



TRABAJO FIN DE GRADO

Vigilancia epidemiológica y caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido en pacientes con bacteriemia hospitalizados en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa

Epidemiological surveillance and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered from hospitalized patients with bacteremia at the Lozano Blesa University Clinical Hospital

Autora

EUGENIA MERCEDES SANZ VALER

Directora

CRISTINA SERAL GARCÍA

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública
Área de Microbiología

Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

Junio 2019

ÍNDICE

<u>0. RESUMEN / ABSTRACT</u>	4
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	6
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : patogenia y epidemiología	6
1.2. Mecanismos de resistencia antibiótica de bacterias gram-negativas	7
1.2.1. Clasificación de enzimas beta-lactamasas	7
1.2.2. Beta-lactamasas de espectro extendido	9
1.3. Colonización e infección por bacterias multirresistentes	10
<u>2. OBJETIVOS</u>	12
<u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	12
3.1. Selección de cepas a estudio	12
3.1.1. <i>K. pneumoniae</i> productora de BLEE procedentes de hemocultivo	12
3.1.1.1. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con bacteriemia	12
3.1.2. <i>K. pneumoniae</i> productora de BLEE procedentes de portadores fecales.....	13
3.2. Detección fenotípica de BLEE: prueba de Epsilon-test (ϵ -test).....	13
3.3. Tipificación molecular de cepas de <i>K.pneumoniae</i> productoras de BLEE	15
3.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)	15
3.3.2. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	16
3.3.2.1. Extracción de ADN	17
3.3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
3.3.2.3. Detección de genes amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa	19
3.3.2.4. Secuenciación	20

<u>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	21
4.1. Selección de cepas a estudio	21
4.1.1. <i>K. pneumoniae</i> productora de BLEE procedentes de hemocultivo	21
4.1.1.1. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con bacteriemia	21
4.1.2. <i>K. pneumoniae</i> productora de BLEE procedentes de portadores fecales	24
4.1.2.1. Colonización por <i>K. pneumoniae</i> productora de BLEE de pacientes ingresados en UCI durante un período superior a tres semanas	24
4.2. Detección fenotípica de BLEE: prueba de Epsilon-test (ϵ -test)	26
4.3. Tipificación molecular de cepas de <i>K. pneumoniae</i> productoras de BLEE	26
4.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)	26
4.3.2. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	29
<u>5. CONCLUSIONES</u>	32
<u>6. BIBLIOGRAFÍA</u>	33

ABREVIATURAS

ADN ácido desoxirribonucleico

ARN ácido ribonucleico

BLEE beta-lactamasas de espectro extendido

BMR bacterias multirresistentes

cm centímetro

CIM concentración inhibitoria mínima

ESBL extended-spectrum beta-lactamases

g gramo

kb kilobase

K. pneumoniae *Klebsiella pneumoniae*

HCULB Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa

mA miliamperios

ml mililitro

min minuto

M molar

mM milimolar

MLST *Multilocus sequence typing*

nm nanómetro

nt nucleótidos

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PFGE electroforesis en gel de campo pulsante

rpm revoluciones por minuto

RZ Resistencia Zero

s segundo

ST secuencia tipo

UCI Unidad de Cuidados Intensivos

V voltios

µg microgramo

µl microlitro

0. RESUMEN

Introducción y objetivos: *K. pneumoniae* productora de BLEE es un patógeno oportunista y multirresistente responsable de un alto porcentaje de bacteriemias nosocomiales, que exige el reconocimiento temprano de los individuos en situación de riesgo y su abordaje diagnóstico y terapéutico precoz en vistas a disminuir su morbimortalidad. Asimismo, la búsqueda activa de portadores de bacterias multirresistentes constituye, en la actualidad, una herramienta crucial en vigilancia epidemiológica. Los objetivos de este estudio son: revisar la epidemiología del estado de portador fecal y de la bacteriemia por *K. pneumoniae* productora de BLEE, detectar fenotípicamente el mecanismo de resistencia a beta-lactámicos y realizar la tipificación molecular de las cepas de *K. pneumoniae* productora de BLEE causantes de bacteriemia.

Material y métodos: se consultaron las bases de datos Modulab (Werfen) y PROA exportadas y anonimizadas y se seleccionaron los aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE en hemocultivos y Resistencia Zero durante el período de estudio. La confirmación fenotípica del mecanismo de resistencia se realizó con el Epsilon-test (ϵ -test®). La tipificación molecular de las cepas se realizó mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) y *Multilocus sequence typing* (MLST).

Resultados: 18,33% de los aislamientos de *K. pneumoniae* en bacteriemias fueron productores de BLEE. La mayoría de pacientes fueron varones de edad avanzada con pluripatología, tratamiento antibiótico previo, procedimientos invasivos y foco urinario. Todos los pacientes ingresados en UCI con bacteriemia mostraron colonización por *K. pneumoniae* productora de BLEE. Tres de los cuatro pacientes ingresados en UCI con bacteriemia estaban colonizados por cepa indistinguible o estrechamente relacionada. El fenotipo productor de BLEE fue confirmado en el 100% de los aislamientos. Fueron detectados 6 patrones en PFGE y 5 STs (ST405, ST307, ST392, ST340 y ST3035), siendo ST405 el más frecuente, aislándose en 5 de 11 aislamientos (45,45%).

Conclusiones: *K. pneumoniae* ST405 y ST307 fueron los clones más prevalentes detectándose en 5 y 3 bacteriemias, respectivamente, demostrando una gran capacidad de diseminación horizontal.

Palabras clave: bacteriemia, *Klebsiella pneumoniae*, beta-lactamasas de espectro extendido, colonización intestinal, ST405, ST307.

ABSTRACT

Introduction and objectives: ESBL-producing *K. pneumoniae* is an opportunistic and multidrug resistant pathogen that causes high percentage of hospital-acquired bacteremias and requires fast identification of patients at risk and an early diagnosis and treatment approach in order to reduce their morbimortality. Additionally, active research of multiresistant bacteria carriers is, currently, crucial tool in epidemiological surveillance. The objectives of this study are: review fecal carrier state and bacteremia epidemiology of ESBL-producing *K. pneumoniae*, carry out phenotypic identification of this antimicrobial resistance and study molecular typing of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates from blood culture at the Lozano Blesa University Clinical Hospital during 2018.

Material and methods: anonymous Modulab (Werfen) and PROA databases were consulted and ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates from blood culture and “Resistencia Zero” program during the study period were selected. In vitro antimicrobial resistance testing was performed by Epsilon-test (ϵ -test®). Molecular typing of recovered isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and *Multilocus sequence typing* (MLST).

Results: 18,33% *K. pneumoniae* isolates from blood culture were ESBL producers. Most patients were elderly men with pluripathology, previous antibiotic therapy, invasive procedures and urinary tract infection. All patients with bacteremia from UCI were fecal carriers of ESBL-producing *K. pneumoniae*. Three of four patients with bacteremia hospitalized at UCI were colonized by indistinguishable or closely related isolates. ESBL phenotype was detected in 100% bacteremia isolates. Six different PFGE patterns and 5 STs (ST405, ST307, ST392, ST340 and ST3035) were detected among the isolates, being ST405 the most frequent, being detected in 5 of 11 isolates (45,45%).

Conclusions: *K. pneumoniae* ST405 y ST307 were the most prevalent clones, being detected in 5 and 3 bacteremias, respectively, showing broad capacity for horizontal dissemination.

Keywords: bacteremia, *Klebsiella pneumoniae*, extended spectrum beta-lactamases, intestinal colonization, ST405, ST307.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Klebsiella pneumoniae*: patogenia y epidemiología

K. pneumoniae fue descrita por primera vez por Carl Friedländer en 1882 tras su aislamiento en pulmones de pacientes fallecidos por neumonía. El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en el suelo, aguas residuales, plantas y animales. Sus principales reservorios en el ser humano son el tracto gastrointestinal y la mucosa nasofaríngea ⁽¹⁾.

K. pneumoniae es un bacilo gram-negativo, no móvil y anaerobio facultativo fermentador de lactosa. Además, posee una cápsula rica en polisacáridos que le confiere a sus colonias un aspecto mucoso característico en medio agar.

En su patogénesis participan diversos factores de virulencia los cuales facilitan la evasión del sistema inmune y permiten la invasión tisular bacteriana, siempre y cuando exista cierta susceptibilidad por parte del huésped. Los factores de virulencia más representativos son: cápsula, lipopolisacárido, sideróforos, hiper mucoviscosidad y fimbrias ⁽²⁾. Este mecanismo patogénico explica que *K. pneumoniae* haya sido clásicamente considerada un patógeno oportunista, al ser típicamente causa de infección en individuos hospitalizados o inmunocomprometidos. El género *Klebsiella* ha sido identificado como la cuarta causa de infección nosocomial en España y tercera causa en Estados Unidos.

