and variance inflation factors for the logistic regression model were analysed. The Wald test was used with a significance level of $\alpha = 0.05$ and 95% confidence intervals (CIs) for the OR were obtained.

Results

Out of 640 patients enrolled in the study, 233 (36.4%) had at least one sample positive for CPE. *Klebsiella pneumoniae* was identified in 90.65% (N = 223), *Proteus mirabilis* in 2.85% (N = 7), *Enterobacter cloacae* in 2.44% (N = 6), *Escherichia coli* in 1.63% (N = 4), *Klebsiella aerogenes* in 1.2% (N = 3), and *Klebsiella oxytoca* in 1.22% (N = 3) of cases. Some patients had more than type of *Enterobacteriales*. The Carbapenemase types were *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) (97.15%, N = 239) and New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) (2.84%, N = 7). Clinical and epidemiologic characteristics of patients and antimicrobial use are provided in Table 1.

Risk factors for infection or colonisation with CPE before current admission in patients who tested positive after enrolment included previous hospitalisation (RR 1.44; 95% CI 0.86–1.58; $p < 0.01$), use of invasive procedures (RR 1.17; 95% CI 0.86–1.58; $p = 0.33$), haemodialysis (RR 1.05; 95% IC 0.60–1.83; $p = 0.87$), long-term care (RR 0.6; 95% CI 0.13–3.75; $p = 0.63$), immunosuppression (RR 0.85; 95% CI 0.49–1.47; $p =$

Table 2. Multivariate analysis of risk factors for carbapenemase-producing *Enterobacteriales* colonisation/infection.

Characteristic	qOR (CI 95%)	p-value
Long ICU stay	1.05 (1.03–1.08)	< 0.01
Tracheostomy	3.52 (1.90–6.75)	< 0.01
Hospitalisation 3 months prior to admission	2.07 (1.17–3.71)	< 0.01
Vancomycin administration	3.31 (2.02–5.18)	< 0.01
Macrolide administration	3.31 (1.43–7.86)	< 0.01

0.54), and antimicrobial use (RR 1.18; 95% CI 0.91–1.54; $p = 0.23$) (Table 2).

Discussion

Prospective studies aimed at identifying risk factors for CPE colonisation/infection in patients in developing countries are scarce. The incidence and prevalence of CPE varies among geographical regions. Previous studies have reported values ranging for 0.6% in Asia to 35.2% in Uganda. In this study, we observed an incidence of 36.4%, which is higher than those in other countries in South America, like Brazil [9,4]. The length of ICU stay and invasive device use contribute to CPE infection [3,10], consistent with the results of this study. Tracheostomy was the only invasive device associated with CPE colonisation/infection in our multivariate analysis, which is inconsistent with the results of some previous studies [11,12]. Therefore, additional studies of ventilator-associated pneumonia as an important end point are needed. Carbapenems, fluoroquinolones, antipseudomonal penicillin, and broad-spectrum cephalosporins increase the risk of KPC colonisation [3]. We were unable to confirm that the administration of these drugs is associated with CPE based on a multivariate analysis. Fluoroquinolones and broad-spectrum cephalosporins are not frequently used in the hospitals studied; thus, a limited number of patients received these antimicrobials, making statistical analyses difficult. We obtained two unexpected results: i) vancomycin administration increased CPE-colonisation two-fold and ii) the presence of macrolides was a risk factor. Vancomycin induces drastic and consistent changes in the human intestinal microbiota, with a decrease in gram-positive bacteria (mainly Firmicutes) and a compensatory increase in gram-negative bacteria. Importantly, several genera belonging to the phylum Proteobacteria (i.e., *Escherichia/Shigella* and *Klebsiella*) increase after vancomycin administration [13,14]. This effect could explain the detection of CPE in ICU patients exposed to a short course of vancomycin treatment. The identification of macrolides as risk factors can be explained by the fact that azithromycin treatment can increase the selection of macrolide resistance genes in the gut microbiome [15], which acts as an important reservoir of various resistance genes. Different mechanisms underlying macrolide resistance have been identified in *Enterobacterales*, some of which can be transferred amongst microorganisms via mobile genetic elements. Transferable mechanisms of macrolide resistance (TMMR) are present in genetic structures that also include β -lactam resistance; for example, the

IncHI1 plasmid from *C. freundii*, which might also be involved in macrolide extrusion, can harbour the *bla*_{NDM-1} gene [16]. Detailed studies of these resistance mechanisms are needed to better understand the relationship between macrolides and CPE.

The discovery of macrolide use as a risk factor has critical implications, since clarithromycin is a first-line treatment in severe community-acquired pneumonia and vancomycin is included as part of the empiric treatment in septic shock and high-risk febrile neutropenia [17]. Another macrolide, azithromycin, was initially considered for the treatment of COVID-19-related pneumonia and the collateral effects of this drug should be carefully addressed during the pandemic [18]. Our results confirm a report by the World Health Organization in 2017, suggesting that the use of these drugs should be prioritised for monitoring as part of an appropriate antimicrobial stewardship program [17]; these programs are scarce in developing countries, such as Ecuador. Thus, modifying the recommended empirical antimicrobial treatments based on the infectious diseases processes of each patient and improving our understanding of the clinical and molecular epidemiological properties as well as resistance mechanisms are key goals. Patients colonised or infected with CPE in our study had a significantly higher mortality rate than that of controls. This is an important finding, since most studies have focused on infection and its relationship with higher mortality rates. In one study, colonisation did not increase ICU mortality, whereas KPC infection did [11]. Our findings require further research for validation and highlight the importance of early identification and isolation [19]. The difficulty in obtaining reliable information on antimicrobial exposure and the use of invasive procedures outside of the study centres was a limitation of our study. We did not collect information about other microorganisms and related infections, which could result in selection bias. Finally, the short study period and the composite of variables related to colonisation and infection could have affected the identification of factors that determine the shift from colonisation to infection.

