

Jessica Bueno Sancho

Vigilancia epidemiológica y
caracterización de mecanismos de
resistencia a carbapenems en
enterobacterias de origen clínico y
de portadores

Director/es

Castillo Garcia, Francisco Javier
Seral Garcia, Cristina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y
CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE
RESISTENCIA A CARBAPENEMS EN
ENTEROBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO Y DE
PORTADORES

Autor

Jessica Bueno Sancho

Director/es

Castillo Garcia, Francisco Javier
Seral Garcia, Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2020

Tesis Doctoral

**Vigilancia epidemiológica y caracterización de
mecanismos de resistencia a carbapenems en
enterobacterias de origen clínico y de portadores**

Memoria presentada por **Jessica Bueno Sancho** para optar al **Grado de
Doctor** por la Universidad de Zaragoza

Directores: Cristina Seral García y Francisco Javier Castillo García

Zaragoza, noviembre 2019

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

Índice

Índice

Índice.....	1
Abreviaturas.....	5
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tablas.....	9
Introducción.....	13
1. El orden Enterobacterales.....	15
1.1. Epidemiología.....	17
2. Antibióticos frente a Enterobacterias.....	20
2.1. Antibióticos β -lactámicos.....	20
2.2. Otras familias de antibióticos.....	21
2.2.1. Quinolonas.....	21
2.2.2. Aminoglucósidos.....	22
2.3. Resistencia a los antibióticos en enterobacterias.....	23
2.3.1. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos.....	24
2.3.2. β -lactamasas.....	25
2.3.3. Mecanismos de resistencia a carbapenems en enterobacterias.....	29
2.4. Evolución de la resistencia a β -lactámicos en enterobacterias.....	34
3. Estructura y función de los integrones.....	39
4. Tipificación molecular de enterobacterias.....	41
4.1. Tipificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
4.2. Clones de alto riesgo en <i>K. pneumoniae</i>	44
Objetivos.....	47

Material y métodos	53
1. Selección de los aislados estudiados.....	55
1.1. Aislados clínicos.....	55
1.2. Aislados procedentes de pacientes colonizados.....	55
2. Identificación y determinación de la sensibilidad a los antibióticos.....	56
3. Métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia a antibióticos.....	58
3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas	58
3.1.1. Test de sinergia de doble disco	58
3.1.2. Test modificado de Hodge	59
3.2. Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE)	60
3.2.1. Epsilon-test (ϵ -test [®])	60
3.3. Detección fenotípica de β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas.....	61
3.3.1. Epsilon-test (ϵ -test [®])	61
4. Extracción y cuantificación del DNA.....	61
4.1. Extracción del DNA.....	61
4.2. Cuantificación del DNA.....	62
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
5.1. Detección de genes codificantes de MBL.....	65
5.2. Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A.	66
5.3. Detección de genes codificantes de otras carbapenemasas.	68
5.4. Detección de genes codificantes de β -lactamasas de tipo AmpC.....	69
5.5. Detección de genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).	71
5.5.1. Entornos genéticos de BLEEs tipo CTX-M.....	72
5.6. Análisis de integrones.	75
5.6.1. Otras PCR realizadas para el análisis de integrones.....	76
5.7. Estudio de la porina OmpK.....	79

6.	Electroforesis en gel de agarosa	80
7.	Secuenciación.....	81
7.1.	Análisis de secuencias	81
8.	Tipificación molecular	82
8.1.	Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	82
8.2.	Determinación de la Secuencia Tipo (MLST).....	83
8.3.	Análisis filogenético.....	85
	Resultados.....	89
1.	Aislados clínicos.....	91
1.1.	Datos clínicos y epidemiológicos.....	91
1.2.	Estudio de la sensibilidad a antibióticos	92
1.3.	Aislados productores de BLEE	94
1.3.1.	Entornos genéticos de BLEEs tipo CTX-M.....	95
1.4.	Aislados productores de pAmpC.....	96
1.5.	Aislados productores de carbapenemasas.....	97
1.5.1.	Estudio de integrones.....	97
1.5.2.	Resistencia plasmídica a quinolonas	99
2.	Aislados procedentes de portadores	101
2.1.	Prevalencia de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems como colonizadores intestinales en pacientes ingresados en la UCI.....	101
2.2.	Test fenotípicos y estudio de la sensibilidad a antibióticos	101
2.3.	Aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistentes como colonizador intestinal .	103
2.3.1.	Datos clínicos y epidemiológicos.....	103
2.3.2.	Caracterización de β -lactamasas.....	106
2.3.3.	Estudio de la porina OmpK.....	107
2.3.4.	Estudio de integrones.....	110
2.3.5.	Tipificación molecular	113
2.3.6.	Resistencia plasmídica a quinolonas	118

2.4. Otras enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems como colonizadores intestinales.....	120
2.4.1. Caracterización de β -lactamasas.....	120
2.4.2. Integrones	121
3. Aislados productores de carbapenemasas.....	123
3.1. Datos clínicos y epidemiológicos de las cepas productoras de carbapenemasas	123
3.2. Estudio de la sensibilidad a otros antibióticos.....	124
3.3. Tipificación molecular	125
Discusión	129
Conclusiones	151
Bibliografía	157

Abreviaturas

ác.	ácido
AMC	amoxicilina/ácido clavulánico
AMK	amikacina
AmpC	β -lactamasa de tipo AmpC
APB	ácido 3-aminofenilborónico
ATCC	American Type Culture Collection
BGN	bacilo gram negativo
BHI	Brain Heart Infusion (medio de cultivo)
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
°C	grado centígrado / Celsius
CIP	ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	centímetro
CMI	concentración mínima inhibitoria
CPE	enterobacterias productoras de carbapenemasa
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótido
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ERT	ertapenem
etc	etcétera
EUCAST	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
g	gramo
GEN	gentamicina
h	hora
I	sensibilidad intermedia
IMI	imipenem
L	litro
NAL	ácido nalidíxico
Neg	negativo
MBL	metalo- β -lactamasa
MDR	multirresistente
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
MLST	multilocus sequence typing
mm	milímetro
Nº	número
orf	Marco de lectura abierta (open reading frame)
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
PTZ	piperacilina/tazobactam
R	resistente
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
S	sensible
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilin resistente
spp.	especies
ST	secuencia tipo (sequence type)
SXT	trimetoprim/sulfametoxazol
TBE	solución tris (hidroximetil)aminometano + ácido bórico + EDTA
TE	solución tris (hidroximetil)aminometano + EDTA
TOB	tobramicina
UCI	unidad de cuidados intensivos
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
%	signo de porcentaje (por ciento)

Lista de Figuras

Figura 1.- Distribución de los microorganismos aislados en las infecciones comunitarias y nosocomiales según grupos	18
Figura 2.- Semejanza estructural entre la molécula de β -lactámico y D-Alanina-D-Alanina	20
Figura 3.- Mecanismos de resistencia en bacterias gram negativas (Peleg & Hooper 2010)	24
Figura 4.- Mapa de incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en 38 países europeos en el año 2015.....	36
Figura 5.- Porcentaje de infecciones invasivas por <i>K. pneumoniae</i> con resistencia a carbapenems, por países, en 2017.	37
Figura 6.- Porcentaje de infecciones invasivas por <i>K. pneumoniae</i> con resistencia combinada a fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª generación y aminoglucósidos, por países, en 2017. ..	37
Figura 7.- Estructura básica de un integrón de clase 1 y representación de la adquisición de un casete génico (González R et al. 2004).....	40
Figura 8.- Test de sinergia de doble disco para la detección de carbapenemasas de clase A (1) y clase B (2).	59
Figura 9.- Test modificado de Hode. A: resultado positivo (presencia de carbapenemasa). B: resultado negativo	60
Figura 10.- Posibles entornos genéticos de los genes bla_{CTX-M} y posición de los cebadores utilizados para su estudio.....	74
Figura 11. Distribución (%) por Servicios de los pacientes hospitalizados.....	92
Figura 12. Estructura de los entornos genéticos de las BLEEs procedentes de aislados clínicos.	96
Figura 13.- Estructuras de los integrones de clase 1 que contienen los genes codificantes de carbapenemasas de clase B.	98

Figura 14.- Estructura del entorno genético de qnrB procedentes de aislados clínicos productores de carbapenemasa.	99
Figura 15.- Estructura de los entornos genéticos de los genes de las β -lactamasas CTX-M-15 procedentes de aislados de <i>K. pneumoniae</i> de portadores fecales.....	107
Figura 16.- Estructuras de los integrones de clase 1 detectados en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de portadores fecales.....	111
Figura 17a y 17b .- Patrones de PFGE de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> multirresistente	114
Figura 18.- Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes colonizados por <i>K. pneumoniae</i> multirresistente	115
Figura 19. Patrón de bandas obtenido en la técnica de PCR-RFLP para el estudio de los grupos filogenéticos en <i>K. pneumoniae</i>	117
Figura 20. Cortes de la enzima de restricción <i>TaqI</i> en el grupo filogenético Kpl (a) y en la cepa K76 (b).	117
Figura 21.- Estructura del entorno genético de qnrB procedentes de aislados de <i>K. pneumoniae</i>	118
Figura 22.- Estructuras de los integrones de clase 1 que contienen los aislados de otras enterobacterias de portadores fecales.	121
Figura 23.- Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes con <i>C. freundii</i> productor de carbapenemasa.....	124
Figura 24.- Patrones de PFGE de los aislados de las enterobacterias productoras de carbapenemasa. A la izquierda, los aislados de <i>E. aerogenes</i> y a la derecha los de <i>C. freundii</i>	126

Lista de Tablas

Tabla 1.- Fenotipos de resistencia asociados a las enzimas modificantes de aminoglucósidos (Martínez-Martínez & Ruíz de Alegría 2009; Fernández-Martínez et al. 2015).....	23
Tabla 2.-Clasificación de β -lactamasas adaptada (Bush & Jacoby 2010)	28
Tabla 3.- Perfiles hidrolíticos de carbapenemasas descritas en Enterobacterias (Martinez-Martinez & Gonzalez-Lopez 2014; Codjoe & Donkor 2017)	30
Tabla 4.- Concentraciones de los antibióticos presentes en el panel 53 de MicroScan WalkAway® y puntos de corte para Enterobacterias obtenidos del EUCAST 2015 y CLSI 2015. 57	
Tabla 5. Reactivos y cantidades utilizados en la técnica de PCR.....	64
Tabla 6.- Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de MBL y condiciones de amplificación	65
Tabla 7.- Reactivos y cantidades empleadas en la realización de la PCR multiplex de carbapenemasas de clase A	66
Tabla 8.- Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A y condiciones de amplificación	67
Tabla 9.- Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de carbapenemasas no incluidas en las PCR múltiples.	68
Tabla 10. Reactivos y cantidades para realizar la PCR multiplex AmpC.....	69
Tabla 11. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de β -lactamasas tipo AmpC.....	70
Tabla 12. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de β -lactamasas tipo BLEE.....	71
Tabla 13. Cebadores empleados para caracterizar el entorno genético de BLEEs tipo CTX-M. .	72
Tabla 14. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de integrones de clase 1, 2 y 3.	75

Tabla 15. Cebadores y condiciones para la detección de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos.....	76
Tabla 16. Cebadores y condiciones para la detección de genes relacionados con la resistencia plasmídica a quinolonas y entornos genéticos.	77
Tabla 17. Cebadores utilizados en el estudio del gen OmpK y condiciones de amplificación	79
Tabla 18. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la determinación de la Secuencia Tipo.....	84
Tabla 19. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de los genes <i>infB</i> y <i>pgi</i> para la determinación de la Secuencia Tipo.....	85
Tabla 20. Reactivos empleados en la amplificación del fragmento del gen <i>gyrA</i> para el estudio del grupo filogenético de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	86
Tabla 21. Reactivos empleados por muestra en la digestión enzimática con <i>HaeIII</i>	87
Tabla 22. Reactivos empleados por muestra en la digestión enzimática con <i>TaqI</i>	87
Tabla 23.- Características fenotípicas de los aislados con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de muestras clínicas.	93
Tabla 24. Distribución de la resistencia antibiótica en los aislados de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de muestras clínicas.....	94
Tabla 25. β -lactamasas detectadas en las cepas obtenidas de muestras clínicas.	96
Tabla 26.- Integrones, fenotipo de resistencia a otros antibióticos y genes encontrados en las enterobacterias productoras de carbapenemasa procedentes de muestras clínicas.	100
Tabla 27. Resistencia a los antibióticos de los aislados con sensibilidad disminuida a carbapenems obtenidos de portadores fecales.....	102
Tabla 28.- Relación de pacientes colonizados por <i>K. pneumoniae</i> multirresistente en los que se aisló la misma cepa en muestra clínica.	103
Tabla 29.- Colonización por microorganismos multirresistentes (<i>K. pneumoniae</i> multirresistente, <i>P. aeruginosa</i> productora de carbapenemasa de clase B y SARM).....	104

Tabla 30. Características clínicas de los pacientes con aislamiento de <i>K. pneumoniae</i> multirresistente.....	105
Tabla 31. Caracterización de las β -lactamasas de <i>K. pneumoniae</i> de portadores fecales.....	106
Tabla 32. Patrones de OmpK encontrados en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de portadores fecales.	108
Tabla 33. Características de los diferentes patrones de OmpK de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de portadores fecales.....	110
Tabla 34. Análisis de integrones de clase 1 y sus correspondientes genes cassettes en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> asociados a sus Secuencias Tipo.	112
Tabla 35. Análisis filogenético de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> y su relación con los patrones de PFGE.	118
Tabla 36.- Relación de MLST, patrón de PFGE, integrones y genes de resistencia encontrados en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de portadores fecales.	119
Tabla 37.- Caracterización de β -lactamasas y de integrones de clase 1 encontrados en aislados de otras enterobacterias de portadores fecales.....	122
Tabla 38.- Resistencia a los antibióticos de los aislados productores de carbapenemasa	125

Introducción

1. El orden *Enterobacterales*

El orden *Enterobacterales* es un amplio grupo de bacilos gram negativos de gran importancia clínica que ha sido recientemente clasificado, y que incluye siete nuevas familias: *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Budviciaceae* y *Enterobacteriaceae* (Munson & Carroll 2019).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son aerobios/anaerobios facultativos, con forma de bacilos o cocobacilos, con un tamaño que oscila entre 0,3-1 μm por 0,6-6 μm . No forman esporas y son móviles por flagelos peritricos, excepto los géneros *Klebsiella* y *Shigella* que carecen de ellos. Tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa con o sin producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, son oxidasa negativa (a excepción del género *Plesiomonas*) y catalasa positiva. Una importante característica taxonómica que diferencia los diversos géneros de enterobacterias es el tipo y la proporción de productos producidos por la fermentación de la glucosa. Se pueden distinguir dos amplios perfiles: la fermentación ácido mixta y la fermentación butanodiólica (Madigan et al. 2009).

Como las enterobacterias están muy relacionadas genéticamente, su identificación a menudo presenta considerable dificultad. En los laboratorios su identificación se basa en una serie de diferencias metabólicas reflejadas en diferentes pruebas bioquímicas, ya que la morfología de las colonias es muy similar. Además, se han desarrollado un conjunto de medios de cultivo selectivos y diferenciales que permiten distinguir entre diversos géneros de enterobacterias en función de alguna de sus propiedades, como, por ejemplo, su capacidad de fermentar la lactosa, que es una característica típica de las bacterias comensales del intestino humano y atípica en las bacterias patógenas.

La pared celular de las enterobacterias, al igual que en otras bacterias gram negativas, está compuesta por una estructura multilaminar: la membrana interna o citoplasmática y la capa más exterior o membrana externa. Entre ellas se encuentra el peptidoglicano y el espacio periplásmico, que contiene diversas enzimas hidrolíticas y proteínas implicadas en la síntesis y el transporte de sustratos. En las bacterias gram negativas la mayor parte de la pared celular está representada por la membrana externa. Esta capa es una segunda bicapa lipídica, pero a diferencia de la membrana interna, no está compuesta sólo por fosfolípidos y proteínas, sino que contiene polisacáridos. Los lípidos y los polisacáridos están unidos en la membrana externa y se presentan formando un complejo: el lipopolisacárido (LPS). La proporción lipídica del LPS es la región más interna y se conoce como lípido A, el cual es una endotoxina formada

Introducción

por ácidos grasos insaturados. La región de polisacáridos la forman el núcleo o core y la denominada polisacárido específico O, que es la región hidrofílica y, por tanto, la más externa. El polisacárido O está unido al núcleo y consta de una secuencia repetitiva de azúcares, cuyas variaciones son las responsables de la especificidad del antígeno somático O e influye en la virulencia de estas bacterias.

La membrana externa de las bacterias gram negativas es relativamente permeable a pequeñas moléculas pese a su composición de bicapa lipídica. Esto se debe a la presencia de unas proteínas transmembrana llamadas porinas, que actúan como canales para la entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular. Las porinas inespecíficas forman canales rellenos de agua a cuyo través puede pasar cualquier tipo de sustancia pequeña. Por el contrario, las porinas específicas contienen una zona de unión para un determinado tipo de sustancia. Las porinas tienen tres subunidades idénticas. Cada proteína que forma la porina contiene un canal, y además se disponen de forma que queda un pequeño agujero central de cerca de 1 nm de diámetro en la membrana externa por el que las sustancias muy pequeñas pueden pasar.

La mureína o peptidoglucano es otro componente esencial de la pared celular. Frente a las bacterias gram positivas en las que constituye cerca del 90% de su estructura, en las bacterias gram negativas sólo representa cerca del 10% del total de la pared celular. El peptidoglucano se encuentra comprendido con el espacio periplásmico, entre la membrana interna y la externa. Es un polisacárido formado por repeticiones de una unidad disacárida, N-acetil-glucosamina (NAG), unida mediante un enlace glucosídico β -1,4 al ácido N-acetil-murámico (NAM). De este último cuelga un pequeño grupo de aminoácidos que incluye L-Alanina, D-Glutámico, meso-diaminopimélico (DAP) y D-Alanina. Estos tetrapéptidos se unen entre sí mediante enlace peptídico directo (entre D-Ala terminal de una cadena con m-DAP de otra cadena). Estas uniones cruzadas refuerzan la estructura proporcionándole rigidez y resistencia a la pared celular.

Las enterobacterias tienen una estructura antigénica compleja. Además del antígeno somático O, las cepas móviles tienen unas proteínas (las flagelinas) que se localizan en los flagelos y constituyen el antígeno flagelar H. En las cepas capsuladas, los antígenos K son termolábiles y constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria, por tanto, son un factor de virulencia fundamental. Un método de clasificación muy importante en estas bacterias es la basada en la determinación serotípica de estos tres tipos de antígenos.

1.1. Epidemiología

Algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* forman parte de la microbiota comensal del tracto intestinal del ser humano y de los animales, así como de otros nichos ecológicos del medio ambiente como el agua, el suelo y la vegetación. Las enterobacterias que colonizan al hombre forman parte en su mayoría de la flora gastrointestinal, pero debemos recordar que su proporción relativa en la flora colónica es inferior al 0,1% (Eckburg 2005).

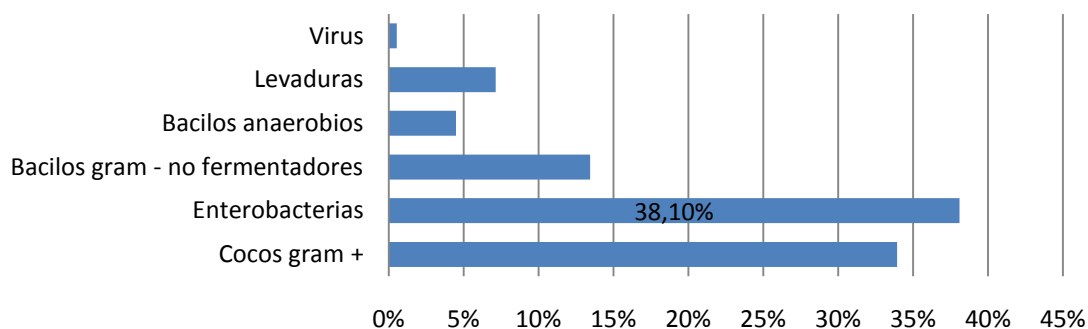
Con excepción de los géneros *Salmonella* y *Shigella* que poseen capacidad patógena primaria, las enterobacterias son parte de la flora normal o ambientales, pudiendo actuar como patógenos potenciales y dar lugar a infecciones oportunistas cuando aparecen en el huésped factores que predisponen a dicha infección. Entre los múltiples factores predisponentes, podemos distinguir dos tipos:

- Locales: son los que facilitan la penetración microbiana por rotura de las barreras mucocutáneas como, por ejemplo, heridas quirúrgicas o traumáticas, quemaduras, sondajes, drenajes y catéteres, así como la presencia de material protésico y algunas maniobras diagnósticas o terapéuticas (intubación).
- Generales: debidos a la alteración directa o indirecta del sistema inmune como sucede en algunas enfermedades crónicas o sistémicas, pacientes neoplásicos, inmunosupresión y edades extremas por falta de madurez (neonatos) o disfunción (ancianos) inmunitaria.

Por ello, las enterobacterias son uno de los principales agentes etiológicos en las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios. Las infecciones nosocomiales se pueden definir como infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital, que no estaban presentes en el periodo de incubación ni en el momento del ingreso del paciente. Las infecciones nosocomiales ocasionan una elevada mortalidad, prolongan la estancia hospitalaria y aumentan los costes asistenciales.

Los datos del Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España en el contexto del *European Prevalence Survey of Healthcare Associated Infections and Antimicrobial Use* en 2017 (EPINE-EPSS 2017) muestran que las enterobacterias son los microorganismos que con más frecuencia se aíslan tanto en las infecciones nosocomiales como en las comunitarias (Figura 1).

Distribución de los microorganismos aislados en las infecciones nosocomiales según grupos (%)



Distribución de los microorganismos aislados en las infecciones comunitarias según grupos (%)

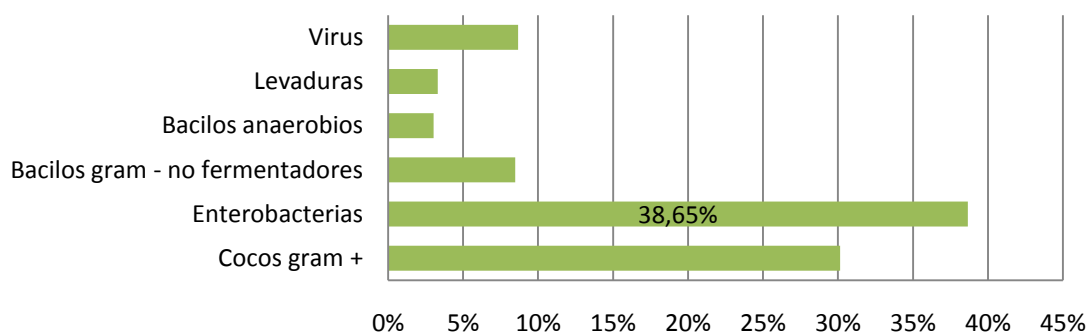


Figura 1.- Distribución de los microorganismos aislados en las infecciones comunitarias y nosocomiales según grupos

El motivo por el que las infecciones por enterobacterias son tan frecuentes en el ámbito hospitalario se debe en parte a la rapidez con que algunas enterobacterias colonizan, además del tracto gastrointestinal, la nasofaringe, independientemente de la administración de antibióticos (Pérez Guerrero et al. 2014). A nivel hospitalario, se ha observado que los pacientes con estancias hospitalarias prolongadas tienen más riesgo de sufrir infecciones por enterobacterias. *E. coli* y *K. pneumoniae* son las responsables de un número importante de estas infecciones, favorecidas por el uso de técnicas de diagnóstico y/o terapéuticas invasivas, la presencia de dispositivos que alteran las barreras mucosas, tratamientos antibióticos inadecuados y presencia de un mayor número de comorbilidades (Lautenbach et al. 2001). En las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) se detecta una incidencia notable de infecciones por enterobacterias, así como por BGN no fermentadores, favorecidos fundamentalmente por la

presión antibiótica de amplio espectro y por el empleo de ventilación mecánica y otras técnicas invasivas (Harris et al. 2007). El informe del Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en los Servicios de Medicina Intensiva (ENVIN 2017) de 2017 recoge una incidencia de infecciones producidas por enterobacterias en estos Servicios de un 40,15% del total.

Otro grupo de riesgo relacionado con el anterior está formado por aquellos enfermos que sufren las denominadas infecciones asociadas a cuidados sanitarios, propias de las residencias de ancianos, centros de diálisis, pacientes con hospitalización reciente, etc. En ellos se detectan infecciones de adquisición comunitaria, pero con un espectro microbiológico mixto entre la hospitalaria y la comunitaria, debido al uso de tratamientos parenterales y disruptores de barrera (Hilty et al. 2012).

Las enterobacterias forman parte de la microbiota comensal del tracto digestivo en individuos sanos. La colonización por enterobacterias multirresistentes constituye un importante reservorio que facilita su mecanismo de transmisión (Gagliotti et al. 2013) y en algunos estudios se ha relacionado la colonización por enterobacterias productoras tanto de BLEEs como de carbapenemasas con un mayor riesgo de infección por éstas, incluso de 50 veces más, en pacientes ingresados en UCI (Dickstein et al. 2016; Detsis et al. 2017). Un factor de riesgo importante en los pacientes que están colonizados por estas enterobacterias multirresistentes es el haber recibido tratamiento antibiótico en el mes previo con algún β -lactámico pero, curiosamente, no solo con carbapenems, sino también con otros β -lactámicos como cefalosporinas e incluso otras familias de antibióticos como quinolonas (Palacios-Baena et al. 2016).

Se han realizado diferentes estudios para evaluar los porcentajes de colonización por enterobacterias multirresistentes en pacientes ingresados en UCI, describiéndose tasas de hasta un 14,4%, siendo la mayor parte de ellas productoras de BLEEs (Padilla-Serrano et al. 2018). Estas cifras de prevalencia disminuyen si nos centramos en aislados productores de carbapenemasas, donde se describen tasas entre un 1,5 y 2,5% en pacientes ingresados en los Servicios de UCI en la Comunidad de Madrid (Jesús Oteo et al. 2015) y del 4% en pacientes hospitalizados cuyos ingresos son de larga duración (Ruiz-Garbajosa et al. 2016).

2. Antibióticos frente a Enterobacterias

2.1. Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más empleada en la práctica clínica. No solo poseen una gran eficacia terapéutica, sino que además no son tóxicos para el hombre debido a que actúan bloqueando las enzimas biosintéticas del peptidoglucano, las cuales están presentes solo en las células bacterianas.

Son agentes bactericidas que producen su efecto a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos precursores, mediante el enlace peptídico directo y la pérdida de uno de los aminoácidos terminales. Esto lo llevan a cabo unas transpeptidasas que se localizan en el espacio periplásmico. El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido a la que se unen estas enzimas (el extremo D-Alanina-D-Alanina), de forma que bloquean este paso ya que se unen covalentemente a ellas e impiden la formación de la pared celular. Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP (*penicilin binding protein* - "proteína ligada a la penicilina") (Suarez & Gudiol 2009). Este efecto se ve incrementado por la acción de unas autolisinas, que destruyen determinadas zonas del peptidoglucano para permitir el crecimiento celular, provocando la lisis de la bacteria. Las cepas que carecen de autolisina inhiben su crecimiento en presencia del β -lactámico, pero no se destruyen completamente.



Figura 2.- Semejanza estructural entre la molécula de β -lactámico y D-Alanina-D-Alanina

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por la presencia del anillo β -lactámico, el cual define químicamente a esta familia. Este anillo es el que determina el mecanismo de acción (inhibe la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad (ya que actúa bloqueando las enzimas biosintéticas del peptidoglucano, que se encuentra solamente en la pared de las células bacterianas) y el principal mecanismo de la resistencia (las β -lactamasas). Sin embargo, para que el antibiótico sea activo, es necesario que esté unido a otros radicales, obteniendo diferentes propiedades en el compuesto resultante. Esto da lugar a diferentes grupos de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas y los inhibidores de las β -lactamasas.

2.2. Otras familias de antibióticos

En el tratamiento de infecciones por Enterobacterias, no solo la familia de los β -lactámicos juega un papel importante, sino que otros antibióticos como las quinolonas, aminoglucósidos, tigeciclina, fosfomicina, trimetoprim-sulfametoxazol y polimixinas (colistina) son importantes a la hora de abordar estas infecciones.

Debido a la emergencia y la rápida difusión de las Enterobacterias multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), en las cuales los antibióticos β -lactámicos son los principales afectados, son necesarias alternativas terapéuticas que sean activas frente a estos gérmenes. En estos casos, en los que no se puede recurrir a los β -lactámicos tradicionales, hay que utilizar otros tratamientos potencialmente activos, entre los que se encuentran los fármacos anteriormente nombrados, considerados de segunda línea y que muchas veces también se ven afectados debido a la co-resistencia; a la terapia combinada, con o sin β -lactámicos clásicos, o a los nuevos β -lactámicos (ceftazidima-avibactam, ceftolozano-tazobactam) de reciente aparición (Rodríguez-Baño et al. 2018).

Se describen a continuación los mecanismos de acción y resistencia a quinolonas y aminoglucósidos, por su importancia y por su implicación en este trabajo.

2.2.1. Quinolonas

Las quinolonas son antibióticos sintéticos bactericidas, que actúan inhibiendo la DNA girasa y la topoisomerasa IV. La primera quinolona utilizada fue el ácido nalidíxico, pero hoy en día la mayoría de las quinolonas usadas en la práctica clínica son del grupo de las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino). Tienen un amplio espectro de actividad frente a bacterias gram negativas, y también algunas gram positivas.

La resistencia a quinolonas es el punto final del efecto acumulativo de varios mecanismos genéticos. Estos mecanismos de resistencia incluyen determinantes cromosómicos y plasmídicos. Dentro de los mecanismos cromosómicos se incluyen las mutaciones en las topoisomerasas diana en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de las subunidades GyrA/GyrB y ParC/ParE, reducción de la permeabilidad de la membrana por defecto de las porinas y la sobreexpresión de las bombas de expulsión activas. Además, y desde su descripción en 1998, se ha descrito un aumento de la prevalencia de la resistencia plasmídica a quinolonas, a través de la protección de las topoisomerasas diana por proteínas Qnr (genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*), de la modificación enzimática del antibiótico por una aminoglucósido acetil-transferasa AAC(6')-Ib-cr y de su expulsión activa por la bomba QepA (Martínez-Martínez et al. 2008; Aldred et al. 2014).

2.2.2. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, interfiriendo en la síntesis proteica. Actúan frente a bacterias gram negativas y gram positivas. Los principales aminoglucósidos empleados en la práctica clínica contra enterobacterias son gentamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina. Muchas veces se emplean en asociación, debido a su efecto sinérgico, con los β -lactámicos.

Aunque los mecanismos de resistencia adquiridos frente a los aminoglucósidos son variados, el mecanismo más común son las enzimas que modifican los grupos amino o hidroxilo de la molécula del antibiótico, bloqueando de esta manera su actividad antibacteriana. Estas enzimas se diferencian en tres tipos: N-acetiltransferasas (ACCs, genes *aac(3)*, *aac(6')*), O-fosfotransferasas (APHs, genes *aphA*, *strAm* *strB*) y O-adeniltransferasas (ANTs, genes *aadA*, *aaB*). Dentro de cada tipo, se subdividen en clases en función de su sitio de modificación (Ramírez & Tolmasky 2010; Ho et al. 2016). En la Tabla 1 se reflejan los fenotipos de resistencia asociados a las enzimas modificantes de aminoglucósidos.

Tabla 1.- Fenotipos de resistencia asociados a las enzimas modificantes de aminoglucósidos (Martínez-Martínez & Ruíz de Alegría 2009; Fernández-Martínez et al. 2015).

Fenotipo de resistencia	Enzima modificante
STR	APH(3'')
GEN	AAC(3)-I
KAN, AMK	APH(3')-IV
STR, SPT	ANT(3'')
KAN, NEO	APH(3')-I, APH(3')-II
KAN, TOB, AMK	ANT(4')-II
KAN, GEN, TOB	ANT(2'')-I
KAN, GEN, TOB, NET	AAC(3)-II, AAC(3)-IV
KAN, TOB, AMK, NET	AAC(6')-I
GEN, TOB, NET, NEO	AAC(2')

2.3. Resistencia a los antibióticos en enterobacterias

La resistencia a los antimicrobianos es un problema con implicaciones terapéuticas, epidemiológicas, microbiológicas y de salud pública. El problema de la resistencia se puede ver como una ecuación con dos componentes principales: el de los antibióticos que inhiben los organismos sensibles y seleccionan los resistentes debido a la aparición de mutaciones; y la resistencia genética de un microorganismo (Levy & Marshall 2004). En cualquier caso, el uso indebido de antimicrobianos favorece la aparición de resistencias.

La resistencia a los antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La primera de ellas la presentan de forma natural las bacterias, y está asociada a genes cromosómicos. La resistencia adquirida puede obtenerse como consecuencia de la adquisición de material genético nuevo que procede de otras bacterias, contenida en plásmidos, transposones o integrones, mediante difusión horizontal; o alcanzarse por mutaciones cromosómicas en el DNA originadas por errores en su replicación, cuya transmisión será de tipo vertical (Peleg & Hooper 2010).

diferentes tipos en función del sustrato preferido frente al que actúan, y el perfil de inhibición. Su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada. En el primer caso, pueden ser transferibles y suelen ser inactivadas por los inhibidores de las β -lactamasas. Algunos microorganismos poseen β -lactamasas de origen cromosómico (ej: *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp. y *Serratia* spp.), las cuales muchas veces son inducibles, es decir, aumenta su producción tras la exposición a β -lactámicos, y no son sustrato de los inhibidores de las β -lactamasas.

2.3.2. β -lactamasas

Las β -lactamasas se clasifican en función a dos parámetros:

1. **Clasificación molecular:** en función de su estructura proteica (Ambler 1980), dividiendo las β -lactamasas en 4 clases (A-D). Las β -lactamasas de las clases A, C y D necesitan un aminoácido de serina para llevar a cabo su actividad hidrolítica, mientras que las enzimas de la clase molecular B requieren un ión de zinc divalente, y son las llamadas metaloenzimas.
2. **Clasificación funcional:** en función de sus características bioquímicas y funcionales (Bush, 1988). Se establecen 4 grupos diferentes, los cuales se subdividen en función del sustrato y el perfil de inhibición. Esta clasificación es más útil a nivel clínico y microbiológico ya que refleja la resistencia selectiva a diferentes clases de antibióticos β -lactámicos y diferentes patrones de inhibición.

Según la clasificación funcional de Bush-Medeiros-Jacoy (Bush & Jacoby 2010) diferenciamos:

Grupo 1: β -lactamasas AmpC, cefalosporinasas o cefamicinasas. Este grupo se corresponde con la clase C de Ambler. Hidrolizan la mayoría de β -lactámicos, incluidas las cefamicinas (cefoxitina). Estas enzimas no son inhibidas por los inhibidores de las β -lactamasas como el ácido clavulánico, e incluyen las codificadas tanto en el cromosoma como en plásmidos de diferentes especies de enterobacterias.

Grupo 2: son serin- β -lactamasas. Es un grupo heterogéneo que incluye enzimas de las clases A y D de Ambler, y está constituido por seis subgrupos (2a, 2b, 2c, 2d, 2e y 2f). Engloba enzimas que actúan sobre un amplio conjunto de sustratos: penicilinas, cefalosporinas, oxacilinas y

Introducción

carbapenems, y son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas clásicos (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam).

El subgrupo 2a incluye las enzimas de gram positivos con capacidad de hidrolizar la penicilina G. Son las denominadas penicilinasas, que pueden estar codificadas en plásmidos o en el cromosoma. Además, son inhibidas por el ácido clavulánico.

