



Universidad
Zaragoza



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS EN UN HOSPITAL TERCIARIO

TRABAJO FIN DE MÁSTER INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

CURSO 2022-2023

María Riesgo Magaña

Dirigido por:

Cristina Seral García

Francisco Javier Castillo García

1. Introducción.....	4
1.1 Estado de la cuestión y dimensión del problema	4
1.2 Familia Enterobacteriaceae	5
1.3 Antibióticos β-lactámicos.....	9
1.3.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.....	9
1.3.2 Estructura y clasificación.....	10
1.4 Mecanismos de resistencia a los antibióticos	18
1.4.1 Transferencia horizontal de mecanismos de resistencia.....	18
1.4.2 Mecanismo de resistencia a β -lactámicos	19
1.4.3 β -lactamasas	21
1.4.4. Carbapenemasas	24
1.4.5 Mecanismos de resistencia a otros antibióticos relacionados.....	28
2. Objetivos.....	30
3. Material y métodos	32
3.1 Estudio de las características clínicas y epidemiológicas.....	32
3.2 Selección de cepas.....	32
3.3 Identificación y estudio de la sensibilidad a antibióticos	32
3.4 Estudio de sensibilidad a nuevas combinaciones de β-lactámicos e inhibidores de β-lactamasas y A Cefiderocol.	34
3.5 Detección fenotípica de mecanismos de resistencia	35
3.5.1 Detección fenotípica de carbapenemasas	35
3.5.2 Detección fenotípica de ESBL y AMPC	37
3.6 Caracterización de resistencias por inmunocromatografía	39
3.6.1 Para la detección de ESBL CTX-M (NG-Test CTX-M MULTI, Next Generation, Biotech).	40
3.6.2 Para la diferenciación de carbapenemasas (NG-Test Carba 5, Next Generation, Biotech).	40
3.7 Detección molecular de mecanismos de resistencia.	41
3.7.1 Técnicas de amplificación del ADN.	41
3.7.2 Secuenciación masiva	41
4. Resultados	43
4.1 Estudio epidemiológico y caracterización de las cepas productoras de carbapenemasas.....	43

4.1.2 Distribución de las cepas portadoras de carbapenemasas.....	43
4.2 Estudio de cepas portadores de mecanismos de resistencia para antibióticos β-lactámicos.....	44
4.3 Selección de cepas.....	49
4.4 Estudio de sensibilidad de las cepas productoras de carbapenemasas.....	50
4.4.1 Estudio de la sensibilidad antibiótica de las cepas productoras de carbapenemasas.....	50
4.4.2 Estudio de la sensibilidad a cefiderocol y nuevas combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas.....	51
4.5 Detección de los fenotipos de resistencia.....	53
4.6 Caracterización de resistencias por inmunocromatografía.....	54
4.6.1 Carbapenemasas.....	55
4.6.2 BLEE CTX-M.....	55
4.6.3 Estudio y validación de una nueva inmunocromatografía (Certest).....	56
4.7 Presencia de mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos por métodos de amplificación de ADN.....	56
4.8 Estudio de genes de resistencia a β-lactámicos de las cepas portadoras de carbapenemasas por secuenciación masiva.....	57
4.8.1 Detección de mecanismos de resistencia a β -lactamasas.....	58
4.8.2 Caracterización del secuenciotipo y carbapenemasa.....	60
4.8.3 Detección de mecanismos asociados de resistencia a otros microorganismos.....	61
4.9 Comparación de los métodos fenotípicos, inmunocromatográficos y moleculares para la caracterización de enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	63
5. Discusión.....	64
5.1 Epidemiología y distribución de las carbapenemasas en <i>Enterobacteriaceae</i> en la actualidad: un problema cada vez más preocupante.....	64
5.2 Estudio de sensibilidad y genes de resistencia a antibióticos no β-lactámicos.....	68
5.3 Clones de alto riesgo: <i>K. pneumoniae</i>.....	70
5.4 Epidemiología y caracterización otras especies de enterobacterias productoras de carbapenemasas en nuestro estudio.....	73
5.5 Evaluación de los métodos fenotípicos y moleculares para la detección de carbapenemasas.....	74
5.6 Limitaciones del estudio.....	76

6. Conclusiones.....	77
7. Bibliografía.....	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTADO DE LA CUESTIÓN Y DIMENSIÓN DEL PROBLEMA

Las bacterias resistentes a antibióticos y su propagación se ha visto notablemente incrementada en los últimos años, estando en muchos casos asociada con el aumento de mortalidad y del coste económico. Por ello, la organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2017 una lista de patógenos prioritarios para la búsqueda de nuevos antibióticos (Tabla 1).

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multiresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos.

Tabla 1.- Lista de patógenos prioritarios (OMS).