El tracto urinario es la localización predominante en las infecciones por *K. pneumoniae*. Asimismo, su capacidad para formar biofilms le ha permitido convertirse en agente etiológico no desdeñable de infecciones asociadas a sondaje vesical. Actualmente representa la segunda causa más frecuente de bacteriemia nosocomial por bacilos gram-negativos, detrás de *Escherichia coli*. Los tractos urinario, gastrointestinal y respiratorio, así como los catéteres intravasculares, son los focos más frecuentemente hallados en estas bacteriemias secundarias. La tasa de letalidad de la bacteriemia por *K. pneumoniae* se estima en 20-30% y la tasa de mortalidad poblacional en 1,3 cada 100.000 habitantes. *K. pneumoniae* constituye la tercera causa más frecuente de neumonía nosocomial y ha sido relacionada con neumonías asociadas a ventilación mecánica en pacientes ingresados en UCI. Por último, las infecciones de herida quirúrgica representan el 13% de todas las infecciones causadas por este microorganismo. Conjuntamente, *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista responsable de una importante carga para el sistema sanitario ⁽³⁾.

1.2. Mecanismos de resistencia antibiótica de bacterias gram-negativas

Las bacterias gram-negativas disponen de un amplio arsenal de mecanismos que les permiten evadir la acción antibiótica. Las bombas de expulsión, los cambios en la permeabilidad de la membrana externa y las mutaciones en estructuras diana son algunos de ellos. Sin embargo, la capacidad de las bacterias gram-negativas para expresar enzimas que pueden hidrolizar las moléculas antibióticas, hace que la modificación enzimática del antibiótico sea el mecanismo de resistencia por excelencia en estas bacterias. Las enzimas de mayor prevalencia son las beta-lactamasas. Estas hidrolizan el anillo beta-lactámico de los antibióticos con el mismo nombre anulando su funcionalidad ⁽⁴⁾. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, representando un gran reto para el control de las infecciones.

1.2.1. Clasificación de enzimas beta-lactamasas

Tradicionalmente, la clasificación de beta-lactamasas se ha elaborado en base a dos criterios: moleculares y de sustrato. La clasificación molecular fue propuesta por Ambler en 1980. Ésta clasifica a las beta-lactamasas en cuatro clases en función de su secuencia proteica: las clases A, C y D utilizan serina en el proceso de hidrólisis mientras que la clase B incluye a aquellas que requieren iones divalentes de zinc, también llamadas metalo-beta-lactamasas. Bush, Jacoby y Medeiros propusieron en 1995 una clasificación funcional basada en el sustrato hidrolizado por cada enzima, cuya versión actualizada se muestra en la **tabla 1**.

Esta actualización muestra la correspondencia entre los grupos mayores de esta clasificación con las categorías moleculares de Ambler e incluye el perfil inhibitorio de cada tipo enzimático en un intento de facilitar la correlación entre el patrón de resistencia y el fenotipo que mostraría en los aislamientos clínicos.

De esta manera, el grupo 1 de Bush y Jacoby incluye a las cefalosporinasas y tiene correspondencia con la clase C de Ambler. El grupo 2 está compuesto por las penicilinasas, beta-lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y beta-lactamasas resistentes a inhibidores, pertenecientes a las clases moleculares A y D. Por último, Bush y Jacoby conformaron el grupo 3 con el conjunto de metalo-beta-lactamasas de la clase B de Ambler. Se han descrito numerosos subgrupos basados en atributos específicos de las enzimas individuales e incluidos en cada grupo mayor.

El grupo 2 de Bush y Jacoby representa el conjunto más extenso de beta-lactamasas, fundamentalmente debido al incremento exponencial en la identificación de BLEE sucedido en los últimos 20 años (**figura 1**) ⁽⁵⁾.

Tabla 1. Clasificación de beta-lactamasas actualizada de Bush et al ⁽⁵⁾

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
NI	4	Unknown					CphA, Sft-1

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

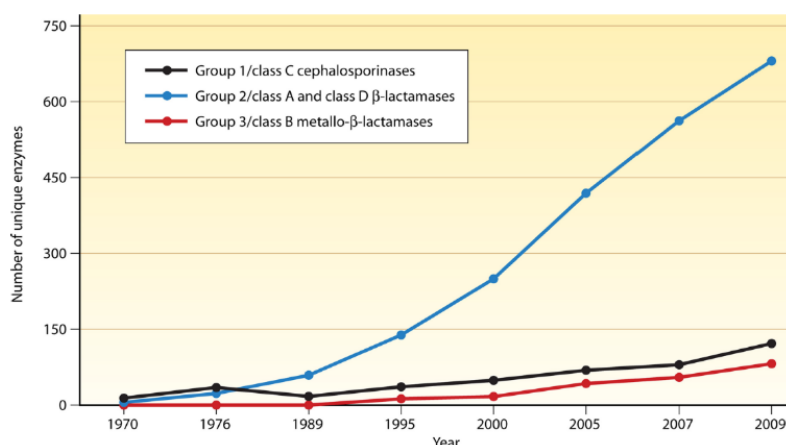


Figura 1. Incremento del número de beta-lactamasas en el período de 1970 a 2009 ⁽⁵⁾

1.2.2. Beta-lactamasas de espectro extendido

Las beta-lactamasas de espectro extendido tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico.

Estas beta-lactamasas pertenecen a la clase molecular A de Ambler y entre ellas se encuentran las de tipo TEM y SHV (derivadas de enzimas con menor espectro de hidrólisis), la familia CTX-M (procedente de beta-lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*), y otras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby.

Otras enzimas BLEE también pertenecientes a la clase A, aunque del subgrupo 2ber, son las beta-lactamasas CMT (complex mutant TEM) como la TEM-50 que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas. Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de) y el grupo 2e de la clase A de Ambler se consideran también beta-lactamasas de espectro extendido.

La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica, la cual está condicionada por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia. Su detección se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo su sensibilidad a estos antibacterianos, y en su inhibición por el ácido clavulánico.

Se han desarrollado diversas pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, la mayoría basadas en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico. Entre ellas destaca la técnica de disco-difusión en la que la presencia de una BLEE se sospecha no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de amplio espectro o los monobactámicos y el ácido clavulánico, cuando previamente se han situado de forma estratégica los discos. Otras técnicas basadas en el mismo principio son la utilización de discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico y su variante en las técnicas de microdilución que permiten conocer las CIM de las cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor. La técnica de difusión en gradiente

(ϵ -test) con tiras combinadas de cefalosporinas con y sin inhibidor es también de utilidad para la detección de BLEE.

Todas estas pruebas requieren como mínimo 48 horas desde que el producto patológico llega al laboratorio. Se han buscado nuevos métodos para acortar este tiempo por lo que se han diseñado medios cromogénicos para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE. Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (bioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagar™ ESBL (CHROMagar). Otro método cromogénico rápido es el Cica-beta-Test (Kanto Chemical) que se utiliza para la detección rápida de BLEE directamente de la colonia de enterobacteria aislada. El método utiliza una cefalosporina cromogénica (HMRZ-86) y el ácido clavulánico como inhibidor para detectar rápidamente si el aislado es portador o no de una BLEE. Esta técnica permite también detectar metalo-beta-lactamasas y AmpC hiperproducidas mediante el uso de EDTA y ácido borónico, respectivamente.

Es importante recordar que algunas enterobacterias poseen beta-lactamasas cromosómicas que hidrolizan las cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Cuando se hiperproducen dan lugar a un patrón fenotípico de resistencia compatible con la presencia de una BLEE. Entre ellas se encuentra la beta-lactamasa K1 de *Klebsiella oxytoca*, la SHV-1 de *K. pneumoniae* y las cefalosporinasas CepA de *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri* ⁽⁶⁾.

1.3. Colonización e infección por bacterias multirresistentes

Aunque se han utilizado diferentes criterios y conceptos para definir la multirresistencia, Magiorakos et al ⁽⁷⁾ la definieron recientemente como la ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de tres o más familias consideradas de utilidad para el tratamiento de las infecciones producidas por la especie bacteriana considerada.

La colonización intrahospitalaria por BMR se produce fundamentalmente por contacto persona-persona, siendo las manos el principal vehículo transmisor, además de por contacto con superficies e instrumentación contaminadas.

Los factores de riesgo de colonización e infección por BMR como *K. pneumoniae* productora de BLEE son habitualmente descritos de manera conjunta. Los principales factores identificados son el tratamiento previo con antibióticos, la

hospitalización prolongada (especialmente si esta tiene lugar en UCI), los procedimientos invasivos y quirúrgicos, la edad avanzada y la enfermedad renal crónica. La colonización asintomática es, a su vez, el principal factor de riesgo de infección posterior ⁽³⁾. Recientemente se han identificado la toma de antibióticos en el mes previo y las intervenciones quirúrgicas como los factores de riesgo más determinantes de colonización rectal por BMR ⁽⁸⁾.

La colonización asintomática por BMR no sólo incluye el riesgo de infección posterior en el individuo, sino que también implica una fuente potencial de transmisión a otros pacientes vulnerables o al medio ambiente. Se ha descrito que hasta un 15% de los pacientes hospitalizados colonizados con bacterias gram-negativas posteriormente desarrollaron una bacteriemia causada por la misma cepa, con un desenlace fatal en algunos casos.

La prevención de la transmisión de BMR en entornos sanitarios depende del reconocimiento de casos, el aislamiento de pacientes colonizados e infectados, el uso efectivo de medidas de control de infecciones y la administración correcta de antibióticos. El empleo de técnicas moleculares como PCR, PFGE y secuenciación permite la detección de brotes por estas bacterias y, en consecuencia, la implantación de las medidas encaminadas a interrumpir la transmisión de los mismos ⁽⁹⁾.