Conclusions

Although risk factors associated with CPE have been studied extensively in developed countries, it is imperative to evaluate these factors in developing countries with different public health contexts. Our study contributes to the few reports indicating that tracheostomy use as well as vancomycin and macrolide administration are risk factors for CPE, at least in



Original

Carmen Soria-Segarra^{1,2}
Mercedes Delgado-
Valverde³
María Luisa Serrano-García⁴
Inmaculada López-
Hernández³
José María Navarro-Mari⁴
José Gutiérrez-Fernández^{1,4}

Infecciones en pacientes colonizados con bacterias gramnegativas resistentes a carbapenémicos en una ciudad media española

¹Departamento de Microbiología y Programa de Doctorado de Medicina Clínica y Salud Pública. Universidad de Granada-Instituto de Investigación Biosanitaria-ibs.Granada, Granada, España.

²Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador.

³UGC Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva. Laboratorio de Tipado Molecular de Andalucía, Programa PIRASOA. Hospital Universitario Virgen Macarena /Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla, España.

⁴Laboratorio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves-Instituto de Investigación Biosanitaria - ibs. Granada, Granada, España.

Article history

Received: 24 January 2021; Revision Requested: 12 March 2021; Revision Received: 1 May 2021; Accepted: 10 May 2021; Published: 8 June 2021

RESUMEN

Objetivo. Debido a que existen pocos estudios sobre las implicaciones clínicas de la colonización por bacterias gramnegativas resistentes a carbapenémicos (BRC) se analizó ésta en frotis rectales (FR) y faríngeos (FF) y su relación con la capacidad de predecir infección/colonización.

Material y métodos. Se realizó un estudio transversal, retrospectivo de los pacientes adultos hospitalizados entre enero del 2016 y diciembre del 2019. Los aislamientos fueron caracterizados mediante MicroScan y espectrometría de masas, aplicando los puntos de corte EUCAST 2018. La detección de carbapenemasas se realizó mediante PCR y secuenciación Sanger; se asignó el secuenciotipo mediante MLST. La relación genética entre los aislados se hizo mediante electroforesis de campo pulsado usando las enzimas *XbaI*, *SpeI* o *ApaI*.

Resultados. Se detectaron 308 (86,03 %) FR y 50 (13,97%) FF positivos, teniendo el FR una sensibilidad del 85%, especificidad del 100%, VPP 100% y VPN 97%. En los FR se aislaron: 44% (n=135) *Acinetobacter baumannii*, 26% (n=80) *Enterobacteriales* (20 KPC, 29 OXA-48, 22 VIM, 2 IMP, 7 NDM), 17% (n=53) *Pseudomonas aeruginosa* y 13% (n=40) *Stenotrophomonas maltophilia*. En los FF se aislaron un 44% (n=22) *S. maltophilia*, 40% (n=20) *A. baumannii*, 8% (n=4) *P. aeruginosa* y 8% (n=4) *Enterobacteriales* (3 VIM, 1 OXA). De los pacientes con tomas simultáneas de FR y FF, 41 (40,6%) tuvieron positividad en ambos frotis, 45 (44,6%) sólo en FR y 15 (14,9%) sólo en FF. En el 81,3% (n=13) de los episodios la colonización precedió a la infección, existiendo asociación entre infección y colonización ($p<0,001$; χ^2) y en todos en los que se conservó la información del pulstipo los aislados de las muestras clínicas y de los frotis fueron similares.

Correspondencia:

José Gutiérrez-Fernández.
Laboratorio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves.
Avenida de las Fuerzas Armadas, 2, E-18014, Granada, España.
E-mail: josegf@ugr.es

Conclusiones. La probabilidad de predecir la infección a través del colonizado por BRC en diferentes muestras clínicas es factible, teniendo el FR una mayor sensibilidad para detectar colonización.

Palabras clave: resistencia a carbapenémicos, carbapenemasas, bacterias gramnegativas, colonización.

Infections in patients colonized with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in a medium Spanish city

ABSTRACT

Objective. Because there are few studies on the clinical implications of colonization by carbapenem-resistant gram-negative bacteria (CRB) this was analyzed in rectal smears (RS) and pharyngeals (PS) and its ability to predict infection/colonization.

Methodology. A cross-sectional, retrospective study from adult inpatients between January 2016 and December 2019 was conducted. The isolates were characterized by MicroScan and spectrometry of masses applying EUCAST 2018 cut-off points. The detection of carbapenemases was performed by PCR and Sanger sequencing; sequences was assigned by MLST. The genetic relationship between the clinical isolates was made by pulsed field electrophoresis using the enzymes *XbaI*, *SpeI* or *ApaI*.

Results. A total of 308 (86.03%) RS and 50 (13.97%) positive PS were detected, the RS had a 85% sensibility, 100% specificity, 100% positive predictive value and 97% negative predictive value. In RS, the following were isolated: 44% (n=135) *Acinetobacter baumannii*, 26% (n=80) *Enterobacteriales* (20 KPC, 29 OXA-48, 22 VIM, 2 IMP, 7 NDM), 17% (n=53) *Pseudomonas aeruginosa* and 13% (n=40) *Stenotrophomonas maltophilia*. In the PS were isolated 44% (n=22) *S. maltophilia*, 40% (n=20) *A. baumannii*, 8% (n=4) *P. aeruginosa* and

8% (n=4) *Enterobacterales* (3 VIM, 1 OXA). From the patients with simultaneous RS and PS, 41 (40.6%) had positivity in both smears, 45 (44.6%) only in RS and 15 (14.9%) only in PS. Colonization preceded infection in 81.3% (n=13) of the isolates; association between infection and colonization was found ($p<0.001$; χ^2); and the episodes where the information was found all the isolates from the clinical samples and from the smears were similar.

Conclusions. The probability of predicting infection through the CRB colonized in different clinical samples is feasible. The RS has a major sensibility to detect colonization.

Key words: carbapenems resistance, carbapenemases, gram-negative bacteria, colonization.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina en el siglo pasado, las bacterias gram negativas han demostrado ser muy eficientes para evadir la actividad antibacteriana de los antibióticos betalactámicos, principalmente a través de la producción de betalactamasas [1]. En los últimos 15 años, la aparición de resistencia a los carbapenémicos, uno de los últimos recursos para el tratamiento de estas infecciones, y la producción de carbapenemases, han llevado a expresar un creciente temor por la finalización de la era antibiótica [2]. Tanto que la Organización Mundial de la Salud ha clasificado a una serie de bacterias gramnegativas resistentes a carbapenémicos (BRC) como de alto riesgo para la salud humana [3].