CRÍTICA	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	resistente a los carbapenémicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	resistente a los carbapenémicos
<i>Enterobacteriaceae</i>	resistente a los carbapenémicos, productoras de ESBL
ELEVADA	
<i>Enterococcus faecium</i>	resistente a la vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	resistente a la claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i>	resistente a las fluoroquinolonas
<i>Salmonella spp.</i>	resistentes a las fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	resistente a las cefalosporinas, resistente a las fluoroquinolonas
MEDIA	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	sensibilidad disminuida a la penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	resistente a la ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	resistente a las fluoroquinolonas

Para la detección de bacterias multirresistentes, desde el laboratorio de microbiología se hace una vigilancia activa de estos microorganismos con el fin de controlar y evitar su propagación.

Los planes de prevención, detección y control de bacterias multirresistentes están coordinados desde el PRAN (Plan nacional de Resistencia a Antibióticos). Este es un plan estratégico y de acción que comenzó en 2014 y en el que participan profesionales y colaboradores expertos cuyo principal objetivo es reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antibióticos y, consecuentemente, reducir el impacto de este problema sobre la salud de las personas y los animales, preservando de manera sostenible la eficacia de los antibióticos existentes.

Resultante de la aplicación del PRAN en la Comunidad Autónoma de Aragón, nace IRAS-PROA. Un programa integral de vigilancia y prevención de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y de optimización del uso de antibióticos, siendo una de sus estrategias la implementación de la secuenciación masiva del genoma completo en la búsqueda de resistencias bacterianas de enterobacterias productoras de carbapenemasas.

1.2 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con mayor importancia clínica. Se han descrito 47 géneros y existen diversos grupos que recogen todo un conjunto de *Enterobacteriaceae* que no se han clasificado aún (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy). Estos géneros se clasifican en función de características bioquímicas, estructura antigénica, análisis molecular de sus genomas y composición de proteínas(1). La mayoría de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son flora comensal intestinal y sólo algunas de ellas constituyen el grupo de patógenos más comunes en el ser humano (Tabla 2).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos y no forman esporas. Todos los miembros son aerobios/anaerobios facultativos y crecen en medios no selectivos (agar chocolate) y selectivos (agar MacConkey). Tienen requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa positivos y oxidasa negativos (a excepción del género *Plesiomonas*).

Tabla 2.- Principales *Enterobacteriaceae*

Citrobacter	freundii
	<i>koseri</i>
Enterobacter	<i>cloacae</i>
Escherichia	<i>coli</i>
Hafnia	<i>alvei</i>
Klebsiella	<i>aerogenes</i>
	<i>pneumoniae</i>
	<i>oxytoca</i>
	<i>granulomatis</i>
Morganella	<i>morganii</i>
Plesiomonas	<i>shigelloides</i>
Providencia	<i>stuarti</i>
	<i>rettgeri</i>
Proteus	<i>mirabilis</i>
Salmonella	<i>enterica</i>
Serratia	<i>marcescens</i>
Shigella	<i>dysenteriae</i>
	<i>flexneri</i>
	<i>boydii</i>
	<i>sonnei</i>
Yersinia	<i>pestis</i>
	<i>enterocolitica</i>
	<i>psudotuberculosis</i>

De esta forma podemos diferenciar especies de enterobacterias que poseen capacidad patógena primaria causando infecciones en personas sanas como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y algunos serotipos de *Escherichia coli* (como *E. coli* enterohemorrágico serotipo O157:H7) y patógenos causantes de las infecciones oportunistas, siendo los más prevalentes: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Citrobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*.

La pared celular de las enterobacterias está compuesta por una estructura de varias membranas (Figura 1). La membrana externa es una bicapa lipídica que compone la mayor parte de la pared celular, y está compuesta por fosfolípidos, proteínas y polisacáridos. Los lípidos y polisacáridos se unen a la membrana externa y forman un complejo denominado lipopolisacárido (LPS). La proporción lipídica del LPS está anclada a la membrana externa y se denomina lípido A, el cual es una endotoxina formada por ácidos grasos insaturados. La región de polisacáridos forma el core o núcleo y en su extremo se encuentra una región hidrofílica formada por una secuencia repetitiva de azúcares denominada polisacárido específico O. Las variaciones de los azúcares son las responsables de la especificidad del antígeno somático O y virulencia de estas bacterias.