La vigilancia epidemiológica del estado de portador de BMR fue protocolizada en 2014 por el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social con la puesta en marcha del proyecto “Resistencia Zero” en las UCIs españolas. El objetivo principal de este programa era reducir en un 20% la tasa de pacientes colonizados por BMR de origen nosocomial en la UCI ⁽¹⁰⁾. La aplicación de RZ en el HCULB está basada en la toma semanal de triple hisopo (nasal, faríngeo y perineal) de cada paciente ingresado en el servicio.

En nuestro medio, el desarrollo de bacteriemia por patógenos productores de BLEE se encuentra estrechamente ligado a los cuidados sanitarios, al tratamiento indiscriminado con antibióticos, a los procedimientos invasivos y a diferentes comorbilidades asociadas con la inmunodepresión, tales como diabetes o neoplasia. Estos factores se asocian, además, a una mayor mortalidad, y constituyen factores predictores de mala evolución a medio plazo que deben tenerse en cuenta durante el seguimiento de estos pacientes ⁽¹¹⁾.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este proyecto son:

- Revisar las características epidemiológicas y clínicas de las bacteriemias producidas por *K.pneumoniae* productora de BLEE.
- Vigilancia epidemiológica del estado de portador de *K. pneumoniae* productora de BLEE de los pacientes con bacteriemia e ingresados en la UCI.
- Detectar fenotípicamente el mecanismo de resistencia a beta-lactámicos (producción de BLEE) en las cepas de *K. pneumoniae* causantes de bacteriemia.
- Tipificación molecular de las cepas de *K. pneumoniae* productora de BLEE causantes de bacteriemia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de cepas a estudio

3.1.1. *K. pneumoniae* productora de BLEE procedentes de hemocultivo

Se realizó una búsqueda retrospectiva de los hemocultivos positivos durante un período de 12 meses (desde el 1 de enero de 2018 al 31 de diciembre de 2018), seleccionando los aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE. Se utilizó para ello una base de datos anonimizada de Modulab versión 3.1 (Werfen) del Servicio de Microbiología.

3.1.1.1. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con bacteriemia

Mediante la base de datos anonimizada del grupo PROA del hospital se revisaron los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes registrando las variables: sexo, edad, servicio peticionario, enfermedades de base, factores de riesgo, foco de infección, origen y gravedad de la bacteriemia.

Se consideraron factores de riesgo los siguientes: edad superior a 65 años, inmunodepresión, alcoholismo, tratamiento antibiótico previo, procedimientos invasivos o quirúrgicos, ser portador de dispositivos, proceder de residencia y uso frecuente de los servicios hospitalarios incluido ingreso en los 3 meses previos.

En cuanto al origen, se consideró bacteriemia de origen comunitario cuando se produjo en las primeras 48 horas del ingreso hospitalario y nosocomial, cuando se produjo 48 horas tras el ingreso hospitalario o hasta 10 días después del alta. Asimismo, se consideró bacteriemia relacionada con la asistencia sanitaria cuando ésta se produjo en las primeras 48 horas del ingreso hospitalario y adicionalmente se cumplió uno de los siguientes criterios:

- a) Terapia por vía endovenosa en el domicilio, curas de las heridas o asistencia especializada de enfermería a través de una agencia de asistencia sanitaria, familia o amigos, o autoadministración de terapia por vía endovenosa en los 30 días previos a la bacteriemia.
- b) Asistencia en un dispensario de hospital o de hemodiálisis o bien administración de quimioterapia en los 30 días previos a la bacteriemia.
- c) Ingreso en un hospital de agudos durante 2 o más días en los 90 días previos a la bacteriemia.
- d) Ingreso en residencias de ancianos y centros de larga estancia.

3.1.2. *K. pneumoniae* productora de BLEE procedentes de portadores fecales

De los pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* productora de BLEE se seleccionaron aquellos que habían sido ingresados en UCI en el transcurso de su hospitalización y se revisaron los resultados de las muestras de triple hisopo del programa RZ. Se seleccionó la primera cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE de cada paciente y de aquellos que permanecieron ingresados en UCI un tiempo superior a tres semanas se hizo un estudio complementario con todas las cepas.

3.2. Detección fenotípica de BLEE: prueba de Epsilon-test (ϵ -test®)

La detección fenotípica del mecanismo de resistencia basado en la producción de BLEE se realizó con el Epsilon-test (ϵ -test®). Esta técnica consiste en la utilización de un conjunto de tiras de plástico no poroso de ϵ -test que contienen, por un lado, una concentración creciente de la cefalosporina correspondiente, y por el otro lado, una concentración creciente de la misma cefalosporina asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4 μ g/ml).

En el proceso de identificación de BLEE se recomienda la utilización de tiras de ceftazidima, cefotaxima y cefepima con y sin ácido clavulánico (ESBL CT/CTL, TZ/TZL, PM/ PML). El empleo simultáneo de las tiras de ceftazidima y cefotaxima se recomienda debido a que no todas las enzimas hidrolizan por igual estos dos

sustratos, y con la utilización exclusiva de uno de ellos podría limitarse su detección. Este sería el caso de los microorganismos productores de BLEE de tipo CTX-M en los que la utilización de ceftazidima como único sustrato impediría una detección correcta, ya que la hidrólisis de este último antibiótico por estas enzimas es muy pobre, al contrario de lo que acontece con la mayoría de las BLEE de los grupos TEM y SHV. Por el contrario, la hidrólisis de la cefotaxima es muy eficiente con las CTX-M, siendo el mejor marcador para su detección.

Igualmente es imprescindible añadir cefepima con ácido clavulánico en los casos en los que se sospeche la presencia de BLEE en los microorganismos productores de AmpC ya que esta cefalosporina de cuarta generación se afecta poco por AmpC, incluso cuando está hiperproducida, y puede observarse la sinergia con el ácido clavulánico en el caso de que exista una BLEE ⁽¹²⁾.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se inocularon placas de Müller-Hinton (bioMérieux) con las cepas bacterianas a estudio y se aplicaron las tres tiras ϵ -test recomendadas (ϵ -test® ESBL bioMérieux). Tras 24 horas de incubación en estufa, la difusión del antibiótico se manifestó en forma de un halo elíptico de inhibición de crecimiento bacteriano. El punto en que este halo interceptó la tira ϵ -test se consideró la CIM del antibiótico, siempre que no existieran colonias en los halos de inhibición. En caso de suceder este fenómeno, el valor de la CIM debería determinarse observando cuál es la CIM a la que todas las mutantes han sido inhibidas.

Se confirma la presencia de una BLEE cuando se observa una reducción de más de 3 diluciones en la CIM de cualquiera de los antibióticos, la presencia de una deformación en la elipse o “zona fantasma” (**figura 2**) ⁽¹³⁾.

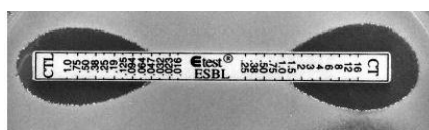


Figure 4. Clear cut ESBL positive:
MIC CT/CTL = 1.5/0.047 = 32



Figure 5. A "rounded" phantom inhibition zone below CT indicative of ESBL.

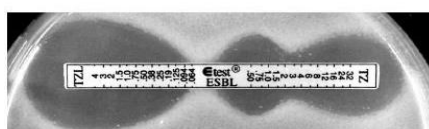


Figure 6. Deformation of the TZ inhibition ellipse indicative of ESBL.

Figura 2. Criterios de presencia de BLEE en la interpretación de ϵ -test®.

Las cepas a estudio se introdujeron en crioviales Viabank™ (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido) con perlas tratadas con agentes crioprotectores para su preservación en armario congelador en vistas a ser recuperadas posteriormente para llevar a cabo su caracterización molecular.

3.3. Tipificación molecular de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE

La caracterización molecular de las cepas a estudio se realizó mediante dos técnicas: electroforesis en campo pulsante (PFGE) y *Multilocus sequence typing* (MLST).

3.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Para estudiar la relación clonal existente entre las cepas aisladas en el HCULB se empleó la técnica PFGE.

Este procedimiento consiste en realizar un análisis de ADN cromosómico bacteriano mediante macrorrestricción. Las enzimas de macrorrestricción son enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del mismo en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante o estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente o pulsante.

Se obtienen así, patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas, lo que convierte a la PFGE en una herramienta excelente en el estudio de la relación clonal existente entre cepas de una especie bacteriana concreta ⁽¹⁴⁾.

En este trabajo se ha empleado el protocolo propuesto por R.K. Gautom (1997) ⁽¹⁵⁾ brevemente modificado, esencialmente utilizado para el estudio de la relación clonal en bacterias gram-negativas.

Todos los aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE fueron incluidos en PFGE y sometidos a la acción de la enzima de restricción XbaI (New England, BioLabs). El proceso se realizó en la cubeta de electroforesis de campos pulsados

CHEF-DR II (BioRad) bajo las siguientes condiciones: rampa lineal pulsada comprendida entre 1 s y 30 s a un gradiente de voltaje de 6V/cm y 14°C durante 23 horas. Una muestra de ADN de *Salmonella* sometida a idéntica digestión enzimática fue usada en el procedimiento como marcador de peso molecular. La fotografía del gel se realizó en el transiluminador ultravioleta Gel Doc EQ (BioRad) del departamento de Bioquímica del HCULB con el programa Quantily one 4.6.9.