Estudios moleculares han demostrado que la tasa de colonización por microorganismos productores de carbapenemases es alta [4, 5], lo que constituye un reto para el control de infecciones, el manejo clínico de los pacientes y la salud pública [6]. Por otro lado, las infecciones por BRC, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacterales*, están ampliamente distribuidas en países tanto de escasos o altos recursos económicos [7,8], generando importantes procesos clínicos con elevada morbimortalidad [9], así como grandes costes para los sistemas sanitario. La colonización intestinal, así como de faringe, fosas nasales o periné, podrían servir como un importante reservorio de genes de resistencia [10, 11] de los microorganismos que la habitan, y puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones. En la actualidad existen pocos estudios acerca de la colonización rectal y faríngea por BRC y sus implicaciones clínicas. De ahí que el objetivo de nuestro trabajo fue analizar, en los pacientes ingresados en un hospital de tercer nivel, la frecuencia y distribución de la recuperación de BRC en frotis rectales (FR) y frotis faríngeos (FF), y la capacidad de esta colonización para predecir el desarrollo de enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal y retrospectivo de los pacientes adultos ingresados en los servicios de Medicina Interna y sus Especialidades, unidades de cuidados intensivos (general

y cardiaca), y Cirugía General y sus Especialidades del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. No se establecieron criterios de exclusión en la población. Este hospital presta asistencia especializada a un conjunto poblacional de 460.000 habitantes aproximadamente. Para el estudio de colonización, se estudiaron microbiológicamente las BRC de todos los FR y FF recibidos entre enero de 2016 y diciembre de 2019 (2.892 FR y 556 FF) para estudio de "posible episodio de colonización por BRC", mediante una muestra de FR, con o sin FF, por episodio. Para el estudio de la relación entre colonización e infección, dentro del grupo anterior, se seleccionaron, entre enero de 2016 y julio de 2019, los episodios donde el estudio de FR y FF precedió o coincidió al estudio de un "posible episodio de infección", mediante muestras clínicas de diferentes localizaciones que fueron estudiadas mediante procedimientos habituales. Para la investigación de las BRC aisladas se utilizaron procedimientos descritos [12]. De forma resumida, las muestras se sembraron en el medio de cultivo selectivo CHROMID® ESBL (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), incubando a 37°C en aerobiosis 48 h. Los aislamientos se identificaron con el sistema MicroScan (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) y espectrometría de masas (Maldi-ToF®, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Se caracterizó la resistencia mediante el sistema MicroScan utilizando paneles NegCombo 44, interpretado de acuerdo con los puntos de corte clínicos definidos por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) [13], con posterior detección de carbapenemasa, si correspondía, mediante la prueba colorimétrica Neo-Rapid CARB Kit® (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) e inmunocromatografía (NG5-Test Carba, NG Biotech, Guipry-Francia, para detección de KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48-like enzimas; y OXA-23 mediante K-Set, Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica). Los aislados identificados en muestras de frotis y clínicas que fueron resistentes a carbapenémicos se enviaron al Laboratorio de Referencia para el tipado molecular de patógenos nosocomiales y detección genotípica de mecanismos de resistencia a antimicrobianos de interés sanitario del programa PIRASOA, localizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Virgen Macarena en Sevilla.

Estudio microbiológico de los microorganismos productores de carbapenemases. Se investigó la sensibilidad a ertapenem, imipenem y meropenem mediante difusión con discos en Mueller Hinton agar y los resultados fueron interpretados de acuerdo con los puntos de corte clínicos definidos por EUCAST [13]. La inhibición de la actividad carbapenemasa [14] se estudió mediante difusión con discos, usando discos de meropenem, meropenem/ác. borónico, meropenem/ác. dipicolínico y meropenem/cloxacilina, además de un disco de temocilina (Rosco Diagnostica). La detección de genes de carbapenemases y MLST se estudió mediante PCR con cebadores específicos y posterior secuenciación Sanger hasta octubre de 2018 y a partir de entonces por secuenciación masiva (Illumina Inc, San Diego, CA, Estados Unidos). Para el análisis de las secuencias se utilizó el software CLC Genomics Workbench, v10 (Qiagen). Para la detección de los determinantes de resistencia se usaron las bases de datos ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/>)

services/ResFinder) y CARD databases (<https://card.mcmaster.ca/>) y para el MLST la base de datos MLST finder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST>).

El estudio genotípico de la relación clonal entre los aislados fue evaluado mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), usando las enzimas *Xba*I (*Enterobacterales*), *Spe*I (*Pseudomonas* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia*) y *Apa*I (*Acinetobacter* spp.) de acuerdo con las especies. Los aislados que diferían en 2 o más bandas en el análisis por PFGE fueron asignados a diferentes pulsotipos. Para establecer los patrones de bandas los geles fueron analizados con el software Fingerprinting 2.0 (BioRad). La tolerancia y la optimización de la posición de la banda se fijaron en 1%. Se utilizó un método de agrupación por pares no ponderados con un algoritmo de agrupación de media aritmética (UPGMA) para generar un dendrograma y el coeficiente de Dice para medir la similitud genética entre los aislados. Los patrones de PFGE con una similitud $\geq 90,0\%$ se consideraron como el mismo grupo con aislados estrechamente relacionados.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis estadístico descriptivo, calculando frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas. Se aplicó la prueba chi-cuadrado de Pearson para analizar la asociación entre colonización e infección. Se consideró significativo un valor $p < 0,05$. Para el análisis

de la validez de sus pruebas diagnósticas se midió sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Los datos se analizaron con el software IBM SPSS Statistics 19.

Consideraciones éticas. El protocolo del estudio se llevó a cabo con arreglo a la Declaración de Helsinki y las consideraciones éticas de la investigación epidemiológica. Debido al carácter no intervencionista del estudio, ya que el material biológico se utilizó sólo para el diagnóstico estándar de infecciones, siguiendo las prescripciones de los médicos sin ninguna investigación adicional a los procedimientos rutinarios, no se recabó el consentimiento informado del paciente para el análisis integrado de los resultados, según lo señalado por las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud en seres humanos de la Organización Mundial de la Salud. No se realizó muestreo adicional ni modificación del protocolo diagnóstico de rutina por el laboratorio. Se realizaron los análisis de datos utilizando una base de datos completamente anónima, donde los sujetos fueron identificados sólo mediante el Número Único de Historia de Salud de Andalucía (NUHSA) y sustituidos por episodios infecciosos diferentes, ocurridos al menos con 6 semanas de diferencia del anterior, si es que lo hubo. La entidad que concedió el permiso para acceder y utilizar los datos fue la Unidad de Gestión Clínica de Microbiología Clínica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, España.