En el subgrupo 2b encontramos la gran mayoría de β -lactamasas de amplio espectro. Hidrolizan las penicilinas e incluso cefalosporinas de 1ª generación cuando su expresión es elevada, y son inhibidas por el ácido clavulánico. Tanto las enzimas del tipo TEM como SHV se encuentran en este grupo.

El subgrupo 2be deriva de las β -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), generadas a través de mutaciones aminoacídicas puntuales. Estas son las conocidas como **β -lactamasas de espectro ampliado o extendido (BLEE)**. Además de hidrolizar penicilinas, también actúan frente a todas las cefalosporinas (excepto las cefamicinas) y aztreonam. Son sensibles a carbapenems y a los inhibidores clásicos de β -lactamasas. No todas las BLEE pertenecen al grupo 2be (clase molecular A) ya que algunas oxacilinasas pertenecen al grupo 2d (clase molecular D). En este grupo, aparte de las TEM (que derivan de TEM-1 y TEM-2) y SHV (que derivan de SHV-1), se incluyen otro tipo de BLEE denominado cefotaximasas o CTX-M. Las CTX-M pertenecen a la clase molecular A y son resistentes a cefotaxima, cefuroxima, cefepime y en menor medida a ceftazidima.

El subgrupo 2br incluye las **β -lactamasas resistentes a los inhibidores (IRT)**. Su perfil hidrolítico es similar a las BLEE pero son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas clásicos (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Son derivadas de las enzimas tipo TEM que han adquirido resistencia a los inhibidores, de ahí su nombre IRT (inhibitor resistant TEM-type).

El subgrupo 2c o carbenicilinasas (CARB o PSE) hidrolizan las carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina).

El subgrupo 2d o oxacilinasas hidrolizan la oxacilina. Son similares a las β -lactamasas tipo BLEE pero son más resistentes a la acción de los inhibidores de las β -lactamasas. Además, algunas actúan también frente a los carbapenems.

El subgrupo 2e se corresponde con la clase C de Ambler, e incluye las cefalosporinasas cromosómicas de *P. vulgaris*, *C. koseri* y *C. sedlakii*.

El subgrupo 2f incluye las serin- β -lactamasas de clase molecular A de Ambler. Hidrolizan los carbapenems (son carbapenemasas), son inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico pero no por agentes quelantes. Corresponden a las carbapenemasas de clase A de Ambler.

Grupo 3: metalo- β -lactamasas (MBLs). Se corresponde con la clase B de Ambler, las cuales requieren la presencia del ión zinc (son metalo-enzimas), por lo que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA. Su perfil de hidrólisis incluye todos los β -lactámicos, incluyendo cefamicinas y carbapenems. A diferencia de otras carbapenemasas, no hidrolizan monobactámicos (aztreonam). No son inhibidos por los inhibidores clásicos de β -lactamasas. Este grupo se divide según su estructura en tres subclases (B1, B2 y B3) o según su función (subgrupos 3a, 3b y 3c), grupos que se diferencian tanto por su perfil hidrolítico como por su estructura molecular.

Grupo 4: incluye la penicilinasa de *Burkholderia cepacea*. Hasta el momento no se corresponde con ninguna clase molecular de Ambler ya que no están completamente caracterizadas.

Introducción

Grupo Bush	Clase Ambler	Sustratos preferidos	Inhibidos por		Enzimas representativas
			Ácido clavulánico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sí	No	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, PER-1, CTX-M-15, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	A	Carbenicilinas	Sí	No	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilinas, cefepime	Sí	No	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Sí	No	CepA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenémicos	No	Sí	IMP-1, VIM-1, CrA, NDM
3b	B	Carbapenémicos	No	Sí	CphA, Sfh-1

Tabla 2.-Clasificación de β -lactamasas adaptada (Bush & Jacoby 2010)

2.3.3. Mecanismos de resistencia a carbapenems en enterobacterias

Los carbapenems poseen un espectro de actividad muy amplio, determinado por la capacidad de penetrar a través de la pared de los gram negativos, la alta afinidad por las PBP esenciales de muchas especies y la elevada resistencia a muchas β -lactamasas. Por ello, son utilizados como antibióticos de "última línea", en pacientes graves con infecciones no filiadas o en sospecha de infecciones por microorganismos resistentes (Papp-Wallace et al. 2011). Los principales carbapenems son: ertapenem, imipenem, meropenem y doripenem.

En las enterobacterias, la aparición de resistencias a carbapenems puede producirse por dos mecanismos:

- Adquisición de genes que codifican enzimas capaces de degradar los carbapenémicos (carbapenemasas).
- Disminución en la expresión o funcionalidad de las porinas de la membrana externa de las bacterias, dificultando la penetración del antibiótico en el espacio periplásmico, junto a la sobreexpresión de β -lactamasas que poseen baja afinidad por los carbapenems (Papp-Wallace et al. 2011).

2.3.3.1. Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan carbapenems pero también actúan frente a otros β -lactámicos, aunque su espectro depende de la especificidad de cada enzima. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles. Podemos diferenciar dos grupos principales: las serín-carbapenemasas, que pertenecen a la clase molecular A o D de Ambler, y las metalo- β -lactamasas (MBLs), llamadas así por su dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento, que corresponden a la clase B de Ambler (Ambler 1980).

En un principio, la resistencia a carbapenems sólo fue descrita en algunas especies de bacilos gram negativos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, pero hoy en día es cada vez más frecuente su presencia en enterobacterias. Diferentes estudios alertan de la creciente incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Albiger et al. 2015; van Duin & Doi 2017; Asthana et al. 2014; Robilotti & Deresinski 2014).

Clase molecular	Carbapenems	Penicilinas	Cefalosp. 1º y 2º	Cefalosp. 3º y 4º	CLAV/EDTA	Monobactams
A	+	+	+ ^a	+/v	±/-	+ ^b
B	+	+	+	+	-/+	-
D	+	+	+	-	-/±	±

Tabla 3.- Perfiles hidrolíticos de carbapenemasas descritas en Enterobacterias (Martinez-Martinez & Gonzalez-Lopez 2014; Codjoe & Donkor 2017). Cefalosp.: cefalosporinas. CLAV/EDTA: inhibidas por ácido clavulánico y EDTA. V: variable. ^a Cefamicinas no suelen ser sustrato de las carbapenemasas de clase A. ^b Algunas enzimas tipo GES no hidrolizan aztreonam.

Las carbapenemasas se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010, en la que se establecen 3 grupos (Bush & Jacoby 2010):

- La **clase A de Ambler** corresponde con el grupo 2f de Bush y Jacoby. Son enzimas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y aztreonam. Su actividad es inhibida por ácido borónico, y parcialmente por ácido clavulánico y tazobactam. Esta propiedad es útil en su detección, ya que se emplean métodos fenotípicos basados en el efecto de inhibición producido por el ácido borónico, en formato de test de sinergia de doble disco. Dentro de estas se encuentran las proteínas de tipo SME, IMI, NMC-A, KPC y algunas de la familia GES. Las carbapenemasas tipo SME, IMI y NMC-A están codificadas por genes cromosómicos. Los genes *bla_{GES}* suelen estar codificados en integrones de clase 1 localizados en plásmidos, pero se han descrito genes codificados cromosómicamente en algunas enterobacterias. Dentro de las carbapenemasas de clase A, las enzimas KPC son las de mayor importancia epidemiológica. Desde la primera descripción en 1996 en Carolina del Norte, Estados Unidos, en *Klebsiella pneumoniae*, las bacterias productoras de KPC se han propagado por todo el mundo y hay más de 20 variantes identificadas (<http://www.lahey.org/Studies/>). Los genes *bla_{KPC}* suelen estar codificados en transposones, lo que facilita su transmisión.

- La **clase B de Ambler** (grupos 3a y 3b) comprende las carbapenemasas que actúan frente a todos los β -lactámicos excepto monobactámicos. Son las llamadas metalo- β -lactamasas (MBLs), ya que son inhibidas por quelantes de cationes divalentes como el EDTA o el ácido dipicolínico debido a que su mecanismo de hidrólisis depende de la interacción con un ión Zn^{2+} en su sitio activo, pero no se ven afectadas por los inhibidores clásicos (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam). En este caso, para su identificación se emplean los test de sinergia con EDTA. Entre ellas, encontramos diferentes enzimas como VIM, IMP, NDM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM, siendo las más importantes las tres primeras (Meini, Llarrull, & Vila, 2014), las cuales se han descrito tanto en cepas de enterobacterias como de *Pseudomonas*.

Las primeras carbapenemasas tipo VIM (*Verona Integron-Encoded MBL*) fueron aisladas de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenems en 1997, en Verona (Italia). Desde entonces, se han registrado 46 variantes de estas enzimas, principalmente en cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, siendo la variante VIM-2 la más prevalente de este grupo a nivel mundial (Zhao & Hu 2011; Paul et al. 2016).

Las carbapenemasas NDM (*New Delhi Metallo- β -lactamasas*), fueron descubiertas en 2008 en Suecia en un paciente indio, quien primero había estado hospitalizado en Nueva Delhi (Yong et al., 2009). Estas enzimas se han propagado rápidamente y ahora las encontramos en diferentes países, sobre todo en enterobacterias (Nordmann, Poirel, Toleman, & Walsh, 2011). En comparación con otras carbapenemasas, NDM-1 tiene unas características que son muy preocupantes para la salud pública mundial: 1) el gen bla_{NDM-1} no está solo en una especie, sino que se encuentra en diferentes especies no relacionadas, 2) una frecuente adquisición por patógenos nosocomiales como *K. pneumoniae* y *E. coli*, 3) el gran tamaño del reservorio, ya que está presente en todo el subcontinente Indio (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011).

La primera enterobacteria con el gen bla_{IMP} fue aislada en *Serratia marcescens* en Japón (Ito et al. 1995). Éste gen tiene en común con bla_{VIM} que ambos suelen encontrarse albergados en integrones de clase 1, junto con otros genes de resistencia a otras familias de antibióticos. Esporádicamente, se han encontrado dentro de integrones de clase 3. Suelen estar localizados en transposones y plásmidos, lo que facilita su diseminación. Aunque de forma poco común, también se han descrito localizados cromosómicamente en bacilos gram negativos no fermentadores (Walsh et al. 2005).

- La **clase D** (grupo 2df) engloba diferentes tipos de oxacilinasas (OXA). Hidrolizan cloxacilina, oxacilina y carbapenems, pero no cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam. Las enzimas de este grupo no son inhibidas por quelantes (EDTA) y la inhibición por el ácido clavulánico es variable, por lo que los test de inhibición y sinergia no son útiles en su detección. Por tanto, la presencia de carbapenemasas tipo OXA siempre debe de ser confirmada por un método genotípico. Los productores de carbapenemasas tipo OXA son, probablemente, los más difíciles de identificar y, por tanto, su prevalencia real podría estar subestimada (Nordmann et al., 2011).

Hay descritas más de 400 tipos de β -lactamasas tipo OXA (<http://www.lahey.org/Studies/>), de las cuales solo se consideran carbapenemasas 128 (grupo 2df de Bush), como por ejemplo OXA-23, 27, 40, 48, 51, 58, 143 y 181, y se han identificado muchas de ellas en el género *Acinetobacter* (Martinez et al. 2010). En Enterobacterias, el principal problema está en las cepas productoras de OXA-48. La primera descripción de OXA-48 en enterobacterias se hizo en Turquía en 2003, en una cepa de *K. pneumoniae* (Poirel et al. 2012), y desde entonces su distribución ha sido tal que incluye muchos países de Europa y África (van Duin & Doi 2017). En España, el aumento de la diseminación de OXA-48, sobre todo en cepas de *K. pneumoniae*, se ha convertido en un gran problema de salud pública (J Oteo et al. 2015; Aracil-García et al. 2017; Argente et al. 2018).

2.3.3.2. Alteración de las porinas

Los carbapenémicos, para ejercer su acción, deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, esto ocurre a través de las porinas de la membrana externa en las bacterias gram negativas (Martinez et al. 2010). En enterobacterias, las porinas implicadas en la entrada de los antibióticos pertenecen a las familias OmpF o OmpC, y cambios en el número o funcionalidad de estas proteínas pueden tener efectos en la sensibilidad a los antibióticos (Pagès et al. 2008). Estos cambios incluyen mutaciones, disminución en la cantidad de proteína o cambios en el tipo de porinas que expresan.

En la familia *Enterobacteriaceae*, la resistencia a los carbapenems se observó por primera vez en cepas que presentaban una sobreexpresión de los genes que codifican una β -lactamasa cromosómica de tipo AmpC, fundamentalmente en *Enterobacter* spp., junto con modificaciones en las porinas OmpC y OmpF (Bush et al. 1985). Mecanismos de resistencia similares se han descrito también en *Serratia* spp y *Morganella morganii* (Goldstein et al. 1983). Las β -lactamasas de tipo AmpC o cefalosporinasas presentan baja afinidad a los carbapenems. Sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y, a su vez, se produce un mecanismo de pérdida de porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplásmico permite que la enzima lo hidrolice, produciendo una resistencia a los carbapenems. ACT-1, CMY-4 y ACC-1 son algunas de las β -lactamasas tipo AmpC presentes en plásmidos que se han identificado en enterobacterias resistentes a los carbapenems (Suárez et al. 2006). En estos casos la resistencia se produce por la combinación de la AmpC plasmídica junto a la pérdida de la permeabilidad de la membrana debido a modificaciones en las porinas OmpK35 y OmpK36 de *K. pneumoniae*, OmpF y OmpC en *E. coli* y OmpF en *Salmonella typhimurium* (Nordmann et al. 2012; López-Camacho et al. 2014).

De forma similar, la producción de BLEE en combinación con déficits en la permeabilidad de la membrana puede producir la aparición de resistencia a carbapenems en enterobacterias. Este mecanismo se ha descrito para casi todas las especies de enterobacterias, incluyendo *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. y *Enterobacter* spp. (Nikaido 2003; Webster et al. 2010).

K. pneumoniae es actualmente uno de los patógenos más prevalente en el mundo, siendo una de las principales causas de infección nosocomial. La resistencia a carbapenems en estas cepas causa gran preocupación, debido al incremento de la diseminación de cepas productoras de carbapenemasas, principalmente KPC, causando grandes brotes. Sin embargo, la pérdida de porinas de la membrana externa también ha destacado como otra causa frecuente en la resistencia a carbapenems, asociada a la producción de BLEE y AmpC. El principal mecanismo responsable de esta deficiencia en la permeabilidad es la interrupción directa por mutaciones puntuales que pueden causar cambios en la estructura de las proteínas OmpK35 y OmpK36, delecciones que interfieren con la expresión de la porina así como interrupciones directas causadas por secuencias de inserción (Martínez-Martínez 2008; Hamzaoui et al. 2018; Papagiannitsis et al. 2013). Cada vez es más frecuente la identificación de aislados resistentes a ertapenem como consecuencia de la diseminación mundial de aislamientos productores de BLEE tipo CTX-M, principalmente CTX-M-15, junto a una

modificación en la porina, causando brotes importantes (Poulou et al. 2013), y también casos de adquisición comunitaria de BLEEs (J. D. Pitout & Laupland 2008). Así mismo, se han descrito aislados de *K. pneumoniae* productora de BLEE y resistente a ertapenem portadoras de una nueva variante de porina OmpK32 (OmpK32V) que contribuye a la resistencia a ertapenem junto a la disminución de la sensibilidad a meropenem y manteniéndose sensible a imipenem (García-Fernández et al. 2010).

2.4. Evolución de la resistencia a β -lactámicos en enterobacterias

Desde el año 2000, se ha observado una propagación mundial de diferentes aislados de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales hidrolizan todas las cefalosporinas y monobactams, pero no carbapenems (J. Pitout & Laupland 2008). Hoy en día, las bacterias productoras de BLEE se han expandido globalmente a través de elementos genéticos móviles y asociadas a otros genes de resistencia a antibióticos, haciendo que la erradicación de estas enzimas sea difícil. *K. pneumoniae* y *E. coli* son las especies de mayor importancia inicial en cuanto a la producción de BLEEs, causando brotes nosocomiales en grandes hospitales, principalmente en unidades de cuidados intensivos, quirúrgicas y neonatales. Sin embargo, en los últimos años han cobrado gran relevancia las infecciones de origen estrictamente comunitario (en especial por *E. coli*) y por otras especies como *Enterobacter* spp., *P. mirabilis* y *Salmonella*.

Dentro de las BLEEs, se incluyen enzimas de tipo TEM, SHV, CTX-M, VEB y GES. En la actualidad existen múltiples variantes de todas ellas y han sido descritas en diferentes especies de enterobacterias. Desde su primera descripción, las CTX-M se han expandido de forma mundial, de modo que su diseminación se ha llegado a considerar como "la pandemia de las CTX-M" (Cantón & Coque 2006). Su propagación ha podido verse favorecida al haberse movilizado a través de secuencias de inserción como *ISCR1*, *ISEcp1* o *IS26*, así como dentro de otras estructuras genéticas como integrones y transposones (*Tn21*), lo que ha facilitado su integración y persistencia. Otra razón para este aumento de su difusión es su co-resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos y quinolonas, lo que puede facilitar el proceso de selección (Cantón & Ruiz-Garbajosa 2011). Esto ha facilitado que variantes como CTX-M-15, CTX-M-9 y CTX-M-14 estén presentes de forma mayoritaria en todo el mundo (Cantón et al. 2012).

La secuencia de inserción *ISEcp1* es la secuencia encontrada con mayor frecuencia en el entorno de estos genes, siendo capaz de movilizar los genes localizado río abajo de *bla*_{CTX-M}.

Esta secuencia se ha localizado aguas arriba de los genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-10}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-15}, en algunos casos interrumpida por la presencia de otras secuencias de inserción como IS26 o IS10 (Toleman & Walsh 2011; Jouini et al. 2007; Lartigue et al. 2004)(Lartigue et al. 2004; Jouini et al. 2007). Aguas abajo de las β -lactamasas, en el caso de *bla*_{CTX-M-14} se ha encontrado la secuencia de inserción IS903 y en otras variantes del grupo CTX-M-1 como *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-15} la proteína ORF477. Las β -lactamasas CTX-M-9 y CTX-M-2 se han asociado con integrones de clase 1, como el integrón In60 que contiene el gen *bla*_{CTX-M-9} con los genes *dfrA16* y *aadA2* o los integrones In35 e In116 que contienen el gen *bla*_{CTX-M-2} junto a un gen *bla*_{OXA-2} (Eckert et al. 2006; Sabate & Prats 2002).

En 1985 una nueva clase de antibióticos, los carbapenémicos, fueron introducidos en la práctica clínica. Son antimicrobianos que se caracterizan por su amplio espectro y una gran actividad frente a las β -lactamasas, incluidas las enterobacterias productoras de BLEE, por lo que se constituyeron en el tratamiento de elección en infecciones multirresistentes por bacilos gram negativos. Por tanto, se originó un importante aumento en el uso de carbapenems, que sin duda ha influido en la aparición en los últimos años de bacilos no fermentadores (*Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) y fermentadores (Enterobacterias) resistentes a carbapenems. Este hecho ha causado una creciente preocupación en todo el mundo sobre sus consecuencias, debido a la asociación de la resistencia a β -lactámicos y otras clases de antibióticos (aminoglucósidos, quinolonas, cotrimoxazol...), lo que reduce la posibilidad de tratamiento de las infecciones producidas por cepas multirresistentes.

Como respuesta a este aumento de las resistencias, especialmente en antibióticos utilizados como último escalón terapéutico, se puso en marcha el proyecto EuSCAPE (*European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) elaborado por el ECDC en abril de 2012, cuyo objetivo principal era obtener información epidemiológica sobre la incidencia y diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) en 38 países europeos. Con este proyecto se observó que la epidemiología europea de las enterobacterias productoras de carbapenemasas fue cambiando, con países que sufrieron un aumento en la prevalencia de CPE, como España, Francia o Turquía, mientras que en otros disminuyeron (Irlanda, Noruega y Países Bajos, entre otros). Islandia fue el único país que no declaró ningún caso de CPE en el transcurso del proyecto (Albiger et al. 2015). En el informe se recoge que España ha pasado de una situación epidemiológica de casos y brotes esporádicos en 2010, a una diseminación regional, afectando a 34/50 provincias, siendo las carbapenemasas más predominantes OXA-48 y VIM, seguidas de cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC. En la

Introducción

Figura 4 se muestra la situación epidemiológica de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en Europa recogido en el análisis post-EusCAPE en 2015 (Albiger et al. 2015).

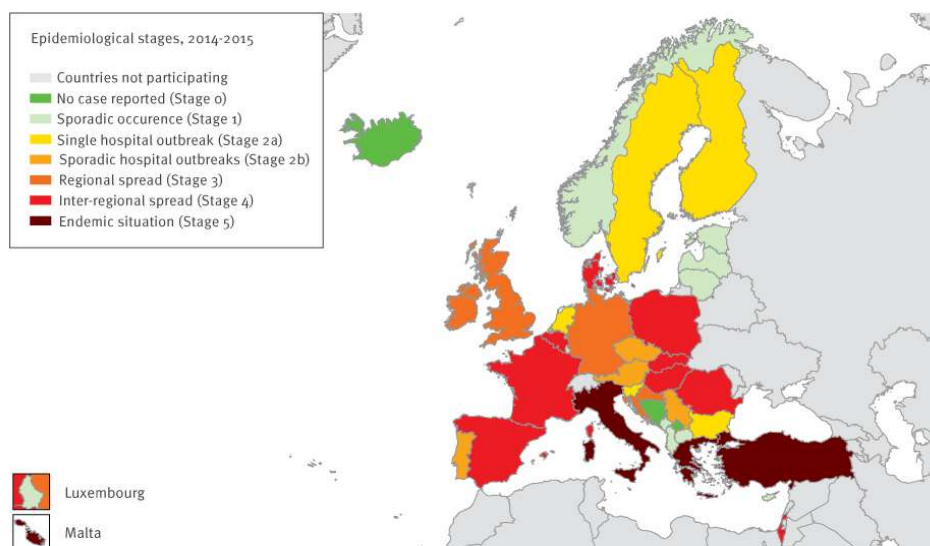


Figura 4.- Mapa de incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en 38 países europeos en el año 2015

Como se ha comentado, la resistencia a carbapenems puede ser debida a diferentes mecanismos, siendo frecuentemente las carbapenemasas las principales causantes, pero combinaciones de otros mecanismos diferentes también pueden causar resistencia a carbapenems. En los últimos datos analizados por EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) encontramos datos de esta vigilancia, en particular en *K. pneumoniae* (Figura 5).

La situación en el caso de *K. pneumoniae* es problemática, especialmente en los países del sur y este de Europa. La resistencia combinada a diferentes grupos de antimicrobianos no es rara en 2017 (Figura 6), y la frecuencia de aislados productores de BLEE ha aumentado. Los altos niveles de resistencia a carbapenems, casi siempre combinada con otros antibióticos, en algunas partes de Europa son, por tanto, una preocupación; sobre todo debido a los últimos datos que reflejan una emergencia de la resistencia a colistina, una de las últimas alternativas en pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* multirresistente .

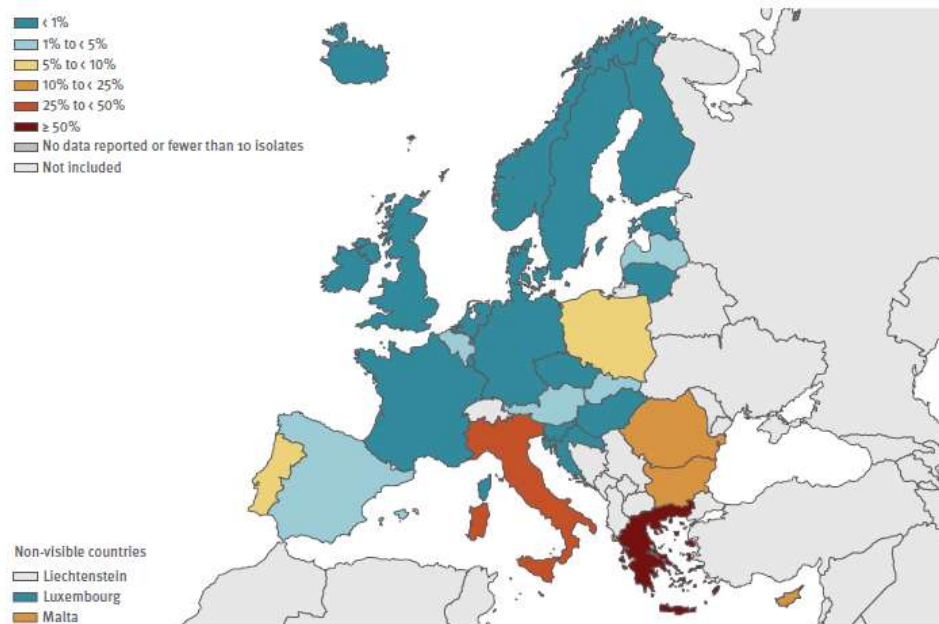


Figura 5.- Porcentaje de infecciones invasivas por *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenems, por países, en 2017.

Nota: los datos de EARS-Net están basados en aislados procedentes de infecciones invasivas como sangre y líquido cefalorraquídeo. No están incluidos los aislados procedentes de otros lugares de infección o de colonización.

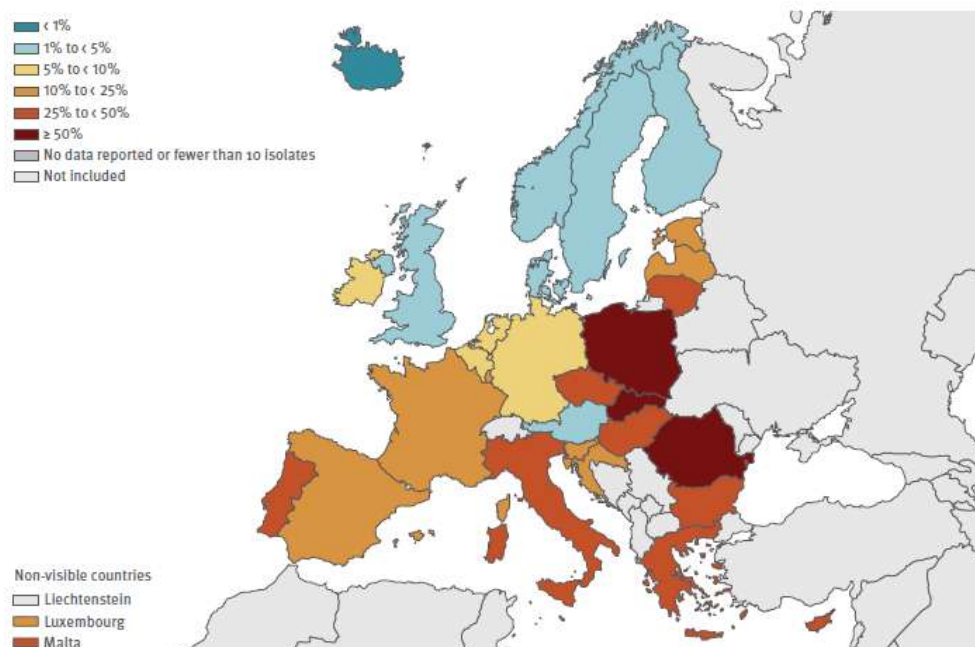


Figura 6.- Porcentaje de infecciones invasivas por *K. pneumoniae* con resistencia combinada a fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª generación y aminoglucósidos, por países, en 2017.

En España, el incremento de la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *K. pneumoniae* ha sido muy rápido. En un periodo de 5 años (2010-2014) las cifras se han duplicado, desde el 9,4% al 19%; y la resistencia combinada de cefalosporinas de 3ª generación, ciprofloxacino y aminoglucósidos se ha triplicado (Aracil-García et al. 2017). En el caso de imipenem, esta resistencia ha aumentado casi 13 veces, principalmente por la diseminación de aislados productores de carbapenemasas, los cuales se han descrito en al menos el 68% de las provincias españolas, con posibilidad de dispersión interregional (J Oteo et al. 2015; Aracil-García et al. 2017).

Las principales carbapenemasas descritas a nivel europeo en Enterobacterias pertenecen a los tipos KPC y OXA-48, seguidas de VIM y NDM (Albiger et al. 2015). La distribución de las enterobacterias productoras de KPC y OXA-48 varía entre países y no necesariamente se superpone, por ejemplo, en Grecia es predominante la producción de KPC, seguido de VIM, y más raro OXA-48 (Papadimitriou-Olivgeris et al. 2017), mientras que en Malta casi exclusivamente se encuentran enterobacterias productoras de OXA-48 (Girmenia et al. 2016).

En España, los primeros casos detectados de CPE lo fueron en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* portadoras de VIM-1 obtenidas en un estudio realizado en Barcelona en 2003 (Tórtola et al. 2005). Desde este primer descubrimiento, se han ido registrando casos esporádicos, hasta que en los últimos años se ha producido un importante cambio epidemiológico caracterizado por un aumento de las enterobacterias productoras de carbapenemasas principalmente debido a OXA-48 y VIM-1 (J Oteo et al. 2015; Machuca et al. 2018).

La aparición de carbapenemasas tipo KPC en España fue detectada entre septiembre de 2009 y febrero de 2010. Se aislaron dos clones de *K. pneumoniae* en un hospital de Madrid con el gen *bla_{KPC-3}* (Curiao et al. 2010) y, al poco tiempo, en otro hospital, el gen *bla_{KPC-2}* en tres clones de *C. freundii* (Gomez-Gil et al. 2010). Sin embargo, el gran impacto epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas en España ha sido protagonizado por las cepas productoras de OXA-48. El primer brote fue debido a una cepa de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 y CTX-M-15 en Barcelona (Pitart et al. 2011). Desde entonces se han descrito varios brotes en diferentes hospitales del país, convirtiéndose en un grave problema de salud pública (Argente et al. 2018; J Oteo et al. 2015; Zhao & Hu 2015; Brañas et al. 2015).

3. Estructura y función de los integrones

Los integrones son elementos genéticos que pertenecen a la familia de los transposones y se caracterizan por ser capaces de captar genes (genes casetes) que codifican determinantes de resistencia a antibióticos mediante un mecanismo de recombinación sitio-específica (Fluit & Schmitz, 2004). Están formados por tres elementos necesarios para la captura y expresión de genes externos (casetes): el gen *IntI* que codifica una integrasa, un lugar de recombinación sitio-específico (*attI*) y un promotor (Pc) necesario para la expresión de los genes casetes integrados. A veces contienen un segundo promotor más fuerte, P2, localizado adyacentemente en posición 3' del primero y que incrementa el grado de transcripción y expresión de los genes (Sabate & Prats, 2002). Los integrones probablemente no son móviles, pero se diseminan en transposones o plásmidos conjugativos que aseguran su difusión entre bacterias (Sabate & Prats 2002). Por tanto, su estudio es de gran importancia para conocer la dispersión epidémica de clones, para una política de control de infección hospitalaria, o desde el punto de vista del tratamiento antibiótico.

Los casetes génicos generalmente incluyen un único gen, se caracterizan por carecer de un promotor y en posición 3' presentan una secuencia de recombinación sitio-específica, conocida como *attC* de 59 bp, y un marco de lectura abierto denominado *orf* (*open reading frame*). Los casetes génicos son movilizados por la integrasa que reconoce el lugar *attC* del gen y el lugar del receptor *attI* del integrón, permitiendo tanto la integración como la escisión del gen casete (Hall 2012)**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Según algunos investigadores (Collis et al. 1993) , parece más probable que se produzcan recombinaciones *attC-attI* que entre dos elementos *attC*. De este modo, el gen que se inserta el último cronológicamente ocupará la posición más cercana a los promotores y, a su vez, es importante destacar que tendrá una mayor expresión que los genes situados más alejados de los promotores.

Los integrones pueden dividirse en dos grandes grupos, los integrones móviles o de resistencia (MI o RI) y los superintegrones (SI). Los RI suelen encontrarse formando parte de transposones y/o plásmidos, y contienen principalmente genes de resistencia a antibióticos, mientras que los SI son de localización cromosómica y contienen genes asociados a diferentes funciones adaptativas. Los SI o integrones cromosómicos se caracterizan por presentar

Introducción

múltiples genes casetes (más de 100) de diferentes funciones, incorporados en tándem. Estos integrones han sido descritos en especies de los géneros *Vibrio* y *Xanthomonas* (Mazel 2006).

La secuencia aminoacídica de la integrasa (*IntI*) se ha utilizado para diferenciar nueve clases de integrones. Hasta el momento, se han descrito cinco clases de RI en función de su integrasa, aunque los más frecuentemente implicados en la resistencia a antibióticos son los de clase 1, 2 y 3 (Fluit & Schmitz 2004). Estos tres tipos de integrones son los más estudiados y se han detectado mayoritariamente en enterobacterias, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Rowe-Magnus & Mazel 2002). Sin embargo, en las bacterias gram negativas de interés clínico, los que se han encontrado con mayor frecuencia son los integrones de clase 1, por lo que nos centraremos en esta clase

Los integrones de clase 1 se caracterizan por tener un segmento 5' conservado (5'-CS) que contiene el gen que codifica la integrasa, la *attI* y el promotor. Por otra parte, la mayoría de los integrones contienen también un segmento conservado en 3' (3'-CS) con los genes *qacEΔ1* que confiere resistencia a componentes de amonio cuaternario, *sul1*, de resistencia a sulfonamidas, y *orf5*, con función desconocida hasta el momento. Entre estos extremos 5'-CS y 3'-CS se encuentra una zona variable en la que se encuentran los casetes génicos (Figura 7).

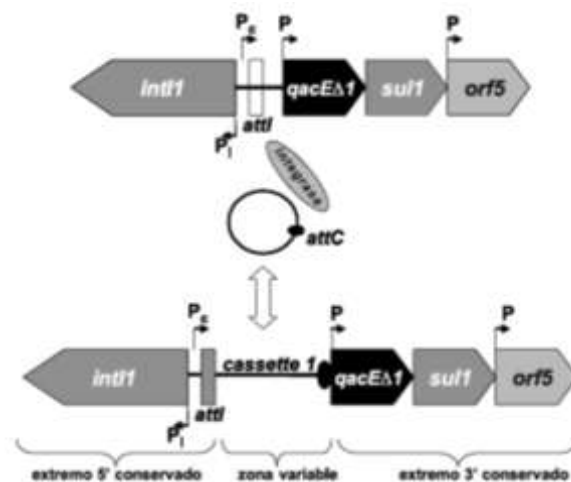


Figura 7.- Estructura básica de un integrón de clase 1 y representación de la adquisición de un casete génico (González R et al. 2004).

Los integrones de clase 1 están asociados con transposones funcionales y no funcionales derivados de Tn402 u otros más complejos como Tn21 (Brown et al. 1996; Stokes et al. 2006). Los integrones de clase 2 están asociados exclusivamente con derivados del transposón Tn7 (Mazel 2006; Partridge et al. 2009) y los de clase 3 están relacionados con la familia de transposones Tn5053 (Partridge et al. 2009).

Dentro de los integrones, podemos encontrar gran variedad de genes de resistencia a antimicrobianos. En las enterobacterias, los genes de resistencia más frecuentemente encontrados incluyen una gran variedad de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y β -lactamasas tipo AmpC o cefamicinasas, así como genes de resistencia a quinolonas (*qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*), o a aminoglucósidos (*aac*, *aad*, *aph*). Hay un gran número de posibilidades de recombinación y de intercambio de los genes que poseen los integrones, lo que proporciona a las bacterias una gran versatilidad para hacer frente a los antibióticos.

Muchas carbapenemasas se encuentran codificadas dentro de integrones, como *bla_{GES}*, que suele encontrarse en integrones de clase 1, aunque en enterobacterias también han sido descritos de forma cromosómica (Walther-Rasmussen & Høiby 2007). Algunas carbapenemasas de clase B suelen estar codificadas en integrones de clase 1, como IMP y VIM, dentro de transposones, junto con otros genes de resistencia como a aminoglucósidos, cloranfenicol y sulfonamidas, dando lugar a cepas multirresistentes (Martinez-Martinez & Gonzalez-Lopez 2014).