Los patrones se compararon visualmente y se clasificaron según las directrices propuestas por Tenover et al (1995) ⁽¹⁶⁾ en indistinguibles, si los aislamientos presentaban el mismo número de bandas y aparentemente del mismo peso molecular; estrechamente relacionados, cuando se identificaban hasta tres diferencias entre sus bandas; posiblemente relacionados, si los patrones de los aislamientos mostraban entre cuatro y seis bandas distintas; o diferentes, cuando el número de diferencias entre los dos patrones era superior a seis bandas. Los aislamientos indistinguibles y estrechamente relacionados fueron identificados con el mismo patrón de PFGE, ya que la existencia de 3 o menos diferencias entre dos cepas responde a un único cambio genético, acumulable en las sucesivas generaciones bacterianas, pudiendo ser consideradas una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común. Aquellos que mostraron más de 3 diferencias fueron identificados con diferente patrón. Los patrones de PFGE fueron identificados con números (1-6) y se nombraron con letras (A-C) los pulsotipos estrechamente relacionados.

3.3.2. *Multilocus sequence typing* (MLST)

En vistas a poder comparar desde un punto de vista molecular los clones de *K. pneumoniae* productora de BLEE causantes de bacteriemia aislados en el HCULB con aislamientos procedentes de otras regiones geográficas se utilizó la técnica MLST.

La técnica MLST, desarrollada por Diancourt et al (2005) ⁽¹⁷⁾ para *K. pneumoniae*, consiste en el análisis de la secuencia del ADN de fragmentos internos de genes “*housekeeping*”, codificantes de enzimas metabólicas. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidas a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables ⁽³⁾. Los genes “*housekeeping*” que han sido estudiados en las cepas de *K. pneumoniae* se incluyen en la **tabla 2**.

Tabla 2. Genes “housekeeping” a estudio en MLST para *K. pneumoniae*.

Gen “housekeeping”	Enzima metabólica	Nucleótidos
<i>rpoB</i>	subunidad β de ARN polimerasa	1075 nt
<i>gapA</i>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	662 nt
<i>mdh</i>	malato deshidrogenasa	756 nt
<i>pgi</i>	fosfoglucosa isomerasa	566 nt
<i>phoE</i>	fosforina E	602 nt
<i>infB</i>	factor 2 de iniciación y traslación	462 nt
<i>tonB</i>	transductor de energía periplásmico	539 nt

3.3.2.1. Extracción de ADN

Con carácter previo al proceso de extracción se comprobó que las cepas no hubieran sufrido contaminación por otras especies en el proceso de criopreservación. Para ello se tomó una perla del criovial de cada una de las cepas a estudio y se sembraron en medio MacConkey (bioMérieux). Tras 24 horas de incubación a 37°C en la estufa verificamos en la placa de cultivo que el aislamiento seguía siendo puro. En vistas a realizar el proceso de extracción de ADN y la ulterior PCR en condiciones óptimas resembramos las cepas, esta vez en medio Müller-Hinton.

Para la extracción del ADN de los aislados de *K.pneumoniae* se utilizó el sistema InstaGene™Matrix (BioRad), una matriz que absorbe los productos de la lisis celular que pueden interferir en la PCR, facilitando la obtención de ADN válido para su posterior amplificación. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Resuspender 1 colonia en 1ml de agua destilada estéril en un tubo de centrífuga para eliminar partículas residuales de agar.
2. Centrifugar 1 min a 14.000 rpm. Desechar el sobrenadante.
3. Añadir 200 μ l de InstaGeneMatrix al pellet e incubar a 56°C durante 20 min. La matriz se debe mantener en agitación a una velocidad moderada.
4. Agitar en agitador tipo vórtex a alta velocidad durante 10 s.
5. Hervir la mezcla a 100°C durante 8 min para inactivar enzimas capaces de degradar el ADN.
6. Centrifugar durante 5 min a 14.000 rpm.

El sobrenadante obtenido contenía el ADN genómico puro e intacto a emplear en la amplificación. Una excesiva concentración de ADN podría haber inhibido la PCR, por lo que se realizaron alícuotas con dilución 1:10 del ADN extraído de cada cepa, preservándose ambas muestras juntas en armario congelador.

3.3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR, procedimiento desarrollado por Kary Mullis (1985)⁽¹⁸⁾, permite obtener de forma *in vitro* un gran número de copias de un fragmento de ADN. Para que esta técnica sea desarrollada correctamente debemos delimitar la secuencia que queremos amplificar con unos fragmentos cortos de ADN monohebra complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Se denomina primer directo al cebador que hibridará con la hebra molde y primer reverso al cebador que hibridará con la hebra codificante. Estos fragmentos servirán de cebadores para que la enzima taq-polimerasa pueda incorporar el resto de nucleótidos complementarios a la cadena molde. Esta amplificación es estrictamente necesaria para poder acometer exitosamente la secuenciación génica.

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes “*housekeeping*” se recogen en la **tabla 3**.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de genes “*housekeeping*” de *K. pneumoniae*.

Gen “ <i>housekeeping</i> ” a amplificar	Secuencia nucleotídica cebador
<i>rpoB</i>	F:GGCGAAATGGCWGAGAACCA
	R:GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
<i>gapA</i>	F:TGAAATATGACTCCACTCACGG
	R:CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
<i>mdh</i>	F:CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG
	R:CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG
<i>pgi</i>	F:GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC
	R:CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT
<i>phoE</i>	F:ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG
	R:TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
<i>infB</i>	F:CTCGCTGCTGGACTATATTCG
	R:CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC

<i>tonB</i>	F:CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT
	R:ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG

En este proyecto se emplearon el termociclador Viasure 48 real-time PCR system (CerTest Biotec, España), los cebadores sintetizados por Sigma-Aldrich® y la master-mix Viasure Essentials (CerTest Biotec, España). El programa de amplificación para *infB*, *rpoB*, *mdh*, *pgi* y *phoE* fue el siguiente: desnaturalización a 94°C 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94° 20 s + hibridación a 50° 30 s + elongación a 72°C 30 s y elongación final a 72°C 5 min. Los genes *gapA* y *tonB* se amplificaron de manera idéntica a salvedad de la temperatura de hibridación que fue de 60°C y 45°C respectivamente.

3.3.2.3. Detección de genes amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos de PCR se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa, que está basada en la migración unidireccional del ADN cuando se le aplica un campo eléctrico. A pH neutro, el ADN tiene carga negativa, lo que comporta su migración desde el polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). La movilidad electroforética de los fragmentos de ADN depende en gran medida de su tamaño. Es una técnica utilizada para separar, identificar y aislar fragmentos de ADN a partir de una mezcla heterogénea.

La visualización de los fragmentos de ADN se consigue mediante la incorporación al gel de Bromuro de Etidio (BrEt), un colorante fluorescente que se intercala entre las dos hebras de ADN. Este reactivo revela la presencia de una banda de ADN al ser iluminada con luz ultravioleta de longitud de onda corta (310 nm).

La concentración de agarosa está condicionada por el tamaño de los fragmentos de ADN que se pretenden separar. En este estudio, los geles de agarosa precisaban ser elaborados a concentración 1% para poder visualizar correctamente los genes de interés. Los geles de agarosa se prepararon partiendo de una solución del tampón TBE (Tris 0.44M, ácido bórico 0.44M, EDTA 12.5 mM pH 8) a una concentración de stock 10X. Puesto que la concentración necesaria era 1X, se mezclaron 100 ml de TBE buffer con 900 ml de agua bidestilada. A continuación, se disolvió 1 g de agarosa en 100 ml de TBE 1X y se llevó a ebullición hasta su total disolución. Se dejó enfriar y se añadió una solución acuosa de BrEt (0,5µg/ml). Esta

mezcla se vertió en un molde previamente sellado y con dos peines y se dejó solidificar. Se retiraron los peines con precaución para no dañar los pocillos y se colocó el gel en una cubeta de electroforesis llena de tampón TBE 1X, asegurando su completa cobertura. Por último, se procedió a cargar los pocillos con 5 μ l de producto de PCR mezclados con 2 μ l de tampón de carga. El primer y último pocillo del gel fueron cargados con 4 μ l de marcador de peso molecular.

La electroforesis se programó a 100 V, 400 mA y duración de 35 min. El gel se visualizó en el transiluminador ultravioleta Gel Doc EQ (BioRad) del departamento de Bioquímica del HCULB con el programa Quantily one 4.6.9.

La equivalencia entre pares de bases y peso molecular proporcionada por la casa comercial (**figura 3**) nos permitió verificar la correcta realización de la amplificación.

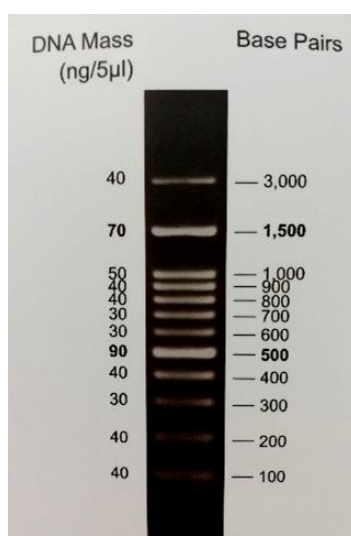


Figura 3. Equivalencia entre peso molecular y pares de bases en el análisis de genes amplificados.