Tabla 1 Bacterias resistentes a carbapenémicos aisladas en frotis rectal y faringeo a lo largo de los años.

Microorganismos aislados en frotis rectales, n=308 (85,03%)									
Año	Enterobacterales productoras de carbapenemasas n=80 (25,9%)					<i>P. aeruginosa</i> n=53 (17,2%)		<i>A. baumannii</i> n= 135 (43,7%)	<i>S. maltophilia</i> n=40 (12,9%)
	OXA	KPC	VIM	IMP	NDM	VIM	IMP		
	n=29 (36,3%)	n=20 (25,0%)	n=22 (27,5%)	n=2 (2,5%)	n=7 (8,8%)	n=8 (15,1%)	n=45 (84,9%)		
2016	0	13	1	0	0	0	0	17 (12,6%)	0
2017	3	3	10	0	0	0	0	15 (11,1%)	1 (2,5%)
2018	2	1	8	2	0	3	24	46 (34,1%)	11 (27,5%)
2019	24	3	3	0	7	5	21	57 (42,2%)	28 (70,0%)
Total									308
Microorganismos aislados en frotis faringeos, n=50 (13,97%)									
Año	Enterobacterales productoras de carbapenemasas n=4 (8,0%)					<i>P. aeruginosa</i> n=4 (8,0%)		<i>A. baumannii</i> n=20 (40,0%)	<i>S. maltophilia</i> n=22 (44,0%)
	OXA	KPC	VIM	IMP	NDM	VIM	IMP		
	n=1 (25,0%)		n=3 (75,0%)			n=2 (50,0%)	n=2 (50,0%)		
2016	0	0	0	0	0	0	0	3 (15,0%)	1 (4,5%)
2017	0	0	3	0	0	0	0	4 (20,0%)	0
2018	0	0	0	0	0	0	2	5 (25,0%)	8 (36,4%)
2019	1	0	0	0	0	2	0	8 (40,0%)	13 (59,1%)
Total									50

RESULTADOS

Tasa de colonización por bacterias gramnegativas resistentes a carbapenémicos. Se determinó que la tasa de colonización por BRC fue del 10,38% (358 frotis positivos de un total de 3.448 frotis), encontrándose una colonización por *A. baumannii* del 2,4% (155/3.448), *Enterobacterales* del 4,5% (84 frotis positivos/3.448), *S. maltophilia* del 1,8% (62/3.448) y *P. aeruginosa* del 1,7 % (57/3.448), mostrándose un aumento de la frecuencia a lo largo de los años de estudio siendo del 10,9% en el año 2016; 11,3% en el 2017; 12,6% en el 2018 y 9,1% en el 2019.

Entre los positivos se detectaron 308 FR (86,03%) y 50 (13,97%) FF, de un total de 3.448 frotis estudiados. En la tabla 1 se exponen las BRC detectadas. En los FR los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas del grupo OXA-48 correspondieron a 19 *Klebsiella pneumoniae*, 4 *Escherichia coli*, 3 *Citrobacter freundii*, 2 *Enterobacter cloacae* y 1 *Raoultella ornithinolytica*; los del grupo KPC a 18 *K. pneumoniae*, 1 *C.*

freundii y 1 *K. oxytoca*; los del grupo VIM a 8 *K. oxytoca*, 6 *E. cloacae*, 4 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii* y 1 *R. ornithinolytica*; los del grupo IMP correspondieron a 2 *K. pneumoniae* y los del grupo NDM a 6 *K. pneumoniae* y 1 *E. coli*. En los FF la carbapenemasa del grupo OXA-48 correspondió a 1 *K. pneumoniae* y del grupo VIM a 2 *K. oxytoca* y 1 *K. pneumoniae*. Para determinar la rentabilidad de las muestras, en 490 episodios con estudios de colonización, de 389 pacientes, se tomaron FR y FF simultáneamente. De ellos resultaron 101 (20,6%) episodios positivos, para uno o dos frotis. En la tabla 2 se indican los resultados obtenidos en estos episodios, siendo el FR la principal muestra para su recuperación, excepto para *S. maltophilia* que se recuperó en mayor medida en el FF. El FR para detectar colonización mostró una sensibilidad (S) del 85%, especificidad (E) del 100%, valor predictivo positivo (VPP) 100% y valor predictivo negativo de 97%, mientras que el FF mostró una S: 55%, E: 100%, VPP 100% y VPV: 91%.

Relación entre los microorganismos de frotis y muestras clínicas. Entre enero del 2016 y julio del 2019 se investi-

Tabla 2 Microorganismos aislados en estudios simultáneos en frotis rectal (FR) y faringeo (FF).

Microorganismo	Aislado en FR y FF	Aislado sólo en FR	Aislado sólo en FF	Total
	No (%)	No (%)	No (%)	
<i>A. baumannii</i>	10 (50,0%)	7 (35,0%)	3 (15%)	20
<i>P. aeruginosa</i>	5 (55,56%)	3 (33,3%)	1 (1,1%)	9
<i>E. cloacae</i>	0 (0,0%)	3 (100%)	0 (0,0%)	3
<i>E. coli</i>	1 (9,1%)	10 (90,91%)	0 (0,0%)	11
<i>K. oxytoca</i>	3 (60,0%)	2 (40,0%)	0 (0,0%)	5
<i>K. pneumoniae</i>	14 (43,8%)	17 (53,1%)	1 (3,13%)	32
<i>S. maltophilia</i>	8 (38,1%)	3 (14,3%)	10 (47,62%)	21
Total	41 (40,60%)	45 (44,55%)	15 (14,9%)	101

FR: frotis rectal, FF: frotis faringeo

Tabla 3 Número de aislados por tipos de carbapenemasas en muestras clínicas de infección

Tipo de carbapenemasas	Microorganismos n=60							Total
	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>A. baumannii</i>	Enterobacterales					
			<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	
KPC	0	0	8	0	0	0	0	8
OXA	1	9	8	0	0	0	0	18
VIM	3	0	2	10	3	1	1	20
IMP	11	0	0	2	0	0	0	13
NDM	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	9	18	12	3	1	1	60