La resistencia plasmídica a quinolonas, principalmente por genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr*, que están asociados muchas veces a *bla_{OXA}* dentro de integrones complejos, en aislados productores de cefamicinasas plasmídicas o BLEE tipo CTX-M (Bado et al. 2010; Quiroga et al. 2007; Cao et al. 2014).

4. Tipificación molecular de enterobacterias

Los estudios sobre la estructura genética de las poblaciones microbianas son fundamentales para comprender la evolución, la ecología y la epidemiología de los microorganismos involucrados en las enfermedades infecciosas. Los sistemas de tipificación molecular comprenden una gran variedad de técnicas cuyo objetivo principal es la comparación de la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos, de forma que se pueda conocer la relación existente, clonal o no, de los aislados estudiados.

Introducción

El término clon o complejo clonal en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos que descienden de un ancestro común o que proceden directamente de la misma fuente o cadena de transmisión. Estos aislamientos mantienen un nivel de similitud genética elevado, mucho mayor al que encontramos en aislamientos seleccionados arbitrariamente, sin relación epidemiológica.

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas de tipificación molecular para comparar los genotipos de especies bacterianas. Estos métodos deben cumplir tres requisitos esenciales: 1) poder de tipificación, es decir, ser capaces de catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado; 2) poder discriminatorio, deben ser capaces de discriminar entre aislamientos no relacionados; 3) reproducibilidad, deben de dar resultados reproducibles entre distintos estudios y estables para una cepa determinada (Coll et al. 2005).

Las técnicas moleculares son numerosas, e incluyen estudios de restricción del ADN cromosómico mediante electroforesis de campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), la secuenciación de fragmentos internos de genes metabólicos muy conservados (multilocus sequence typing, MLST), análisis del número de copias determinadas de secuencias de inserción o aquellos elementos palindrómicos repetidos a lo largo del cromosoma (repetitive element palindromic, REP-PCR), la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (random amplified polymorphic DNA, RAPD-PCR) o el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism analysis, AFLP).

Las técnicas de tipificación moleculares no deben utilizarse de forma sistemática ante la sospecha de un brote. En un estudio epidemiológico molecular, hay que obtener información epidemiológica preliminar de forma rápida y que sea fiable. Hay que tener en cuenta que los aislados implicados en el brote están epidemiológicamente relacionados y proceden de un mismo progenitor o clon si están genéticamente relacionados. Por el contrario, los aislados que no estén relacionados epidemiológicamente tendrán genotipos diferentes.

El análisis del polimorfismo genético a través de PFGE es la técnica con mayor poder discriminatorio y, además, proporciona una visión completa del genoma de la bacteria, ya que los patrones de bandas son únicos para cada clon (Ballarini et al. 2012). Sin embargo, su uso se encuentra limitado en ciertas situaciones debido a su baja reproducibilidad y laboriosidad y al tiempo requerido para obtener los resultados (Vílchez & Alonso 2009). Por ello, se ha incrementado el desarrollo de métodos basados en el análisis de secuencias. El método más empleado para estudios epidemiológicos es el MLST ya que es capaz de detectar cambios

genéticos dentro de los 7 genes conservados que estudia, denominados "housekeeping" (Glaeser & Kämpfer 2015), además de proporcionar una nomenclatura clara ("Sequence Type", ST) y los datos se almacenan fácilmente en bases de datos en formato electrónico, de forma que se pueden intercambiar entre laboratorios, permitiendo comparar perfiles o secuencias tipos entre aislados de distintos países o continentes.

4.1. Tipificación de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es fenotípica y genotípicamente diversa, y tradicionalmente ha sido dividida en subespecies. La primera clasificación, basada en las características fenotípicas, bioquímicas y en criterios clínicos, permitió diferenciar tres subespecies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (Ørskov & Ørskov 1984). Desde entonces, gracias a la aplicación de métodos taxonómicos moleculares, esta primera clasificación ha sido revisada en repetidas ocasiones.

En 2001 se propuso la división del género en tres clusters de acuerdo con su heterogeneidad filogenética: KpI, con las especies más patógenas (*K. granulomatis* y las tres subespecies de *K. pneumoniae*), KpII (*K. ornithinolytica*, *K. planticola* y *K. terrigena*) y KpIII (*K. oxytoca*) (Brisse & Verhoef 2001; Brisse et al. 2004). El cluster II fue reclasificado en un nuevo género, *Raoultella* sp. (Drancourt et al. 2001).

Posteriormente esta clasificación se modificó y en la actualidad se diferencian tres grupos filogenéticos, los cuales se han definido en base a la secuenciación de un pequeño número de genes, de forma que se ha propuesto que cada grupo filogenético corresponde a especies distintas: *K. pneumoniae* (KpI), *K. quasipneumoniae* (KpII) y *K. variicola* (KpIII) (Brisse et al. 2014; Holt et al. 2015).

Además del análisis filogenético, es esencial estudiar la relación clonal a través de los métodos de tipificación molecular, como PFGE y MLST. En *K. pneumoniae* los genes secuenciados para el MLST son los descritos por el Instituto Pasteur (Paris): *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* y *tonB*.

El PFGE estudia el genoma completo por digestión del mismo con enzimas de restricción, mientras que el MLST estudia las secuencias de 7 genes conservados, por lo que el PFGE será más sensible a polimorfismos debidos a inserciones y deleciones de material genético mientras que MLST detectará polimorfismos de nucleótidos que se acumularán por

error en la replicación durante la evolución (Ballarini et al. 2012).

En el caso de *K. pneumoniae*, se ha considerado que el PFGE es más discriminatorio que el MLST, aunque el MLST es más eficaz para detectar la diseminación de los clones. Por ello, se recomienda para el análisis de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE realizar en primer lugar un análisis mediante PFGE y posteriormente realizar el MLST para identificar los clones específicos de cada grupo (Elhani et al. 2011).

4.2. Clones de alto riesgo en *K. pneumoniae*

La diversidad clonal en *K. pneumoniae* es muy amplia, pero el esquema MLST propuesto en 2005 permitió estandarizar la identificación de las cepas de una manera reproducible, para identificar e investigar los grupos clonales clínicamente relevantes (Diancourt et al. 2005). A pesar de la gran cantidad de secuencias tipo (ST) descritas actualmente (3336 STs a fecha 4 de mayo de 2018), se han descrito ciertos clones de alto riesgo, sobre todo en cepas multirresistentes, que se han asociado con los secuenciotipos ST11, ST15, ST258, ST340 y ST512 (Bialek-Davenet et al. 2014; Wyres & Holt 2016). Algunos de ellos, se han relacionado con brotes de cepas productoras de carbapenemasas KPC y OXA-48.

Las enzimas KPC han sido descritas en más de 100 diferentes STs, pero los clones pandémicos se han relacionado específicamente con el complejo clonal 285 (Munoz-Price et al. 2013). Este complejo clonal consiste en un ST predominante, el ST258, y, en menor medida, ST11, ST340, ST437 y ST512, que son variantes del ST258 (Chen et al. 2014; Munoz-Price et al. 2013). El ST258 es prototipo de un clon de alto riesgo y la reciente información sobre su epidemiología, la reorganización genética y la evolución de este exitoso clon en países como Estados Unidos, Noruega, Italia, Canadá, Brasil, Grecia, Polonia, Suecia y Corea del Sur ha proporcionado información sobre la propagación mundial de la resistencia a los antimicrobianos y sugiere que es un ST de riesgo internacional (Mathers et al. 2015). En España, el clon ST258 está menos extendido y las cepas productoras de KPC no están asociados al ST258 (Ruiz-Garbajosa et al. 2013).

El primer caso de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 en España se identificó en 2009 (Pitart et al. 2011). Desde entonces, se han asociado diferentes ST a las cepas productoras de OXA-48, incluyendo ST11, ST405, ST15 y ST16, los cuales se han diseminado en hospitales (J Oteo et al. 2015; Pitart et al. 2011), siendo los más frecuentes en nuestro país los ST405 y ST11, relacionados con OXA-48, seguidos de ST15, más asociados a VIM (Pérez-Vázquez et al. 2016; Argente et al. 2018). Por otra parte, el ST405 era un secuenciotipo

infrecuente hasta la aparición de cepas productoras de OXA-48, no solo en España, sino también en Francia y Bélgica (J Oteo et al. 2015). El ST11 es un clon adaptado al medio hospitalario, habiéndose descrito como un clon de alto riesgo por su elevada capacidad de diseminación y su versatilidad en cuanto a la captación de genes de resistencia (Woodford et al. 2011).

La exitosa difusión de otros grupos clonales de alto riesgo aún no ha sido completamente estudiada. Sin embargo, sí que es conocido que otros ST de alto riesgo como ST14, ST147, ST37 y ST101 tienden a portar genes codificantes de carbapenemasas, mientras que ST15 y ST17 son principalmente clones portadores de BLEEs, la mayoría de tipo CTX-M (Navon-Venezia et al. 2017).

Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

En aislados clínicos:

1. Detección de carbapenemasas en enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems en aislados clínicos de pacientes asistidos en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y en el Sector III de Zaragoza.
2. Estudio de la sensibilidad a otros antibióticos en las cepas de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems.
3. Descripción de las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas.
4. Caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia a β -lactámicos, principalmente los asociados con fenotipo BLEE, AmpC y presencia de carbapenemasas.
5. Detección y caracterización de integrones de clase 1, 2 y 3 en los aislados productores de carbapenemasas.
6. Estudio de clonalidad en los aislados productores de carbapenemasas.

En aislados procedentes de portadores fecales:

1. Estudio de la prevalencia de pacientes portadores de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems en pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
2. Detección de portadores de enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
3. Estudio de la sensibilidad a otros antibióticos en las cepas identificadas.
4. Caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia a β -lactámicos, principalmente los asociados con fenotipo BLEE, AmpC y presencia de carbapenemasas.
5. Descripción de las características epidemiológicas de los pacientes colonizados por enterobacterias productoras de carbapenemasas.
6. Estudio de la proteína OmpK en aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes
7. Detección y caracterización de integrones de clase 1, 2 y 3.

Objetivos

8. Estudio de clonalidad en los aislados productores de carbapenemasas y en los aislados multirresistentes.

Material y métodos

1. Selección de los aislados estudiados

1.1. Aislados clínicos

Se ha estudiado la sensibilidad de un total de 40.557 aislados del orden de los *Enterobacterales* obtenidos de muestras clínicas durante el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2012 y el 30 de septiembre de 2016 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Se seleccionaron un total de 51 cepas con un perfil compatible con la presencia de carbapenemasas, siguiendo el criterio de selección establecido para detectar sensibilidad disminuida a carbapenems por la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST): CIM de ertapenem >0,5 µg/ml y/o imipenem >2 µg/ml. Se recogió una cepa por paciente excepto en un paciente, en el que se recogieron dos aislados por presentar diferente fenotipo de resistencia.

1.2. Aislados procedentes de pacientes colonizados

Durante el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de abril de 2015 y el 30 de septiembre de 2016, en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, se recogieron aislados de enterobacterias procedentes de muestras de portadores fecales obtenidas dentro del Programa Resistencia Zero llevado a cabo en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital. Para ello, se han recogido tres hisopos (frotis nasal, frotis faríngeo y frotis rectal) de los pacientes al ingreso y posteriormente 1 vez a la semana durante su ingreso en UCI. Durante este periodo, se recibieron un total de 1324 muestras procedentes de 598 pacientes, que se procesaron utilizando los medios cromogénicos MRSA (Oxoid), ESBL (Oxoid) y Brilliance-CRE Agar (Oxoid). Tras incubación a 37°C durante 18-24h se recuperaron un total de 38 enterobacterias, una por paciente, obtenidas a partir del medio cromogénico selectivo para detección de carbapenemasas Brilliance-CRE Agar (Oxoid).

2. Identificación y determinación de la sensibilidad a los antibióticos

La identificación bacteriana y los estudios de sensibilidad se realizaron mediante el sistema semiautomático de microdilución en caldo (MicroScan Walkaway®, Siemens Healthcare, España). Para la realización de esta técnica se utilizaron los paneles comerciales, que incluyen una batería de antibióticos en distintos pocillos y a diferentes concentraciones que, tras inocular y rehidratar con una suspensión estandarizada del microorganismo, se incuban a 37°C durante 18 h. A continuación se determina la CMI, como la concentración antimicrobiana mínima que muestre inhibición del crecimiento. Estos paneles nos permiten obtener la CMI en µg/mL de los antibióticos reflejados en la Tabla 4. Los puntos de corte utilizados por el sistema MicroScan WalkAway® son los recomendados por The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y/o European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST), clasificando así los aislados en distintas categorías de sensibilidad a antibióticos: sensibles (S), sensibles a exposición aumentada (I) o resistentes (R). Posteriormente, la identificación bacteriana se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (BrukerDaltonicsGmbH, Leipzig, Germany).

Todos los aislados seleccionados se conservaron a -20°C en crioviales Viabank™ (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido), que contienen aproximadamente 0,5-1 mL de un caldo nutritivo estéril crioprotector con 15-20% de glicerol.

Tabla 4.- Concentraciones de los antibióticos presentes en el panel 53 de MicroScan WalkAway® y puntos de corte para Enterobacterias obtenidos del EUCAST 2015 y CLSI 2015.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIONES (µg/ml)	PUNTOS DE CORTE	
		Sensible	Resistente
Ampicilina	8 - 16	≤8	>8
Amoxicilina / Ác. clavulánico	8/4 – 16/8	≤8	>8
Cefalotina	8 - 16	≤8	≥32
Cefazolina	8 - 16	≤2	≥8
Cefuroxima	4 - 16	≤8	>8
Cefoxitina	8 - 16	≤8	≥32
Cefotaxima	1 - 32	≤1	>2
Ceftazidima	1 - 16	≤1	>4
Cefepime	1 - 16	≤1	>4
Piperacilina / Tazobactam	8 - 64	≤8	16
Aztreonam	1 – 16	≤1	>4
Imipenem	1 – 8	≤2	>8
Ertapenem	0,5 - 4	≤0.5	>1
Gentamicina	2 – 8	≤2	>4
Tobramicina	2 – 8	≤2	>4
Amikacina	8 – 32	≤8	>16
Ác. Nalidíxico	16	≤16	≥32
Ciprofloxacino	0,5 - 2	≤0.5	>1
Tigecilina	1 - 2	≤1	>2
Trimetoprim / Sulfametoxazol	2/38	≤2/38	>4/76
Colistina	4	≤2	>4

3. Métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia a antibióticos

Se realizó la detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), cefamicinasas (AmpC) y carbapenemasas de clase A y de clase B o metalo- β -lactamasas (MBL).

En las enterobacterias con AmpC se realizaron todos los test fenotípicos por duplicado: en agar Mueller-Hinton (bioMérieux) y en agar Mueller-Hilton (bioMérieux) suplementado con una concentración de 50 mg/ml de cloxacilina, con el efecto de inhibir su AmpC para evitar unos resultados falsamente positivos.

3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas

3.1.1. Test de sinergia de doble disco

El test de sinergia de doble disco se basa en la utilización de inhibidores de carbapenemasas.

Para la detección de **MBL** se realizó un antibiograma con una distribución determinada de los discos: imipenem (10 μ g) + disco blanco con 6 μ l de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5M pH=8,0 + ertapenem (10 μ g) a una distancia de 1 cm. Se observa el fenotipo MBL cuando se produce una deformación del halo de inhibición de los carbapenems en las proximidades del disco de EDTA (Figura 8-2). Este estudio nos da una idea preliminar de la presencia de algún tipo de carbapenemasa de tipo B en la cepa correspondiente, aunque deberá ser confirmado por técnicas moleculares.

En el caso de las **carbapenemasas de clase A**, se emplea ácido 3-aminofenilborónico (APB) en vez de EDTA. La disposición de los discos es similar al caso anterior, pero colocando en el disco en blanco 6 μ l de ácido 3-aminofenilborónico a una concentración de 50 mg/ml (Figura 8-1).

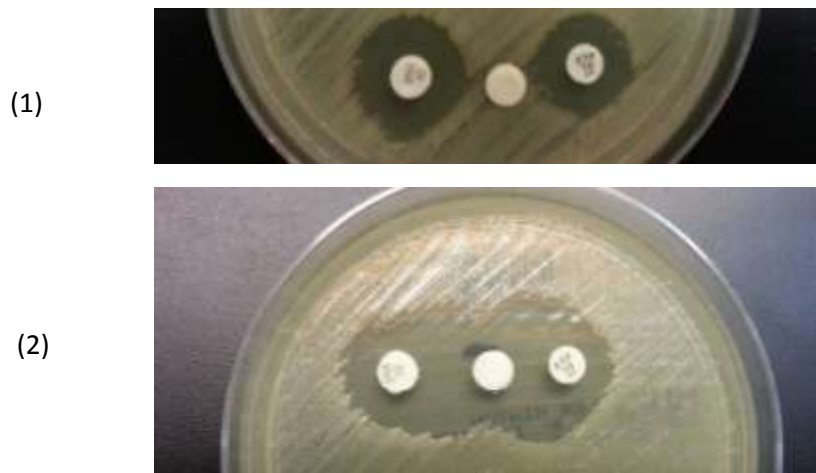


Figura 8.- Test de sinergia de doble disco para la detección de carbapenemasas de clase A (1) y clase B (2).

3.1.2. Test modificado de Hodge

Este test nos permite confirmar la producción de carbapenemasas en enterobacterias, siendo el único método de detección recomendado por el CLSI.

Se prepara una suspensión bacteriana a 0,5 McFarland de la cepa control *E. coli* ATCC 25922. Esta cepa se emplea como siembra base (en césped) de la placa de agar Mueller-Hinton por su característica de ser sensible a los carbapenems. Colocamos en el centro de la placa un disco de ertapenem 10 µg. Con un asa estéril se siembra en línea desde el disco de antibiótico hacia el borde de la placa la cepa en estudio y unas cepas control positivo (que posea una carbapenemasa) y control negativo (sensible a carbapenems). Incubar durante 18-24 horas a 37 °C.

En el caso de un resultado positivo se observará formación de una punta de flecha por el crecimiento de la cepa ATCC 25922 en la intersección entre el halo de inhibición (generado por la difusión del antibiótico) y la estría de siembra de la cepa de estudio productora de carbapenemasa. Lo que ha sucedido es que la carbapenemasa de la cepa a estudio es liberada al medio, degradando el carbapenem y permitiendo el desarrollo de la cepa *E. coli* control (Figura 9).

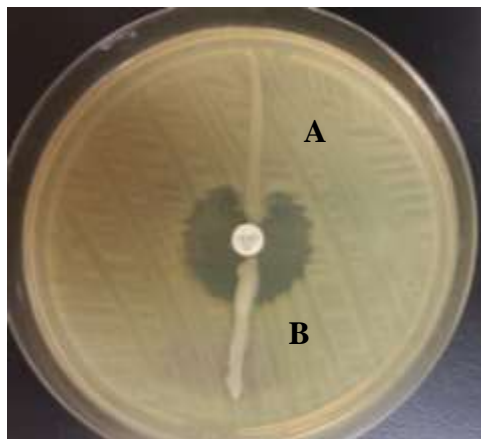


Figura 9.- Test modificado de Hode. A: resultado positivo (presencia de carbapenemasa). B: resultado negativo

3.2. Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE)

3.2.1. Epsilon-test (ϵ -test®)

El método de Epsilon-test (ϵ -test®, bioMérieux) permite determinar la actividad antimicrobiana ya que proporciona la concentración mínima inhibitoria (CMI, expresada en $\mu\text{g/ml}$). El fundamento es similar a la difusión con disco, pero empleando en este caso tiras de plástico no poroso, de 6 cm de largo por 5 mm de ancho, que incorporan un gradiente definido del antibiótico equivalente a 15 diluciones dobles seriadas.

Para la preparación del inóculo se sigue el mismo protocolo que para la difusión en disco. Al colocar la tira de E-test sobre la superficie del agar inoculado con el microorganismo, se produce la difusión del antibiótico desde la tira hasta el agar, creando un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico. Tras la incubación de la placa, se observará una zona de inhibición de forma elipsoidal y simétrica. La CMI será el valor de la concentración correspondiente al punto de intersección del halo de inhibición con la tira.

Para detectar la presencia de BLEEs, se realizaron las prueba comerciales E-test (bioMérieux): Cefotaxima (0,25-16 µg/ml) y Cefotaxima-Ácido Clavulánico (0,016-1 µg/ml) (CT/CTL), Ceftazidima (0,5-32 µg/ml) y Ceftazidima-Ácido Clavulánico (0,064-4 µg/ml) (TZ/TZL) Cefepime (0,25-16 µg/ml) y Cefepime-Ácido Clavulánico (0,064-4 µg/ml) (PM/PML).

3.3. Detección fenotípica de β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas

3.3.1. Epsilon-test (ϵ -test[®])

Se realizó solo en las cepas que no poseen AmpC o cefamicinasa cromosómica. En este caso, la prueba comercial empleada fue el E-test Cefotetán (0,5-32 µg/ml) y Cefotetán-Cloxacilina (0,5-32 µg/ml) (CN/CNI) (bioMérieux).

4. Extracción y cuantificación del DNA

4.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA en todas las enterobacterias se utilizó el sistema InstaGene™ PurificationMatrix (BioRad), que consiste en un equipo comercial que permite la extracción de DNA mediante resinas. Su matriz permite la absorción de los productos de la lisis celular que interfieren en la PCR, facilitando la preparación de DNA para su posterior amplificación.

A partir de un cultivo bacteriano puro, se realiza una suspensión de una colonia en 1 ml de agua destilada estéril. Se centrifuga 1 min a 13000 rpm, y se desecha el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 200 µl de la resina de extracción InstaGene y se incuba 20 min a 56 °C. Posteriormente, se agita en vortex a alta velocidad durante 10s, y se hierve durante 8 min a 100 °C. Tras esta incubación, se agita nuevamente en vortex durante 10s. Por último, se centrifuga a 13000 rpm durante 5 min.

4.2. Cuantificación del DNA

La cuantificación y pureza del DNA extraído se comprobó con el espectrofotómetro Nanodrop® ND-100 que permite realizar lecturas de volúmenes pequeños de muestra (1-3 μL).

La concentración de DNA se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, para lo que se considera que una unidad de absorbancia ($A_{260}=1$) corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble hebra y a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de cadena única, aproximadamente. La pureza del DNA extraído se determina con el cociente entre las lecturas a 260 y 280 nm. Una muestra con DNA puro presentará un cociente entre 1,8 y 2,0; mientras que la contaminación con proteínas disminuye la relación por debajo de 1,8 y la presencia de RNA da un cociente superior a 2,0. Los valores óptimos de concentración de DNA para las PCR realizadas son 400-600 $\text{ng}/\mu\text{L}$. En aquellos casos en que la concentración extraída fue superior, se realizaron diluciones con agua destilada estéril.

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) es una técnica de biología molecular que permite amplificar un fragmento particular de DNA delimitado por un par de cebadores. Para ello es necesario la acción de una enzima, la DNA polimerasa, que realiza la síntesis de DNA con ayuda de dos cebadores. El proceso se realiza de forma cíclica en un termociclador, y cada ciclo está dividido en tres fases:

- **Desnaturalización:** las dos hebras del DNA se separan. Se lleva a cabo a una elevada temperatura.
- **Hibridación:** se produce la unión de los cebadores por complementariedad al DNA molde.
- **Elongación:** se sintetizan cadenas complementarias monocatenarias gracias a la acción de la DNA polimerasa termoestable, que incorpora nucleótidos a partir del extremo 3' del cebador en dirección 5' → 3', utilizando como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizada. Generalmente se suele emplear Taq polimerasa, cuya temperatura óptima de elongación es 72°C.

Debido a que los productos de un ciclo sirven como moldes para el siguiente, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de DNA. Por tanto, al final del proceso se obtiene un número de moléculas de ADN de 2^X , siendo X el número de ciclos realizados.

Para llevar a cabo la PCR se utilizaron los siguientes componentes:

- DNA de la muestra: es el DNA molde que queremos amplificar. Debe estar exento de compuestos inhibidores como quelantes (EDTA) que recuden la concentración de iones Magnesio necesarios para llevar a cabo la reacción.
- Primers o cebadores: son moléculas cortas, de entre 10 y 30 pares de bases, que son complementarios a la región que se quiere amplificar.
- DNA polimerasa: es la enzima que cataliza la síntesis de DNA.

Material y Métodos

- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): se incorporarán durante el proceso de elongación al extremo 3' libre del cebador creando una cadena complementaria por acción de la DNA polimerasa.
- Tampón de la reacción: proporciona el pH y la fuerza iónica necesaria para que se produzca la reacción.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$): es el cofactor de la enzima.

Al añadir el conjunto de todos estos elementos formaremos la Master-Mix. Hay que calcular un volumen final de Master-Mix en función del número total de muestras a estudio, añadiendo siempre un control positivo y un control negativo. El volumen final para cada tubo de reacción, incluyendo el DNA, será de 50 μ l. Los componentes y cantidades empleadas se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y cantidades utilizados en la técnica de PCR

Componentes	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Primer directo (F) (Sigma)	25 μ M	1 μ l	0,5 μ M
Primer reverso (R) (Sigma)	25 μ M	1 μ l	0,5 μ M
Tampón de reacción ("NH ₄ buffer") (Bioline)	10X	5 μ l	1X
dNTPs (Sigma)	10 mM	1 μ l	0,2 mM
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 μ l	1,5 mM
BioTaq DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ μ l	0,3 μ l ^a	1,5 U
DNA	-	10 μ l	-
Agua	-	Hasta 50 μ l ^b	-

^aEn las PCR con fragmentos superiores a 1500 pb se emplearon 0,5 μ l de BioTaq DNA polimerasa.

^bVolumen variable en función de si la PCR es simple o múltiple.

En todas las reacciones de PCR se incluyeron controles positivo y negativo. El control positivo contenía DNA en el que se había comprobado por secuenciación la presencia del gen que se desea amplificar. El control negativo contenía todos los componentes de la mezcla excepto DNA. Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados se describen a continuación.

5.1. Detección de genes codificantes de MBL

Se estudió la presencia de genes codificantes de MBL en todos los aislados seleccionados, tanto aquellos con fenotipo MBL positivo como negativo. Se empleó una PCR múltiple para la detección de genes que codifican carbapenemasas de clase B. Las condiciones específicas de esta PCR se especifican en la Tabla 6. En los resultados positivos, se repitió la PCR específica del gen codificante empleando únicamente su pareja de primers.

Tabla 6.- Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de MBL y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
SIM: 570 pb F: TAZAAGGGATTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG		
GIM: 477 pb F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTTCCAACCTTGCCATGC		
VIM: 390 pb F: GATGGTGTGGTTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 52°C 40s 36 ciclos 72°C 50s 72°C 5min 1 ciclo	(Ellington et al. 2007)
SPM: 271 pb F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG		
IMP: 188 pb F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC ^a R: CCAAACYACTAS GTTATCT ^a		

^aY= C+T; S=G+C

5.2. Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase

A.

Se utilizó una PCR múltiple en la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A (Hong et al. 2012). En este caso, el volumen final en cada tubo de reacción fue de 25 μ l, y se empleó otro tipo de polimerasa ("KAPA Taq HotStart DNA Polymerase", KAPABIOSYSTEMS). En la Tabla 7 se reflejan los reactivos y cantidades empleadas para la realización de esta PCR. Se estudió la presencia de genes codificantes de carbapenemasas de clase A en todos los aislados.

Tabla 7.- Reactivos y cantidades empleadas en la realización de la PCR multiplex de carbapenemasas de clase A

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
KPC-F, KPC-R (Sigma)	25 μ M	0,5 μ l	0,5 μ M
SME-F, SME-R (Sigma)	25 μ M	0,5 μ l	0,5 μ M
IMI-F, IMI-R (Sigma)	25 μ M	0,5 μ l	0,5 μ M
GES-F, GES-R (Sigma)	25 μ M	0,5 μ l	0,5 μ M
Tampón de reacción (KAPA BIOSYSTEMS)	5X	2,5 μ l	0,5X
dNTPs (Sigma)	10 mM	0,5 μ l	0,2 mM
MgCl ₂ (KAPA BIOSYSTEMS)	25mM	1,5 μ l	1,5mM
BioTaq DNA polimerasa (KAPA BIOSYSTEMS)	5 U/ μ l	0,1 μ l	0,5 U
DNA	-	5 μ l	-
Agua estéril	-	Hasta 25 μ l	-

Tabla 8.- Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Carbapenemasas amplificadas	Condiciones de amplificación	Referencia
KPC: 638 pb F: GTATCGCCGTCTAGTTCTGC R: GGTCGTGTTCCCTTTAGCC	KPC-2 a KPC-10		
SME: 551 pb F: ACTTTGATGGGAGGATTGGC R: ACGAATTCGAGCATCACCAG	SME-1 a SME-3	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 50°C 30s 25 ciclos 72°C 1min	(Hong et al. 2012)
IMI: 399 pb F: TGCGGTCGATTGGAGATAAA R: CGATTCTTGAAGCTTCTGCG	IMI-1, IMI-2, NMC-A	72°C 7min 1 ciclo	
GES: 323 pb F: GCTTCATTCACGCACTATT R: CGATGCTAGAAACCGCTC	GES-1 a GES-9, GES-11 a GES-15		

5.3. Detección de genes codificantes de otras carbapenemasas.

Para el análisis del gen portador de carbapenemasas tipo OXA-48 y NDM, las cuales no están incluidas en las anteriores PCR múltiples, se realizaron PCR específicas según las condiciones de la Tabla 9.

Tabla 9.- Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de carbapenemasas no incluidas en las PCR múltiples.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
OXA-48: 743 pb F: TTGGTGGCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTTGATGGC	94°C 3 min 1 ciclo	(Poirel et al. 2004)
	94°C 1 min	
	57°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
NDM: 620 pb F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	72°C 5 min 1 ciclo	(Poirel et al. 2011)
	94°C 10 min 1 ciclo	
	94°C 30 s	
	52°C 40 s 36 ciclos	
	72°C 50 s	
72°C 5 min		

5.4. Detección de genes codificantes de β -lactamasas de tipo AmpC.

Se utilizó una PCR multiplex para detectar la presencia de β -lactamasas tipo AmpC, siguiendo las condiciones descritas (Perez-Perez & Hanson 2002) (Tabla 10 y Tabla 11).

Tabla 10. Reactivos y cantidades para realizar la PCR multiplex AmpC.

Componentes	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
CITM-F, CITM-R	25 μ M	1,2 μ L	0,6 μ M
DHAM-F, DHAM-R	25 μ M	1,2 μ L	0,6 μ M
MOXM-F, MOXM-R	25 μ M	1,2 μ L	0,6 μ M
EBCM-F, EBCM-R	25 μ M	1 μ L	0,5 μ M
AACM-F, AACM-R	25 μ M	1 μ L	0,5 μ M
FOXM-F, FOXM-R	25 μ M	0,8 μ L	0,4 μ M
Tampón de reacción ("NH ₄ buffer") (Bioline)	10X	5 μ L	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 μ L	1,5 mM
dNTPs	10 mM	1 μ L	0,2 mM
BIOTAQ™ DNA polimerasa	5 U/ μ L	0,3 μ L	0,03 U/ μ L
DNA	-	10 μ L	
Agua estéril	-	Hasta 50 μ L	

Tabla 11. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de β -lactamasas tipo AmpC

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	β -lactamasas amplificadas	Condiciones de amplificación	Referencia
MOXM: 520 pb F: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT R: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11		
CITM: 462 pb F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	LAT-1 a LAT-4, CMY-1 a CMY-7, BIL-1		
DHAM: 405 pb F: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	DHA-1, DHA-2		
AACM: 346 pb F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R: CCGCCGCAATCATCCCTACG	AAC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 30 s 64°C 30 s 25 ciclos 72°C 1 min	
EBCM: 302 pb F: TCGGTAAGCCGATGTTGCCG R: CTTCCACTGCGGCTGCCACTT	MIR-1T, ACT-1	72°C 7 min 1 ciclo	
FOXN: 190 pb F: ACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	FOX-1 a FOX-5b		
CMY-2: 1126 pb F: AACACACTGATTGCGTCTGAC R: CTGGCCTCATCGTCAGTTA	CMY-2		
DHA-1: 500 pb F: GAGCTGAATGTCACCCATGC R: TGAACATACATACCGGTGC	DHA-1		(Perez-Perez & Hanson 2002)

5.5. Detección de genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

La identificación de BLEEs se realizó mediante PCR con primers para TEM, SHV y CTX-M universal. Posteriormente se caracterizó el grupo CTX-M mediante PCR: grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-9 o grupo CTX-M-10 (Tabla 12).

Tabla 12. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de β -lactamasas tipo BLEE

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
CTX-M-UNIVERSAL: 585 pb F: CGATGTGCAGTACCAAGTAA R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C 5 min 1 ciclo	(Batchelor et al. 2005)
	94°C 30 s	
	52°C 30 s 35 ciclos	
	72°C 1 min	
CTX-M-9: 857 pb F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	72°C 5 min 1 ciclo	(Coque et al. 2002)
	94°C 3 min 1 ciclo	
	94°C 45 s	
	62°C 45 s 30 ciclos	
CTX-M-3G: 1017 pb F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	72°C 45 s	(Pagani et al. 2003)
	72°C 10 min 1 ciclo	
	94°C 7 min 1 ciclo	
	94°C 50 s	
CTX-M-10: 944 pb F: CCGCGCTACACTTTGTGGC R: TTACAAACCGTTGGTGACG	50°C 40 s 35 ciclos	(Coque et al. 2002)
	68°C 1 min	
	94°C 3 min 1 ciclo	
	94°C 45 s	
SHV: 885 pb F: CACTCAAGGATGTATTGTG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	72°C 45 s	(Pitout et al. 1998)
	72°C 10 min 1 ciclo	
	96°C 15 s 1 ciclo	
	96°C 15 s	
	52°C 15 s 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 3 min 1 ciclo	

	94°C 10 min 1 ciclo	
TEM: 1080 pb	94°C 30 s	
F. ATAAAATTCTTGAAGAC	50°C 30 s 35 ciclos	(Weill et al. 2004)
R: TTACCAATGCTTAATCA	72°C 1 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	

5.5.1. Entornos genéticos de BLEEs tipo CTX-M

Se estudiaron los entornos genéticos inmediatos de las BLEE de tipo CTX-M obtenidas, según las condiciones reflejadas en la Tabla 13. El número que define el cebador es el otorgado para su localización en la Figura 10.