3.3.2.4. Secuenciación

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) con el secuenciador 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para la secuenciación se emplearon los mismos cebadores que se habían utilizado en las reacciones de PCR con tres excepciones: cebador Fw y cebador Rv de *pgi* y cebador Fw de *infB* (**tabla 4**).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la secuenciación de genes “*housekeeping*” de *K. pneumoniae*. Excepciones a cebadores empleados en la reacción de PCR: cebador Fw y cebador Rv de *pgi* y cebador Fw de *infB*.

Gen “ <i>housekeeping</i> ” a secuenciar	Secuencia nucleotídica cebador
<i>pgi</i>	F:CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
	R:TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT
<i>infB</i>	F:ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC

El análisis de las secuencias de ADN se realizó con el programa ApE y se compararon los resultados con la base de datos <https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>. La combinación de los 7 alelos nos proporcionó el ST que permitió tipificar las diferentes cepas a estudio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de cepas a estudio

4.1.1. *K. pneumoniae* productora de BLEE procedentes de hemocultivo

Durante el período de estudio se procesaron en el laboratorio de Microbiología del HCULB 15405 hemocultivos, de los cuales 1923 fueron positivos (12,48%). Se aislaron enterobacterias en 810 (42,12%), de los cuales 120 correspondieron a *K. pneumoniae* (6,24%), documentándose un total de 60 bacteriemias por este microorganismo. Once de ellas fueron producidas por cepas productoras de BLEE (18,33%).

4.1.1.1. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con bacteriemia

Los pacientes, 9 varones (81,81%) y 2 mujeres (18,18%), tenían edades comprendidas entre 59 y 95 años (edad media 78,81 ±11,3). Las enfermedades de base y los factores de riesgo se recogen en la **tabla 5** y **tabla 6** respectivamente.

En cuanto a la gravedad, 5 bacteriemias se presentaron en forma de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) y 6 como sepsis. El origen se consideró nosocomial en 5 pacientes y relacionado con la asistencia sanitaria en los 6 restantes.

Tabla 5. Enfermedades de base de los pacientes a estudio.

Enfermedad de base	Pacientes
Enfermedad cardiovascular	8
Enfermedad neurológica	6
Enfermedad renal	6
Enfermedad hepática	4
Enfermedad respiratoria	3
Diabetes	3
Neoplasia	2

Tabla 6. Factores de riesgo presentes en los pacientes a estudio.

Factor de riesgo	Pacientes
Mayor de 65 años	10
Tratamiento antibiótico previo	9
Procedimientos invasivos, quirúrgicos y dispositivos ^(a)	8
Uso frecuente de los servicios hospitalarios incluido ingreso en 3 meses previos	6
Inmunodepresión	4
Residencia	3
Alcoholismo	3

^(a) Catéter central (5), ventilación mecánica (2), sonda nasogástrica (3), intubación orotraqueal (1), sonda vesical (4), CPRE (1), marcapasos (2), intervención quirúrgica (2), catéter doble J (1).

Los servicios peticionarios y los focos de infección quedan representados en las **figuras 4 y 5** respectivamente.

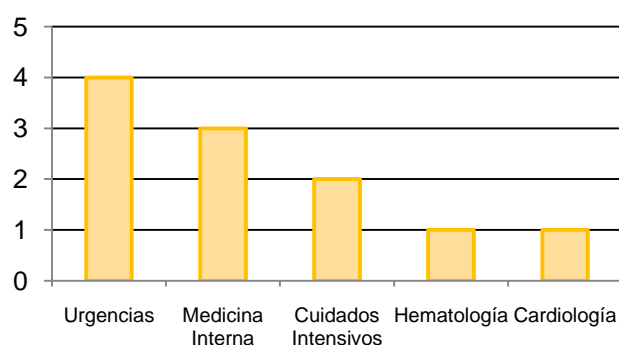


Figura 4. Servicios peticionarios de los hemocultivos.

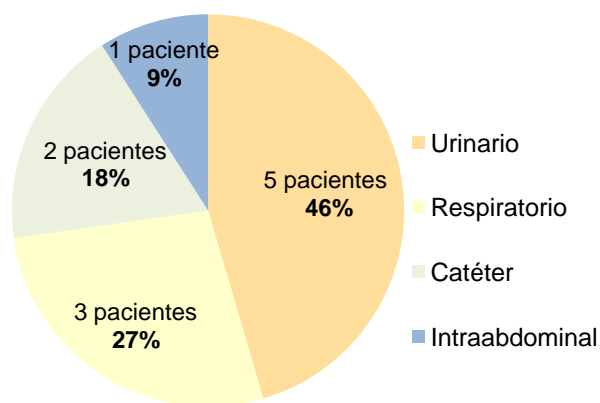


Figura 5. Focos de infección.

El perfil epidemiológico del paciente con bacteriemia por *K. pneumoniae* productora de BLEE en el estudio multicéntrico de Díaz et al ⁽¹⁹⁾ es similar al hallado en este estudio: paciente varón mayor de 60 años, con foco urinario y adquisición nosocomial. Sin embargo, el servicio predominante en su muestra fue la UCI, mientras que en nuestro trabajo resultaron ser otros servicios médicos como Urgencias y Medicina Interna.

El foco de infección más prevalente en las publicaciones consultadas resultó ser urinario ^(19,20,21), sin embargo, Perianes-Díaz et al ⁽¹¹⁾ señalan el foco abdominal como más frecuente en bacteriemias por *K. pneumoniae* seguido del foco respiratorio.

El empleo de antibióticos, estancias hospitalarias prolongadas o antecedentes de ingreso recientes, edad superior a 65 años, haber sido sometido recientemente a una intervención quirúrgica y ser portador de dispositivos tales como catéteres vasculares o sondajes vesicales son factores de riesgo reincidentes que incrementan la probabilidad de infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE, tal y como señalan Díaz et al ⁽¹⁹⁾ y Nguyen et al ⁽²⁰⁾.

El tratamiento antibiótico previo resulta ser el factor de riesgo más reiterativo en relación a la bacteriemia por enterobacterias productoras de BLEE ^(11,19,20).

Perianes-Díaz et al ⁽¹¹⁾ demuestran como la antibioterapia previa constituye, no solo un riesgo para el desarrollo de bacteriemia por bacterias productoras de BLEE, sino que se asocia a una peor evolución, ya que son estos pacientes lo que muestran una mayor mortalidad intrahospitalaria y tasa de reingreso hospitalario. Este hallazgo debe ser considerado a la hora de plantear un seguimiento más estrecho tras el alta hospitalaria de pacientes ingresados por bacteriemias debidas a estas BMR.

La importancia de este hallazgo radica fundamentalmente en la capacidad de modificar este factor por parte de los facultativos a la hora de prescribir tratamientos antibióticos, ya que un uso más racional de los mismos contribuiría a reducir la incidencia de infecciones potencialmente graves como las bacteriemias.

4.1.2. *K. pneumoniae* productora de BLEE procedentes de portadores fecales

Cuatro de los 11 pacientes hospitalizados con bacteriemia por *K. pneumoniae* productora de BLEE fueron ingresados en UCI en el transcurso de su hospitalización. De cada uno de ellos se seleccionó el primer aislamiento de *K. pneumoniae* productora de BLEE del programa RZ para realizar la comparación con la cepa causante de bacteriemia mediante PFGE (ver más adelante apartado 4.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE), figura 8). Además, 2 de los 4 pacientes permanecieron en la UCI durante un período superior a 3 semanas, por lo que se seleccionaron la totalidad de las muestras tomadas durante dicho ingreso para estudiar más exhaustivamente su estado de portador. En este sentido, se tomaron un total de 21 muestras, 7 al primer paciente (identificado como paciente A) y 14 al segundo (identificado como paciente B), aislándose *K. pneumoniae* productora de BLEE en 6 y 12 respectivamente.

4.1.2.1. Colonización por *K. pneumoniae* productora de BLEE en pacientes ingresados en UCI durante un período superior a tres semanas

El paciente A fue colonizado por *K. pneumoniae* productora de BLEE a nivel intrahospitalario como consecuencia de ser ingresado en UCI. El paciente B fue considerado portador desde el inicio de su ingreso en UCI dado el aislamiento de *K. pneumoniae* productora de BLEE en la primera muestra del programa RZ. Perdió temporalmente su estado de portador, probablemente como consecuencia del tratamiento antibiótico recibido en el contexto de su bacteriemia, siendo recolonizado poco tiempo después (**figura 6**).

La relación clonal existente entre las cepas colonizadoras de ambos pacientes se estudió mediante PFGE, cuyos resultados quedan recogidos en el apartado 4.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE), figura 9.