Tabla 4 Tipo de microorganismo productor de carbapenemasa detectado en muestra clínica y tipo de frotis

Microorganismo	Tipo de muestra	Tipo de frotis	Tipo de carbapenemasa	ST
<i>A. baumannii</i>	Respiratoria	Rectal	OXA-23	2
<i>A. baumannii</i>	Respiratoria	Rectal y faringoamigdalas	OXA-58	2
<i>A. baumannii</i>	Orina	Rectal	OXA-23	2
<i>E. cloacae</i>	Sangre y orina	Rectal	VIM-1	78
<i>E. cloacae</i>	Orina	Rectal	VIM-1	78
<i>K. oxytoca</i>	Respiratoria	Rectal y faringoamigdalas	VIM-1	36
<i>K. oxytoca</i>	Sangre	Rectal y faringoamigdalas	VIM-1	36
<i>K. pneumoniae</i>	Orina	Rectal	KPC-3	258
<i>K. pneumoniae</i>	Orina	Rectal	VIM-1	525
<i>K. pneumoniae</i>	Respiratoria	Rectal	OXA-48	307
<i>K. pneumoniae</i>	Orina	Rectal	KPC-3	258
<i>E. coli</i>	Orina	Rectal	VIM-1	128
<i>P. aeruginosa</i>	Líquido ascítico	Rectal	IMP	348

garon 2.416 muestras para el estudio de BRC, que incluyeron 1.819 (75,2 %) FR, 356 (14,74%) FF, 93 (3,85 %) muestras respiratorias, 73 (3,0 %) orinas, 32 (1,3%) frotis de piel, 26 (1,1 %) exudados de herida, 11 (0,5%) hemocultivos, 2 (0,1%) dispositivos intravasculares, 2 (0,1 %) exudados de partes blandas y 2 (0,1%) líquidos ascíticos, de un total 1.525 pacientes en los que se hizo estudios de colonización, con o sin muestras de infección. El 10,1% (n=246) de las muestras fueron positivas para BRC y el 89,9% (n=2.195) negativas. La mayor parte de los positivos correspondieron a estudios de colonización, con un 70,73% (n=174) de muestras positivas.

Se detectaron 61 pacientes infectados y 63 infecciones, ya que dos pacientes presentaron dos tipos diferentes de infección. La infección del tracto urinario ocurrió en 24 (38,1%) pacientes, la neumonía nosocomial en 22 (34,9%), sepsis en 11 (17,5%), infección de piel y partes blandas en 4 (6,4%), fascitis necrotizante en 1 (1,6%) y peritonitis en 1 (1,6%). En la tabla 3 se muestran las especies bacterianas con el grupo de carbapenemasas, además 3 aislados de *P. aeruginosa* fueron BRC por alteración en la porina OprD.

De los 61 pacientes infectados, se recuperó la información sobre el tratamiento antibiótico recibido en 49 (80,3%), de los cuales a 46 (93,9%) pacientes se les administró antimicrobianos previo al diagnóstico de la infección por BRC y 3 (6,1%) no recibieron ningún antimicrobiano previo. En 26 (15,9%) pacientes se utilizó carbapenémicos, en 21 (12,9%) inhibidores de betalactamasas, en 20 (12,3%) oxazolidinonas, en 18 (11,0%) trimetoprim/sulfametoxazol, en 15 (9,2%) cefalosporinas de amplio espectro, en 15 (9,2%) fluoroquinolonas, en 11 (6,7%) colistina, en 8 (4,9%) daptomicina, en 8 (4,9%) aminoglucósidos, en 4 (2,4%) penicilinas, en 4 (2,4%) tigeciclina, en 3 (1,8%) macrólidos, en 3 (1,8%) ceftazolidona/tazobactam, en 2 (1,2%)

vancomicina, en 2 (1,2%) fosfomicina, en 1 (0,6%) ceftazidima/avibactam, en 1 (0,61%) doxiciclina, y en 1 (0,61%) rifampicina.

En 26 episodios infecciosos se solicitó FR, con o sin FF. Hubo correspondencia de los aislamientos en las muestras clínicas y FR y/o FF en 16 (61,5 %) episodios de los 26. En 13 (81,3%) de estos la colonización precedió a la infección, existiendo asociación entre infección y colonización ($p < 0,001$), y las BRC aisladas fueron: 4 (21,1%) *K. pneumoniae*, 3 (15,8%) *A. baumannii*, 2 (10,5%) *K. oxytoca*, 2 (10,5%) *E. cloacae*, 1 (5,3%) *P. aeruginosa*, y 1 (5,3%) *E. coli*. En todos los casos se aisló el microorganismo en FR y en 3 (23,08%) en FF, además. En la tabla 4 se muestran los aislamientos productores de carbapenemasas en muestras clínicas y en frotis. En los 3 episodios restantes en los que la infección precedió a la colonización, se estudió una muestra clínica simultánea y se aislaron 1 *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 en orina y FR; 1 *K. pneumoniae* OXA-48/ST308 en orina y FR; y 1 *P. aeruginosa* IMP-16/ST253 en muestra respiratoria y FR. En la figura 1 se reflejan las imágenes de las comparaciones que se han podido realizar, en los 4 episodios disponibles, y en todos los casos los aislados de las muestras clínicas y de los frotis han sido idénticos o muy similares. No se dispone de las imágenes del pulso tipo de todos los aislados indicados anteriormente.