Tabla 13. Cebadores empleados para caracterizar el entorno genético de BLEEs tipo CTX-M.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencias
	94°C 5 min 1 ciclo	
<i>sul1-orf513</i> (ISCR1): 2120pb	94°C 1 min	
(1) <i>sul1</i> -F: TGGTGACGGTGTTCGGCATTG	60°C 1 min 30 ciclos	(Lartigue et al. 2004)
(2) <i>orf513</i> -D3: CTCACGCCCTGGCAAGGTTT	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
	94°C 5 min 1 ciclo	
<i>orf513-bla_{CTX-M}</i> : 1600 pb	94°C 1 min	
(3) <i>orf513</i> -D5: CTTTTGCCCTAGCTGCGGT	58°C 1 min 35 ciclos	(Lartigue et al. 2004)
(4) MA3(CTX-M): ACYTTACTGGTRCTGCACAT ^a	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
	94°C 5 min 1 ciclo	
<i>bla_{CTX-M}-orf1005</i> : 1729 pb	94°C 1 min	
(5) M9rlower: GAGAATCATCGCCGAAGGG	55°C 1 min 30 ciclos	(Eckert et al. 2004)
(6) Orf1005-R: ATCCATAATAGCATCCATCAT	72°C 3 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

	94°C	3 min	1 ciclo	
<i>ISEcp1- bla_{CTX-M}</i> : 831 pb	94°C	30 s		
(7) ISEcp1U2: AATACTACCTTGCTTTCTGA	55°C	30 s	30 ciclos	(Saladin et al. 2002)
(8) MA3(CTX-M): ACYTTACTGGTRCTGCACAT ^a	72°C	30 s		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<hr/>				
	94°C	3 min	1 ciclo	
<i>IS26- bla_{CTX-M}</i> : 538 pb	94°C	30 s		
(9) IS26U: AGCGGTAAATCGTGGAGTGA	55°C	30 s	30 ciclos	(Saladin et al. 2002)
(10) MA3(IS26): CGCCATAACTTTACTGGTA	72°C	30 s		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<hr/>				
	94°C	3 min	1 ciclo	
<i>bla_{CTX-M}- IS903</i> : 1200 pb, 320 pb	94°C	1 min		
(11) M9 IS903: CTACGGCACCACCAATGATA	55°C	1 min	30 ciclos	(Eckert et al. 2004; Vinué 2010)
(12) IS903 reverse: CGGTTGTAATCTGTTGTCCA	72°C	1 min		
(13) IS903 r5'Eckert: CATCATCCAGCCAGAAAGTT	72°C	7 min	1 ciclo	
<hr/>				
	94°C	3 min	1 ciclo	
<i>bla_{CTX-M}-orf477</i> : 450 pb	94°C	1 min		
(14) M3 int upp: TCACCCAGCCTCAACCTAAG	55°C	1 min	30 ciclos	(Eckert et al. 2004)
(15) ORF1 polM3: GCSCCGACACCCTCACACCT ^a	72°C	1 min		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<hr/>				
	94°C	5 min	1 ciclo	
<i>Int11 - dfrA16</i> : 1100 pb	94°C	30 s		
(16) Int11centro: CGAAATCCAGATCCTTGACCC	62°C	30 s	30 ciclos	
(17) dfrA1-R: TTAACCCTTTTGCCAGATTT	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	

Material y Métodos

	94°C 5 min 1 ciclo
<i>Int11-aadA2</i> : 1800 pb	94°C 30 s
(16) <i>Int11centro</i> : CGAAATCCAGATCCTTGACCC	62°C 30 s 30 ciclos
(18) <i>aadA1-R</i> : ATCCTTCGGCGCGATTTTG	72°C 1 min
	72°C 8 min 1 ciclo
<hr/>	
	94°C 5 min 1 ciclo
<i>dfrA16-aadA2</i> : 1300 pb	94°C 30 s
(19) <i>dfrA1-F</i> : GTGAAACTATCACTAATGG	62°C 30 s 30 ciclos
(18) <i>aadA1-R</i> : ATCCTTCGGCGCGATTTTG	72°C 1 min
	72°C 8 min 1 ciclo

^a Y=C o T; R= A o G; S=C o G.

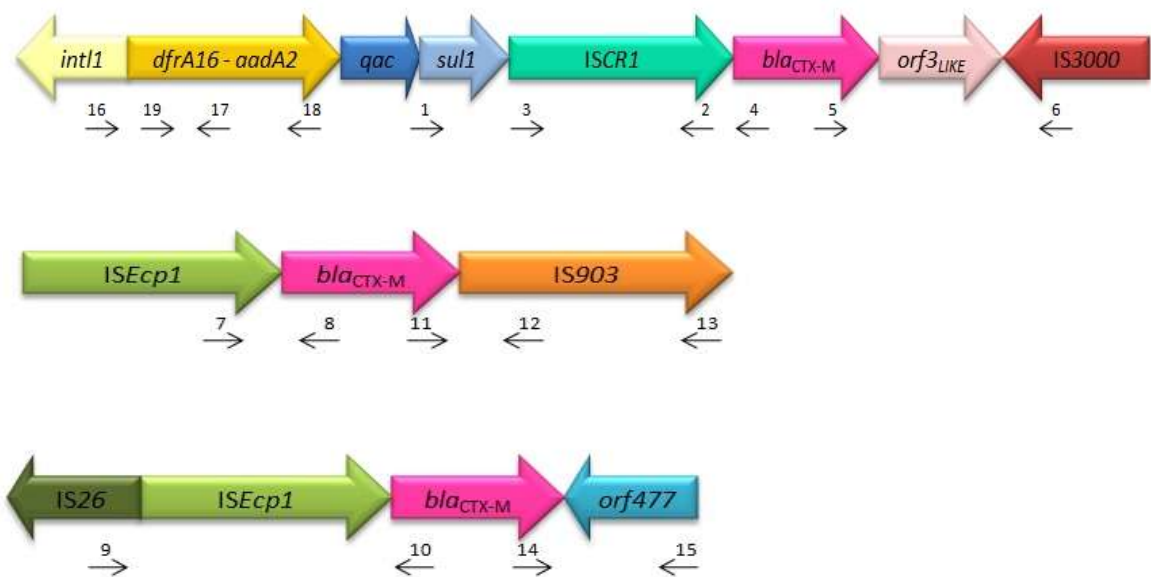


Figura 10.- Posibles entornos genéticos de los genes *bla_{CTX-M}* y posición de los cebadores utilizados para su estudio

5.6. Análisis de integrones.

Se estudió la presencia de integrones en las cepas portadoras de carbapenemasas y en las cepas obtenidas de portadores fecales.

En la Tabla 14 se reflejan los cebadores y las condiciones empleadas para la detección de la presencia integrones de clase 1, 2 y 3 mediante amplificación de su integrasa, el segmento 3' conservado característico del integrón de clase 1 así como la región variable del integrón de clase 1. Cuando las regiones variables de los integrones tenían un tamaño elevado (superior a 1500 pb) fue necesario recurrir a la técnica de mapeo por PCR donde, combinando diferentes cebadores tanto para amplificar como para secuenciar, se sucedían los fragmentos de manera solapante permitiendo obtener el integrón completo.

Tabla 14. Cebadores y condiciones de amplificación para la detección de integrones de clase 1, 2 y 3.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
	94°C 5 min 1 ciclo	
Int-1: 483 pb F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG R: ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C 30 s 62°C 30 s 30 ciclos 72°C 1 min	(Mazel et al. 2000)
	72°C 8 min 1 ciclo	
	94°C 5 min 1 ciclo	
Int-2: 788 pb F: CACGGATATGCGACAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C 30 s 62°C 30 s 30 ciclos 72°C 1 min	(Mazel et al. 2000)
	72°C 8 min 1 ciclo	
	94°C 5 min 1 ciclo	
Int-3: 979 pb F: GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGATCTGCCAACCTGACT	94°C 30 s 62°C 30 s 30 ciclos 72°C 1 min	(Mazel et al. 2000)
	72°C 8 min 1 ciclo	
	94°C 5 min 1 ciclo	
QacEΔ1-Sul1: 1125 pb Qac - F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG Sul1 - R: GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG	94°C 30 s 62°C 30 s 30 ciclos 72°C 1 min	(Mazel et al. 2000)
	72°C 8 min 1 ciclo	

	94°C 5 min 1 ciclo	
RV-Int1: tamaño variable	94°C 30 s	
F: CGAAATCCAGATCCTTGACCC	62°C 30 s 30 ciclos	(Lévesque P.H 1993)
R: AAGCAGACTTGACCTGA	72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	

5.6.1. Otras PCR realizadas para el análisis de integrones

Tabla 15. Cebadores y condiciones para la detección de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
aac(6')Ib: 482 pb	94°C 5 min 1 ciclo	
F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	94°C 45 s	(Park et al. 2006)
R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	55°C 45 s 34 ciclos	
	72°C 45 s	
	72°C 8 min 1 ciclo	
aadA1: 282 pb	94°C 5 min 1 ciclo	
F: GCAGCGCAATGACATTCTTG	94°C 1 min	(Madsen et al. 2000)
R: ATCCTTCGGCGGATTTTG	60°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
aadA5: 453 pb	95°C 5 min. 1 ciclo	
F: CTTAGTTCGGTGAGTGGC	95°C 1 min.	(Wei et al. 2009)
R: CAATCGTTGCTTTGGCATAT	54°C 1 min. 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 10 min. 1 ciclo	

Tabla 16. Cebadores y condiciones para la detección de genes relacionados con la resistencia plasmídica a quinolonas y entornos genéticos.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
qnrA: 650 pb F: GGGTATGGATATTATTGATAAA R: CTAATCCGGCAGCACTATTA	95°C 5 min 1 ciclo	(Cattoir et al. 2007)
	95°C 1 min	
	55°C 1 min 40 ciclos	
	72°C 1 min	
72 ^a C 7 min 1 ciclo		
qnrB: 469 pb F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	94°C 5 min 1 ciclo	(Wang et al. 2008)
	94°C 45 s	
	53°C 45 s 35 ciclos	
	72°C 1 min	
72 ^a C 7 min 1 ciclo		
qnrC: 307 pb F: GGGTTGTACATTTATTGAATCG R: CACCTACCCATTTATTTTCA	95°C 5 min 1 ciclo	(Kim et al. 2009)
	95°C 1 min	
	55°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
72°C 7 min 1 ciclo		
qnrD: 581 pb F: CGAGATCAATTTACGGGGAATA R: AACAAAGCTGAAGCGCCTG	95°C 5 min 1 ciclo	(Cavaco et al. 2009)
	95°C 1 min	
	55°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
72°C 7 min 1 ciclo		
qnrS: 550 pb F: AGTGATCTCACCTTCACCGC R: CAGGCTGCAATTTTGATACC	95°C 5 min 1 ciclo	(Cattoir et al. 2007)
	95°C 1 min	
	55°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 2 min	
72 ^a C 7 min 1 ciclo		
qepA: 500 pb F: GGACATCTACGGCTTCTTCG R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG	96°C 1 min 1 ciclo	(Yamane et al. 2008)
	96°C 1 min	
	60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
72 ^a C 5 min 1 ciclo		

Material y Métodos

	94°C 5 min 1 ciclo	
qnrB-psp2: AAATTTAAYCAGAAAAAAGC	94°C 45 s	
qnrBnew-R: CGATGCCTGGTACTTGTCC	55°C 45 s 30 ciclos	(Jacoby et al. 2011a)
(787 pb)	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<hr/>		
qnrB-psp2: AAATTTAAYCAGAAAAAAGC		
qnrB-sc3: GCTSARGAGAACAGCTATAC		
	94°C 5 min 1 ciclo	
qneBnew-F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	94°C 1 min	
sapA-F: GCAGCAGCCTGACCACTC	55°C 1 min 35 ciclos	(Jacoby et al. 2011a)
qnrB-psp2: AAATTTAAYCAGAAAAAAGC	65°C 8 min	
qnrB-ds2: AAGAGTGGAATTTCCACA	72°C 58min 1 ciclo	
qnrB-psp2: AAATTTAAYCAGAAAAAAGC		
qnrB-ds3: ATGGCTGAAGTTGAGATTAT		

5.7. Estudio de la porina OmpK

Se realizó el estudio de la porina OmpK en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* recogidas de los portadores fecales. Para ello, se amplificó por PCR el gen *OmpK* con las condiciones de amplificación que se muestran en la Tabla 17, y posteriormente se llevó a cabo su secuenciación. Las secuencias se compararon con cepas de referencia de OmpK35, OmpK36, OmpK37 (GenBank accession no. AJ011501, Z33506 y AJ011502, respectivamente).

Tabla 17. Cebadores utilizados en el estudio del gen OmpK y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación			Referencia
	95 ^a C	5 min		
OmpK 35: 738 pb	95 ^o C	1 min	35 ciclos	(Lee et al. 2007)
F: TGATCCCTGCCCTGCTGGT	54 ^o C	1min		
R: CCGGAGTCATGTTGTAAGTCT	72 ^o C	2 min		
	72 ^o C	10 min		
	95 ^a C	5 min		
OmpK 36: 1107 pb	95 ^o C	1 min	35 ciclos	(Lee et al. 2007)
F: ACAGAGGGTTAATAACATGAA	54 ^o C	1min		
R: TAGAACTGGAAACCAGGC	72 ^o C	2 min		
	72 ^o C	10 min		
	95 ^a C	5 min		
OmpK 37: 1200 pb	95 ^o C	1 min	35 ciclos	(Doménech-Sánchez et al. 1999)
F: CCGGATCCTAAAGCATGAGTTC	54 ^o C	1min		
R: GGGGATCCGCATCAGAACTGG	72 ^o C	2 min		
	72 ^o C	10 min		

6. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR se empleó la electroforesis en gel de agarosa. Ésta técnica nos permite separar de forma unidireccional los fragmentos de DNA de diferente tamaño mediante la acción de un campo eléctrico. La movilidad electroforética de los diferentes fragmentos depende del tamaño y la conformación del DNA, así como de la porosidad del gel y de la corriente eléctrica aplicada.

Para la preparación del gel se utilizó una concentración de agarosa entre el 1 y el 2 % en tampón TBE 1X, dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar: a mayor tamaño de banda esperada, mayor porcentaje de agarosa.

- a) Preparación del tampón TBE: a partir de una concentración comercial de TBE 10X (Tris 1 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 0,01 M pH 8) (Tris, Gibco®) se prepara la disolución de trabajo TBE 1X con agua estéril.
- b) Se mezcla la cantidad correspondiente de agarosa (Agarose, Fisher BioReagents®) en TBE y se lleva a ebullición hasta su total disolución.
- c) Para poder visualizar las bandas, se añade una solución acuosa de bromuro de etidio (0,5 µg/ml).
- d) La solución se vierte en el molde preparado para la electroforesis y se deja solidificar dentro de la campana de flujo laminar.
- e) Una vez solidificado, se coloca el gel en la cubeta de electroforesis y se carga cada pocillo con 10 µl del producto de PCR mezclados con 3 µl de tampón de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol). Uno de los pocillos siempre se carga con 3 µl de marcador de peso molecular según los tamaños de amplicón esperados se pueden utilizar distintos marcadores de peso molecular (Bioline): Hyperladder IV (100 pb) o Hyperladder I (200 pb). La electroforesis se desarrolló a 100 V en TBE 1X.
- f) Una vez finalizada la electroforesis, el gel se visualiza en un transluminador ultravioleta (Gel Doc EZ Imager), y se fotografiaron las bandas con el software ImageLab (Bio-Rad).

7. Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo para la identificación de diferentes genes de resistencia y sus entornos, en la detección de mutaciones del gen *OmpK*, en el análisis de integrones y en el estudio de MLST. Se emplearon para la secuenciación los mismos cebadores que en las diferentes reacciones de PCR, excepto en algunos casos que se tuvieron que diseñar para secuenciar completamente el fragmento amplificado. La secuenciación se realizó por el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) con el secuenciador ABI 3130 VL (Applied Biosystems).

7.1. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el software Chromas Lite, así como las siguientes herramientas informáticas:

- **Tratamiento de las secuencias:** Extended Nucleic Acid Sequence Massager (<http://www.cmbn.no/tonjum/seqMassager-saf.htm>)
- **Análisis y comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia patrón:** Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- **Traducción de aminoácidos:** EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)
- **Comparación con la base de datos GenBank:** Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- **Análisis de la acción de las enzimas de restricción:** NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)
- **Análisis de secuencia tipo:** *Klebsiella pneumoniae* MLST database del Instituto Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>)
- **Estudio de integrones:** INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>)
- **Estudio de secuencias de inserción:** ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/>)

8. Tipificación molecular

8.1. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis)

El protocolo utilizado fue el propuesto por R. K. Gautom (1997) modificado ligeramente. Este protocolo se utiliza para el estudio de la relación clonal de bacterias gram negativas. Se utilizó la enzima de restricción *Xba*I (40 U) (TAKARA Biotechnology, Dalian, China)

Preparación de insertos: A partir de un cultivo puro de 24 horas en placa de agar BHI, se inocularon varias colonias en 3 mL de BHI líquido y se incubaron toda la noche (overnight, 16 h) a 37 °C con agitación. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 13000 rpm durante 2 min (en caso necesario, repitiendo la centrifugación) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA pH 8) y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min. Se eliminó de nuevo el sobrenadante y se volvió a resuspender en 1 mL de TE. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1,5% en buffer TE y se mantuvo a 56 °C. Se mezclaron 0,5 mL de la suspensión bacteriana con 0,5 mL de agarosa y se distribuyó en los moldes, preparando 3 insertos por cepa. A continuación, se dejó solidificar unos minutos a 4°C.

Lisis de insertos: Se añadieron 3 mL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% sarcosil, 1 mg/mL proteinasa K) en cada tubo que albergaba los tres insertos de la cepa correspondiente y se dejó incubar en un baño de agua a 56 °C con agitación durante toda la noche (overnight, 16 h).

Lavado de insertos: Tras elimina el buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados en un baño con agitación a 56°C: 1) 10 mL de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces; 2) 10 mL de buffer TE con tiourea (0,005 g de tiourea en 1 L TE) durante 30 min, tres veces; y 3) 10 mL de buffer TE con tiourea durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Los insertos se conservaron en un nuevo buffer TE con tiourea a 4 °C hasta su utilización.

Digestión enzimática de insertos: Para la digestión enzimática se utilizó la mitad de un inserto de cada cepa en estudio. El volumen final fue de 100 µL de la mezcla de digestión compuesta por: 2,6 µL de enzima *Xba*I (40 U) + 10 µL de BSA (0,1%) + 10 µL de NE Buffer 4 (10X) + 77,4 µL de agua destilada estéril. Se incubó durante 6 h en un baño de agua a 37 °C.

Preparación del gel de agarosa: Se disolvió agarosa (Pulsed Field Certified Agarosa, BioRad) al 1% en TBE 0,5X, se vertió sobre el molde para hacer el gel, preparado previamente con el peine correspondiente, y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los pocillos se rellenaron con los insertos dejando el primero y último de los mismos para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker BioLabs) y se sellaron con agarosa de la misma concentración a 50 °C.

Electroforesis: Se realizó en una cuβ de electroforesis de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 μM. Las condiciones de electroforesis fueron: 1) Una rampa lineal pulsada de 1 a 30 segundos durante 23 h con un gradiente de voltaje 6 V/cm a 14 °C.

Tinción del gel y visualización: La tinción del gel se llevó a cabo en una solución acuosa de 300 mL de Bromuro de Etidio (BrEt) (30 μL/300 mL) durante 20 min. El gel se visualizó en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con captador de imágenes (Image Store 5000, UVP). Posteriormente se destiñó el gel con agua miliQ.

Análisis de los patrones: Los patrones se compararon visualmente y se clasificaron en indistinguibles, si los aislados presentaban el mismo número de bandas y aparentemente del mismo peso molecular, estrechamente relacionados, cuando los aislados presentaban de dos a tres bandas diferentes, posiblemente relacionados, si los patrones de los aislados presentaban de cuatro a seis bandas distintas, o diferentes, generalmente cuando los patrones se diferencian en más de 7 bandas, según las directrices propuestas por Tenover y colaboradores (Tenover et al. 1995). Para la comparación de los diferentes patrones obtenidos se utilizó el software GelJ v.1.3.

8.2. Determinación de la Secuencia Tipo (MLST)

Esta técnica se llevó a cabo en los aislados de *K. pneumoniae* de portadores fecales con distinto patrón de PFGE.

En la tipificación molecular se empleó la técnica de “MultiLocus Sequence Typing” (MLST) basada en el estudio de las secuencias nucleotídicas de 7 genes internos que codifican fragmentos estables en cada género bacteriano. Estos genes se denominan “housekeeping” y la combinación de los 7 alelos determina la secuencia tipo (ST). La técnica de MLST ha sido desarrollada y diseñada para identificar clones o líneas clonales en poblaciones bacterianas,

Material y Métodos

por lo que se considera un marcador molecular de aplicación en epidemiología global tanto a corto como a largo plazo.

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores y las condiciones utilizadas, así como los tamaños de amplicones buscados se representan en la Tabla 18 (Diancourt et al. 2005). Para la secuenciación de los genes, se emplearon los mismos cebadores que para la reacción de PCR excepto en el caso de *infB* y *pgi* (Tabla 19).

Tabla 18. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la determinación de la Secuencia Tipo.

Cebadores (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Tamaño del amplicón
<i>rpoB</i> F:Vic3: GGCGAAATGGCWGAGAACCA R: Vic2: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		1075 pb
<i>gapA</i> F:gapA173: TGAATATGACTCCACTCACGG R:gapA181: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		662 pb
<i>mdh</i> F:mdh130: CCAACTCGCTTCAGGTTTCAG R:mdh867: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	94°C 2 min 1 ciclo	756 pb
	94°C 20 s	
<i>pgi</i> F:pgi1F: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC R:pgi1R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	50°C ^a 30 s 35 ciclos	566 pb
	72°C 30 s	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>phoE</i> F:phoE604.1: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG R:phoE604.2: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		602 pb
<i>infB</i> F:infB1F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG R:infB1R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		462pb
<i>tonB</i> F:tonB1F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT R:tonB2R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		539 pb

^a La temperatura de annealing en todos los casos es de 50°C excepto en los genes *gapA* (60°C) y *tonB* (45°C).

Tabla 19. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de los genes *infB* y *pgi* para la determinación de la Secuencia Tipo.

Gen	Cebadores (secuencia 5'→ 3')
<i>infB</i>	F: infB2F: ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC
	R: infB1R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC
<i>pgi</i>	F: pgi2F: CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
	R: gi2R: TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados, analizados y comparados con la base de datos del Instituto Pasteur <http://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>. La combinación de los 7 alelos nos proporcionó la secuencia tipo que nos permite tipificar las diferentes cepas.

8.3. Análisis filogenético

El grupo filogenético de *Klebsiella pneumoniae* se puede determinar mediante el análisis de variaciones en la secuencia del gen cromosómico *gyrA*, codificante de la enzima DNA girasa. Concretamente, en función de las variaciones detectadas hasta el momento, se han establecido tres grupos filogenéticos: Kpl, Kpll y Kplll. Las variaciones que determinan dichos grupos son reconocidas por las enzimas de restricción *TaqI* y *HaeIII*, por lo que empleando la técnica de PCR-RFLP se obtiene un patrón de bandas específico para cada uno de los grupos filogenéticos señalados (Brisse et al. 2004).

Se realizó el estudio filogenético en las cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de portadores fecales.

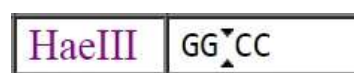
Procedimiento:

- Extracción del DNA.
- PCR. Se amplificará un fragmento de 411 pb del gen *gyrA* utilizando los reactivos especificados en la Tabla 20. Las condiciones de reacción fueron: 1) 94°C, 4 min, 1 ciclo; 2) 94°C, 1 min; 50°C, 30 s; 72°C, 30s; 35 ciclos; 3) 72°C, 5 min, 1 ciclo.

Tabla 20. Reactivos empleados en la amplificación del fragmento del gen *gyrA* para el estudio del grupo filogenético de *Klebsiella pneumoniae*

Componentes	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
Cebador: <i>gyrA</i> -F CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	25 µM	1 µL	0,5 µM
Cebador: <i>gyrA</i> -R ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	25 µM	1 µL	0,5 µM
Tampón de reacción ("NH ₄ buffer") (Bioline)	10X	5 µL	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 µL	1,5 mM
dNTPs	10 mM	1 µL	0,2 mM
BIOTAQ™ DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ µL	0,3 µL	1,5 U
DNA	-	10 µL	
Agua estéril	-	Hasta 50 µL	

- Digestión. Los productos de PCR obtenidos se digerirán con las enzimas *TaqI* y *HaeIII* cuyas secuencias de reconocimiento son las siguientes:



Los reactivos empleados se representan en las Tabla 21 y 22.

Tabla 21. Reactivos empleados por muestra en la digestión enzimática con *HaeIII*.

Reactivos	Cantidades (por muestra)
Buffer 10X	2 μ L
Producto PCR	7 μ L
Enzima	1 μ L
H ₂ O	10 μ L
Volumen final	20 μ L

Condiciones: Incubar a 37°C en estufa overnight (16 h)

Tabla 22. Reactivos empleados por muestra en la digestión enzimática con *TaqI*.

Reactivos	Cantidades (por muestra)
Buffer 10X	2 μ L
BSA	2 μ L
Producto PCR	7 μ L
Enzima	1 μ L
H ₂ O	8 μ L
Volumen final	20 μ L

Condiciones: Incubar a 65°C en un baño overnight (16 h)

- Electroforesis. Finalmente, se cargará el volumen total digerido en un gel de agarosa al 2% durante 1,5h a 86V y se analizarán los resultados obtenidos.

Resultados

1. Aislados clínicos

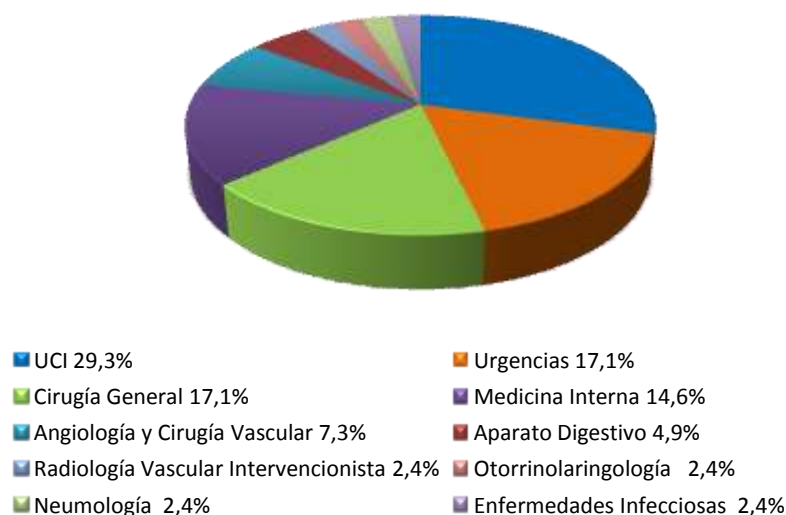
1.1. Datos clínicos y epidemiológicos

Durante el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de enero de 2012 y el 30 de septiembre de 2016 se estudiaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (HCULB) un total de 40.557 enterobacterias, de las cuales se aislaron un total de 51 cepas de 50 pacientes con sensibilidad disminuida a carbapenems, lo que representa el 0,13% de los aislados. Estas cepas fueron obtenidas a partir de las siguientes muestras clínicas: absceso (3), aspirado traqueal (1), broncoaspirado (5), bilis (2), catéter central (1), esputo (4), frotis vaginal (2), fístula (1), herida no quirúrgica (2), herida quirúrgica (5), lesión de piel (3), líquido peritoneal (3), orina (12), prótesis (1), sangre (6). Únicamente se estudió una cepa por paciente excepto en un paciente, en el que se recogieron dos aislados por presentar diferente fenotipo de resistencia.

Las cepas recogidas fueron: 23 *Enterobacter cloacae* (45,10%), 10 *Klebsiella aerogenes* (19,61%), 6 *Citrobacter freundii* (17,76%), 6 *Escherichia coli* (11,76%), 5 *Klebsiella pneumoniae* (9,80%) y 1 *Serratia marcescens* (1,96%).

De los 50 pacientes, 25 (50%) fueron hombres y 25 mujeres (50%) con una edad media de 68,5 años. Cuarenta y un pacientes estaban ingresados y los 9 restantes procedían de Atención Primaria. La mayor parte de los pacientes hospitalizados con aislamiento de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems (29,3%) estaban ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). El resto, estaban ingresados en los Servicios de Cirugía General (17,1%), Urgencias (17,1%), Medicina Interna (14,6%), Angiología y Cirugía Vascular (7,3%), Aparato Digestivo (4,9%), Enfermedades Infecciosas (2,4%), Neumología (2,4%), Otorrinolaringología (2,4%) y Radiología Vascular Intervencionista (2,4%) (Figura 11).

Figura 11. Distribución (%) por Servicios de los pacientes hospitalizados.



1.2. Estudio de la sensibilidad a antibióticos

Se obtuvieron 29 aislados resistentes a ertapenem (56,8%), 5 resistentes a ertapenem e imipenem (9,8%), 14 resistentes a ertapenem y sensibilidad intermedia a imipenem (27,5%), y 3 sensibles a ertapenem y sensibilidad intermedia a imipenem (5,9%). La resistencia global a ertapenem fue del 96,1% mientras que a imipenem fue del 9,8%. No se encontró ninguna cepa con sensibilidad a ambos carbapenems (ertapenem e imipenem).

Un total de 11 cepas presentaron fenotipo BLEE (21,6%), 5 fenotipo AmpC plasmídica (9,8%), 8 fenotipo MBL (15,7%) y 28 (54,9%) no presentaron ningún fenotipo de resistencia característico. De los aislados con fenotipo MBL, una cepa presentaba también fenotipo BLEE. No se encontró ninguna cepa con un fenotipo característico de carbapenemasa de clase A. Cuarenta y seis (90,2%) aislados mostraron un resultado positivo con el test de Hodge modificado realizado con ertapenem. Los fenotipos de los aislados y los porcentajes de resistencia a los antibióticos se presentan en la Tabla 24.

Tabla 23.- Características fenotípicas de los aislados con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de muestras clínicas.

Características de los aislados	Pacientes con fenotipo BLEE (n=10)	Pacientes con fenotipo pAmpC ^a (n=5)	Pacientes con fenotipo MBL (n=7)	Pacientes con fenotipo BLEE y MBL (n=1)	Pacientes sin fenotipo de resistencia característico (n=28)
Especie aislada:					
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (10%)	-	5 (71,43%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (10%)	-	2 (28,57%)	1 (100%)	6 (21,4%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (20%)	-	0 (0%)	0 (0%)	21 (75%)
<i>Serratia marcescens</i>	0 (0%)	-	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,6%)
<i>Escherichia coli</i>	1 (10%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 24. Distribución de la resistencia antibiótica en los aislados de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de muestras clínicas.

Antibiótico	Nº (%) de aislados resistentes con fenotipo BLEE (n=10)	Nº (%) de aislados resistentes con fenotipo pAmpC ^a (n=5)	Nº (%) de aislados resistentes con fenotipo MBL (n=7)	Nº (%) de aislados resistentes con fenotipo BLEE y MBL (n=1)	Nº (%) de aislados resistentes sin fenotipo de resistencia adicional (n=28)	Nº (%) de aislados totales resistentes (n=51)
Ampicilina	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	28 (100%)	51 (100%)
AMC	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	28 (100%)	51 (100%)
Cefalotina	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	28 (100%)	51 (100%)
Cefazolina	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	28 (100%)	51 (100%)
Cefuroxima	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	28 (100%)	51 (100%)
Cefoxitina	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	28 (100%)	51 (100%)
Cefotaxima	10 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	26 (92,9%)	49 (96,1%)
Ceftazidima	10 (100%)	5 (100%)	4 (57,1%)	1 (100%)	25 (89,3%)	45 (88,2%)
Cefepime	10 (100%)	3 (60%)	3 (42,9%)	1 (100%)	14 (50%)	31 (60,8%)
PTZ	9 (90%)	5 (100%)	6 (85,7%)	1 (100%)	19 (67,9%)	37 (72,5%)
Aztreonam	9 (90%)	5 (100%)	3 (42,9%)	1 (100%)	22 (78,6%)	40 (78,4%)
Imipenem	1 (10%)	1 (20%)	1 (14,3%)	1 (100%)	1 (3,6%)	5 (9,8%)
Ertapenem	9 (90%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	27 (96,4%)	49 (96,1%)
Gentamicina	4 (40%)	1 (20%)	5 (71,4%)	1 (100%)	0 (0%)	11 (21,6%)
Tobramicina	6 (60%)	1 (20%)	5 (71,4%)	1 (100%)	3 (10,7%)	16 (31,4%)
Amikacina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ác. Nalidíxico	5 (50%)	4 (80%)	5 (71,4%)	1 (100%)	3 (10,7%)	18 (35,3%)
Ciprofloxacino	5 (50%)	4 (80%)	4 (57,1%)	1 (100%)	3 (10,7%)	17 (33,3%)
Tigecilina	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7,1%)	4 (7,8%)
SXT	3 (30%)	3 (60%)	2 (28,6%)	1 (100%)	3 (10,7%)	12 (23,5%)
Colistina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

^a Estudiado en aislados sin AmpC cromosómica

AMC: amoxicilina/ác. clavulánico, PTZ: piperacilina/tazobactam, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol

1.3. Aislados productores de BLEE

Se estudió la presencia de BLEEs en todos los aislados seleccionados con sensibilidad disminuida a carbapenems. De las 45 cepas (88,2%) resistentes a ceftazidima y 49 (96,1%) resistentes a cefotaxima, 11 presentaron un fenotipo BLEE positivo, representando el 21,6% total de las cepas.

Se procedió a la caracterización molecular del tipo de BLEE mediante PCR. En primer lugar se analizó el gen *bla*_{CTX-M} mediante una PCR universal y en las que fue positiva se hicieron sucesivas PCR para identificar los diferentes grupos de CTX-M y se estudiaron sus entornos genéticos. También se analizaron mediante PCR y posterior secuenciación los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}.

Se encontraron 4 cepas con el gen *bla*_{CTX-M-15} (K39, K43, K56, K83), una de ellas asociado a *bla*_{TEM-1} y otra dos asociado a *bla*_{TEM-1b} y *bla*_{SHV-2a}; en 3 se identificó el gen *bla*_{CTX-M-9} (K26, K46, K50), en una de ellas asociada a *bla*_{TEM-1} y en otra asociada a *bla*_{VIM-1}; y en 1 cepa se halló el gen con *bla*_{CTX-M-14a} asociado a *bla*_{SHV-2a} (K25), y, por último, en 3 cepas se encontró *bla*_{SHV-2a} (K4, K9, K32) (Tabla 25).

1.3.1. Entornos genéticos de BLEEs tipo CTX-M

De las 11 cepas productoras de BLEEs, se seleccionaron los 8 aislados productores de CTX-M para estudiar los entornos genéticos de las β-lactamasas de tipo CTX-M mediante diferentes PCR y posterior secuenciación de sus productos amplificados, siguiendo lo anteriormente descrito (Lartigue et al. 2004; Saladin et al. 2002; Eckert et al. 2004).

El gen *bla*_{CTX-M-14a} presentó el entorno genético habitual formado por dos secuencias de inserción: *ISEcp1* delante del gen e *IS903* detrás del mismo. En el caso de *bla*_{CTX-M-9} hallamos en los tres casos delante del gen *ISCR1*, y, en dos casos, detrás se encontraba la secuencia de inserción *IS3000*. En la tercera cepa no se pudo saber qué se encontraba después de CTX-M-9 ya que todas las PCR realizadas fueron negativas. En estos tres casos, el gen *bla*_{CTX-M-9} se encontró asociado al integrón de clase 1 descrito, compuesto por *aadB* y *aadA1* (Figura 12B).

El entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} fue estudiado en las 4 cepas con este gen, encontrándose en una cepa el entorno descrito, con *ISEcp1* delante del gen y *orf477* detrás del mismo. En las otras 3 cepas, se encontró *orf477* detrás del gen pero no se pudo conocer la estructura aguas arriba ya que las PCR fueron negativas.

Resultados

A) Entorno genético de *bla*_{CTX-M-14a} (K25)



B) Entorno genético de *bla*_{CTX-M-9} (K46, K50)



C) Entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} (K39)



Figura 12. Estructura de los entornos genéticos de las BLEEs procedentes de aislados clínicos.

1.4. Aislados productores de pAmpC

Se estudió la presencia de cefamicinas plasmídicas en las especies bacterianas que no poseen este tipo de enzima en su cromosoma. El resultado fue positivo en 5 de ellos, todos *E. coli*. En estos casos, el gen detectado fue *bla*_{CMY-2} (Tabla 25).

Tabla 25. β-lactamasas detectadas en las cepas obtenidas de muestras clínicas.