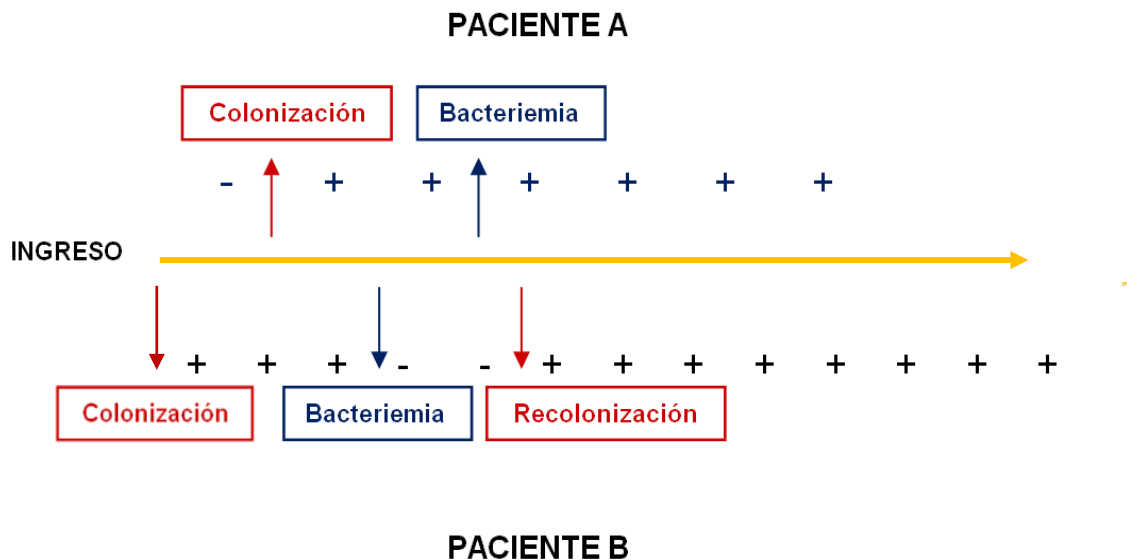


Figura 6. Cronología de aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE durante el período de ingreso en UCI de pacientes A y B.

Los pacientes con bacteriemia pueden experimentar episodios recurrentes tras el proceso inicial. Lee et al ⁽²¹⁾ estudiaron la incidencia y los aspectos clínicos y microbiológicos de la recurrencia de bacteriemia por *K. pneumoniae* productora de BLEE. Se demostró una tasa de recurrencia sustancial (16,7%) y el 67,8% de los casos sufrió reinfección por idéntica cepa, hecho que sugeriría la existencia de un foco residual de infección o reservorios persistentes que no sean eliminados durante el tratamiento del primer episodio, incluso siendo este efectivo. Actualmente, ser portador fecal del microorganismo productor de BLEE se considera el factor de riesgo más importante para sufrir estas recidivas.

La detección de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE que colonizan pacientes de UCI es una tarea importante porque con frecuencia la colonización por estas BMR precede a la infección. Es necesaria la evaluación y la implementación de estrategias de detección y vigilancia durante la hospitalización en la UCI, especialmente en pacientes que cumplen ciertos factores de riesgo. En este sentido, especial observación merecen los pacientes posquirúrgicos y aquellos que han consumido antibióticos durante el mes previo. Si bien el estado de portador aumenta el riesgo de sufrir una infección posterior, no ha sido asociado a mayor mortalidad del proceso infeccioso en comparación con pacientes no colonizados ⁽⁸⁾.

4.2. Detección fenotípica de BLEE: prueba de Epsilon-test (ϵ -test)

Se realizó el ϵ -test a los 11 aislamientos en vistas a confirmar el fenotipo de resistencia basado en la producción de BLEE asignado en el estudio primitivo de las cepas. Se aplicaron las 3 tiras recomendadas (ESBL CT/CTL, TZ/TZL, PM/ PML) y los resultados fueron los siguientes: las 11 cepas de *K. pneumoniae* (100%) presentaron fenotipo BLEE con relación CT/CTL ≥ 8 y/o TZ/TZL ≥ 8 y/o PM/ PML ≥ 8 (**figura 7**).

De esta manera se pone de manifiesto la resistencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE a cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima y ceftazidima) y 4ª generación (cefepima), la cual queda anulada con la adición de un inhibidor de beta-lactamasa (ácido clavulánico).

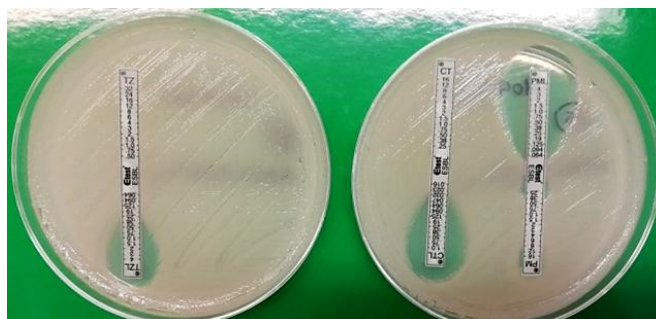


Figura 7. Confirmación fenotípica de producción de BLEE con CT/CTL 16/0.032, TZ/TZL 32/0.25 y PM/ PML 16/0.064 y “zona fantasma” en PM/PML.

4.3. Tipificación molecular de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE

4.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Se incluyeron en PFGE las 11 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE causantes de bacteriemia y la primera cepa aislada en el programa RZ de cada uno de los 4 pacientes ingresados en UCI. Se identificaron 6 patrones diferentes, siendo el pulsotipo 1 claramente predominante (**figura 8**).

Las 11 cepas causantes de bacteriemia fueron clasificadas en 6 patrones. El aislamiento con pulsotipo 1 fue responsable de 5 de las 11 bacteriemias (45,45%). El patrón 3 de PFGE causó 2 bacteriemias (18,18%) y a los restantes 2, 4, 5 y 6 se les atribuyó únicamente una bacteriemia (9,09%). La cepa causante de bacteriemia resultó ser indistinguible a la cepa colonizadora aislada en RZ en 2 de los 4 pacientes ingresados temporalmente en UCI (HC1802 idéntica a ZB701 y HC3063 idéntica a ZB795). La cepa colonizadora y la causante de bacteriemia del tercer paciente

ingresado en UCI resultaron estar estrechamente relacionadas y se les asignó el mismo patrón (HC3087 y ZB773). El cuarto paciente sufrió colonización y bacteriemia por distintas cepas, si bien su cepa colonizadora resultó ser indistinguible a la de otro paciente de UCI (ZB674 idéntica a ZB701). Además, ZB773 resultó ser idéntica a ZB795. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que estas cepas se encuentren en la UCI del HCULB y por ello hayan sido identificadas en distintos huéspedes hospitalizados en distintos momentos del período de estudio.

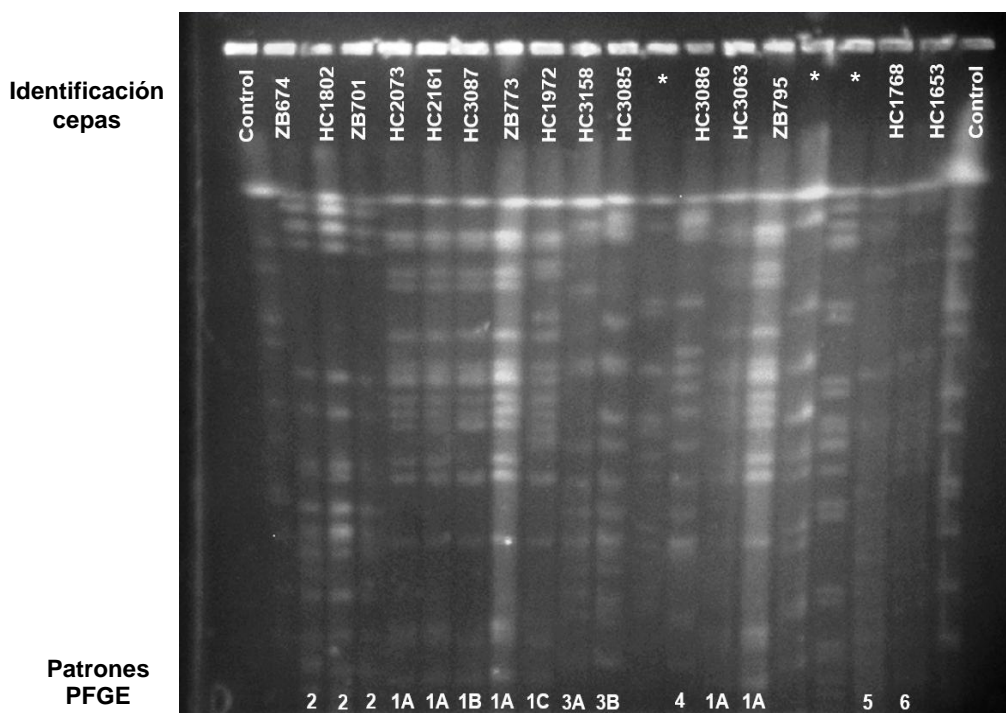


Figura 8. PFGE de cepas causantes de bacteriemia y cepas colonizadoras de pacientes de UCI. ZB: cepa de programa RZ; HC: cepa de hemocultivo. (*) Cepas no incluidas en el estudio.

Se realizó una segunda PFGE que incluyó las cepas causantes de bacteriemia de los pacientes A y B ingresados en UCI junto a las cepas aisladas en ambos como parte del programa RZ, que fueron 6 y 9 respectivamente. Se identificaron un total de 4 patrones diferentes, siendo nuevamente el pulsotipo número 1 el más frecuente (**figura 9**).