En 5 (19,2%) episodios de los 26, las muestras de colonización fueron negativas. En 5 (19,2 %) episodios de los 26 no hubo correspondencia entre las BRC de las muestras clínicas y los frotis de colonización. Los microorganismos aislados en estos episodios fueron: 1 *A. baumannii* OXA-23/ST2 en muestra respiratoria, con *A. baumannii* OXA-58/ST2 en FR; 1 *A. baumannii* OXA-23/ST2 en orina, con un FR con *A. baumannii* OXA-58/ST2; 1 *C. freundii* VIM-1 en muestra respiratoria y *K. oxytoca* VIM-1/ST36 en FR; 1 *E. cloacae* VIM-1/ST78 en hemocultivo y

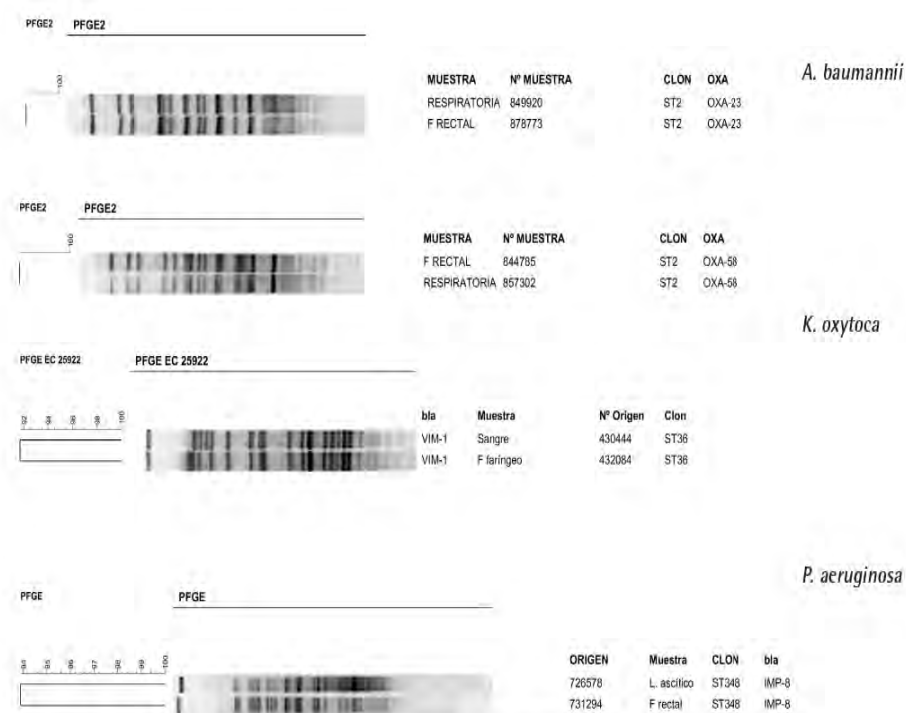


Figura 1 Dendrogramas de los perfiles genéticos y secuenciotipo de los aislados conseguidos.

S. maltophilia en FR; y 1 *K. pneumoniae* KPC-3/ST258 en exudado de herida con FR negativo.

DISCUSIÓN

Las BRC constituyen una amenaza importante para la salud pública, por la falta de alternativas terapéuticas y la posibilidad de generar brotes [15]. Los cultivos de vigilancia son recomendados para identificar las BRC y evitar su diseminación [16]. La presencia de colonizados por microorganismos multirresistentes (MMR) gramnegativos puede llegar a ser hasta el 24.6% [17]. Si bien el presente trabajo no muestra una tasa elevada de aislamientos de BRC, estos han ido en aumento desde el 2016 hasta 2018, lo que guarda relación con la presencia de brotes por KPC descritos [5]. Además, en nuestro estudio, en el 2019, hubo una disminución en la tasa de colonización, aunque el número de muestras positivas aumentó, lo que puede deberse a que se duplicó el número de estudios de colonización solicitados, y demuestra el interés producido en la institución por los estudios de vigilancia. El frotis rectal mostró una alta sensibilidad para la detección de BRC, y es el método sugerido para los estudios de cribado de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos [18]. El FF mostró sensibilidad baja,

pero un valor predictivo negativo muy elevado, lo cual puede deberse al elevado número de sujetos que no estaban colonizados.

La incidencia de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos han mostrado un aumento en los últimos diez años en España, las carbapenemasas predominantes son las de clase D (OXA-23, -24 y -58) y el ST 2 [19], situación similar a la encontrada en el presente trabajo. La detección de este microorganismo, tanto en FR como FF, muestra variaciones importantes. A nivel de la faringe es del 23% - 82%, mientras que en el recto es del 14%-74% [15,20,21]. Nuestro trabajo demuestra que la presencia de este microorganismo en ambas localizaciones tiene porcentajes similares, pero la colonización rectal se anticipó con más frecuencia a la infección.

Las tasas de aislamientos clínicos de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas son del 1,7% en España [15] y de colonización del 2% [22], las mismas pueden variar del 13,4% al 73,1% dependiendo del país [4,17,23-26], los microorganismos predominantes son *K. pneumoniae* y *E. coli* [24]. En este trabajo la tasa de colonización se encuentra dentro de los valores estimados para España, y se demuestra que la detección de estos microorganismos en FR juega un papel preponderante, incluso pudiendo predecir la infección. La colonización aumen-

ta 5 veces el riesgo de muerte y el riesgo de bacteriemias en pacientes sometidos a trasplantes alogénicos de médula ósea [24,25,27]. La muestra ideal para la detección de colonizados parece ser la rectal, y así lo determinan la mayoría de los estudios de colonización [4,17,26], incluido el nuestro.

La tasa de aislados de *Pseudomonas* spp. multiresistentes oscila entre el 1,9% y el 30% a nivel mundial y en hospitales españoles [15,17]. Las cifras de este estudio están dentro de las esperadas, aunque llama la atención que aparece un número importante de casos a partir del año 2018, con la presencia de carbapenemasas ya reportadas en España, pero el 21% de los infectados por *Pseudomonas* presentó inactivación de la OprD. Esto es de especial importancia ya que se puede considerar un potencial uso de antibióticos como ceftolozano/tazobactam para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* extremadamente resistentes [28]. Se detectó la presencia de clones de alto riesgo como el ST175 [28], el clon ST348 reportado en este trabajo, no ha sido descrito con anterioridad en España. La detección de colonización para *P. aeruginosa* muestra que la orina, los hisopados nasofaríngeos y el recto son lugares frecuentes de colonización [16,29,30], en este trabajo predominó la colonización intestinal.