Cepa	Especie bacteriana (nº)	β-lactamasas
K4, K9, K32	<i>E. cloacae</i> (1), <i>K. pneumoniae</i> (2)	SHV-2a
K25	<i>K. pneumoniae</i> (1)	SHV-2a + CTX-M-14a
K26	<i>C. freundii</i> (1)	CTX-M-9 + TEM-1
K50	<i>K. aerogenes</i> (1)	CTX-M-9
K46	<i>K. aerogenes</i> (1)	CTX-M-9 + VIM-1
K56	<i>E. cloacae</i> (1)	CTX-M-15
K83	<i>E. coli</i> (1)	CTX-M-15 + TEM-1
K39, K43	<i>K. pneumoniae</i> (2)	CTX-M-15 + TEM-1b + SHV-2a
K5, K24, K40, K42, K45	<i>E. coli</i> (5)	CMY-2 + TEM-1

1.5. Aislados productores de carbapenemasas

Se analizó la presencia de genes codificantes de carbapenemasas en todos los aislados recogidos durante el periodo de estudio (51) mediante una primera PCR múltiple para la detección de los genes codificantes de MBL (*bla_{SIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}* y *bla_{IMP}*), otra PCR múltiple para detección de carbapenemasas de clase A (*bla_{KPC}*, *bla_{SME}*, *bla_{IMI}* y *bla_{GES}*) así como otras PCR para la detección de los genes OXA-48 y NDM.

En la PCR múltiple para la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase B se obtuvieron un total de 8 aislados positivos (15,7%), que se confirmaron mediante una PCR simple del gen *bla_{VIM}* y posterior secuenciación. Todas las cepas con fenotipo MBL presentaron genotípicamente el gen *bla_{VIM}*. Estos aislados fueron 5 *C. freundii* y 3 *K. aerogenes*, pertenecientes a 7 pacientes ya que 2 de los *K. aerogenes* (cepas K1 y K13) pertenecían a un mismo paciente, pero presentaron diferente fenotipo de resistencia (Tabla 26). Tras el estudio de integrones, la variante del gen *bla_{VIM-2}* se confirmó en todos los aislados excepto en uno, en el cual la variante del gen fue *bla_{VIM-1}* (K46).

El resto de PCR resultaron en todos los casos negativas, por lo que se descartó la presencia de otros tipos de carbapenemasas en nuestros aislados.

1.5.1. Estudio de integrones

Se estudió la presencia de integrasas de clase 1, 2 y 3 en los aislados productores de carbapenemasa mediante amplificación de la integrasa y la región variable, y se procedió al análisis de la región variable mediante la técnica de mapeo por PCR. En todos ellos se detectaron integrones de clase 1. No se detectó ningún integrón de clase 2 o de clase 3. En estos integrones se detectaron dos variantes del gen VIM implicado en la resistencia a carbapenémicos: *bla_{VIM-1}* (1 cepa) y *bla_{VIM-2}* (7 cepas). A su vez, también se detectaron casetes génicos relacionados con la resistencia a aminoglucósidos (*aacA4'*, *aacA4'-30*, *aadA1*), trimetoprim (*dfrA27*, *dfrB1*) y rifampicina (*arr3*).

En el caso del aislado en el que se encontró el gen *bla_{VIM-1}*, éste se encontraba en un integrón de clase 1 que ya había sido descrito con anterioridad (In3103), y que posee la siguiente estructura: *bla_{VIM-1}* + *aacA4'* + *dfrB1* + *aadA1* (Figura 13).

Resultados

En tres aislados (K1, K13 y K53), el gen codificante de la metalo- β -lactamasa VIM-2 se encontró en un nuevo integrón de clase 1 que portaba a su vez otros cassettes génicos de resistencia. Entre estos genes de resistencia, se encontró una nueva variante de la acetiltransferasa *aacA4*, con las siguientes mutaciones: L102S y D164Y. Esta nueva variante fue incluida en la base de datos y denominada *aacA4'*-30.

La expresión de dichos genes estaba regulada por un promotor de tipo PcS. Este integrón contenía los cassettes génicos en la siguiente disposición: *aacA4'*+*bla*_{VIM-2}+*aacA4'*-30+*arr3*+*dfrA27* (Figura 13). Esta estructura no había sido descrita hasta la fecha por lo que fue asignado el número In1470 a través de la página de referencia <http://integrall.bio.ua.pt>.

En el resto de las cepas (K30, K51, K97 y K99), solo se pudo demostrar la estructura hasta el nivel de la nueva acetilasa, ya que el resto de PCR fueron negativas, de forma que la estructura sería la siguiente: *aacA4'*+*bla*_{VIM-2}+*aacA4'*-30/.

A) Estructura del integrón que posee el gen *bla*_{VIM-1} (K46)



B) Estructura del nuevo integrón encontrado, que posee el gen *bla*_{VIM-2} (K1, K13, K53)

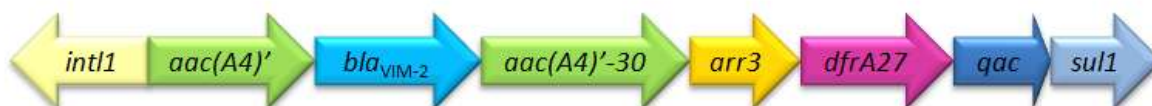


Figura 13.- Estructuras de los integrones de clase 1 que contienen los genes codificantes de carbapenemasas de clase B.

Además, en tres aislados (K1, K13 y K53) se encontraron integrones vacíos, en los cuales en su región variable no se encontraba ningún gen, y en un aislado un integrón con la estructura *aadB + aadA2* (K30) (Tabla 26).

1.5.2. Resistencia plasmídica a quinolonas

Se estudió la resistencia plasmídica a quinolonas en los aislados productores de carbapenemasas, mediante la detección de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*. Se obtuvo un resultado positivo para el gen *qnrA* en dos aislados, y en otros dos para el gen *qnrB*. Las variantes detectadas fueron *qnrA1* y *qnrB6*. Cabe destacar que de las dos cepas aisladas del mismo paciente, en una de ellas (K13) se detectó *qnrB6* pero no en la otra (K1). Si comparamos las CIM a quinolonas en estos dos aislados, en ambos casos las CIM al ácido nalidíxico es de 0,5 µg/ml, pero, en el caso de ciprofloxacino, en K1 la CIM es de 0,5 µg/ml mientras que en K13 es de 1 µg/ml.

En el caso de los genes *qnrB*, se determinó el entorno genético inmediato mediante PCR usando diferentes combinaciones de cebadores (Jacoby et al. 2011b). En ambos casos, el entorno encontrado fue *pspF+qnrB6+sdr* (Figura 14).



Figura 14.- Estructura del entorno genético de *qnrB* procedentes de aislados clínicos productores de carbapenemasa.

Resultados

Tabla 26.- Integrones, fenotipo de resistencia a otros antibióticos y genes encontrados en las enterobacterias productoras de carbapenemasa procedentes de muestras clínicas.

Aislado	Microorganismo	<i>Int1</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	Integrones	Fenotipo de resistencia (antibióticos no β-lactámicos)	MBL	Otros genes <i>bla</i>	Genes <i>qnr</i>
K1	<i>K. aerogenes</i>	<i>Int1</i>	+	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30+ <i>arr3</i> + <i>dfrA27</i> vacío	GM, TOB, SXT	<i>bla</i> _{VIM-2}		
K13	<i>K. aerogenes</i>	<i>Int1</i>	+	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30+ <i>arr3</i> + <i>dfrA27</i> vacío	SXT	<i>bla</i> _{VIM-2}		<i>qnrB6</i>
K46	<i>K. aerogenes</i>	<i>Int1</i>	+	<i>bla</i> _{VIM-1} + <i>aacA4'</i> + <i>dfrB1</i> + <i>aadA1</i>	GM, TOB, NAL, CIP, SXT	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>qnrA1</i>
K30	<i>C. freundii</i>	<i>Int1</i>	-	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/ <i>aadB</i> + <i>aadA2</i>	GM, TOB, NAL, CIP	<i>bla</i> _{VIM-2}		
K51	<i>C. freundii</i>	<i>Int1</i>	-	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/	GM, TOB, NAL, CIP	<i>bla</i> _{VIM-2}		<i>qnrA1</i>
K53	<i>C. freundii</i>	<i>Int1</i>	+	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30+ <i>arr3</i> + <i>dfrA27</i> vacío	NAL, CIP	<i>bla</i> _{VIM-2}		<i>qnrB6</i>
K97	<i>C. freundii</i>	<i>Int1</i>	-	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/	GM, TOB, NAL	<i>bla</i> _{VIM-2}		
K99	<i>C. freundii</i>	<i>Int1</i>	-	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/	GM, TOB, NAL, CIP	<i>bla</i> _{VIM-2}		

2. Aislados procedentes de portadores

2.1. Prevalencia de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems como colonizadores intestinales en pacientes ingresados en la UCI.

Desde el 1 de abril de 2015 hasta el 30 de septiembre de 2016, en la Sección de Epidemiología del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, se seleccionaron las cepas de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de pacientes colonizados, que se encontraban ingresados en el Servicio de Medicina Intensiva del mismo hospital. Estas muestras fueron recogidas dentro del Programa Resistencia Zero.

Durante estos 18 meses se recibieron un total de 1324 muestras procedentes de 598 pacientes, de las cuales se seleccionaron 38 enterobacterias, una por paciente, con sensibilidad disminuida a carbapenems, lo que supone un 6,35% de los pacientes ingresados en la UCI e incluidos en el programa de vigilancia. Veintinueve de los 38 pacientes eran hombres (76,3%), con edades comprendidas entre 17 y 82 años (edad media 64,96 años); y 9 mujeres (23,7%), con edades entre 45 y 79 años (edad media 65,78 años).

Los aislados obtenidos fueron los siguientes: 30 *K. pneumoniae*, 5 *C. freundii*, 1 *E. coli*, 1 *K. aerogenes*, 1 *E. kobei*.

2.2. Test fenotípicos y estudio de la sensibilidad a antibióticos

En primer lugar, se realizaron test fenotípicos para el estudio de la producción de β -lactamasas de tipo BLEE, AmpC y carbapenemasas. El 78,95% de los aislados presentaron un fenotipo BLEE, el 10,53% fenotipo MBL, 5,26% fenotipo pAmpC y el 5,26% presentaron fenotipos BLEE y MBL.

Los porcentajes de resistencia antibiótica (Tabla 27) se han obtenido mediante microdilución en caldo, excepto para colistina, en la que la CIM se determinó mediante E-test (Biomérieux®).

Resultados

Todos los aislados fueron resistentes a ampicilina, cefalosporinas de 1º y 2º generación, incluida cefoxitina, cefotaxima y ertapenem. El 28,95% mostraron sensibilidad disminuida a imipenem. Algunos aislados presentaron resistencia a: amoxicilina-ác. clavulánico (97,37%), piperacilina-tazobactam (89,47%), ceftazidima (97,37%), cefepime (86,84%), aztreonam (86,84%), imipenem (7,89%), gentamicina (65,79%), tobramicina (92,11%), amikacina (7,89%), ác. nalidíxico (92,11%), ciprofloxacino (92,11%), tigeciclina (21,05%), trimetoprim-sulfametoxazol (86,84%) y colistina (26,31%). En la Tabla 27 se muestran por separado los resultados obtenidos en *K. pneumoniae* (30 aislados) y en el resto de enterobacterias (8 aislados).

Tabla 27. Resistencia a los antibióticos de los aislados con sensibilidad disminuida a carbapenems obtenidos de portadores fecales.

Antibiótico	Nº (%) de <i>K. pneumoniae</i> resistentes (n=30)	Nº (%) de otras enterobacterias resistentes (n=8)
Ampicilina	30 (100%)	8 (100%)
Amoxicilina / Ác. clavulánico	29 (97%)	8 (100%)
Cefalotina	30 (100%)	8 (100%)
Cefazolina	30 (100%)	8 (100%)
Cefuroxima	30 (100%)	8 (100%)
Cefoxitina	30 (100%)	8 (100%)
Cefotaxima	30 (100%)	8 (100%)
Ceftazidima	30 (100%)	7 (88%)
Cefepime	30 (100%)	4 (50%)
Piperacilina / Tazobactam	27 (90%)	7 (88%)
Aztreonam	28 (93%)	5 (63%)
Imipenem	3 (10%)	0 (0%)
Ertapenem	30 (100%)	8 (100%)
Gentamicina	20 (67%)	5 (63%)
Tobramicina	29 (97%)	6 (75%)
Amikacina	2 (7%)	1 (13%)
Ác. Nalidíxico	28 (93%)	7 (88%)
Ciprofloxacino	29 (97%)	6 (75%)
Tigeciclina	7 (23%)	1 (13%)
Trimetoprim / Sulfametoxazol	27 (90%)	6 (75%)
Colistina	10 (33,33%)	0 (0%)

2.3. Aislados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes como colonizador intestinal

2.3.1. Datos clínicos y epidemiológicos

Durante el periodo de estudio, en el Servicio de Microbiología se obtuvieron un total de 30 cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes (5,02% de los pacientes ingresados en UCI durante ese periodo de estudio), con un fenotipo compatible con una producción de BLEE asociada a otros mecanismos de resistencia, debido a su perfil de resistencia a antibióticos β -lactámicos como ampicilina, cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª y 4ª generación así como de cefamicinas (cefotixina). Además, todas las cepas recogidas fueron resistentes a ertapenem. El 10% de los aislados fueron resistentes a imipenem. El 93,33% (28) de los aislados presentaron fenotipo BLEE, el 6,67% (2) fenotipo pAmpC, y el 3,33% (1) fenotipo MBL, presentando este último además fenotipo BLEE.

En el curso de la evolución clínica de los pacientes portadores de estos aislados, observamos que en 10 de ellos se produjeron infecciones clínicas por aislados de *K. pneumoniae* con el mismo fenotipo identificado en una o varias muestras clínicas: hemocultivos (3), bilis (2), orina (2), broncoaspirado (1), lavado broncoalveolar (1), exudado perianal (1), lesión de piel (1), herida quirúrgica (1), líquido peritoneal (1), catéter central (1) y esputo (1) (Tabla 28).

Tabla 28.- Relación de pacientes colonizados por *K. pneumoniae* multirresistente en los que se aisló la misma cepa en muestra clínica.

Muestra clínica	Nº pacientes
Sin infecciones clínicas	20
Con infección clínica documentada	10
Hemocultivo	3
Lesión de piel	1
Orina	1
Exudado perianal	1
Lavado broncoalveolar	1
Bilis, Broncoaspirado	1
Líquido peritoneal, herida quirúrgica	1
Bilis, orina, esputo, catéter central	1

Resultados

Ningún paciente ingresó en UCI colonizado por una de estas cepas. En la mayoría de los pacientes la colonización por estas cepas se produjo de forma precoz en la primera (17 pacientes) o segunda semana (11 pacientes) desde su ingreso en UCI. Solo en dos pacientes la colonización se produjo en la tercera semana de su estancia en UCI.

Se estudiaron las colonizaciones por otros gérmenes multirresistentes, y se observó que 12 pacientes (40%) se colonizaron durante su estancia: 9 por *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasa de clase B, 2 por *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SARM) y un paciente fue colonizado tanto por *P. aeruginosa* productora de carbapenemasa de clase B como por SARM. En la mayoría de los casos (7 pacientes), la colonización se produjo primero por la cepa de *K. pneumoniae* multirresistente, dos de ellos a la vez (uno por SARM y *K. pneumoniae* y el otro por *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*), y los tres restantes se colonizaron primero por SARM (2 pacientes) o *P. aeruginosa* (1 paciente) (Tabla 29).

Tabla 29.- Colonización por microorganismos multirresistentes (*K. pneumoniae* multirresistente, *P. aeruginosa* productora de carbapenemasa de clase B y SARM).

Nº pacientes	Primera colonización por MDR	Otras colonizaciones por MDR
7	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	<i>K. pneumoniae</i> y SARM	-
1	<i>K. pneumoniae</i> y <i>P. aeruginosa</i>	-
1	SARM	<i>K. pneumoniae</i>
1	SARM	<i>K. pneumoniae</i> y <i>P. aeruginosa</i>
1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>

En cuanto a las enfermedades de base o comorbilidades de los 30 pacientes, un 70% (21/30) tenía alguna enfermedad cardiovascular (arritmia cardiaca por fibrilación auricular, hipertensión arterial, cardiopatía isquémica y/o valvulopatía aórtica) y el 40% (12/30) habían sufrido una intervención quirúrgica abdominal en los últimos quince días debido a pancreatitis aguda, peritonitis secundaria por perforación, hemorragia digestiva y/o abscesos intraabdominales (Tabla 30).

Los antibióticos más empleados en los 30 días previos al aislamiento de *K. pneumoniae* multirresistente fueron los β -lactámicos, seguidos de quinolonas. Ningún paciente había sido tratado previamente con un antibiótico de la familia de los aminoglucósidos. Todos los pacientes habían sido tratados con un β -lactámico y el 80% de ellos (24/30) había recibido tratamiento con algún carbapenem.

Tabla 30. Características clínicas de los pacientes con aislamiento de *K. pneumoniae* multirresistente

Características de los pacientes	Nº pacientes (n=30)	Colonización 1ª semana (n=17)	Colonización 2ª semana (n=11)	Colonización 3ª semana (n=2)
Género:				
Número de hombres (%)	22 (73,34%)	13 (76,47%)	8 (72,73%)	1 (50%)
Número de mujeres (%)	8 (26,66%)	4 (23,53%)	3 (27,27%)	1 (50%)
Edad (años) (rango de edades)	64 (17-82)	63 (17-82)	65 (45-77)	66 (59-73)
Comorbilidades:				
Enfermedad cardiovascular	21	11	9	1
Enfermedad respiratoria	8	3	4	1
Cirugía abdominal reciente	12	8	4	0
Inmunodepresión	6	4	2	0
Diabetes mellitus	5	4	1	0
Trasplantados	5	3	2	0
Insuficiencia Hepática	6	3	2	0
Insuficiencia Renal	4	2	2	0
Otras colonizaciones por MDR:				
<i>P. aeruginosa</i> carbapenemasa B	9	7	2	0
SARM	2	0	2	0
<i>P. aeruginosa</i> carbapenemasa B y SARM	1	0	1	0
Terapia antimicrobiana (30 días previos):				
B-lactámicos	30	17	11	2
Carbapenems	24	15	7	2
Quinolonas	6	2	3	1
Tigeciclina	5	4	1	0
Fosfomicina	2	2	0	0
Colistina	2	2	0	0
Aminoglucósidos	0	0	0	0

2.3.2. Caracterización de β -lactamasas

Se estudió la presencia de β -lactamasas mediante PCR en 22 aislados de *K. pneumoniae* de portadores fecales: 19 con fenotipo BLEE, 2 con fenotipo pAmpC y 1 con fenotipo MBL y BLEE. El criterio de selección fue por patrón de PFGE: se seleccionó un aislado de cada perfil de PFGE obtenido. El resultado de la caracterización de las β -lactamasas se presenta en la Tabla 31.

Se encontraron un total de 11 cepas productoras de CTX-M-15, las cuales además eran productoras también de otras β -lactamasas: SHV-76, TEM-1 y SHV-2a. La cepa con fenotipo MBL se caracterizó como productora de VIM-2 y de SHV-2a. El resto de las cepas con fenotipo BLEE eran productoras de SHV-2a, excepto una, que era productora de SHV-11 y no se encontró ninguna β -lactamasa de espectro extendido. En las dos cepas con fenotipo pAmpC se encontró el gen *bla*_{SHV-11}, pero solo en una se encontró un gen productor de AmpC (*bla*_{DHA-1}). La otra cepa con fenotipo pAmpC resultó ser también productora de TEM-40, que está clasificada como una β -lactamasa resistente a los inhibidores (IRT), lo que explicaría el fenotipo que presentaba este aislado. En un aislado se detectó también una nueva β -lactamasa de tipo SHV que se caracteriza por presentar una nueva mutación con cambio aminoacídico en la posición 237 de alanina por glicina, además de las mutaciones ya descritas G238S y L35Q. Esta nueva variante no pudo ser incluida en la base de datos de β -lactamasas del GenBank.

Tabla 31. Caracterización de las β -lactamasas de *K. pneumoniae* de portadores fecales

β -lactamasas	Nº aislados
CTX-M-15 + SHV-76 + TEM-1	8
CTX-M-15 + SHV-2a + TEM-1	2
CTX-M-15 + SHV-2a	1
SHV-2a	4
SHV-2a + VIM-2	1
SHV-2a + SHV-1	2
SHV-11	1
SHV-11 + DHA-1	1
SHV-11 + TEM-40	1
SHV-1 + SHV-new	1
TOTAL	22

Se estudiaron los entornos genéticos en las cepas productoras de CTX-M-15, encontrando en 10 de las cepas el mismo entorno inmediato: *ISEcp1* + *bla*_{CTX-M-15} + *orf477*. En la cepa restante (K94) se encontró la misma estructura aguas abajo del gen *bla*_{CTX-M-15}, sin embargo, encontramos la secuencia de inserción *ISEcp1* interrumpida por la secuencia de inserción IS26.

A) K57, K60, K73, K75, K79, K80, K84, K85, K95, K96



B) K94



Figura 15.- Estructura de los entornos genéticos de los genes de las β -lactamasas CTX-M-15 procedentes de aislados de *K. pneumoniae* de portadores fecales

2.3.3. Estudio de la porina OmpK

Se estudiaron la presencia de los genes codificantes de las proteínas OmpK 35, 36 y 37 de *K. pneumoniae* y las alteraciones genéticas de éstas mediante PCR, secuenciación y comparación con secuencias de referencia (GenBank accession no. AJ011501, Z33506 y AJ011502, respectivamente) en 22 aislados, seleccionados por patrón de PFGE.

El gen *OmpK35* amplificó en todas los aislados excepto en tres. Cinco de los que amplificaron el gen, presentaron una mutación en la posición 68 que codificaba un codón de finalización prematuro y, como resultado, una proteína de menor tamaño. El resto de los aislados presentaban la estructura salvaje de la proteína OmpK35.

En el caso del gen *OmpK36*, 3 aislados no presentaban el gen y 9 presentaron un codón de finalización prematuro, en diferentes localizaciones. Los 10 aislados restantes presentaron numerosas mutaciones así como inserciones. Todos estos cambios sugieren la pérdida de la función de la porina OmpK36 y, por tanto, la posible disminución de sensibilidad a carbapenems, en particular a ertapenem.

Resultados

En cuanto a *OmpK37*, el gen solo se amplificó en 6 aislados, los cuales presentaron una gran variedad de cambios aminoacídicos así como la presencia de secuencias de inserción truncando la secuencia del gen.

En total, se presentaron 17 patrones diferentes de OmpK35, 36 y 37 (Tabla 32). No se encontró ningún patrón con una estructura conservada de las tres porinas, lo que sugiere que en todos los aislados haya una pérdida de la función de la permeabilidad a carbapenems, lo que se traduce en una disminución de su sensibilidad. Además, en muchos casos estas modificaciones van acompañadas de un resultado negativo de la PCR para alguna de las porinas, por lo que la resistencia a carbapenems sería compatible con la pérdida de ésta. Además, en todos los aislados, se encontraron diferentes β -lactamasas que, junto a la pérdida de la función de las diferentes porinas, explica la disminución de la sensibilidad, no solo a ertapenem, sino en muchos casos también a imipenem (Tabla 33).

Tabla 32. Patrones de OmpK encontrados en las cepas de *K. pneumoniae* de portadores fecales.

PATRON OmpK	Porinas		
	OmpK35	OmpK36	OmpK37
1	salvaje	Neg	Neg
2	salvaje	Q76STOP	Neg
3	Q68STOP	Neg	Neg
4	Q68STOP	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304R Inserciones: P en V228 y E en L303	Neg
5	Neg	T240STOP	Neg
6	Q68STOP	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304R Inserciones: P en V228 y E en L303	Mutaciones: I70M, I128M, N230A, M233Q, T234H, Q235F, N237S, R239T, N274S, D275T, V277I Inserciones: DNNF detrás de S237 y SSTNGG detrás de T275
7	Q68STOP	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304R Inserciones: P en V228 y E en L303	Mutaciones: I70M, I128M, N230A, M233Q, T234H, Q235F, N237S, R239T, N274S, D275T, V277I Inserciones: DNNF detrás de S237 y SSTNGG detrás de T275
8	Neg	D157STOP	Neg

9	salvaje	Q172STOP	Mutaciones: I70M, I128M, N230G, M233Q, T234H, Q235Y, N237H, R239K, E244D, N274S, D275T, V277I Inserciones: TERY detrás de H237 y SSTNGG detrás de T275
10	salvaje	Q309STOP Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, N272D, A280V, D302N, N304Q, G305N Inserciones: P en V228 y NNFTGV en Q304	Mutaciones: I70M, I128M, N230G, M233Q, T234H, Q235Y, N237H, R239K, E244D, N274S, D275T, V277I Inserciones: TERY detrás de H237 y SSTNGG detrás de T275
11	salvaje	Neg	Mutaciones: I70M, I128M, N230G, M233Q, T234H, Q235Y, N237H, R239K, E244D, N274S, D275T, V277I Inserciones: TERY detrás de H237 y SSTNGG detrás de T275
12	salvaje	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, N272D, A280V, D302N, N304Q, G305N Inserciones: P en V228 y NNFTGV en Q304	Mutaciones: I70M, I128M, N230G, M233Q, T234H, Q235Y, N237H, R239K, E244D, N274S, D275T, V277I Inserciones: TERY detrás de H237 y SSTNGG detrás de T275
13	salvaje	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, N272D, A280V, D302N, N304Q, G305N Inserciones: P en V228 y NNFTGV en Q304	Neg
14	salvaje	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304R, Q309E Inserciones: P en V228 y E en L303	Neg
15	salvaje	Q170STOP	Neg
16	salvaje	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304R Inserciones: P en V228 y E en L303	Neg
17	Neg	Mutaciones: D49S, L59V, A190W, L191S, V202L, F207W, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229A, E232R, H235N, N272D, A280V, D302N, N304Q, G305N Inserciones: P en V228 y NNFTGV en Q304	Neg

Tabla 33. Características de los diferentes patrones de OmpK de las cepas de *K. pneumoniae* de portadores fecales.

Patrón OmpK	Patrón PFGE	Nº aislados	Sensibilidad		MBL	β-lactamasas
			ERT	IMI		
1	P1	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-76, TEM-1
2	P1a	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-76, TEM-1
	P1b, P1g	2		I		
3	P1c	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-76, TEM-1
4	P1d	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-76, TEM-1
	P1f	1		I		
5	P1e	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-76, TEM-1
6	P1h	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-2a, TEM-1
7	P1i	1	R	S	No	CTX-M-15, SHV-2a
8	P2	1	R	S	No	SHV-2a
9	P2a	1	R	S	No	SHV-2a
10	P2b	1	R	S	No	SHV-2a
11	P2c	1	R	R	No	CTX-M-15, SHV-2a, TEM-1
12	P2d	1	R	R	Si	SHV-2a, VIM-2
13	P3	1	R	S	No	SHV-1, SHV-2a
	P3a	1				SHV-1, SHVnew
14	P4	1	R	S	No	SHV-1, SHV-2a
15	P5	1	R	R	No	SHV-11, DHA-1
16	P6	1	R	S	No	SHV-11
	P7	1				SHV-11, TEM-40
17	P8	1	R	S	No	SHV-2a

2.3.4. Estudio de integrones

Se estudió la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3 en los 30 aislados de *K. pneumoniae*, detectándose integrones de clase 1 en todos ellos. No se detectó ningún integrón de clase 2 o de clase 3. En estos integrones, se detectó un único gen implicado en la resistencia a carbapenémicos, (*bla*_{VIM-2}), y casetes génicos relacionados con la resistencia a aminoglucósidos (*aadA1*, *aadA2*, *aadA16* y *aacA4*), sulfamidas (*sul3*), trimetoprim (*dfrA27*) y β-lactámicos (*bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-224}).

Se han detectado 9 estructuras diferentes de regiones variables, entre el gen codificante de la integrasa de tipo 1 y la región 3' conservada. Dichas estructuras están representadas en la Figura 16. En la Tabla 34 se presentan las estructuras génicas de estos integrones asociadas con las secuencias tipo (ST) detectadas. Se han encontrado 2 cepas que portaban dos integrones simultáneamente y 4 presentaron tres integrones diferentes.

La única cepa productora de MBL contenía el gen *bla*_{VIM-2} dentro de estos integrones, en combinación con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos. Es importante destacar que la estructura de este integrón es similar a la estructura de los integrones de cepas clínicas que contienen el gen *bla*_{VIM-2}. Esta cepa, además de este integrón, presentaba dos integrones más, de los cuales uno era un integrón vacío con ausencia de genes cassettes en su estructura.

En cuanto a las cepas no productoras de carbapenemasas, se seleccionó una por perfil de PFGE para estudiar las estructuras de los integrones, analizándose un total de 21 aislados. No se pudo llegar a conocer la estructura de las regiones variables de 9 aislados por no amplificar en ninguna de las PCR realizadas, y correspondieron a las secuencias tipo ST405 y ST1145.

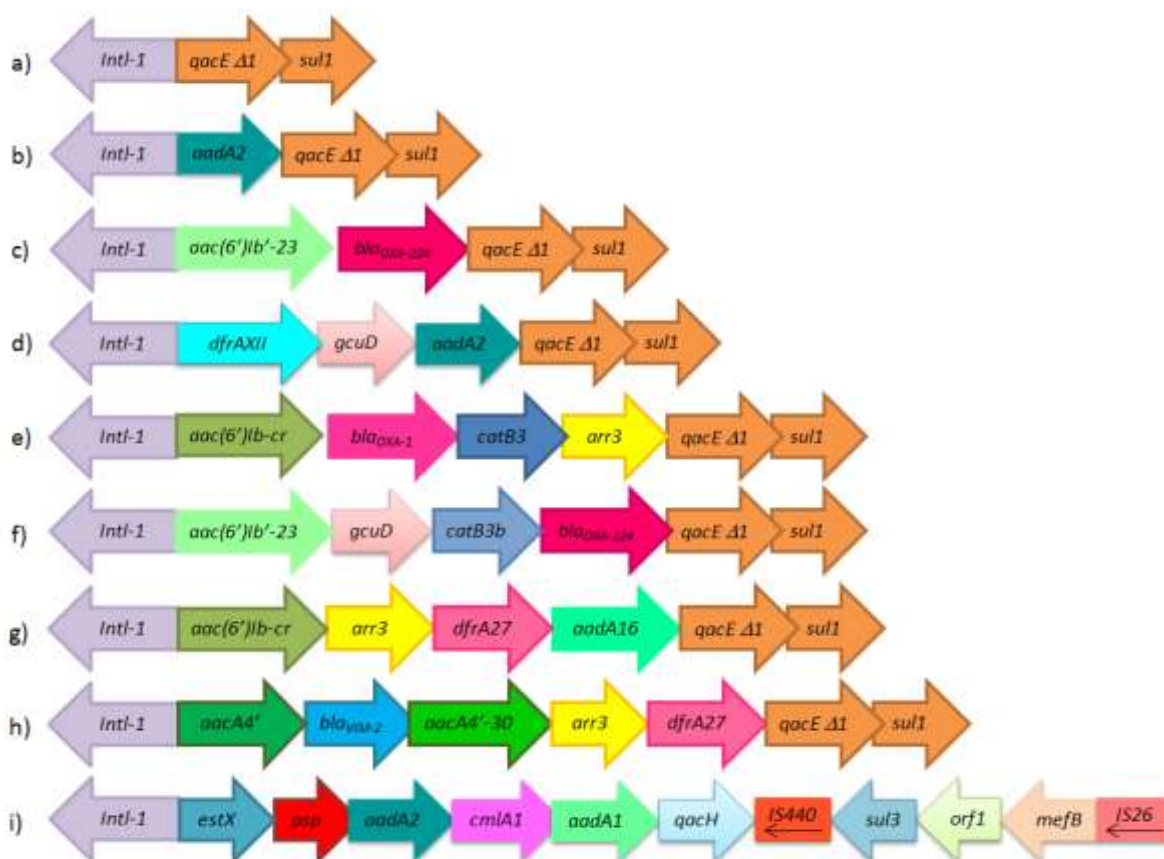


Figura 16.- Estructuras de los integrones de clase 1 detectados en las cepas de *K. pneumoniae* de portadores fecales

Tabla 34. Análisis de integrones de clase 1 y sus correspondientes genes cassettes en las cepas de *K. pneumoniae* asociados a sus Secuencias Tipo.

Cepas con integrones (Nº cepas)	MLST	Estructura genética de las regiones variables de los integrones de clase 1
K58, K93 (2)	ST340	<i>estX+psp+aadA2+cmLA+ aadA1+qacH+IS440+sul3+orf1+mefB+IS26</i>
K100 (1)	ST340	<i>estX+psp+aadA2+cmLA+ aadA1+qacH+IS440+sul3+orf1+mefB+IS26</i> <i>aacA4'+ bla_{VIM-2}+ aacA4'-30 + arr3 + dfrA27</i> <i>vacío</i>
K87 (1)	ST340	<i>estX+psp+aadA2+cmLA+ aadA1+qacH+IS440+sul3+orf1+mefB+IS26</i> <i>aac(6')Ib-cr + bla_{OXA-1} + catB3 + arr3</i>
K94 (1)	ST340	<i>aac(6')Ib'-23 + gcuD + catB3b + bla_{OXA-224}</i>
K77 (1)	ST340	<i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i>
K70 (1)	ST2349	<i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i>
K81 (1)	ST3035	<i>aac(6')Ib-cr + arr3 + dfrA27 + aadA16</i> <i>vacío</i>
K65, K82 (2)	ST15	<i>aac(6')Ib-cr + arr3 + dfrA27 + aadA16</i> <i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i> <i>vacío</i>
K71 (1)	ST11	<i>dfrAXII + gcuD + aadA2</i> <i>aac(6')Ib-cr + bla_{OXA-1} + catB3 + arr3</i> <i>aadA2</i>
K57, K60, K72, K75, K79, K80, K84, K85, K95, K96 (10)	ST405	Desconocido ^a
K76 (1)	ST1145	Desconocido ^a

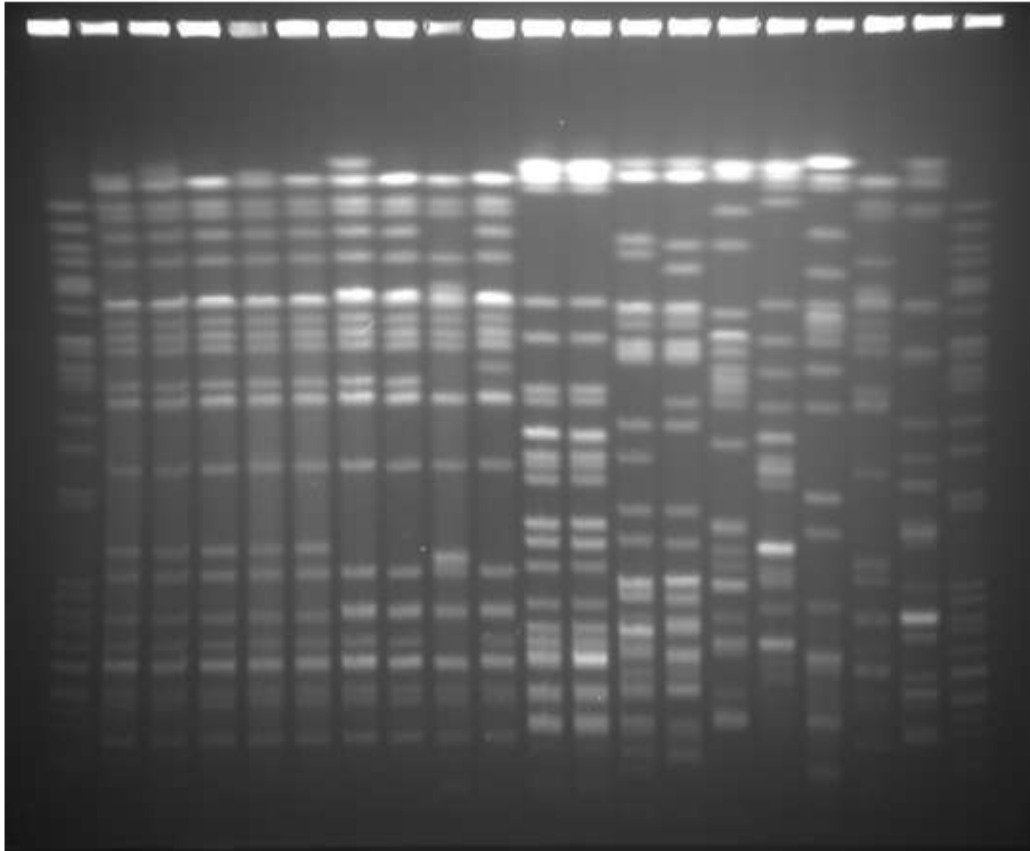
^a Cepas con ausencia de la región 3'-CS en las que no se pudo determinar la composición de genes cassettes

2.3.5. Tipificación molecular

Se realizó **PFGE** a los 30 aislados de *K. pneumoniae* procedentes de portadores fecales obteniendo un total de 8 patrones distintos, en los que podemos diferenciar 22 perfiles. Dentro de estos 8 patrones, se encontraron varias cepas que presentaron únicamente 2 o 3 bandas diferentes en sus patrones de PFGE, por tanto, podemos decir que son clones:

- P1 (K57, K60, K61, K62, K63, K64, K72, K73, K75, K79, K80, K85, K85, K91, K95 y K96). El patrón P1 recoge 16 cepas, de las cuales algunas son indistinguibles entre sí (5 cepas P1, 2 P1a y 2 P1e). Además, todas ellas pertenecían al ST405.
- P2 (K58, K78, K86, K87, K93, K94 y K100). Tres de ellas presentaron perfiles indistinguibles. Todas ellas pertenecían al ST340.
- P3 (K65 y K82). Ambas cepas pertenecían al ST15.