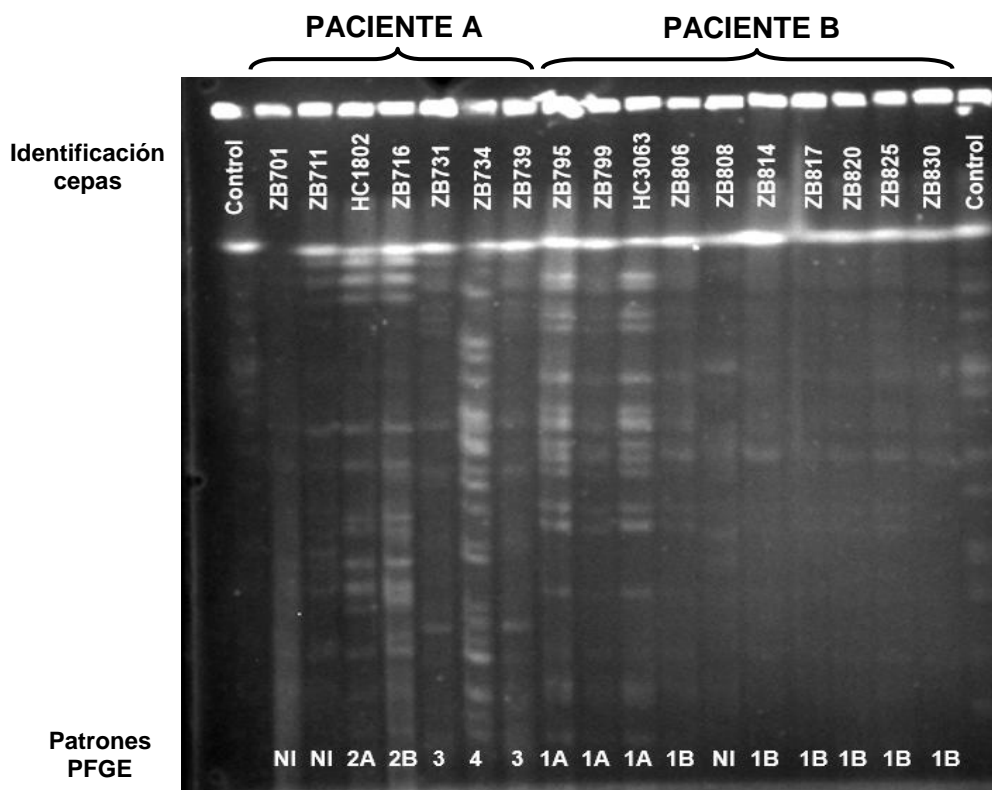


Figura 9. PFGE de cepas causantes de bacteriemia y aisladas en RZ de pacientes A y B. ZB: cepa de programa RZ; HC: cepa de hemocultivo; NI: no interpretable.

El **paciente A** estaba colonizado por cepa indistinguible (ZB701) a aquella causante de bacteriemia (HC1802), tal y como mostraron los resultados de la primera PFGE. El análisis de la cepa ZB711 planteó dificultades por la escasa claridad de las bandas. El aislamiento posterior al episodio de bacteriemia parece reflejar una colonización de novo por una cepa estrechamente relacionada con la primitiva (ZB716), mientras que los siguientes presentan mayor número de diferencias, siendo considerados patrones distintos.

El **paciente B** mostró ser portador de cepa indistinguible (ZB795 y ZB799) a aquella que había causado el proceso infeccioso (HC3063). Los aislamientos realizados con posterioridad revelan una recurrencia de la colonización, si bien no por cepa indistinguible, por una estrechamente relacionada con la primitiva (la mala calidad de la imagen no permite afirmar con absoluta certeza que sean idénticas). El análisis del aislamiento ZB808 plantea dificultades por la escasa claridad de las bandas, no pudiendo extraerse conclusiones al respecto.

4.3.2. Multilocus sequence typing (MLST)

Se realizaron la extracción y amplificación del ADN de las 11 cepas de *K. pneumoniae* productora de BLEE causantes de bacteriemia. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (**figura 10**). Se verificó que la posición de las bandas en el gel se adecuaba a la migración esperada según el número de nucleótidos de cada gen "housekeeping": *rpoB* (1075 nt), *gapA* (662 nt), *mdh* (756 nt), *pgi* (566 nt), *phoE* (602 nt), *infB* (462 nt) y *tonB* (539 nt).

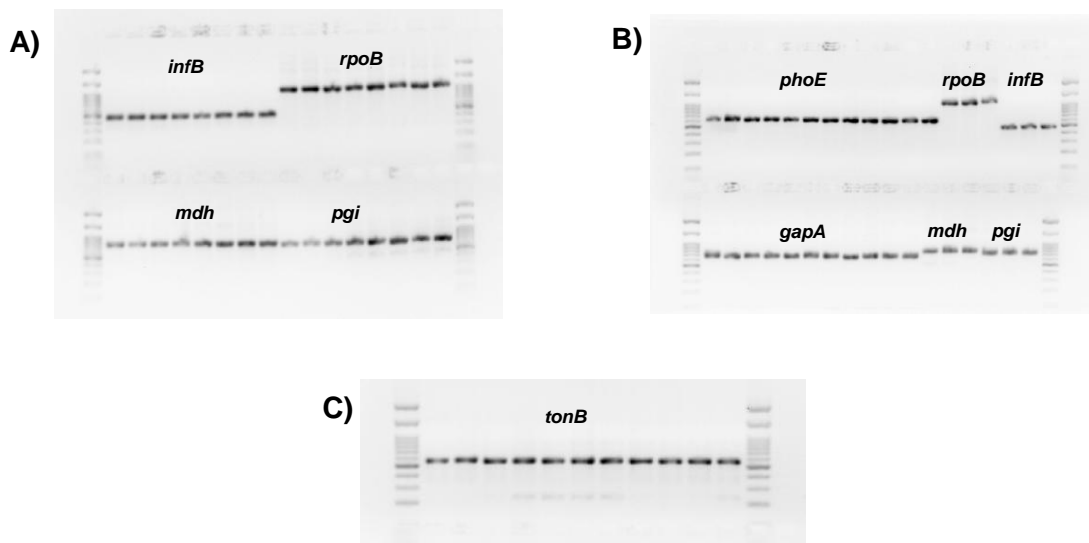


Figura 10. Visualización en gel de agarosa de material genético amplificado. A) Amplificación genes *infB*, *rpoB*, *mdh* y *pgi*; B) Amplificación genes *phoE*, *rpoB*, *infB*, *gapA*, *mdh* y *pgi*; C) Amplificación gen *tonB*.

El análisis de las secuencias remitidas por el CIBA nos permitió identificar los 7 alelos codificantes del ST de cada cepa causante de bacteriemia (**tabla 7**).

Se detectaron 5 STs diferentes: ST405, ST307, ST392, ST340 y ST3035. ST405 resultó ser el mayoritario, detectándose en 5 aislamientos (45,45%), todos ellos con patrón 1 de PFGE. El segundo ST más frecuente fue ST307, siendo identificado en 3 aislamientos (27,27%). Dos de ellos habían sido identificados con el patrón 3 de PFGE, mientras que al tercero se le había asignado el patrón 4. ST340 fue detectado en un único aislamiento (9,09%), de igual forma que ST3035 y ST392. En PFGE habían sido identificados como pulsotipos 2, 5 y 6 respectivamente.

Tabla 7. Alelos de genes “housekeeping” y STs de las cepas causantes de bacteriemia.

Cepa bacteriemia	<i>gapA</i>	<i>phoE</i>	<i>mdh</i>	<i>rpoB</i>	<i>infB</i>	<i>pgi</i>	<i>tonB</i>	ST
1	3	7	6	4	4	1	40	392
2	2	4	108	161	1	3	421	3035
3	3	1	1	1	3	1	18	340
4	2	10	62	4	1	3	110	405
5	2	10	62	4	1	3	110	405
6	2	10	62	4	1	3	110	405
7	2	10	62	4	1	3	110	405
8	4	1	2	1	1	52	7	307
9	4	1	2	1	1	52	7	307
10	4	1	2	1	1	52	7	307
11	2	10	62	4	1	3	110	405

K. pneumoniae **ST405** ha sido descrito como un clon con gran capacidad para diseminar diferentes determinantes de resistencia a quinolonas y beta-lactámicos (incluyendo BLEE y carbapenemasas), entre diferentes hospitales en España ⁽²²⁾ y otros países europeos como Francia y Bélgica ⁽²³⁾. Concretamente, este clon y su variante alélica ST663, fueron responsables de numerosos brotes causados por cepas productoras de OXA-48 en varias regiones de España entre 2010 y 2012: ⁽²⁴⁾. López Dosil et al ⁽²⁵⁾ lo identifican como uno de los clones más prevalentes en España y portador exclusivamente de OXA-48. Sin embargo, Machuca et al ⁽²⁴⁾ caracterizaron un brote nosocomial causado por *K. pneumoniae* ST450 productor de CTX-M-15 carente del gen *bla*_{OXA-48} en una unidad neonatal de un hospital de Córdoba, siendo la primera vez que este clon era descrito sin ser portador de dicha carbapenemasa. De hecho, el estudio multicéntrico realizado por Oteo et al ⁽²⁶⁾ en 2009 no encontró ST405 portador de OXA-48 entre la población de *K. pneumoniae* productoras de BLEE a estudio, lo que plantea la posibilidad de que originariamente ST405 diseminara CTX-M-15 y el plásmido portador del gen *bla*_{OXA-48} fuera adquirido con posterioridad.