La colonización por *S. maltophilia* se ha encontrado en el tracto respiratorio superior en pacientes traqueostomizados [31], la cavidad oral del 17% de pacientes con trasplante de sangre del cordón umbilical [32] y del 6,9 % en pacientes con trasplantes alogénicos de células madre [27]. Estos hallazgos son de gran importancia, porque estuvieron relacionados con una mayor mortalidad y un aumento en el número de infecciones incluso no relacionadas con *S. maltophilia* [27]. En este trabajo fue llamativa la detección de portadores faríngeos de *S. maltophilia*, sin que se presentase ninguna infección por este microorganismo, pero si colonización con *A. baumannii*, e infección con *E. cloacae*. La presencia *S. maltophilia* podría tener un efecto inmunomodulador favoreciendo las infecciones por otros agentes en pacientes inmunocomprometidos [33], el cual puede verse potenciado por el hecho de su efecto co-colonizador que lleva a la emergencia de resistencia antimicrobiana, al portar esta especie plásmidos o transposones de resistencia que facilitan la diseminación de integrones a otras especies bacterianas [34]. En lo que respecta la rentabilidad de la muestra, si bien se pudo detectar en recto como en faringe, la detección de esta última es mayor al realizar las comparaciones entre los dos frotis.

La elección del tipo de muestra para la detección de colonizados es importante, los resultados nos muestran que dependiendo del tipo de microorganismo predomina un sitio diferente de colonización. Sin embargo, la muestra clínica exacta para la vigilancia activa de BRC sigue sin estar definida [30]. Dependiendo del tipo de estudio, microorganismo y población estudiada, la presencia de *Acinetobacter* spp. en la orofaringe, de los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas en el recto y *P. aeruginosa* en orina, parecen ser los lugares más frecuentes de colonización [16, 30]. Nuestros resultados muestran que hubiéramos perdido la detección de *S. maltophilia* si sólo hubiésemos considerado las muestras de recto.

La colonización se sabe que es un factor de riesgo para la infección y la supervivencia de los pacientes [15, 25, 27]. Existe un porcentaje de pacientes cuyos estudios de colonización pueden resultar negativos o con microorganismos colonizantes diferentes a los causantes de infección [23, 25]. Las causas de estas situaciones pueden ser diversas, en este trabajo pudieron deberse a que se tomaron muestras tras detectarse la infección, con lo cual los antimicrobianos usados podrían haber eliminado el microorganismo. También existe la posibilidad de fallos en los aislamientos a pesar de los cambios en los puntos de corte del EUCAST, los cuales no han sido diseñados con fines de vigilancia epidemiológica sino para diagnóstico clínico [2]; los métodos utilizados pueden no ser lo suficientemente sensibles al existir microorganismos en bajas concentraciones en los sitios de cultivo [35]. La detección de OXA-48, encontrada en dos de los aislamientos clínicos con muestra de cultivo de colonización negativo, podría deberse a que esta enzima presenta escasa actividad betalactamasa cuando no está acompañada de otra betalactamasa de espectro extendido y su capacidad de hidrolizar carbapenémicos es menor que la de otros grupos de carbapenemasa, por lo que se pudo haber producido falta de sensibilidad a la hora de detectar carbapenemasas del grupo OXA-48. Hay que señalar que también el uso de sistemas automatizados, como MicroScan, o la espectrometría de masas MALDI-TOF han demostrado producir resultados falsos negativos [2].

Las infecciones más frecuentes detectadas fueron las del tracto urinario, neumonía nosocomial, infección de piel y partes blandas y sepsis [4,6]. Los antimicrobianos utilizados de forma previa a la detección de la infección han sido asociados en la literatura con la presencia de carbapenemasas, como son los carbapenémicos, inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de amplio espectro y fluoroquinolonas [4]. No se ha descrito la asociación entre el uso previo de oxazolidinonas o trimetoprim/sulfametoxazol y la presencia de BRC observada en algunos de nuestros pacientes, los cuales posiblemente producen alteración de la microbiota intestinal que facilitaría la presencia emergente de estas bacterias o podrían estar colonizando al paciente antes de la ingesta antibiótica, situación que puede requerir futuros estudios.

El uso de los pulsotipos ha sido estudiado en profundidad para conocer e investigar brotes, existe evidencia que el mismo clon pudo haberse hallado en dos sitios de un mismo paciente [35], pero las publicaciones que comprueben este tipo de asociación son escasas.

Este trabajo presenta una serie de limitaciones, en primer lugar, es un estudio retrospectivo, que no implicó la toma sistemática y secuencial de muestras de colonización en un solo paciente, ni tampoco de varias muestras de frotis en un mismo paciente, por lo que la presencia de otras localizaciones de colonización podría estar infraestimada, por lo que se sugiere estudios prospectivos para demostrar la rentabilidad de las muestras. Otra limitación, es que no fue posible determinar los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la infección, de manera que podamos justificar la presencia de cultivos negativos o discordantes asociados al uso de antibióticos.