M K60 K61 K62 K63 K64 K57 K73 K72 K75 K58 K78 K65 K82 K70 K71 K76 K79 K81 M
P1 P1 P1 P1 P1 P1a P1a P1c P1b P2 P2 P3a P3 P4 P5 P6 P1d P7



(17a)

Resultados

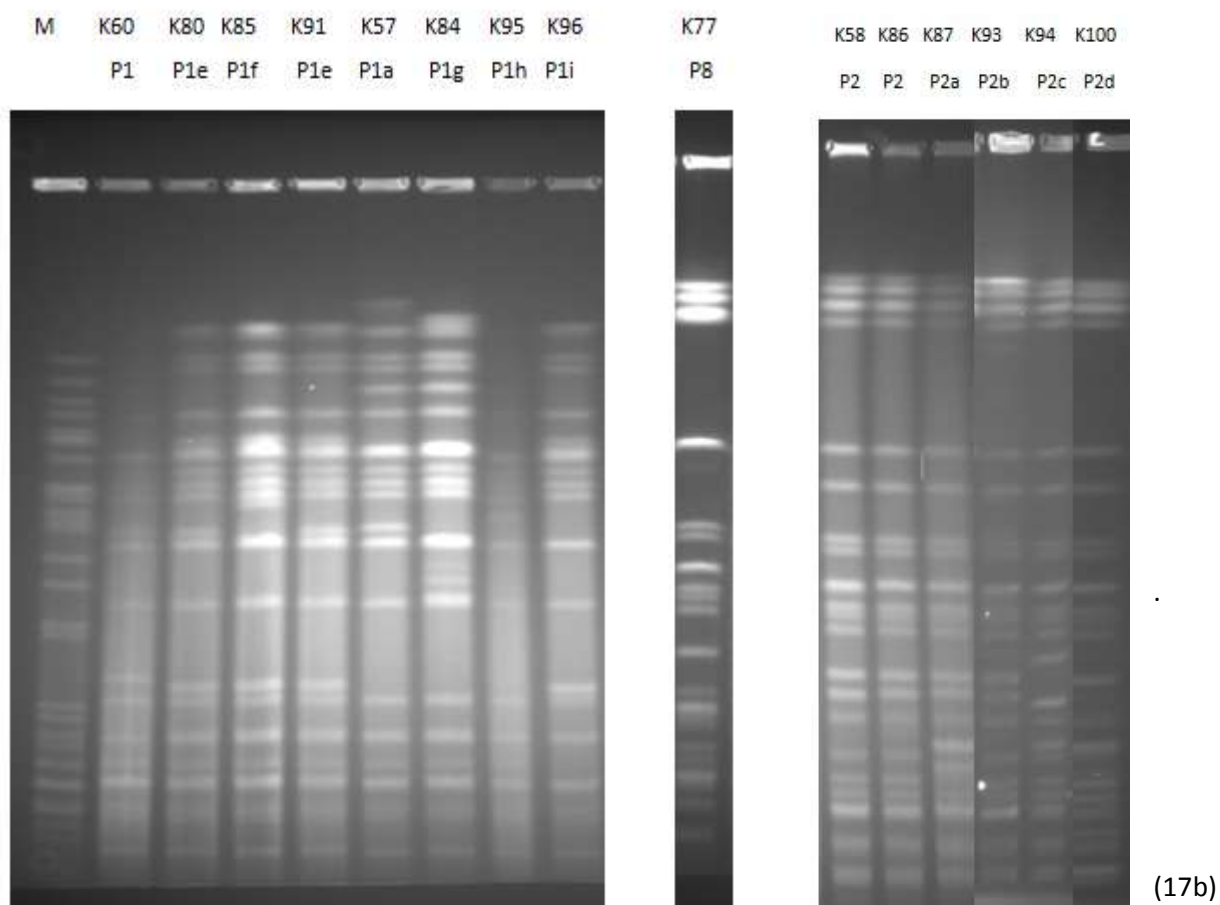


Figura 17a y 17b .- Patrones de PFGE de los aislados de *K. pneumoniae* multirresistente

Se determinó la **Secuencia Tipo (ST)** a los aislados, escogidos uno por patrón de PFGE, encontrando 7 secuencias tipo diferentes: ST405, ST340, ST15, ST11, ST1145, ST2349 y ST3035. Éste último ST fue un patrón nuevo que encontramos en la cepa K81 y que fue incluido en la base de datos de MLST del Instituto Pasteur como ST3035 (*gapA2*, *infB1*, *mdh108*, *pgi3*, *phoE4*, *rpoB161*, *tonB421*).

El MLST mayoritario fue el ST405, detectándose en 16 aislados (53,3%), seguido del ST340 en 8 aislados (26,7%) y ST15 en dos aislados (6,7%). El resto de perfiles se encontraron en una cepa. Todas las cepas productoras de CTX-M-15 pertenecieron al ST405 excepto una (ST340).

Se estudió la relación temporal de las estancias de los pacientes ingresados en los que se aislaron las cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes Figura 18.- Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* multirresistente (Figura 18) y se analizaron en función del patrón MLST de cada cepa. El gráfico muestra una continuidad temporal de las estancias de los pacientes en los que se aislaron las cepas de *K. pneumoniae* multirresistente, especialmente en el caso del ST405 en el que podemos diferenciar dos periodos de propagación: el primero, que va desde marzo de 2015 hasta junio de 2015, y el segundo, desde septiembre de 2015 hasta julio de 2016.

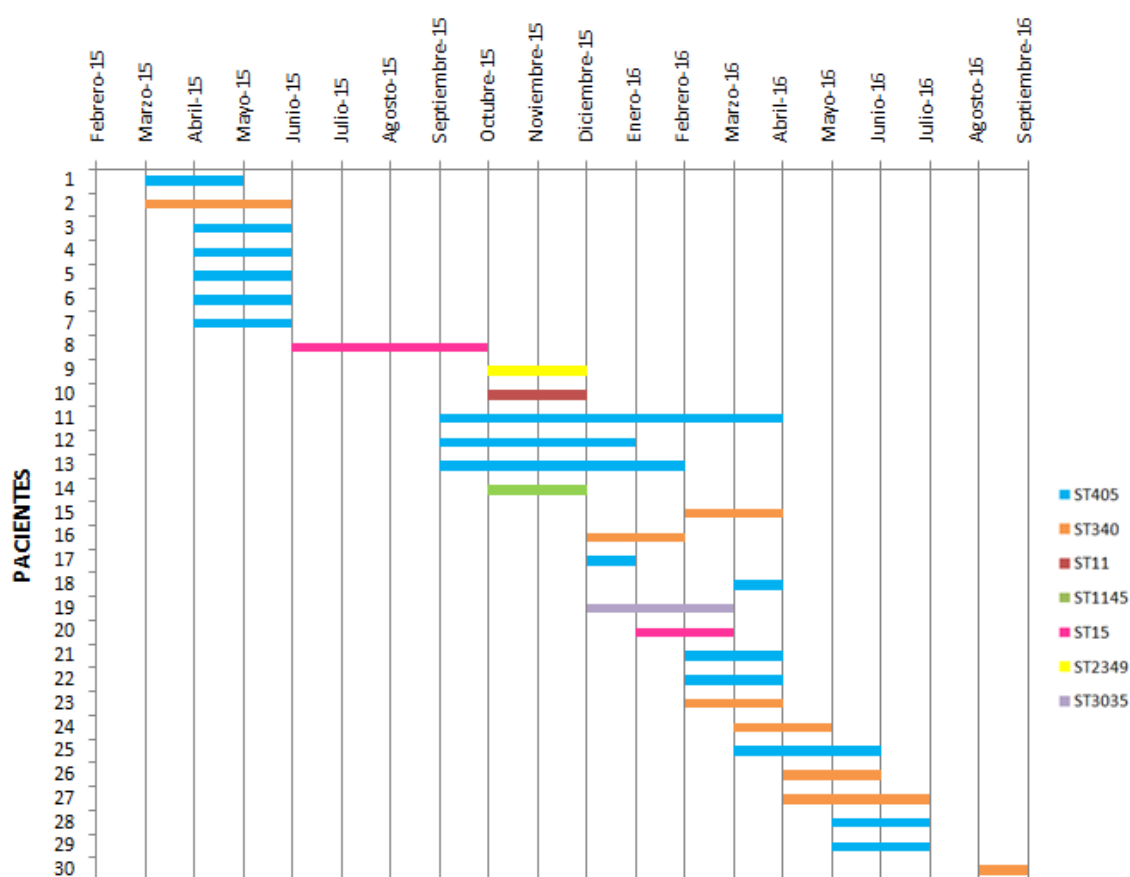


Figura 18.- Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* multirresistente

Resultados

Si analizamos más detenidamente el ST405, en función de la continuidad temporal de las estancias de los pacientes en su ingreso en la UCI, podríamos diferenciar dos periodos: el primero, que va desde marzo de 2015 hasta junio de 2015, y el segundo, desde septiembre de 2015 hasta julio de 2016. En ese primer periodo, encontramos 5 cepas con un patrón de PFGE indistinguible (P1) y una con una variación en una banda (P1a). Esos 5 aislados indistinguibles coincidieron durante las estancias en la UCI de los pacientes colonizados, desde abril hasta junio de 2015.

En el segundo periodo (10 aislados), algunas cepas presentan variaciones de hasta 3 bandas, diferenciando los perfiles P1a hasta P1i, y encontramos solo dos cepas indistinguibles (P1e) cuyos ingresos en la UCI coincidieron durante marzo de 2016.

En el caso del ST340, se puede observar una continuidad temporal desde diciembre de 2015 hasta julio de 2016. Todos los aislados pertenecieron al clon P2, excepto uno (K77, paciente 15) que pertenecía al patrón P8. Este patrón se diferencia de P2 en 5 bandas, de forma que, siguiendo los criterios de Tenover, podemos considerar que estos dos clones están posiblemente relacionados.

La única cepa productora de MBL tipo VIM perteneció al ST340, que apareció en agosto de 2016, por lo que hay un salto de un mes desde el anterior aislado perteneciente al mismo ST.

Se analizaron los **grupos filogenéticos** en las 30 cepas de *K. pneumoniae*. En todas ellas se detectó el grupo filogenético Kpl excepto en una (K76), que no presentó ningún perfil de bandas compatible con ninguno de los grupos filogenéticos descritos al ser cortada con la enzima de restricción *TaqI* (Tabla 35). Por tanto, esta cepa no pudo ser clasificada en ningún grupo filogenético. Se estudió más en profundidad este aislado. Para ello, se recurrió a la secuenciación del fragmento *gyrA* de 431pb amplificado y se observó que presentaba una mutación a nivel nucleotídico (T240A), que no se traducía en una mutación aminoacídica, pero que generaba un nuevo sitio de reconocimiento de la enzima *TaqI* (Figura 20), justificando el perfil obtenido por PCR-RFLP.

Figura 19. Patrón de bandas obtenido en la técnica de PCR-RFLP para el estudio de los grupos filogenéticos en *K. pneumoniae*

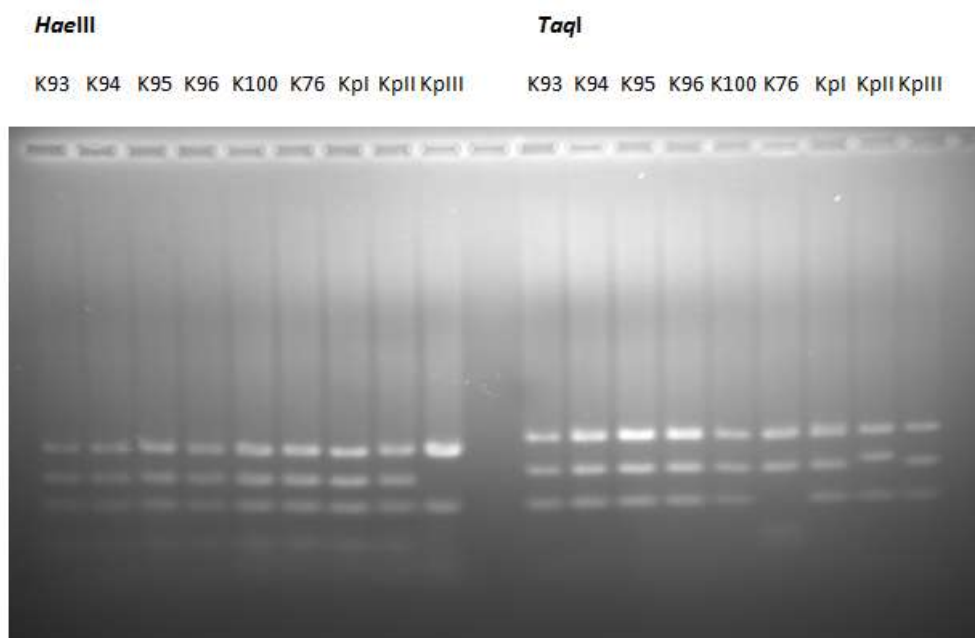


Figura 20. Cortes de la enzima de restricción *TaqI* en el grupo filogenético Kpl (a) y en la cepa K76 (b).

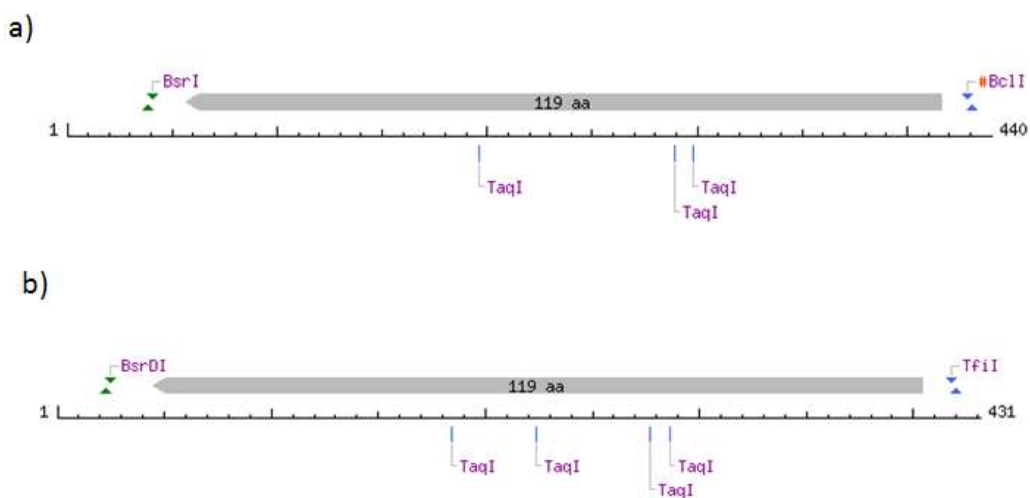


Tabla 35. Análisis filogenético de los aislados de *K. pneumoniae* y su relación con los patrones de PFGE.

K	PFGE	TaqI	HaeIII	Filogenia
57	P1a	B	C	Kpl
58	P2	B	C	Kpl
60	P1	B	C	Kpl
61	P1	B	C	Kpl
62	P1	B	C	Kpl
63	P1	B	C	Kpl
64	P1	B	C	Kpl
65	P3a	B	C	Kpl
70	P4	B	C	Kpl
71	P5	B	C	Kpl
72	P1c	B	C	Kpl
73	P1a	B	C	Kpl
75	P1b	B	C	Kpl
76	P6	-	C	-
77	P8	B	C	Kpl

K	PFGE	TaqI	HaeIII	Filogenia
78	P2	B	C	Kpl
79	P1d	B	C	Kpl
80	P1e	B	C	Kpl
81	P7	B	C	Kpl
82	P3b	B	C	Kpl
84	P1g	B	C	Kpl
85	P1f	B	C	Kpl
86	P2	B	C	Kpl
87	P2a	B	C	Kpl
91	P1e	B	C	Kpl
93	P2b	B	C	Kpl
94	P2c	B	C	Kpl
95	P1h	B	C	Kpl
96	P1i	B	C	Kpl
100	P2d	B	C	Kpl

2.3.6. Resistencia plasmídica a quinolonas

Se analizaron los genes de resistencia plasmídica a quinolonas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* en los aislados de *K. pneumoniae*. Se obtuvo un resultado positivo para *qnrB* en 15 aislados y para *qnrS* en 2. No se obtuvo ningún resultado positivo para *qnrA*, *qnrC* y *qnrD*.

Se analizaron las variantes de los genes *qnr* mediante secuenciación. En el caso de *qnrS* solo se detectó una variante, y en ambos casos fue *qnrS1*. En las cepas *qnrB* positivas se encontraron tres variantes diferentes: *qnrB1* (10 aislados), *qnrB4* (2 aislados) y *qnrB6* (3 aislados). En el caso de los genes *qnrB*, se determinó el entorno genético mediante PCR usando diferentes combinaciones de cebadores, encontrándose en todos ellos la estructura *pspF+qnrB+sdr* (Figura 21).

**Figura 21.-** Estructura del entorno genético de *qnrB* procedentes de aislados de *K. pneumoniae*

Tabla 36.- Relación de MLST, patrón de PFGE, integrones y genes de resistencia encontrados en las cepas de *K. pneumoniae* de portadores fecales.

MLST	PFGE	Aislados	Genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos	Genes <i>qnr</i>	Integrones
ST405	P1	K57, K60, K72, K75, K79, K80, K84, K85	CTX-M-15, SHV-76, TEM-1	<i>qnrB1</i>	Desconocido
		K95	CTX-M-15, SHV-2a, TEM-1	<i>qnrB1</i>	Desconocido
		K96	CTX-M-15, SHV-2a	<i>qnrB1</i>	Desconocido
ST340	P2	K58, K93	SHV-2a		<i>estX+psp+aadA2+cmLA+ aadA1 +qacH+IS440+sul3+orf1+mefB+IS26</i>
		K87	SHV-2a	<i>qnrB6</i>	<i>estX+psp+aadA2+cmLA+ aadA1 +qacH+IS440+sul3+orf1+mefB+IS26</i> <i>aac(6')Ib-cr + blaOXA-1 + catB3 + arr3</i>
		K94	CTX-M-15, SHV-2a, TEM-1	<i>qnrB4</i>	<i>aac(6')Ib'-23+ gcuD + catB3b + bla_{OXA-224}</i>
		K100	VIM-2, SHV-2a	<i>qnrB6</i>	<i>estX+psp+aadA2+cmLA+ aadA1 +qacH+IS440+sul3+orf1+mefB+IS26</i> <i>aacA4'+ blaVIM-2 + aacA4'-30 + arr3 + dfrA27</i> vacío
		K77	SHV-2a		<i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i>
ST15	P3	K65	SHV-1, SHV-new		<i>aac(6')Ib-cr + arr3 + dfrA27 + aadA16</i> <i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i> vacío
		K82	SHV-1, SHV-2a		<i>aac(6')Ib-cr + arr3 + dfrA27 + aadA16</i> <i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i> vacío
		K71	SHV-11, DHA-1	<i>qnrB4</i>	<i>dfrAXII + gcuD + aadA2</i> <i>aac(6')Ib-cr + bla_{OXA-1} + catB3 + arr3</i> <i>aadA2</i>
ST1145	P6	K76	SHV-11		Desconocido
ST2349	P4	K70	SHV-1, SHV-2a		<i>aac(6')Ib'-23 + bla_{OXA-224}</i>
ST3035	P7	K81	SHV-11, TEM-40	<i>qnrB6</i>	<i>aac(6')Ib-cr + arr3 + dfrA27 + aadA16</i> vacío

2.4. Otras enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems como colonizadores intestinales

Durante el periodo de estudio se aislaron en el Servicio de Microbiología 8 enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de pacientes portadores ingresados en la UCI. Estas enterobacterias fueron 5 *C. freundii*, 1 *E. coli*, 1 *K. aerogenes* y 1 *E. kobei*. Todos los aislados fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina-ác. clavulánico, cefalosporinas de 1º y 2º generación (incluida cefoxitina), cefotaxima y ertapenem.

Todos los *C. freundii* presentaron fenotipo MBL y, además, dos de ellos también presentaron fenotipo BLEE. EL resto de aislados solo presentaron fenotipo BLEE.

2.4.1. Caracterización de β -lactamasas

Se estudió la presencia de β -lactamasas mediante PCR en todos los aislados. Las carbapenemasas de los aislados con fenotipo MBL fue caracterizada en todos ellos como *bla*_{VIM-2}. En el caso de las β -lactamasas de espectro extendido, se encontraron tres cepas productoras de *bla*_{CTX-M-15}, una productora de *bla*_{CTX-M-9} y una productora de *bla*_{SHV-12} (Tabla 37).

Se analizaron los entornos genéticos inmediatos de las BLEE tipo CTX-M. En el caso de CTX-M-15, un aislado presentó la secuencia *ISEcp1* interrumpida por IS26 delante del gen, y la secuencia *orf477* detrás del mismo; los otros dos aislados presentaba esta misma secuencia aguas abajo pero no se pudo llegar a saber lo que se encontraba delante del gen ya que no llegó a amplificar ninguna PCR probada.

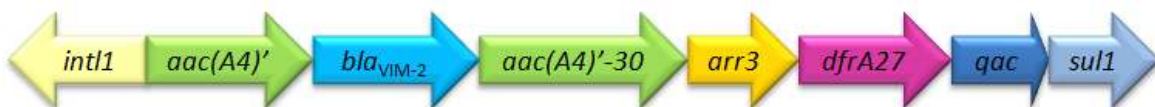
En cuanto a la cepa con *bla*_{CTX-M-9}, presentó dicho gen dentro de la estructura del integrón de clase 1 In60, el cual contiene además los cassettes génicos *dfrA16* y *aadA2* y la secuencia de inserción *ISCR1*. Sin embargo, este integrón se encontraba de forma parcial ya que aguas abajo del gen *bla*_{CTX-M-9} no se encontró la estructura descrita.

2.4.2. Integrones

Se analizó la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3, de manera que 7 aislados presentaron integrones de clase 1. La cepa restante (K74) no presentó integrones de ninguna clase.

Las cepas productoras de carbapenemasa tipo VIM presentaron este gen dentro de la estructura de integrón de clase 1 In1470 descrito en esta tesis: dos de ellas presentaron el integrón completo ($aacA4'+bla_{VIM-2}+aacA4'-30+arr3+dfrA27$), mientras que las tres restantes presentaron el integrón de forma parcial ($aacA4'+bla_{VIM-2}+aacA4'-30/$) (Tabla 37). Las dos cepas que presentaron el integrón completo (K67, K89) portaban a su vez un integrón vacío ausente de casetes génicos y, una de las cepas con integrón parcial (K66), presentó el integrón de clase 1 $dfrA1+aadA1$ (Figura 22).

A) Estructura del integrón que contiene el gen el gen bla_{VIM-2}



B) Estructura del integrón de K66



Figura 22.- Estructuras de los integrones de clase 1 que contienen los aislados de otras enterobacterias de portadores fecales.

Tabla 37.- Caracterización de β -lactamasas y de integrones de clase 1 encontrados en aislados de otras enterobacterias de portadores fecales.

Cepas	Microorganismo	β -lactamasas	Integrones de clase 1
K67	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30+ <i>arr3</i> + <i>dfrA27</i> vacío
K89	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30+ <i>arr3</i> + <i>dfrA27</i> vacío
K66	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/ <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i>
K90	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/ <i>dfrA16</i> - <i>aadA2</i> - <i>qacEΔ1</i> + <i>sul1</i> - <i>ISCR1</i> - <i>bla</i> _{CTX-M-9}
K59	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4'</i> + <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aacA4'</i> -30/
K69	<i>K. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{OXA-224}	<i>aacA4'</i> -23+ <i>bla</i> _{OXA-224}
K74	<i>E. kobei</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	No
K92	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	Desconocido ^a

^a Cepa con ausencia de la región 3'-CS en las que no se pudo determinar la composición de genes cassettes

3. Aislados productores de carbapenemasas

3.1. Datos clínicos y epidemiológicos de las cepas productoras de carbapenemasas

Durante el periodo de estudio se aislaron un total de 14 enterobacterias productoras de carbapenemasa (14/89; 15,7%). De estas cepas, ocho (8/51; 15,7%) procedían de muestras clínicas: 3 *K. aerogenes* y 5 *C. freundii*; y seis (6/38; 15,8%) de portadores fecales: 5 *C. freundii* y 1 *K. pneumoniae*.

De los aislados de *K. aerogenes*, dos pertenecían al mismo paciente y eran productores de VIM-2. El aislado restante era productor de VIM-1. Es importante destacar que el paciente del que se aisló la cepa productora de VIM-1 no se encontraba ingresado en el hospital, si no que se aisló en una muestra recogida en atención primaria.

La primera enterobacteria productora de VIM-2 recogida en nuestro entorno se trata de una cepa de *K. aerogenes* aislada de un paciente ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos de nuestro hospital en el año 2012. El siguiente paciente en el que se encontró una enterobacteria productora de carbapenemasa ingresó en UCI 10 meses después del primer paciente, por tanto, no hubo relación temporal entre ellos. Este segundo aislado fue una cepa de *C. freundii*. Posteriormente, se encontraron sucesivos aislados de *C. freundii* productor de carbapenemasa, que fueron caracterizados como VIM-2. El primer aislado de *C. freundii* se recogió en diciembre de 2012 y no se encontró otro aislado hasta enero de 2014.

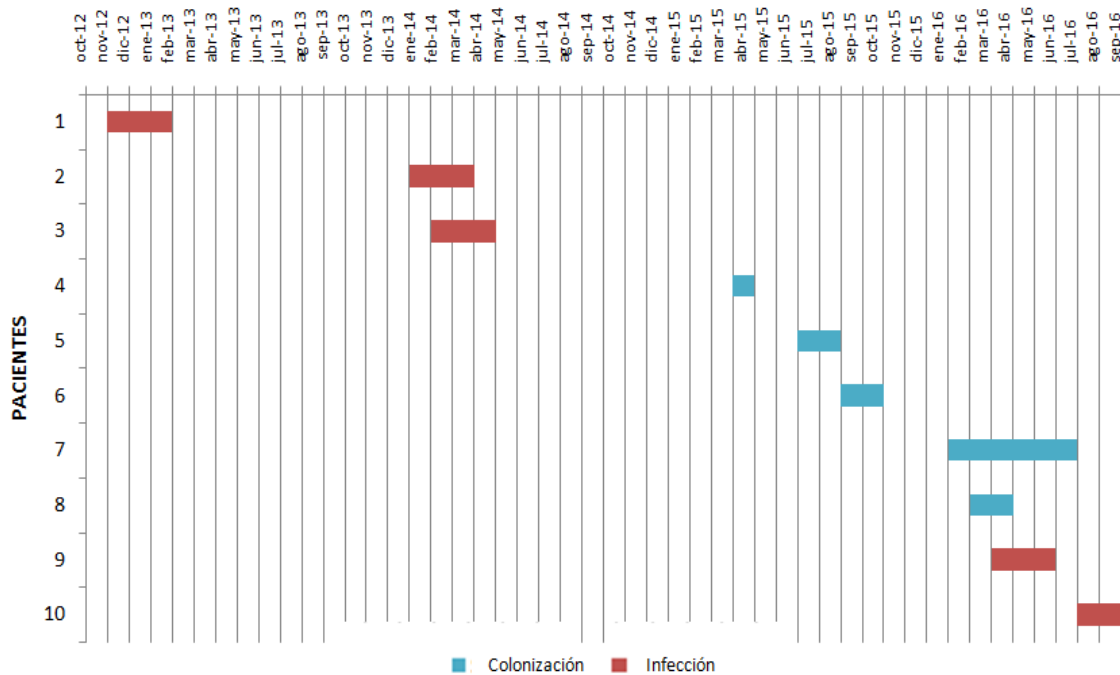
Se analizó la relación temporal de los aislados de *C. freundii* productor de carbapenemasa procedentes tanto de muestras clínicas como de muestras de colonización. Todos los pacientes se encontraban ingresados en la UCI en el momento del aislado de la cepa. Se observan diferentes periodos en los que hay coincidencia en el tiempo de ingreso en la UCI entre los pacientes: año 2014, 2015 (dos pacientes) y 2016 (Figura 23). En el año 2015 comenzó el estudio de los portadores fecales, por lo que no tenemos datos de años anteriores. Sin embargo, en ese año, solo se encontraron cepas procedentes de muestras de colonización, ninguna de muestra clínica.

Hay saltos de tiempo entre los aislados de *C. freundii* productor de MBL. Sin embargo, como se verá más adelante, todos ellos presentaron el mismo perfil de PFGE. Además, 5 de los aislados presentaron el mismo integrón, en el que está localizado el gen *bla*_{VIM-2}, que ha sido descrito por primera vez en este estudio. En los 5 restantes se describió el principio de ese

Resultados

mismo integrón pero no se pudo demostrar la presencia del integrón completo. Todos los pacientes se encontraban ingresados en la UCI en el momento de recogida de la muestra de la que se obtuvo la cepa.

Figura 23.- Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes con *C. freundii* productor de carbapenemasa.



3.2. Estudio de la sensibilidad a otros antibióticos

Si analizamos la sensibilidad a antibióticos en las cepas productoras de carbapenemasa en conjunto, observamos altos niveles de resistencia en los antibióticos β -lactámicos, como era de esperar, así como a gentamicina, tobramicina y quinolonas. No se encontró ninguna cepa resistente a tigeciclina ni colistina. Es importante destacar que, en el caso de *C. freundii* la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos es mayor que en el resto de aislados, principalmente en el caso de los carbapenems, siendo la única especie donde encontramos aislados sensibles a ertapenem (dos cepas, a su vez sensibles a imipenem) (Tabla 38).

Tabla 38.- Resistencia a los antibióticos de los aislados productores de carbapenemasa

Antibiótico	Nº (%) de aislados totales resistentes (n=14)	Nº (%) de <i>K. aerogenes</i> resistentes (n=3)	Nº (%) de <i>C. freundii</i> resistentes (n=10)	Nº (%) de <i>K. pneumoniae</i> resistentes (n=1)
Ampicilina	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Amoxicilina / Ác. clavulánico	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Cefalotina	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Cefazolina	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Cefuroxima	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Cefoxitina	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Cefotaxima	14 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)
Ceftazidima	10 (71,4%)	3 (100%)	6 (60%)	1 (100%)
Cefepime	6 (42,9%)	3 (100%)	2 (20%)	1 (100%)
Piperacilina / Tazobactam	13 (92,9%)	3 (100%)	9 (90%)	1 (100%)
Aztreonam	7 (50%)	3 (100%)	3 (30%)	1 (100%)
Imipenem	6 (42,9%)	1 (33,33%)	4 (40%)	1 (100%)
Ertapenem	12 (85,7%)	3 (100%)	8 (80%)	1 (100%)
Gentamicina	12 (85,7%)	2 (66,7%)	9 (90%)	1 (100%)
Tobramicina	12 (85,7%)	2 (66,7%)	9 (90%)	1 (100%)
Amikacina	1 (7,1%)	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)
Ác. Nalidíxico	11 (78,6%)	1 (33,33%)	9 (90%)	1 (100%)
Ciprofloxacino	10 (71,4%)	1 (33,33%)	8 (80%)	1 (100%)
Tigecilina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Trimetoprim / Sulfametoxazol	8 (57,1%)	3 (100%)	4 (40%)	1 (100%)
Colistina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

3.3. Tipificación molecular

Se estudiaron los diferentes perfiles de PFGE de las cepas productoras de carbapenemasa encontradas, tanto procedentes de muestras clínicas como de portadores fecales. Se analizaron en conjunto y en función de la especie microbiana, comparando sus patrones. De esta forma, se analizaron por un lado los patrones obtenidos de los aislados de *K. aerogenes* y por otro de *C. freundii*. Al obtenerse solo una cepa de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, su perfil no se comparó con ningún otro aislado productor de carbapenemasa.

En el caso de *K. aerogenes*, se obtuvieron dos patrones diferentes: por un lado, K1 y K13 presentaron perfiles idénticos (son cepas procedentes del mismo paciente), y por otro

Resultados

lado K46, que difiere en más de 7 bandas, por lo que son completamente diferentes. Además, las dos primeras cepas eran productoras de VIM-2 mientras que la tercera era productora de VIM-1.

En cuanto a los 10 aislados de *C. freundii*, observamos que en todos ellos se obtiene el mismo patrón de PFGE, con el mismo número de bandas iguales, por lo que son indistinguibles y, por tanto, clones, a pesar de la diferencia de tiempo entre el hallazgo de estas cepas. Estos datos sugieren la persistencia de una cepa epidémica que pudo mantenerse en algún reservorio animado o inanimado de la UCI en los periodos en los que no se documentó su presencia en pacientes ingresados.

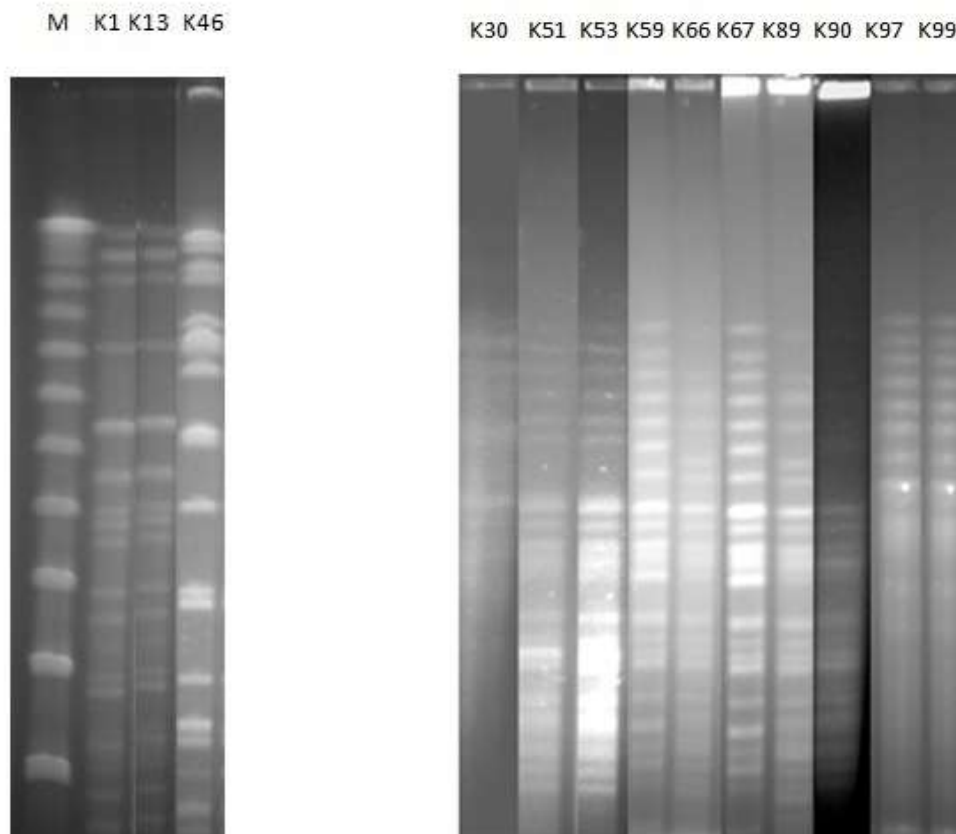


Figura 24.- Patrones de PFGE de los aislados de las enterobacterias productoras de carbapeneamasa. A la izquierda, los aislados de *E. aerogenes* y a la derecha los de *C. freundii*.