K. pneumoniae **ST307** es considerado actualmente un clon multiresistente de alto riesgo por haber sido relacionado con la producción de notables mecanismos de resistencia antimicrobiana como CTX-M-15, KPC-2, OXA-48, NDM-1 y *mcr-1* ⁽²⁷⁾. El estudio de Wyres et al ⁽²⁸⁾ destaca la similitud entre ST307 y ST258 en cuanto a fecha de emergencia, tasa de evolución, alta prevalencia de genes de resistencia antibiótica y potente tasa de conservación de plásmidos aislados. De hecho, en la actualidad, se plantea que ST307 esté remplazando a ST258 como el clon multiresistente más

prevalente. El aislamiento más antiguo registrado tuvo origen en los Países Bajos en 2008. Ha sido aislado con posterioridad en muestras humanas clínicas en Italia, Corea, Texas, Colombia, Pakistán y Marruecos. Asimismo, aunque de manera minoritaria, ha sido aislado en aguas residuales y poblaciones de ratas ^(27,29). Casañ et al ⁽³⁰⁾ analizaron 36 aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE en 2014 en tres hospitales de la Comunidad Valenciana y evidenciaron la presencia de ST307 y ST405 productores de CTX-M-15. Recientemente Lowe et al ⁽²⁷⁾ han descrito una diseminación de este secuenciotipo en 42 hospitales de Sudáfrica. CTX-M-15 es, a diferencia del resto de beta-lactamasas de tipo CTX-M, la única con capacidad de hidrolizar ceftazidima además de cefotaxima. Los aislamientos ST307 mostraron hidrólisis de ambos sustratos en el estudio de resistencia antimicrobiana (ver apartado 4.2. Detección fenotípica de BLEE: prueba de Epsilon-test (ϵ -test)), de lo que se deduce que dichas cepas podrían ser portadoras de CTX-M-15.

K. pneumoniae **ST392** productora de metalo-beta-lactamasa 1 (bla_{NDM-1}) ha sido identificada en Irán ⁽³¹⁾ mientras que *K. pneumoniae* ST392 aislada en Estados Unidos fue relacionada con la producción de CTX-M y KPC-3 ⁽³²⁾. Recientemente el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades ha descrito un brote de *K. pneumoniae* ST392 productor de OXA-48 en habitantes de Suecia y Noruega tras un viaje a Gran Canaria en el año 2018 ⁽³³⁾.

K. pneumoniae **ST340** ha sido identificado en Sri Lanka ⁽³⁴⁾ y Corea del Sur ⁽³⁵⁾. Mathers et al ⁽³⁶⁾ identifican al ST340 como componente del complejo clonal 258 (CC258) y lo describen en Brasil y Grecia. Este CC258 está compuesto por ST258 y otros menos frecuentes entre los que se incluyen ST340, ST11 y ST12. ST258 es considerado uno de los clones de alto riesgo por excelencia.

No se ha encontrado ninguna referencia acerca del **ST3035**. En este estudio, esta cepa fue aislada en un varón de nacionalidad española con pluripatología, bacteriemia de origen nosocomial y foco urinario, probablemente en relación al sondaje vesical del que era portador.

5. CONCLUSIONES

- Durante el período de estudio se documentaron 60 bacteriemias por *K. pneumoniae*, 11 de las cuales causadas por cepas productoras de BLEE.
- Los pacientes fueron, en su mayoría, varones mayores de 70 años con pluripatología, tratamiento antibiótico previo, repetidos ingresos en los últimos 3 meses, procedimientos invasivos y foco urinario.
- Tres de los cuatro pacientes ingresados en UCI con bacteriemia estaban colonizados por una cepa indistinguible o estrechamente relacionada y aquellos pacientes con ingreso prolongado se mantuvieron colonizados durante todo el tiempo por dichas cepas.
- El fenotipo productor de BLEE fue confirmado en el 100% de los aislamientos, hidrolizando en todos los casos cefotaxima, ceftazidima y cefepima.
- *K. pneumoniae* ST405 y ST307 fueron los clones más prevalentes detectándose en 5 y 3 bacteriemias, respectivamente, demostrando una gran capacidad de diseminación horizontal.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Cubero González M, Ardanuy Tisaire C (dir), Domínguez Luzón MA (dir). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* [tesis doctoral en Internet]. [Barcelona]: Universidad de Barcelona; 2015 [citado 30 de abril de 2019]. Recuperado a partir de: <http://bit.ly/2YRmu9i>
2. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016; 4(1): 1-6.
3. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8(4): 1-15.
4. Fica A. Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos, cocáceas gram positivas y anaerobios: implicancias terapéuticas. Rev Med Clin Condes. 2014; 25(3): 432-44.
5. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3): 969-76.
6. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29(7): 524-34.
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(3): 268-81.
8. Padilla-Serrano A, Serrano-Castañeda JJ, Carranza-González R, García-Bonillo MP. Factores de riesgo de colonización por enterobacterias multirresistentes e impacto clínico. Rev Esp Quimioter. 2018; 31(3): 257-62.
9. Asencio Egea MA, Huertas Vaquero M, Muñoz-Cuevas C, Gaitán Pitera J, Herráez Carrera O, Alcázar Carmona P, et al. Diseminación monoclonal de *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-15 multirresistente. Impacto de las medidas para controlar el brote. Rev Esp Quimioter. 2018; 31(3): 237-46.
10. Proyecto Resistencia Zero: prevención de la emergencia de bacterias multirresistentes en el paciente crítico [Internet]. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. 2014 [citado 27 de mayo de 2019]. Recuperado a partir de: <http://bit.ly/2QvqWr8>
11. Perianes-Díaz ME, Novo-Veleiro I, Solís-Díaz K, Prolo-Acosta A, García-García I, Alonso-Claudio G. Bacteriemia por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido: factores asociados a mortalidad y reingreso hospitalario. Med Clin. 2014; 142(9): 381-86.

12. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de beta-lactamasas plasmídicas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003. En: Boletín de Control de Calidad SEIMC. Disponible en: <http://www.seimc.org>.
13. Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(1): 12-8.
14. Coll P, Coque MT, Domínguez MA, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005.
15. Gautom RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(11): 2977-80.
16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting Chromosomal ADN restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2233-39.
17. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8): 4178-82.
18. Mullis K, Faloona R, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 51: 263-73.
19. Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(9): 503-10.
20. Nguyen ML, Tuye B, Kanji S, Zvonar R. Risk factors for and outcomes of bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species at a canadian tertiary care hospital. *Can J Hosp Pharm*. 2015; 68(2): 136-43.
21. Lee H, Su LH, Chen FJ, Tang YF, Chiensand CC, Liu JW. Clinical and microbiologic characteristics of adult patients with recurrent bacteraemia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(12): 1105.e3–1105.e8.
22. Pérez-Vázquez M, Oteo J, García-Cobos S, Aracil B, Harris SR, Ortega A, et al. Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71: 887-96.
23. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M. 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): 3406-11.

24. Machuca J, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Gracia-Ahufinger I, Ruiz-Carrascoso G, Rodríguez-López F, et al. Characterization of an outbreak due to CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* lacking the *bla_{OXA-48}* gene belonging to clone ST405 in a neonatal unit in southern Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(8): 2353-5.

25. López-Dosil M, Bischofberge C, Sáez D, García-Picazo L. Epidemiología de la diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital comarcal y un hospital de media estancia en Madrid. *Rev Esp Quimioter.* 2017; 30(6): 458-63.

26. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, et al. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 524-8.

27. Lowe M, Kock MM, Coetzee J, Hoosien E, Peirano G, Strydom KA, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST307 with *bla_{OXA-181}*, South Africa, 2014-2016. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25(4): 739-46.

28. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74: 577-81.

29. Schaufler K, Nowak K, Dux A, Semmler T, Villa L, Kourouma L, et al. Clinically relevant ESBL-producing *K. pneumoniae* ST307 and *E. coli* ST38 in an urban west african rat population. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1-7.

30. Casañ C, Tormo N, Ocete D, Valero I, Gimeno C. Analysis and distribution of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clones isolated in three hospitals of the same region (Spain). *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2018 April 21-24; Madrid.*

31. Shoja S, Ansari M, Faridi F, Azad M, Davoodian P, Javadpour S, et al. Identification of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with emphasis on New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (*bla_{NDM-1}*) in Bandar Abbas, South of Iran. *Microb Drug Resist.* 2018; 24(4): 447-54.

32. Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H, Moreno-Domínguez S, Toribio-Jiménez J, Jardón-Pineda D, Cuevas-Peña J, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella spp.* isolates causing community-acquired infections. *New Microbes New Infect.* 2018; 23: 17-27.

33. Carbapenemase-producing (OXA-48) *Klebsiella pneumoniae* ST392 in travellers previously hospitalized in Gran Canaria, Spain. *European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2018.*

34. Hall JM, Corea E, Sanjeevani HD, Inglis TJ. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Sri Lanka. J Med Microbiol. 2014; 63(8): 1087-92.
35. Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, et al. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. J Clin Microbiol. 2012; 50(4): 1433-36.
36. Mathers AJ, Pelrano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(3): 565-91.