En conclusión, el FR fue la principal muestra para la recuperación de BRC, así como mostró una mayor sensibilidad, excepto para *S. maltophilia* que se recuperó en mayor medida en el FF. Por lo tanto, los estudios de colonización siempre deben incluir el FR, aunque la detección de colonización proveniente de muestras de diferentes localizaciones da mayor rentabilidad a la positividad en los portadores. Además, la probabilidad de predecir la infección a través de la colonización por BRC es alta.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no presentan ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Halat D, Ayoub C. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics* 2020; 9:186. doi: 10.3390/antibiotics9040186.
- Viau R, Frank K, Jacobs M, Wilson B, Kaye K, Donskey C. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organism: Current Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29: 1-27. Doi: 10.1128/CMR.00108-14.
- World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva.; https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1. 2017 [consultada 30 octubre 2020]
- Soria-Segarra C, Soria-Segarra CI, Catagua-González A, Gutiérrez-Fernández J. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units in Ecuador: Results from a multicenter study. *J Infect Public Health*. 2020; 13:80-88; doi: 10.1016/j.jiph.2019.06.013.
- Soria-Segarra C, González-Bustos P, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Rojo-Martin MD, Fernández-Sierra MA. Tracking KPC-3-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in a third-level hospital in Granada (Andalusia Spain) by risk factors and molecular characteristics. *Mol Biol Rep* 2020; 47:1089-10967. doi:10.1007/s11033-019-05203-w.
- Jia XQ, Pang F, Chen JZ, Jian LX. Prevalence and clinical distribution of multidrug-resistant bacteria (3537 isolates) in a tertiary Chinese hospital (January 2012-December 2013). *Pathog Biol* 2015; 64: 21-23. doi: 10.1016/j.patbio.2014.12.002.
- Hopman J, Meijer C, Kenters N, Coolen J, Ghamati M, Mehtar S. Risk Assessment After a Severe Hospital-Acquired Infection with Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *JAMA Network Open*. 2019; 2:e187665. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2018.7665.
- Detsis M, Karanika S, Eleftherios M. ICU Acquisition Rate, Risk Factors, and Clinical Significance of Digestive Tract Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med* 2017; 45 (4); 705-714. doi: 10.1097/CCM.0000000000002253.
- Hosuru Subramanya S, Bairy I, Nayak N, Padukone S, Sathian B, Gokhale. Low rate of gut colonization by extended-spectrum B-lactamase producing Enterobacteriaceae in HIV infected persons as compared to healthy individuals in Nepal. *PLoS ONE* 2019; 14: e0212042. doi: 10.1371/journal.pone.0212042.
- Li S, Duan X, Peng Y, Rui Y. Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. From clinical infection samples and fecal survey samples in Southern China. *BMC Infect Dis*. 2019; 19:900. doi:10.1186/s12879-019-4423-3.
- Pirii L, Friederich A, Rossen J, Vogels W, Beerhuizen G, Nieuwenhuis M, et al. Extensive colonization with carbapenemase-producing microorganisms in Romanian burn patients: infectious consequences from the Colectiv fire disaster. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37: 175-183. doi:10.1007/s10096-017-3118-1.
- Montiel-Riquelme F, Calatrava-Hernández E, Gutiérrez-Soto M, Expósito-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Clinical relevance of antibiotic susceptibility profiles for screening gram-negative microorganisms resistant to beta-lactam antibiotics. *Microorganisms* 2020; 8:1555. doi:10.3390/microorganisms8101555.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0; https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf. 2020. [consultado 24 septiembre 2020].
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guideline for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical epidemiological importance. V 2.0, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf; 2017 [Consultado 24 septiembre 2020].
- Bou Arévalo G, Chaves Sánchez F, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>. 2015 [consultado 30 agosto 2020].
- Dalben MF, Oliveira MS, Garcia CP, Lobo RD, Costa SF, Toscano CM. Swab cultures across three different body sites among carriers of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species: a poor surveillance strategy. *J Hosp Infect* 2010; 74: 395-411. doi: 10.1016/j.jhin.2009.06.003.
- Russell K, Spalding M, Weiner W, Edwards J, Brown A, Huang J, et al. Vital Signs: Containment of Novel Multidrug-Resistant Organisms and Resistance Mechanisms-United States, 2006-2017. *Morb Mortal Wkly Rep* 2018; 67: 396-401. doi: 10.15585/mmwr.mm6713e1external icon.
- Richter S, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? *Virulence*. 2017; 8: 417-426.

19. Oteo J, Bou G, Chávez F, Olivier A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35:667-675. doi: 10.1016/j.eimc.2015.12.013.
20. Nutman A, Lerner A, Schwartz D, Carmeli Y. Evaluation of carriage and environmental contamination by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2016. 22: 949. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.020.
21. Nutman A, Lerner A, Fallach C, Schwartz D. Likelihood of persistent carriage of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* on re-admission in previous carriers. *Infect Contr Hosp Epidemiol* 2019; 40: 1188-1190. doi:10.1017/ice.2019.210.
22. Hernández-García M, Díaz-Agero C, Pérez-Biso B, Sánchez AM, López-Fresneña N, Morosini MI, Ruiz-Garbayosa P, Cantón R. Implementation of contact isolation strategy for the containment of extended-spectrum B-lactamase carriers in a University Hospital positively affects the epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriales*. *Enferm infect Microbiol Clin*. 2020. doi:10.1016/j.eimc.2020.05.013.
23. Kumar A, Mohapatra S, Bakhshi S, Mahapatra M, SreenivasVDas B et al. Rectal carriage of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A menace to highly vulnerable patients. *J Global Infect Dis* 2018; 10: 218-221. Doi: <http://www.jgid.org/text.asp?2018/10/4/218/246384>
24. Jaiswal SR, Gupta S, Kumar Rs, et al. Gut colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* Adversely Impacts the Outcome in Patients with Hematological Malignancies: Results of Prospective Surveillance Study. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018; 10: e2018025. doi: 10.4084/MJHID.2018.025.
25. Tran D Larsson M, Olson L, Hoang N, Le N, Khu D, Nguyen H, et al. High prevalence of colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among patients admitted to Vietnamese hospitals: Risk factors and burden of disease. *J Infect* 2019; 79: 115-122. doi:10.1016/j.jinf.2019.05.013.
26. Qu x, Wang H, Chen C, Tao Z, Yin C, Ying A, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Chinese hospitals- A five -year retrospective study. *J Infect Dev Citries* 2019; 13:1101-07. doi:10.3855/jidc.11798.
27. Scheich S, Linder S, Koenig R, Reinheimer C, Wichelbaus T, Hogardt M, et al. Clinical impact of colonization with multidrug-resistant organism on outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2017; 124: 286-96. doi: 10.1002/encr.31045.
28. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C et al. Genomics and susceptibility profiles of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 62: e01589-17. Doi: 10.1128/AAC.01589-17.
29. Lepelletier D, Cady A, Caroff N, Marraillac J, Reynaud A, Lucef JC. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 1-6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.014.
30. Araoka H, Kimira M, Abe M, Takahashi N, Yoneyama A. Appropriate sampling sites for the surveillance multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization. *Jpn J Infect Dis*; 67:118-19. doi: 10.7788/118.
31. Riva G, Garzaro M, Zaccaria T, Peruzzeto D, Cipriani R, Salonia L, et al. Nasal and tracheal microbial colonization in laryngectomized patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2016; 125:336-41. doi: 10.1177/0003489415613802.
32. Mizuhashi Y, Inuma T, Kato S, Isobe M, Shibata H, Takahashi O. Clinical implications of persistent colonization with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in adult patients undergoing single cord blood transplantation. *Int J Hematol* 2020; 111:858-68. doi: 10.1007/s12185-020-02854-5.
33. Waters VJ, Gomez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK, Prince A. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Immun*. 2007 75: 1698-1703. doi: 10.1128/IAI.01469-06.
34. Juhász E, Krizsán G, Lengyel G, Grósz G, Pongrácz J, Kristóf K. Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. *An Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13: 333. doi: 10.1186/s12941-014-0058-9.
35. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber M, Carmeli Y. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2007; 155:1-55. doi: 10.1128/JCM.02424-0