Discusión

1. Aislados clínicos

Las bacterias con resistencia a múltiples antibióticos pertenecen con frecuencia al orden de los *Enterobacterales* (Gupta et al. 2011) y constituyen una amenaza emergente para la salud pública en todo el mundo (Albiger et al. 2015). La prevalencia de enterobacterias que presentan resistencia a carbapenems ha aumentado en Europa en los últimos años. En esta tesis se estudiaron las enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems procedentes de aislados clínicos de pacientes asistidos en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Durante el periodo de estudio, se recogieron un total de 51 cepas procedentes de 50 pacientes, lo que supone una prevalencia de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems del 0,13%.

No existen muchos estudios publicados en los que se describa la prevalencia global de enterobacterias resistentes a carbapenems. En un reciente estudio multicéntrico realizado en China se observaron tasas de resistencia a carbapenems que oscilaban en *E. coli* de 0,6 a 3,6% y en *K. pneumoniae* de 1,2 a 18,9% en diferentes zonas geográficas (Zhang et al. 2017). En Europa, la red de vigilancia EARS del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) estudia la evolución de la resistencia a carbapenems solo en aislados de infecciones invasivas y en dos especies de enterobacterias: *K. pneumoniae* y *E. coli*. En *K. pneumoniae* el porcentaje medio de resistencia a carbapenems en pacientes europeos fue del 7,2% mientras que en *E. coli* la resistencia a carbapenems es inferior, mostrando una tendencia decreciente, pequeña pero significativa, con valores porcentuales del 0,1% en 2014, 0.2% en 2015, 0.1% en 2016 y 0.1% en 2017 (<http://ecdc.europa.eu/>).

En el estudio SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) realizado en España durante 2011 a 2015, cuyos resultados han sido recientemente publicados, se describen unas tasas de no sensibilidad a carbapenems en enterobacterias entre el 0 y 7,7% para ertapenem y del 0% a 40,3% para imipenem. Además, en ese estudio se analizó específicamente la actividad de ertapenem, mostrando que, en *K. pneumoniae*, la sensibilidad a ertapenem variaba en los aislados productores de BLEE, manteniendo un rango de sensibilidad de 75% a 86.4% en cepas no productores de BLEE y de 59.6% a 72.5% en productores de BLEE; sin embargo en *E. coli* no se observaron variaciones (Cantón et al. 2018). En nuestra experiencia, la sensibilidad a ertapenem no experimenta variaciones en los aislados productores de BLEE, de modo que el porcentaje de resistencia fue del 7,1% en los no productores de BLEE y del 10% en los productores. Sin duda, en estos resultados influye que

Discusión

en nuestro estudio los aislados fueron seleccionados por su sensibilidad disminuida a carbapenems.

En cuanto a los estudios de caracterización genotípica, en los aislados con fenotipo BLEE la β -lactamasa más frecuentemente encontrada fue CTX-M. La mitad de las cepas que la presentaban, pertenecía al grupo CTX-M-9 (*bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14a}). Las cepas con *bla*_{CTX-M-9} presentaron dicho gen en un integrón compuesto, con *aadB-aadA1* en su región variable. En la literatura, es frecuente encontrar el gen *bla*_{CTX-M-9} dentro del integrón compuesto In60, con *dfrA16-aadA2* dentro de su región variable (Sabate & Prats 2002; Vinue et al. 2008), que también ha sido descrito en *E. cloacae* en la plataforma genética *int1-aadB-qac Δ 1-sul1-ISCR1-bla*_{CTX-M-9}-*orf3-like-IS3000* (Zhao & Hu 2013). Sin embargo, no hemos encontrado referencias en las que se describa CTX-M-9 asociada a *aadB-aadA1*. La variante *bla*_{CTX-M-14a} es la variante de CTX-M-14 más frecuentemente detectada en otros estudios y, además, el entorno encontrado en nuestro aislado flanqueado por las secuencias de inserción *ISEcp1* e *IS903* ha sido descrito previamente en otros estudios (Eckert et al. 2006; Jouini et al. 2007). La otra mitad de las cepas con CTX-M presentaron *bla*_{CTX-M-15} cuyo entorno mostraba la secuencia *orf477* detrás del gen y, delante del mismo, la secuencia *ISEcp1* solo se pudo confirmar en un aislado.

Todos los aislados productores de β -lactamasas AmpC fueron *E. coli* y albergaban el gen *bla*_{CMY-2}. Se cree que *bla*_{CMY-2} tiene como origen el cromosoma de *Citrobacter* y que, gracias a elementos móviles, ha sido capaz de distribuirse en otras especies (Jacoby 2009). Esta variante ha sido descrita ampliamente en la literatura y en la actualidad es la β -lactamasa plasmídica de tipo AmpC más frecuentemente descrita en *E. coli* (Sidjabat et al. 2014). En un estudio multicéntrico llevado a cabo en nuestro país se observó que más del 85% de los aislados de *E. coli* productores de AmpC eran productores de la β -lactamasa CMY-2 (Miro et al. 2013). Anteriormente, en un estudio realizado en nuestro medio, se observó que más del 90% de los aislados productores de AmpC presentaban CMY-2 siendo, en su mayor parte, *E. coli* (Gude et al. 2013).

El 15,7% (8 cepas) de los aislados con sensibilidad disminuida a carbapenems obtenidos de aislados clínicos presentaron fenotipo MBL, asociado con la presencia del gen *bla*_{VIM}. En muchos estudios se confirma que la producción de carbapenemasas es el principal mecanismo que causa resistencia a carbapenems en enterobacterias. Sin embargo, en nuestro medio, el porcentaje de carbapenemasas encontradas en las enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems fue bajo. El grupo europeo de vigilancia de enterobacterias

productoras de carbapenemasa (European survey of carbapenemase-producing enterobacteriaceae, EuSCAPE) realizó un estudio multicéntrico en el que se estudió la producción de carbapenemasas en aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli*. Durante el periodo de estudio se recogieron un total de 1203 *K. pneumoniae* y 194 *E. coli* no sensibles a carbapenems, siendo los porcentajes de aislados productores de carbapenemasas de 70,7% y 39,7%, respectivamente (Grundmann et al. 2017). Además, señalan que los aislados no sensibles a carbapenems en los que no se detectó producción de carbapenemasa (29,3% *K. pneumoniae* y 60,3% *E. coli*) podrían expresar mecanismos alternativos como la disminución de permeabilidad. Los porcentajes de carbapenemasas obtenidos en este estudio entre los aislados no sensibles a carbapenems son superiores a los encontrados en nuestro estudio. También es destacable que Grundmann y colaboradores estudiaron solo cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* mientras que en nuestro estudio, que ha vigilado todas las enterobacterias, no se obtuvo ningún aislado productor de carbapenemasa de estas especies.

Los genes codificantes de las metalo- β -lactamasas tipo VIM se encontraron en integrones de clase 1, como han descrito otros autores anteriormente (Matsumura et al. 2017; van Duin & Doi 2017). Todos los aislados presentaron la variante VIM-2 excepto uno, que contenía una copia del gen *bla*_{VIM-1}. Estos integrones contenían una única copia del gen *bla*_{VIM} en combinación con genes que confieren resistencia a otros antibióticos, resultados que han sido descritos previamente (Matsumura et al. 2017). Dentro del grupo de las carbapenemasas tipo VIM, la variante VIM-2 es la más prevalente a nivel mundial, habiéndose descrito principalmente en *P. aeruginosa* (Paul et al. 2016) y, en menor medida, en enterobacterias (Walsh et al. 2005).

La cepa productora de VIM-1 presentó dicho gen dentro de la estructura del integrón In3103, que fue descrito por primera vez en España en 2015 en una cepa de *K. oxytoca* (Papagiannitsis et al. 2015). Sin embargo, en el resto de aislados que eran portadores del gen *bla*_{VIM-2}, éste se encontraba dentro de un integrón de clase 1 cuya estructura no había sido descrita con anterioridad. Encontramos una cepa co-productora de BLEE (CTX-M-9) y carbapenemasa VIM-1. En un estudio llevado a cabo por Oteo et al. en España, detectaron enterobacterias productoras de carbapenemasas y BLEE en el 70,4% de los aislados, siendo más frecuente la producción de ambas β -lactamasas en las cepas productoras de OXA-48 (J Oteo et al. 2015).

Existe una fuerte correlación entre la presencia de integrones y la expresión de fenotipos multirresistentes en enterobacterias, independientemente de la cepa, la especie o el

Discusión

origen. Como ocurre en este estudio, se ha descrito la asociación de resistencia a antibióticos β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos debida a una gran variedad de casetes genéticos encontrados entre los integrones que portan las enterobacterias y codifican co-resistencia (Kaushik et al. 2018). En los aislados productores de carbapenemasa encontramos los genes codificantes de las metalo- β -lactamasas dentro de integrones de clase 1, en cuya estructura se integraban también genes de resistencia a aminoglucósidos. En un aislado de *C. freundii* se encontró el integrón *aadB+aadA2*, que había sido descrito anteriormente en esta misma especie (Pepperell et al. 2002). Además de los genes de resistencia a aminoglucósidos, en 4 aislados se encontraron genes de resistencia a fluoroquinolonas (*qnrA1* y *qnrB6*). Aunque los mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas (como *qnr*) confieren un bajo nivel de resistencia, suelen ir asociados a integrones portadores de otros genes que originan fenotipos multirresistentes (Hou et al. 2015; Bado et al. 2010).

2. Aislados procedentes de portadores

Las enterobacterias forman parte de la microbiota comensal del tracto intestinal en individuos sanos, de modo que el intestino constituye un importante reservorio de bacilos gram negativos multirresistentes, especialmente en pacientes hospitalizados en unidades con elevada presión antibiótica como las UCIs, pudiendo colonizar los pacientes y el medio ambiente, lo que constituye un desafío para la prevención de la diseminación de enterobacterias multirresistentes como parte esencial de la vigilancia y control de infecciones. Con el objetivo de conocer la prevalencia de enterobacterias multirresistentes y adoptar medidas preventivas para limitar la propagación de microorganismos multirresistentes en pacientes ingresados en UCI, analizamos la existencia de portadores fecales colonizados por enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems.

Se han publicado diversos estudios acerca de la colonización rectal por enterobacterias multirresistentes en pacientes ingresados, principalmente centrados en la detección de portadores intestinales de enterobacterias productoras de BLEE y otras β -lactamasas. La prevalencia de pacientes hospitalizados colonizados por estas enterobacterias se estima que oscila entre un 3 y 7% (Bhargava et al. 2014), pero puede ser superior en pacientes ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos (Hammami et al. 2017; Padilla-Serrano et al. 2018).

Nosotros hemos estudiado los portadores intestinales de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems entre los pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Intensiva. Durante este periodo (18 meses) se recibieron 1324 muestras procedentes de 598 pacientes, con una tasa de colonización del 6,35% (38 pacientes), siendo muy mayoritaria la presencia de *K. pneumoniae* (78,95%). Este porcentaje de colonización es menor que el hallado en otros estudios, como el de McConville, que mantenía una tasa de colonización por enterobacterias resistentes a carbapenems en pacientes ingresados en UCI del 10,65% (McConville et al. 2017); o el estudio más recientemente realizado en España donde recogen un porcentaje de colonización por enterobacterias multirresistentes del 14,4% (Padilla-Serrano et al. 2018).

En otro estudio español se describieron tasas de colonización aún más elevadas, del 16,1% en el caso de pacientes colonizados por enterobacterias productoras de

carbapenemasas y del 17,7% de enterobacterias productoras de BLEE (Maseda et al. 2017). Asimismo, acorde con nuestros resultados, la especie más frecuentemente hallada entre los aislados procedentes de portadores fue *K. pneumoniae* (92,68% de los pacientes).

2.1. Aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes como colonizador intestinal

K. pneumoniae es una de las enterobacterias multirresistentes más frecuentemente adquiridas en la UCI (European Centre for Disease Prevention and Control 2018). En nuestro estudio nos hemos centrado en el análisis de los aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes procedentes de portadores fecales y la investigación de infecciones clínicas surgidas en los pacientes portadores. De los 30 pacientes colonizados por estas cepas, 10 desarrollaron con posterioridad a la colonización infecciones en las que recuperamos cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo similar a los obtenidos de las muestras de colonización. El conocimiento de la existencia de colonización por bacterias multirresistentes puede ayudar a para prevenir infecciones nosocomiales asociadas, tanto endógenas como cruzadas, y orientar la instauración precoz de un tratamiento empírico apropiado en caso de infección. Numerosas publicaciones coinciden en que la colonización rectal es un importante factor de riesgo para el desarrollo de infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenems, especialmente en pacientes de UCI (McConville et al. 2017; Tischendorf et al. 2016). En un reciente estudio realizado en Estados Unidos, demostraron que el estado de portador en pacientes de UCI se asocia significativamente con el desarrollo de una infección posterior por CRE, de manera que el 47% de los pacientes colonizados desarrollaron una infección dentro de los siguientes 30 días de ingreso (McConville et al. 2017).

En nuestro estudio, ningún paciente ingresó en la UCI colonizado, y más de la mitad de ellos se colonizaron en la primera semana de ingreso. A diferencia de nuestros datos, en un estudio similar realizado en nuestro país encontraron que el 70% de los pacientes colonizados ingresaron en UCI siendo ya portadores (Padilla-Serrano et al. 2018). Estas diferencias pueden ser consecuencia del distinto grado de propagación de estos microorganismos en diferentes zonas de nuestro país.

La colonización simultánea por varios microorganismos multirresistentes es cada vez más frecuente ya que suelen ser pacientes que acumulan factores de riesgo intrínsecos y

extrínsecos que facilitan la colonización, especialmente en entornos como la UCI, en los que se reiteran los cuidados y hay una elevada presión antibiótica selectiva. En los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* se evaluó la colonización por otros gérmenes multirresistentes. Observamos que el 40% de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* también se colonizaron por otros microorganismos, principalmente *P. aeruginosa* productora de carbapenemasa de clase B (10 pacientes) y SARM (3 pacientes). En la mayor parte de los casos (58,4%) la primera colonización fue por *K. pneumoniae* multirresistente.

Los datos que se presentan en la red de vigilancia EARS del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) para nuestro país muestran unas cifras de cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems que oscilan entre un 2,3 y un 2,7% (años 2014 - 2017). A pesar de ello, la prevalencia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems en España no es tan elevada, si la comparamos con otros países europeos como Grecia, Italia o Rumania (<http://ecdc.europa.eu/>). Durante el periodo de nuestro estudio, el 5,02% de los pacientes ingresados en UCI se colonizaron por cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem, porcentaje muy superior al descrito por el ECDC, si bien la comparación no es ajustable porque nuestro estudio recoge aislados de pacientes portadores ingresados en UCI mientras que en el informe del ECDC se describen aislados clínicos obtenidos de muestras invasivas.

Como ocurre en este estudio, se ha descrito que haber recibido tratamiento antibiótico en el mes previo es un factor de riesgo de colonización rectal por enterobacterias multirresistentes, especialmente cuando se usaban β -lactámicos como cefalosporinas de 3ª generación y carbapenems (Ana Madueño et al. 2017; Kiddee et al. 2018). En nuestro estudio, todos los pacientes habían recibido β -lactámicos los 30 días previos, y en concreto carbapenems el 80%. Otro factor de riesgo identificado tanto en nuestro estudio como en otros es el haber sido sometido a un procedimiento quirúrgico previo, en particular los relacionados con cirugía abdominal y los invasivos como endoscopias digestivas (Maseda et al. 2017; Leikin-Zach et al. 2018; Padilla-Serrano et al. 2018). En nuestro estudio, el 40% de los pacientes había sufrido una intervención quirúrgica abdominal en los últimos quince días debido a una peritonitis secundaria a perforación, hemorragia digestiva y/o abscesos intraabdominales. En nuestro caso, el 70% de los pacientes presentaron comorbilidades cardiovasculares, factor que no ha sido descrito previamente.

En esta tesis hemos estudiado y caracterizado diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en los aislados de *K. pneumoniae*. Estudiamos la presencia de genes codificantes de BLEE, β -lactamasas tipo AmpC y carbapenemasas de clase A, B y D (OXA-48).

Discusión

Es destacable que, a pesar de que todos los aislados presentaron una sensibilidad disminuida a carbapenems, solo se encontró un aislado de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa. El resto presentaron β -lactamasas de tipo BLEE y/o AmpC. Por tanto, podemos concluir que, en nuestro entorno, el mecanismo de resistencia a carbapenems por producción de carbapenemasas es muy poco frecuente y que la prevalencia de carbapenemasas en enterobacterias identificadas en portadores es también muy baja y no constituye por ahora un problema de envergadura. Este hecho, en un entorno de creciente propagación de cepas multirresistentes, nos habilita para mantener una vigilancia estricta que permite la detección precoz de estas cepas y la consiguiente adopción de medidas de control que eviten su difusión y la posible epidemia subsiguiente que tanto sufrimiento, dificultades y costes suponen para la asistencias de los pacientes.

Durante los últimos años se han notificado múltiples brotes producidos por enterobacterias productoras de BLEE, siendo *K. pneumoniae* la especie más propagada. Concretamente, en la última década, las β -lactamasas tipo CTX-M-15 han surgido como el tipo dominante de BLEE en enterobacterias y especialmente en *K. pneumoniae*, causando brotes en contextos tanto nosocomiales como comunitarios (Calbo & Garau 2015; Oteo et al. 2009). En nuestro estudio, 19 de los aislados presentaron β -lactamasas tipo BLEE, siendo CTX-M-15 la más frecuentemente encontrada (11 aislados). Además, estos aislados también producían otras β -lactamasas (SHV-76, SHV-2a y TEM-1). En 10 de ellos, las secuencias *ISEcp1* y *orf477* fueron detectadas flanqueando el gen *bla*_{CTX-M-15}, como ya ha sido descrito en la literatura (Eckert et al. 2006; Jouini et al. 2007; Ruiz et al. 2010; Cantón & Coque 2006). En el aislado restante, la secuencia *ISEcp1* se encontraba interrumpida por la presencia de la secuencia de inserción IS26, hecho que se ha descrito anteriormente (Saladin et al. 2002; Eckert et al. 2006; Lartigue et al. 2004; Jouini et al. 2007).

Los genes codificantes de BLEEs pueden existir como entidades separadas o pueden aparecer dentro de integrones complejos que facilitan su propagación a otros microorganismos (Cantón et al. 2008). Varios estudios han demostrado una alta incidencia de integrones en cepas de *Klebsiella* productoras de BLEE en contraste con las cepas que no producen estas enzimas, lo que sugiere su papel fundamental en la transferencia de los que producen las BLEE (Machado et al. 2007). Los integrones en *Klebsiella* spp. también portan genes que codifican diferentes variantes de metalo- β -lactamasas, como IMP y VIM, los cuales suelen estar incluidos en integrones de clase 1 (Castanheira et al. 2016; Kaushik et al. 2018).

Los patrones de multirresistencia encontrados en enterobacterias y, concretamente, en *K. pneumoniae* están asociados a genes determinantes de resistencia que se localizan en la región variable de integrones. Por ello, estudiamos la presencia de integrones en los aislados recogidos, seleccionando una cepa por perfil de PFGE. En 9 aislados no se pudo conocer la estructura de las regiones variables de los integrones. Se detectaron 9 estructuras diferentes de integrones de clase 1, y no se obtuvo ningún resultado positivo para la investigación de integrones de clase 2 o de clase 3. La única cepa productora de carbapenemasa presentó el gen *bla*_{VIM-2} dentro de un integrón en combinación con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, y además portaba otros dos integrones, uno de los cuales era un integrón vacío. Cabe destacar que 2 cepas presentaron dos integrones simultáneamente y 4 portaban tres integrones diferentes.

Encontramos 9 estructuras diferentes de integrones de clase 1 que portaban genes codificantes de resistencia a β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos descritos anteriormente como *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-224}, *aac(6')*I'-23, *aadA2* y *aac(6')*Ib-cr, entre otros (Ruiz, Sáenz, et al. 2012; Xia et al. 2016; Chang et al. 2011). Además, tres integrones encontrados en 6 de los aislados presentan también genes de resistencia a rifampicina (*arr3*), lo que confirma la asociación descrita en la literatura de un fenotipo de resistencia a rifampicina con la presencia de integrones en cepas de *Klebsiella* spp. (Kaushik et al. 2018). Otros genes de resistencia transmisible a quinolonas detectados fueron diferentes variantes de *qnrB* y *qnrS*. La resistencia plasmídica a quinolonas está asociada con frecuencia con integrones complejos que contienen *bla*_{OXA}, en aislados productores de β -lactamasas (Jacoby et al. 2011a; Bado et al. 2010; Cao et al. 2014). En nuestro estudio, los dos aislados que portaban el casete genético *bla*_{OXA-1} eran también productoras de *qnrB* (uno *qnrB4* y el otro *qnrB6*). Además, el gen *bla*_{OXA-1} se encontraba dentro del integrón *aac(6')*Ib-cr-*bla*_{OXA-1}-*catB3-arr3*, el cual ha sido relacionado anteriormente con *qnrB4* en aislados de *K. pneumoniae* (Pérez-Moreno et al. 2012; Ruiz, Sáenz, et al. 2012).

No se pudo llegar a conocer la estructura de la región variable de 9 aislados, pertenecientes al ST405 y uno al ST1145, posiblemente por ser integrones de clase 1 atípicos, que se caracterizan por carecer de 3'CS o presentar una región 3'CS inusual con reemplazo de *su1* y *qacEΔ1* por *su3* y *qacH* genes, respectivamente (Kaushik et al. 2018).

El grave problema originado por la diseminación global de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas se debe, en buena medida, a la propagación de cepas productoras de carbapenemasas tipo KPC, OXA-48 y NDM. No obstante, se evidencian

Discusión

considerables diferencias en su distribución geográfica. Las cepas productoras de KPC y NDM se encuentran mayoritariamente en Estados Unidos, Canadá, Grecia, Taiwan, Colombia y China; mientras que OXA-48 es un problema en Argentina (Lee et al. 2016). En Europa el principal problema se debe a KPC y OXA-48. En España, sin embargo, predominan las cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 (Machuca et al. 2018; A. Madueño et al. 2017) seguidas de las productoras de VIM en una proporción mucho menor (Albiger et al. 2015; J Oteo et al. 2015; Aracil-García et al. 2017). En un estudio realizado por Brañas y colaboradores en Madrid describieron que en más del 90% de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa producían OXA-48, mientras que VIM, aún siendo la segunda carbapenemasa encontrada, solo representó el 4,8% de los aislados. A pesar de la alta prevalencia en nuestro país de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, especialmente OXA-48, nosotros solo encontramos un aislado productor de carbapenemasa, que presentó fenotipo compatible con una carbapenemasa de clase B y fue caracterizado como productor de VIM-2.

Aún no siendo tan frecuentes en *K. pneumoniae*, la clase VIM es el grupo de carbapenemasas que con mayor frecuencia se describe en todo mundo y en diferentes especies bacterianas, estando especialmente presente en *P. aeruginosa*. Cepas de *K. pneumoniae* productoras de VIM se han extendido en diferentes países de Europa y Asia aunque en menor medida que otras carbapenemasas, sin embargo es raro encontrarlas en América y África (Lee et al. 2016; Galani et al. 2019; Papagiannitsis et al. 2010; Mohammad Ali Tabrizi et al. 2018). En España, hay pocos casos descritos de *K. pneumoniae* productora de VIM, y casi todos ellos se refieren siempre a la variante VIM-1 (Brañas et al. 2015; Sánchez-Romero et al. 2012). Hasta la fecha no se han descrito cepas de *K. pneumoniae* productoras de *bla*_{VIM-2} en España, y en el resto de Europa se han descrito pocos casos (Perilli et al. 2013).

En nuestro estudio la resistencia a carbapenems en los aislados de *K. pneumoniae* viene determinada principalmente por la combinación de la producción de una β -lactamasa tipo BLEE o AmpC junto con la pérdida de las porinas de membrana OmpK35, OmpK36 y/o OmpK37 (Ruiz, Ocampo-Sosa, et al. 2012; Doménech-Sánchez et al. 2003; García-Fernández et al. 2010). Desde la introducción de los carbapenems en la práctica clínica, la resistencia a los mismos ha ido creciendo considerablemente. Aunque la resistencia viene determinada, principalmente, por la diseminación de las carbapenemasas, la aparición de mutantes de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos debido a la pérdida de la estructura de las porinas es un hecho que se ha demostrado reiteradamente (Martínez-Martínez 2008; Doménech-Sánchez et al. 2003; Tsai et al. 2011). No encontramos ninguna cepa con una estructura de las

tres porinas a la vez conservadas: de los 17 patrones diferentes encontrados de OmpK35, 36 y 37, en once no se detectó mediante PCR la presencia de alguna de las porinas, y diez presentaron una mutación que daban lugar a un codon de finalización prematuro. Solo se encontró un aislado con un patrón de OmpK que mantenía la estructura de las tres porinas, aunque presentaba numerosas alteraciones en OmpK36 y OmpK37 (patrón 12). Este aislado correspondió a la única cepa productora de carbapenemasa (aislado K100). Además, en todos los aislados en los que se detectó la presencia de OmpK37 mediante PCR, se observó la presencia de muchas alteraciones en la estructura, coincidiendo con las descritas por Ruíz y colaboradores (Ruiz, Ocampo-Sosa, et al. 2012). Por tanto, el conjunto de estas modificaciones de las proteínas de membrana de los aislados de *K. pneumoniae* sugieren que en todos ellos hay una pérdida o deterioro de la función de la permeabilidad a los carbapenems.

La combinación de la alteración de las porinas junto con las β -lactamasas detectadas, como CTX-M-15, SHV-76, SHV-2a y DHA-1, se traduce en una disminución de la sensibilidad a carbapenems, especialmente a ertapenem. Este hecho ha sido estudiado anteriormente por Tsai y colaboradores, quienes señalaron que la combinación de β -lactamasas tipo CTX-M-15 o DHA-1 y la pérdida de OmpK35 u OmpK36 aumentaba la CMI a los carbapenems estudiados (ertapenem, meropenem, imipenem y doripenem), volviéndose resistentes, y en el caso de la combinación con SHV-12 se produce resistencia a ertapenem y meropenem (Tsai et al. 2013). Otros autores también han descrito la asociación de la falta de funcionalidad de las porinas y la producción de algunas de las β -lactamasas que hemos encontrado en nuestros aislados (CTX-M-15, SHV-11 y DHA-1) como responsables del mecanismo de resistencia a carbapenems en cepas no productoras de carbapenemasas (Hamzaoui et al. 2018; Ruiz, Ocampo-Sosa, et al. 2012; Lin et al. 2018; Poulou et al. 2013). De los 22 aislados caracterizados, 14 producen una o varias de estas β -lactamasas (CTX-M-15, SHV-11 y DHA-1), lo que explica su sensibilidad disminuida a carbapenems. Un aislado era productor de MBL, y de los 7 restantes, 6 eran productores de BLEE tipo SHV-2, con perfil hidrolítico de β -lactamasa de espectro extendido, cuya expresión, junto a una disminución de OmpK36, contribuye a la resistencia a cefalosporinas y carbapenems (Crowley et al. 2002). En el último aislado se encontró una nueva variante de SHV (además de SHV-1) que no pudo ser incluida en la base de datos del GenBank, por lo que desconocemos su perfil hidrolítico.

Respecto al estudio de clonalidad de los aislados, se estudiaron los 30 aislamientos de *K. pneumoniae* a los que se les realizó PFGE. El análisis reveló la presencia de 8 tipos clonales diferentes, si bien el 83,3% de los aislados se agrupaban en 3 patrones. Se encontró un clon mayoritario, que perteneció al ST405.

Discusión

La tipificación molecular de nuestros aislados mostró la presencia de 7 secuenciotipos (ST) diferentes. El más frecuentemente encontrado fue ST405, seguido de ST340 y ST15. Es importante destacar que hemos encontrado tres ST de alto riesgo: ST340 (8 aislados), ST15 (2 aislados) y ST11 (1 aislados). Un aspecto relevante de los clones denominados "de alto riesgo" es que han experimentado una rápida diseminación mundial en pocos años. El mejor ejemplo es el clon ST258 de *K. pneumoniae* productora de KPC que actualmente se considera endémico en Estados Unidos, Israel, Grecia, Italia, Polonia y Colombia. En nuestro estudio no encontramos ningún aislado perteneciente al ST258. Otros ejemplos de clones de alto riesgo muy propagados son el ST11 en China y Brasil, el ST15 en Italia, Polonia y Colombia o el ST340 en Brasil y Grecia (Mathers et al. 2015).

A nivel mundial, los secuenciotipos más frecuentemente descritos en *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa son ST11, ST14, ST101, ST147 y ST258. Como ya se ha señalado, el ST258 se ha relacionado con la diseminación de *K. pneumoniae* productora de KPC, mientras que ST11 está relacionado con la producción de diferentes carbapenemasas como NDM-1, OXA-48, KPC-2, VIM-1 y OXA-245 (Lee et al. 2016). La enzima OXA-48 se ha descrito en varios clones de *K. pneumoniae* (ST101, ST11, ST14, ST15, ST147, ST395 y ST405), distribuidos por Europa y sobre todo por algunos países mediterráneos (J Oteo et al. 2015; Voulgari et al. 2013; Paño-Pardo et al. 2013). En España, los ST más frecuentemente descritos en cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 son ST405 y ST11 (J Oteo et al. 2015; Pérez-Vázquez et al. 2016). En concreto, el ST11 está descrito como uno de los clones de alto riesgo que se asocia con más frecuencia a la multirresistencia (Barragán-Prada et al. 2019; Hernández-García et al. 2018). En nuestro estudio, no hemos encontrado ningún aislado productor de OXA-48 pero la mayor parte de los aislados (53,3%) pertenecieron al ST405, y un aislado al ST11, lo que sugiere que están muy relacionados y distribuidos por nuestro país. El único aislado productor de carbapenemasa (VIM-2) perteneció al ST340.

El problema que sugiere la presencia de estos clones de alto riesgo es que, por su demostrada capacidad para acumular genes de resistencia, virulencia y capacidad adaptativa, pueden propagarse de forma silente y constituir un huésped propicio para la captación de genes de resistencia a diferentes antimicrobianos, incluyendo codificadores de carbapenemasas, que encontrarían así un medio propicio para su emergencia y propagación, especialmente en unidades con elevada presión antibiótica selectora y mayores posibilidades para la transmisión de infecciones, como son las UCIs.

La presencia de BLEEs tipo CTX-M en *K. pneumoniae* ha sido descrita por diferentes autores, relacionando distintos secuenciotipos con su difusión. En particular, CTX-M-15 ha sido asociada a una gran variedad de STs como ST11, ST15, ST16, ST340, ST341 y ST405 entre otros (Wyres & Holt 2016; Becker et al. 2018; Woodford et al. 2011; Cantón et al. 2012). En nuestro estudio todos los aislados productores de CTX-M-15 pertenecieron al ST405 excepto uno, que pertenecía al ST340.

En cuanto al estudio filogenético, todos los aislados pertenecieron al grupo Kpl, excepto uno que presentaba una mutación en *gyrA* originando un perfil no descrito en la literatura.

2.2. Otras enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems como colonizadores intestinales

Durante el periodo de estudio, se aislaron otras enterobacterias que presentaron sensibilidad disminuida a antibióticos carbapenémicos. *C. freundii* fue el más frecuente (5 cepas), seguido de *E. coli*, *K. aerogenes* y *E. kobei*.

Todos los aislados de *C. freundii* presentaron fenotipo MBL y fueron caracterizados como portadores de *bla*_{VIM-2}. Dos de ellos, además, fueron productores de β-lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M (*bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-9}), que han sido descritas previamente en *C. freundii* por todo el mundo (Shahid 2010; Munday et al. 2004; Arana et al. 2017). En los tres aislados restantes, no se confirmó la presencia de ninguna carbapenemasa. Sin embargo, los tres presentaron un fenotipo compatible con una producción de BLEE, que se confirmó mediante la detección de CTX-M-15 en dos aislados (*E. coli* y *E. kobei*) y, de SHV-12 en la cepa de *K. aerogenes*. Este último enzima presenta un perfil hidrolítico de β-lactamasa de espectro extendido y está muy extendida en Asia y en el sur de Europa, así como en nuestro país (Liu et al. 2016; Alonso et al. 2017).

Discusión

Las cepas productoras de carbapenemasa portaban el gen *bla*_{VIM-2} dentro de un integrón de clase 1, cuya estructura se analizará en el siguiente apartado. La β -lactamasa de espectro extendido *bla*_{CTX-M-9} se encontró dentro del integrón compuesto conocido como *In60*, con *dfrA16+aadA2* dentro de la región variable, descrita por primera vez en *E. coli* en el año 2000 (Sabaté et al. 2000).

3. Aislados productores de carbapenemasas

Aunque la resistencia a carbapenems en enterobacterias suele estar mediada principalmente por la producción de carbapenemasas, en nuestro entorno, las carbapenemasas no son la principal causa de la sensibilidad disminuida a carbapenems y, por tanto, su prevalencia es baja. En este apartado analizaremos los resultados en conjunto de las cepas productoras de carbapenemasas.

Se detectaron un total de 14 cepas productoras de carbapenemasas, tanto de muestras clínicas como de portadores, lo que supone un 15,73% de los aislados con sensibilidad disminuida a carbapenems. La resistencia a carbapenémicos en las cepas productoras de carbapenemasa fue del 85,7% a ertapenem y 42,9% a imipenem, lo que nos alerta sobre la importancia de estar atentos para detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas en nuestro hospital, especialmente en aislados de *C. freundii*, ya que pueden mantener sensibilidad a carbapenems a pesar de ser productores de metalo- β -lactamasas. Todas las enterobacterias productoras de carbapenemasa presentaron un fenotipo MBL y fueron caracterizadas como *bla*_{VIM}.

Las cepas productoras de carbapenemasas suelen presentar co-resistencias a otros antimicrobianos no β -lactámicos, debido a la inclusión de otros genes de resistencia en elementos genéticos móviles como integrones y plásmidos, lo que favorece su diseminación. En nuestro estudio, la resistencia frente a antibióticos no β -lactámicos en las enterobacterias productoras de carbapenemasas es elevada. Se observaron elevados porcentajes de resistencia a aminoglucósidos (gentamicina 85,7%, tobramicina 85,7%), quinolonas (ciprofloxacino 71,4%), y cotrimoxazol (57,1%). Es destacable que solo se encontró una cepa resistente a amikacina y no se encontró ningún aislamiento resistente a colistina. En un estudio multicéntrico realizado en España en el que estudiaron diferentes aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasas, los porcentajes de resistencia a gentamicina (66,8%) y tobramicina (83,6%), fueron inferiores a los resultados obtenidos en nuestro estudio, mientras que los de ciprofloxacino (87,3%), cotrimoxazol (83,9%) y amikacina (18,7%) fueron superiores (J Oteo et al. 2015).

En España, los primeros casos detectados de enterobacterias productoras de carbapenemasas correspondieron a aislados productores de VIM-1 (Tórtola et al. 2005). En 2009, en un estudio multicéntrico llevado a cabo en 35 hospitales españoles, se detectaron 43 enterobacterias productoras de carbapenemasas (0.04%), siendo las más frecuentes VIM-1 y

IMP-22 (Miro et al. 2013). Sin embargo, desde el primer brote producido por *K. pneumoniae* productora de OXA-48 (Pitart et al. 2011), se ha producido un importante cambio epidemiológico caracterizado por un aumento de estas cepas. Actualmente las cifras son elevadas, particularmente en algunas regiones y hospitales con un claro predominio de OXA-48, descrita principalmente en *K. pneumoniae* (Machuca et al. 2018; Oteo et al. 2014).

A pesar de que en muchos lugares de España ha habido un alarmante incremento de carbapenemasas, que principalmente persisten en diferentes clones de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48, no hemos encontrado ninguna enterobacteria productora de esta enzima. En un estudio multicéntrico realizado en España en 2013, se describió una mayor distribución geográfica de los aislados productores de VIM, siendo esta enzima detectada en 16 de las provincias participantes en el estudio, frente a 10 provincias en el caso de OXA-48 (J Oteo et al. 2015). Por tanto, aunque el número de enterobacterias productoras de OXA-48 sea mayor que el de productores de VIM, éstas se encuentran distribuidas en un número más reducido de provincias.

Todos los enzimas identificados fueron caracterizados como bla_{VIM-2} excepto un aislado de *K. aerogenes*, que fue productor de VIM-1. En este aislado, el gen codificante de la carbapenemasa se encontraba en un integrón de clase 1, In3103, descrito por primera vez en *K. oxytoca* en España (Papagiannitsis et al. 2015) y posteriormente descrito en una cepa de *Enterobacter hormaechei* (Matsumura et al. 2017). No hemos encontrado más publicaciones en las que se haga referencia a este integrón, y es la primera vez que se describe en un aislado de *K. aerogenes*.

Los aislados productores de VIM-2 presentaban el gen codificante de la metalo- β -lactamasa dentro de un integrón de clase 1 que no había sido descrito con anterioridad y que fue registrado en GenBank con el número In1470. En el integrón se incluían genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos (*aacA4'*), rifampicina (*arr3*) y trimetoprim (*dfrA27*). Además, presentaba una nueva variante del gen codificante de la acetiltransferasa *aacA4* que confiere resistencia a aminoglucósidos. Tanto el nuevo integrón como la nueva variante de la acetilasa fueron incluidas en las bases de datos correspondientes, con los nombres In1470 y *aacA4'-30*, respectivamente. El integrón completo se detectó en 6 de los aislados (3 *C. freundii*, 2 *K. aerogenes* y 1 *K. pneumoniae*). En el resto de los aislados, no se pudo confirmar la presencia del integrón completo.

Desde la primera descripción de VIM-1 en Italia en 1997, se han detectado bacterias productoras de VIM en todo el mundo (Nordmann et al. 2011). Las carbapenemasas tipo VIM son comunes en *P. aeruginosa*, pero siguen siendo relativamente raras entre las enterobacterias, y se encuentran principalmente en Europa, concretamente en Grecia, Italia, Hungría y España (Albiger et al. 2015; Eichenberger & Thaden 2019). Las especies más comunes asociadas a VIM son *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter* spp (Matsumura et al. 2017). En nuestro estudio hemos descrito aislados productores de VIM en *K. aerogenes*, *C. freundii* y *K. pneumoniae*.

Se han descrito aislados de *P. aeruginosa* productores de *bla*_{VIM-2} distribuidos en todo el mundo, sin embargo, existen menos descripciones de enterobacterias productoras de VIM-2. En enterobacterias, las variantes más frecuentemente descritas son VIM-1 y VIM-4 (Matsumura et al. 2017). En un estudio multicéntrico realizado durante 20 años (1997-2016) en el que participaron 199 hospitales de 42 países de todo el mundo, el porcentaje de carbapenemasas tipo VIM en enterobacterias fue del 2,4% en el periodo comprendido entre 2007 y 2009, y del 1,9% entre 2014 y 2016, y solo se encontró un aislamiento productor de VIM-2 (Castanheira et al. 2019). Recientemente se han publicado brotes de enterobacterias productoras de VIM-2, como el publicado en pacientes iraníes ingresados en UCI sometidos a ventilación mecánica con infecciones por *K. pneumoniae* productora de VIM-2 (Mohammad Ali Tabrizi et al. 2018). En Japón se ha publicado la emergencia de *C. freundii* productor de VIM-2 (Ando et al. 2018). En España, el primer caso publicado de *C. freundii* productor de VIM-2 se detectó en 2014 en una cepa aislada en nuestro hospital (Porres-Osante et al. 2014). Posteriormente, se ha descrito un aislado más en nuestro país (Arana et al. 2017). En cuanto a *K. aerogenes*, existen muy pocas referencias de cepas portadoras de este gen (Biendo et al. 2008). En un estudio publicado en 2017 en el que se recogieron cepas de enterobacterias productoras de VIM, se describió que en España circulan cepas de *Klebsiella* spp. y *E. cloacae* complex productoras de VIM-1 y *Citrobacter* spp productoras de VIM-2 (Matsumura et al. 2017)

Todos los aislados de *C. freundii* presentaron el mismo perfil de PFGE, por lo que podemos afirmar que pertenecen al mismo clon, que hemos de considerar se ha hecho endémico en nuestro hospital. A pesar de ello, mediante el estudio de la distribución temporal de los pacientes en los que se obtuvieron esos aislados, se ha constatado que el hallazgo de estas cepas es puntual, sin haber continuidad temporal y sin ocasionar brotes, aunque todo indica la presencia de uno o varios reservorios en la UCI de nuestro hospital.

Discusión

Es importante destacar que el único aislado de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa presentó el gen *bla*_{VIM-2} insertado en el mismo integrón que el encontrado en los aislados de *C. freundii* y *K. aerogenes*, que ha sido descrito por primera vez por nosotros. Este aislado de *K. pneumoniae* pertenecía a una muestra de vigilancia epidemiológica recogida de un paciente ingresado en UCI, al igual que los pacientes en los que se habían aislado las cepas de *K. aerogenes* y *C. freundii* productoras de VIM-2.

En nuestro hospital se ha publicado una alta prevalencia de aislados de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas de tipo VIM-2, que se detectan fundamentalmente en pacientes ingresados en la UCI. Estos aislados presentan el gen *bla*_{VIM-2} en integrones de clase 1 asociado a casetes génicos de resistencia a aminoglucósidos (Bellés et al. 2018). La transmisión de genes de resistencia entre bacteria es un hecho que se conoce desde hace tiempo. Recientemente se ha publicado la posible transmisión del gen VIM-2 entre diferentes géneros, concretamente desde un desde un aislado de *P. aeruginosa* productor de VIM-2 a un *C. freundii*. Los autores sugieren una reorganización de los elementos genéticos asociados en el integrón que porta *bla*_{VIM-2} al producirse la transferencia entre géneros (Porres-Osante et al. 2014).

Estos hallazgos sugieren la posible transmisión génica entre géneros, desde *P. aeruginosa* a algunas enterobacterias, facilitado porque el gen VIM-2 es muy prevalente en nuestro hospital en aislados de *P. aeruginosa*. Además, encontramos presente el integrón In1470, que parece ser la causa de la transmisión de carbapenemasas entre enterobacterias en el entorno de nuestro hospital. Hemos referido la posible transferencia del integrón en primer lugar desde *K. aerogenes* a *C. freundii* y, posteriormente, a la cepa de *K. pneumoniae*.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en nuestro entorno es muy baja. Solo el 15,7% de los aislados clínicos que presentaron una sensibilidad disminuida a carbapenems portaban un gen codificante de carbapenemasa. Estos genes fueron identificados como *bla*_{VIM} y se encontraban en estructuras de integrones de clase 1 asociados a casetes génicos de resistencia a aminoglucósidos. No encontramos carbapenemasas de clase A ni clase D.
2. El 6,35 % de los pacientes estudiados ingresados en UCI estaban colonizados por una enterobacteria con sensibilidad disminuida a carbapenems, mayoritariamente *K. pneumoniae*. Estos aislados presentaron altos niveles de resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol.
3. En las cepas de *K. pneumoniae* la combinación de la alteración de las porinas junto con las β -lactamasas detectadas, como CTX-M-15, SHV-76, SHV-2a y DHA-1, se traduce en una disminución de la sensibilidad a carbapenems, especialmente a ertapenem.
4. Todos los pacientes colonizados por *K. pneumoniae* multirresistente habían sido sometidos a tratamiento antibiótico previo con β -lactámicos. Ningún paciente ingresó en la UCI colonizado por esta cepa, y más de la mitad se colonizó en la primera semana de ingreso.
5. El secuenciotipo de *K. pneumoniae* más frecuentemente encontrado fue ST405, identificado en pacientes que coincidieron en su ingreso en UCI, seguido de ST340 y ST15, siendo estos dos últimos clones de alto riesgo. No encontramos ningún aislado perteneciente al clon de alto riesgo ST258.
6. La resistencia a ertapenem en las cepas productoras de carbapenemasa fue del 85,7% y del 42,9% a imipenem, además presentaron elevados porcentajes de resistencias a aminoglucósidos y cotrimoxazol.
7. Todos los aislados de *C. freundii* productor de carbapenemasa presentaron el mismo perfil de PFGE y, por tanto, asumimos que pertenecen al mismo clon. Sin embargo, el hallazgo de estas cepas es puntual, sin haber continuidad temporal y sin ocasionar

Conclusiones

brotos, lo que sugiere la presencia de uno o varios reservorios en la UCI de nuestro hospital, en los que se mantiene y desde los que puede colonizar a nuevos pacientes.

8. El gen *bla*_{VIM-2} se encontró insertado en la misma estructura del integrón de clase 1 In1470 en todos los aislados, y ha sido descrito por primera vez en este estudio. Este integrón parece haber actuado como vehículo de transmisión de carbapenemasas entre enterobacterias en el entorno de nuestro hospital.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Albiger, B. et al., 2015. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance*, 20(45), p.30062.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J. & Osheroff, N., 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), pp.1565-1574.
- Alonso, C.A. et al., 2017. Analysis of blaSHV-12-carrying Escherichia coli clones and plasmids from human, animal and food sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), pp.1589-1596. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28333184> [Accedido abril 26, 2019].
- Ambler, R.P., 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289(1036), pp.321-331.
- Ando, S. et al., 2018. Emergence of VIM-2-producing Citrobacter freundii in Japan. *Infectious Diseases*, 50(11-12), pp.862-863. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30317906> [Accedido marzo 26, 2019].
- Aracil-García, B. et al., 2017. Rápido aumento de la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, imipenem y de la coresistencia en 7.140 aislados de Klebsiella pneumoniae en hemocultivos (2010-2014) según datos de EARS-Net en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(8), pp.480-486.
- Arana, D.M. et al., 2017. Carbapenem-resistant Citrobacter spp. isolated in Spain from 2013 to 2015 produced a variety of carbapenemases including VIM-1, OXA-48, KPC-2, NDM-1 and VIM-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), pp.3283-3287. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029114> [Accedido marzo 26, 2019].
- Argente, M. et al., 2018. Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.003>.
- Asthana, S., Mathur, P. & Tak, V., 2014. Detection of Carbapenemase Production in Gram-

Bibliografía

- negative Bacteria. *Journal of laboratory physicians*, 6(2), pp.69-75.
- Bado, I. et al., 2010. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(5), pp.453-458.
- Ballarini, A. et al., 2012. Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. *BMC Microbiology*, 12.
- Barragán-Prada, H. et al., 2019. Emergence and dissemination of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates expressing OXA-48 plus CTX-M-15 in patients not previously treated with colistin in a Spanish university hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(2), pp.147-153. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30266401> [Accedido febrero 20, 2019].
- Batchelor, M. et al., 2005. bla(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), pp.1319-1322.
- Becker, L. et al., 2018. Whole Genome Sequence Analysis of CTX-M-15 Producing *Klebsiella* Isolates Allowed Dissecting a Polyclonal Outbreak Scenario. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.322. Available at: <https://gitlab>. [Accedido febrero 20, 2019].
- Bellés, A. et al., 2018. Characterisation of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from lower tract respiratory infections in a Spanish hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(10), pp.1847-1856. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29978304> [Accedido febrero 1, 2019].
- Bhargava, A. et al., 2014. Risk Factors for Colonization due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae among Patients: Exposed to Long-Term Acute Care and Acute Care Facilities. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(04), pp.398-405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602945> [Accedido enero 24, 2019].
- Bialek-Davenet, S. et al., 2014. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), pp.1812-1820.

- Biendo, M. et al., 2008. Successive Emergence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and Carbapenemase-Producing *Enterobacter aerogenes* Isolates in a University Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), pp.1037-1044. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234876> [Accedido marzo 26, 2019].
- Brañas, P. et al., 2015. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(1), pp.111-116.
- Brisse, S. et al., 2004. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(10), pp.942-945. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00973.x>.
- Brisse, S., Passet, V. & Grimont, P.A.D., 2014. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., And demonstration th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2014), pp.3146-3152.
- Brisse, S. & Verhoef, J., 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 51(3), pp.915-924.
- Brown, H.J., Stokes, H.W. & Hall, R.M., 1996. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *Journal of Bacteriology*, 178(15), pp.4429-4437.
- Bush, K. et al., 1985. Resistance caused by decreased penetration of β -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(4), pp.555-560.
- Bush, K. & Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), pp.969-976.
- Calbo, E. & Garau, J., 2015. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: The CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiology*, 10(6), pp.1063-1075. Available at: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.22> [Accedido enero 31, 2019].

Bibliografía

- Cantón, R. et al., 2018. Antimicrobial susceptibility trends and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases among Gram-negative organisms recovered during the SMART study in Spain (2011-2015). *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 31(2), pp.136-145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29532655> [Accedido abril 9, 2019].
- Cantón, R. et al., 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, pp.144-153. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154538> [Accedido abril 15, 2019].
- Cantón, R. & Coque, T.M., 2006. The CTX-M betalactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), pp.466-475.
- Cantón, R., González-Alba, J.M. & Galán, J.C., 2012. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR).
- Cantón, R. & Ruiz-Garbajosa, P., 2011. Co-resistance: An opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), pp.477-485.
- Cao, X. et al., 2014. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), p.16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24884610> [Accedido abril 27, 2019].
- Castanheira, M. et al., 2016. *Klebsiella pneumoniae* Isolate from a New York City Hospital Belonging to Sequence Type 258 and Carrying blaKPC-2 and blaVIM-4. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), pp.1924-7. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01844-15> [Accedido abril 15, 2019].
- Castanheira, M. et al., 2019. Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among Enterobacteriaceae Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis*, 6, pp.23-33. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/> [Accedido marzo 26, 2019].
- Cattoir, V. et al., 2007. Prevalence of qnr genes in *Salmonella* in France. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(4), pp.751-754.
- Cavaco, L.M. et al., 2009. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp.603-608.
- Chang, C.Y. et al., 2011. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), pp.197-204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947666> [Accedido abril 26, 2019].
- Chen, L. et al., 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*, 22(12), pp.686-696.
- Codjoe, F. & Donkor, E., 2017. Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, 6(1), p.1. Available at: <http://www.mdpi.com/2076-3271/6/1/1>.
- Coll, P. et al., 2005. *Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*,
- Collis, C.M. et al., 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Molecular Microbiology*, 9(1), pp.41-52.
- Coque, T.M. et al., 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), pp.500-510.
- Crowley, B., Benedí, V.J. & Doménech-Sánchez, A., 2002. Expression of SHV-2 beta-lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), pp.3679-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384391> [Accedido abril 27, 2019].
- Curiao, T. et al., 2010. Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(8), pp.1608-1614.
- Detsis, M., Karanika, S. & Mylonakis, E., 2017. 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. *Critical Care Medicine*, 45, pp.705-714. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med8&AN=28157141> <http://digitaal.uba.uva.nl:9003/uva->

Bibliografía

linker?sid=OVID:medline&id=pmid:28157141&id=doi:10.1097%2FCCM.0000000000002253&issn=0090-3493&isbn=&volume=45&issue=4&spage=705&pages.

- Diancourt, L. et al., 2005. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. , 43(8), pp.4178-4182.
- Dickstein, Y. et al., 2016. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization and infection in critically ill patients: a retrospective matched cohort comparison with non-carriers. *Journal of Hospital Infection*, 94(1), pp.54-59.
- Doménech-Sánchez, A. et al., 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 181(9), pp.2726-2732. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217760>.
- Doménech-Sánchez, A. et al., 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), pp.3332-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506051>.
- Drancourt, M. et al., 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), pp.925-932.
- van Duin, D. & Doi, Y., 2017. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4), pp.460-469. Available at: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>.
- Eckburg, P.B., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308(5728), pp.1635-1638. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110591>.
- Eckert, C. et al., 2004. Dissemination of CTX-M-Type β -Lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris , France Dissemination of CTX-M-Type β -Lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris , France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), pp.1249-1255.
- Eckert, C. et al., 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla CTX-M

- genes. , (November 2005), pp.14-23.
- Eichenberger, E.M. & Thaden, J.T., 2019. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 8(2), p.37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30959901> [Accedido abril 11, 2019].
- Elhani, D. et al., 2011. Multilocus sequence typing compared to PFGE for molecular typing of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Annales de biologie clinique*, 69(6), pp.742-744.
- Ellington, M.J. et al., 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(2), pp.321-322.
- ENVIN, 2017. *Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Servicios de Medicina Intensiva. Envin Helics Informe 2017. Sociedad Española De Medicina Intensiva Crística, y Unidades Coronarias (SEMICYUC)*, Available at: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe ENVIN-UCI 2017.pdf>.
- EPINE-EPSS, 2017. *Estudio Epine-Epps 2017. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene*, Available at: <http://hws.vhebron.net/epine/Global/EPINE-EPPS 2017 Informe Global de España Resumen.pdf>.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2018. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance. *Surveillance Network (EARS-Net) 2017*, (Stockholm: ECDC). Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf> [Accedido enero 24, 2019].
- Falagas, M.E. et al., 2014. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerging infectious diseases*, 20(7), pp.1170-1175.
- Fernández-Martínez, M. et al., 2015. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), pp.157-163.
- Fluit, A.C. & Schmitz, F.J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(4), pp.272-288.

Bibliografía

- Gagliotti, C. et al., 2013. Active surveillance for asymptomatic carriers of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital setting. *Journal of Hospital Infection*, 83(4), pp.330-332.
- Galani, I. et al., 2019. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), p.167. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30770727> [Accedido febrero 20, 2019].
- García-Fernández, A. et al., 2010. An ertapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), pp.4178-4184.
- Girmenia, C., Serrao, A. & Canichella, M., 2016. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Mediterranean countries. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 8(1).
- Glaeser, S.P. & Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), pp.237-245.
- Goldstein, F.W. et al., 1983. In vivo and in vitro emergence of simultaneous resistance to both β -lactam and aminoglycoside antibiotics in a strain of *Serratia marcescens*. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie*, 134(3), pp.329-337.
- Gomez-Gil, M.R. et al., 2010. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(12), pp.2695-2697.
- González R, G. et al., 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: Estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Medica de Chile*, 132(5), pp.619-626.
- Grundmann, H. et al., 2017. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2), pp.153-163. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916302572> [Accedido abril 8, 2019].
- Gude, M.J. et al., 2013. Molecular epidemiology, resistance profiles and clinical features in

- clinical plasmid-mediated AmpC-producing Enterobacteriaceae. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), pp.553-557.
- Gupta, N. et al., 2011. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 53(1), pp.60-67. Available at: <http://cid.oxfordjournals.org/> [Accedido marzo 27, 2019].
- Hall, R.M., 2012. Integrons and gene cassettes: Hotspots of diversity in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), pp.71-78.
- Hammami, S. et al., 2017. Rectal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacilli in Intensive Care Units in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 23(6), p.mdr.2016.0205. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28099062> [Accedido enero 17, 2019].
- Hamzaoui, Z. et al., 2018. Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and blaESBLand/or blaAmpCgenes in conferring carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6), pp.898-905. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857918300980> [Accedido febrero 6, 2019].
- Harris, A.D. et al., 2007. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. *Emerging infectious diseases*, 13(8), pp.1144-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953083><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2828082>.
- Hernández-García, M. et al., 2018. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(11), pp.3039-3043. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30053018> [Accedido febrero 20, 2019].
- Hilty, M. et al., 2012. Transmission dynamics of extended-spectrum -lactamase-producing enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clinical*

Bibliografía

- Infectious Diseases*, 55(7), pp.967-975.
- Ho, P.L. et al., 2016. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(1), pp.123-126.
- Holt, K.E. et al., 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), pp.E3574-81. Available at: <http://www.pnas.org/content/112/27/E3574.full>.
- Hong, S.S. et al., 2012. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Annals of laboratory medicine*, 32(5), pp.359-361.
- Hou, X.H. et al., 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3 PG-759-768), pp.759-768.
- Ito, H. et al., 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(4), pp.824-829.
- Jacoby, G.A., 2009. AmpC -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), pp.161-182. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136439> [Accedido abril 2, 2019].
- Jacoby, G.A., Griffin, C.M. & Hooper, D.C., 2011a. *Citrobacter* spp. as a source of qnrB alleles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), pp.4979-4984.
- Jacoby, G.A., Griffin, C.M. & Hooper, D.C., 2011b. *Citrobacter* spp. as a source of qnrB alleles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Jouini, A. et al., 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), pp.1137-1141. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17855726.
- Kaushik, M. et al., 2018. Integrins in Enterobacteriaceae : diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(2), pp.167-176. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857917303680> [Accedido abril 11,

2019].

- Kiddee, A. et al., 2018. Risk factors for gastrointestinal colonization and acquisition of carbapenem-resistant gram-negative bacteria among patients in intensive care units in Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(8). Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00341-18>. [Accedido enero 30, 2019].
- Kim, H.B. et al., 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), pp.639-645.
- Lartigue, M.-F., Poirel, L. & Nordmann, P., 2004. Diversity of genetic environment of bla CTX-M genes. , 234, pp.201-207.
- Lautenbach, E. et al., 2001. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(8), pp.1162-71. Available at: <http://cid.oxfordjournals.org/content/32/8/1162.abstract>.
- Lee, C. et al., 2007. Collateral damage of flomoxef therapy : in vivo development of porin deficiency and acquisition of bla DHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 β -lactamases. , (November 2017), pp.410-413.
- Lee, C.R. et al., 2016. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN).
- Leikin-Zach, V. et al., 2018. Neonatal risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in the neonatal intensive care unit. *Israel Medical Association Journal*, 20(5), pp.286-290. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-012-2675-0> [Accedido enero 24, 2019].
- Lévesque P.H, C.& R., 1993. PCR analysis of integrons. En D. H. P. et al, ed. *Diagnostic Molecular Microbiology*. Washington, American Society for Microbiology, pp. 590-594.
- Levy, S.B. & Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(12 Suppl), pp.S122-9.

Bibliografía

- Lin, D. et al., 2018. Epidemiological study of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine (Poland)*, 13(1), pp.460-466. Available at: <https://doi.org/10.1515/med-2018-0070> [Accedido febrero 6, 2019].
- Liu, J. et al., 2016. Association of antibiotic resistance with SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(1), pp.269-276. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26889253> [Accedido abril 26, 2019].
- López-Camacho, E. et al., 2014. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), pp.632-636.
- Machado, E. et al., 2007. Preservation of Integron Types among Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in a Spanish Hospital over a 15-Year Period (1988 to 2003). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), pp.2201-2204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404002> [Accedido abril 15, 2019].
- Machuca, J. et al., 2018. OXA-48-like-producing *Klebsiella pneumoniae* in southern Spain in 2014-2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1). Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01396-18> [Accedido febrero 1, 2019].
- Madigan, M.T. et al., 2009. *Brock Biología de los Microorganismos*, Madrid (España): Pearson.
- Madsen, L., Aarestrup, F.M. & Olsen, J.E., 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella Typhimurium*. *Veterinary microbiology*, 75(1), pp.73-82.
- Madueño, A. et al., 2017. Dissemination and clinical implications of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 in a Spanish hospital. *Journal of Hospital Infection*, 96(2), pp.116-122. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28395861> [Accedido febrero 1, 2019].
- Madueño, A. et al., 2017. Risk factors associated with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* fecal carriage: A case-control study in a Spanish tertiary care hospital. *American Journal of Infection Control*, 45(1), pp.77-79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.024>.

- Martínez-Martínez, L., 2008. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, pp.82-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154531>.
- Martínez-Martínez, L. et al., 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert review of anti-infective therapy*, 6(5), pp.685-711.
- Martínez-Martínez, L. & Calvo, J., 2010. Development of resistances to antibiotic drugs: causes, consequences and importance to the public health system. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28 Suppl 4, pp.4-9.
- Martínez-Martínez, L. & González-López, J.J., 2014. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 32 Suppl 4, pp.4-9.
- Martínez-Martínez, L. & Ruíz de Alegría, C., 2009. Escherichia coli resistente a gentamicina y sensible a amikacina. En J. I. Alós et al., eds. *Atlas del Antibiograma*. Biomérieux University, pp. 141-143.
- Martínez, M.J. et al., 2010. Available carbapenems: Properties and differences. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28 Suppl 2, pp.53-64.
- Maseda, E. et al., 2017. Risk factors for colonization by carbapenemase-producing enterobacteria at admission to a Surgical ICU: A retrospective study. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(6), pp.333-337. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X16300027> [Accedido diciembre 19, 2018].
- Mathers, A.J., Peirano, G. & Pitout, J.D.D., 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp.565-591.
- Matsumura, Y. et al., 2017. Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), pp.2249-2258. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28520983> [Accedido febrero 21, 2019].

Bibliografía

- Mazel, D. et al., 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), pp.1568-1574.
- Mazel, D., 2006. Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), pp.608-620.
- McConville, T.H. et al., 2017. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS ONE*, 12(10). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186195> [Accedido diciembre 19, 2018].
- Miro, E. et al., 2013. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(2), pp.253-259.
- Mohammad Ali Tabrizi, A. et al., 2018. Outbreak of hypervirulent Klebsiella pneumoniae harbouring blaVIM-2 among mechanically-ventilated drug-poisoning patients with high mortality rate in Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15, pp.93-98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29981456> [Accedido febrero 21, 2019].
- Munday, C.J. et al., 2004. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(3), pp.628-33. Available at: <http://academic.oup.com/jac/article/54/3/628/742065/Predominance-and-genetic-diversity-of-community> [Accedido abril 26, 2019].
- Munoz-Price, L.S. et al., 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(9), pp.785-796.
- Munson, E. & Carroll, K.C., 2019. An Update on the Novel Genera and Species and Revised Taxonomic Status of Bacterial Organisms Described in 2016 and 2017. *Journal of clinical microbiology*, 57(2). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30257907> [Accedido septiembre 23, 2019].
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K. & Carattoli, A., 2017. Klebsiella pneumoniae: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), pp.252-275.

- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4), pp.593-656. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=309051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nordmann, P., Dortet, L. & Poirel, L., 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), pp.263-272.
- Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L., 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, 17(10), pp.1791-1798.
- Ørskov, I. & Ørskov, F., 1984. 4 Serotyping of Klebsiella. *Methods in Microbiology*, 14(C), pp.143-164.
- Oteo, J. et al., 2009. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(3), pp.524-528. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkp211> [Accedido enero 31, 2019].
- Oteo, J. et al., 2014. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 32 Suppl 4, pp.17-23.
- Oteo, J. et al., 2015. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), pp.3406-3412.
- Oteo, J. et al., 2015. Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing enterobacteriaceae among patients admitted to ICUs in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(10), pp.2916-2918.
- Padilla-Serrano, A. et al., 2018. Factores de riesgo de colonización por enterobacterias multirresistentes e impacto clínico. , pp.5-10.
- Pagani, L. et al., 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), pp.4264-4269.

Bibliografía

- Pagès, J.M., James, C.E. & Winterhalter, M., 2008. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), pp.893-903.
- Palacios-Baena, Z.R. et al., 2016. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *Journal of Infection*, 72(2), pp.152-160.
- Paño-Pardo, J.R. et al., 2013. Infections caused by oxa-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), pp.89-96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045224> [Accedido febrero 6, 2019].
- Papadimitriou-Olivgeris, M. et al., 2017. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in critically ill patients: risk factors and predictors of mortality. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(7), pp.1125-1131.
- Papagiannitsis, C.C. et al., 2010. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* of a novel sequence type (ST383) producing VIM-4, KPC-2 and CMY-4 β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(6), pp.573-574. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863669> [Accedido febrero 21, 2019].
- Papagiannitsis, C.C. et al., 2013. OmpK35 and OmpK36 porin variants associated with specific sequence types of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy*, 25(4), pp.250-254. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906079> [Accedido abril 27, 2019].
- Papagiannitsis, C.C. et al., 2015. Survey of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008-11. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(7), pp.1981-1988. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article/70/7/1981/775574> [Accedido marzo 20, 2019].
- Papp-Wallace, K.M. et al., 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), pp.4943-4960.
- Park, C.H. et al., 2006. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), pp.3953-3955.
- Partridge, S.R. et al., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons:

- Review article. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), pp.757-784.
- Paul, D. et al., 2016. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), p.31. Available at: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-016-0146-0>.
- Peleg, A.Y. & Hooper, D.C., 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*, 362(19), pp.1804-1813.
- Pepperell, C. et al., 2002. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), pp.3555-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384364> [Accedido abril 26, 2019].
- Pérez-Moreno, M.O. et al., 2012. Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaDHA-1 and qnrB4 genes within a novel complex class 1 integron. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(2), pp.210-211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445644> [Accedido abril 26, 2019].
- Perez-Perez, F.J. & Hanson, N.D., 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), pp.2153-2162.
- Pérez-Vázquez, M. et al., 2016. Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(4), pp.887-896.
- Pérez Guerrero, P. et al., 2014. Infecciones por enterobacterias. *Medicine (Spain)*, 11(55), pp.3276-3282.
- Perilli, M. et al., 2013. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2), pp.218-221. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153971> [Accedido febrero 21, 2019].
- Pitart, C. et al., 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), pp.4398-4401.

Bibliografía

- Pitout, J. & Laupland, K.B., 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), pp.159-166.
- Pitout, J.D. et al., 1998. beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), pp.1350-1354.
- Pitout, J.D. & Laupland, K.B., 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet. Infectious diseases*, 8(3), pp.159-166.
- Poirel, L. et al., 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), pp.15-22.
- Poirel, L. et al., 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), pp.119-123. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398074> [Accedido noviembre 9, 2017].
- Poirel, L., Potron, A. & Nordmann, P., 2012. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), pp.1597-1606.
- Porres-Osante, N. et al., 2014. First Description of a bla VIM-2-Carrying *Citrobacter freundii* Isolate in Spain. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 58. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099> [Accedido marzo 25, 2019].
- Poulou, A. et al., 2013. Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), pp.3176-3182.
- Quiroga, M.P. et al., 2007. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), pp.4466-4470.
- Ramirez, M.S. & Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), pp.151-171.
- Robilotti, E. & Deresinski, S., 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *F1000prime reports*, 6, p.80-80. eCollection 2014.

- Rodríguez-Baño, J. et al., 2018. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(2), pp.e00079-17. Available at: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00079-17>.
- Rowe-Magnus, D.A. & Mazel, D., 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 292(2), pp.115-125.
- Ruiz-Garbajosa, P. et al., 2016. A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(2), pp.348-352.
- Ruiz-Garbajosa, P. et al., 2013. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(11), pp.2487-2492.
- Ruiz, E., Ocampo-Sosa, A.A., et al., 2012. Acquisition of carbapenem resistance in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strains harbouring bla_{CTX-M-15}, qnrS1 and aac(6')-Ib-cr genes. *Journal of Medical Microbiology*, 61(5), pp.672-677.
- Ruiz, E. et al., 2010. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of aac(6')-Ib-cr and qnrS1 genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(7), pp.464-469.
- Ruiz, E., Sáenz, Y., et al., 2012. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), pp.886-897. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223228> [Accedido abril 26, 2019].
- Sabaté, M. et al., 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(7), pp.1970-3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858363> [Accedido abril 26, 2019].
- Sabaté, M. & Prats, G., 2002. Structure and function of integrons. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 20(7), pp.341-345.

Bibliografía

- Saladin, M. et al., 2002. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. , 209.
- Sánchez-Romero, I. et al., 2012. Nosocomial Outbreak of VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Multilocus Sequence Type 15: Molecular Basis, Clinical Risk Factors, and Outcome. Available at: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8> [Accedido febrero 6, 2019].
- Shahid, M., 2010. *Citrobacter* spp. Simultaneously Harboring blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, blaampC, and Insertion Sequences IS26 and orf513: an Evolutionary Phenomenon of Recent Concern for Antibiotic Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), pp.1833-1838. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220171> [Accedido abril 26, 2019].
- Sidjabat, H.E. et al., 2014. Expansive spread of IncI1 plasmids carrying blaCMY-2 amongst *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(3), pp.203-208. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25052868> [Accedido abril 3, 2019].
- Stokes, H.W. et al., 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*, 188(16), pp.5722-5730.
- Suarez, C. & Gudiol, F., 2009. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 27(2), pp.116-129.
- Suárez, C.J. et al., 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2), pp.85-93.
- Tenover, F.C. et al., 1995. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis : Criteria for Bacterial Strain Typing. , 33(9), pp.2233-2239.
- Tischendorf, J., De Avila, R.A. & Safdar, N., 2016. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *American Journal of Infection Control*, 44(5), pp.539-543. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5262497/pdf/nihms820396.pdf> [Accedido diciembre 20, 2018].

- Toleman, M.A. & Walsh, T.R., 2011. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), pp.912-935.
- Tórtola, M.T. et al., 2005. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two Enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), pp.3492-3494.
- Tsai, Y.K. et al., 2011. Klebsiella pneumoniae Outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), pp.1485-1493.
- Tsai, Y.K. et al., 2013. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of Klebsiella pneumoniae contribute to varied susceptibility to different carbapenems. *PLoS ONE*, 8(11). Available at: www.plosone.org [Accedido enero 14, 2019].
- Vílchez, G. & Alonso, G., 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), pp.6-12.
- Vinue, L. et al., 2008. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in Escherichia coli isolates in a Spanish hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 57(7), pp.916-920. Available at: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47723-0> [Accedido abril 26, 2019].
- Vinué, L., 2010. *Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de Escherichia coli*. Universidad de la Rioja.
- Voulgari, E. et al., 2013. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece involving an ST11 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), pp.84-88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945916> [Accedido febrero 6, 2019].
- Walsh, T.R. et al., 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*, 18(2), pp.306-325.
- Walther-Rasmussen, J. & Højby, N., 2007. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), pp.470-482.

Bibliografía

- Wang, A. et al., 2008. Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC infectious diseases*, 8, p.68.
- Webster, D.P. et al., 2010. Emergence of carbapenem resistance due to porin loss in an extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strain during meropenem therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(6), pp.575-576.
- Wei, Q. et al., 2009. dfrA27, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2), pp.405-406.
- Weill, F.X. et al., 2004. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), pp.5767-5773.
- Woodford, N., Turton, J.F. & Livermore, D.M., 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), pp.736-755.
- Wyres, K.L. & Holt, K.E., 2016. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends in Microbiology*, 24(12), pp.944-956. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.007>.
- Xia, W. et al., 2016. Characterization of integrons and novel cassette arrays in bacteria from clinical isolates in China, 2000-2014. *Journal of Biomedical Research*, 30(4), pp.292-303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27533938> [Accedido abril 25, 2019].
- Yamane, K. et al., 2008. Plasmid-mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), pp.1564-1566.
- Zhang, R. et al., 2017. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Strains in China. *EBioMedicine*, 19, pp.98-106. Available at: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> [Accedido abril 9, 2019].
- Zhao, W.-H. & Hu, Z.-Q., 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(1), pp.79-101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697133> [Accedido abril 26, 2019].
- Zhao, W. & Hu, Z., 2011. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in

Gram-negative bacilli. *Future Microbiology*, 6(3), pp.317-33. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21449842>.

Zhao, W.H. & Hu, Z.Q., 2015. Acquired metallo-beta-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. *Future microbiology*, 10, pp.873-887.