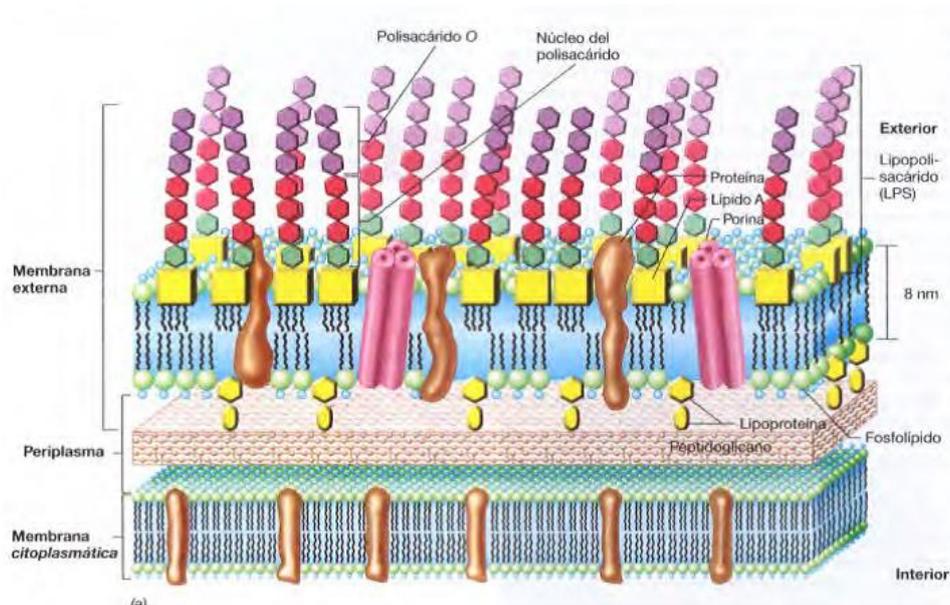


Figura 1.- La pared celular de las bacterias gramnegativas (3).

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 poros de agua a través de los cuales puede pasar cualquier tipo de sustancia de pequeño tamaño. Por el contrario, las porinas específicas contienen una zona de unión para un tipo específico de sustancia. La membrana más interna se denomina membrana citoplasmática, y está constituida por lípidos y proteínas.

Entre la membrana externa y la membrana citoplasmática se encuentra el espacio periplásmico, conteniendo diversas enzimas hidrolíticas y proteínas implicadas en el transporte de sustratos y la síntesis de la pared celular.

El peptidoglicano o mureína es otro componente esencial de la pared celular. Se encuentra inmerso en el espacio periplásmico y anclado por las

lipoproteínas a la membrana externa. Frente a bacterias Gram positivas que constituye cerca del 90% de su estructura, en bacterias Gram negativas sólo representa cerca del 10% del total de la pared celular. 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 de forma que proporciona rigidez y resistencia a la pared celular (2).

Las enterobacterias tienen una estructura antigénica compleja. Además del antígeno somático O visto anteriormente, las cepas móviles tienen unas proteínas (las flagelinas) que se localizan en los flagelos y constituyen el antígeno flagelar H. La mayoría de las enterobacterias son móviles, a excepción de los géneros *Klebsiella* y *Shigella*. Las cepas móviles están rodeadas por flagelos peritricos un gran número de enterobacterias poseen, asimismo, fimbrias comunes y pili sexuales. Las fimbrias comunes están codificadas por el cromosoma y son las que dan la capacidad de la bacteria a adherirse a receptores específicos de la célula anfitriona, mientras que los pili sexuales o conjugativos facilitan el proceso de transferencia genética entre las bacterias.

La familia *Enterobacteriaceae* está asociada a una gran variedad de enfermedades como bacteriemia, infecciones intraabdominales, respiratorias, urinarias... Existen diversos grupos de antimicrobianos con actividad frente a enterobacterias. Los antibióticos más utilizados en estas infecciones son los β -lactámicos seguidos de otras familias de antimicrobianos como los aminoglucósidos o las quinolonas. Sin embargo, las bacterias han ido desarrollando mecanismos de resistencia a los antibióticos. Esto, asociado al mal uso de los antibióticos, que ha permitido seleccionar cepas multirresistente, hace que su erradicación sea cada vez más complicada, urgiendo la necesidad de nuevos fármacos para la eliminación de las bacterias multirresistentes (3).

1.3 ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, con muy buenas características farmacocinéticas y escasa toxicidad, razón por la cual son de amplia utilidad. Algunas modificaciones moleculares de los β -lactámicos de síntesis natural han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencias limita su uso empírico y su eficacia. Aun así, la penicilina continúa siendo el tratamiento de elección en un amplio número de infecciones; las cefalosporinas tienen un amplio espectro de uso; los carbapenémicos se usan en infecciones nosocomiales y en infecciones causadas por bacterias multiresistentes, y los inhibidores de las β -lactamasas permiten recuperar el espectro de actividad de las penicilinas a las que acompañan cuando la resistencia está causada por la producción de enzimas β -lactamasas (4).

1.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos inhiben la síntesis de peptidoglicano en su última etapa, impidiendo la formación de la pared bacteriana a través de dos mecanismos de acción: mediante la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y por inducción de la autólisis bacteriana. El final de la síntesis de la pared bacteriana se produce por la pérdida del aminoácido terminal que forma parte del pentapéptido del peptidoglicano. Esto se produce gracias a unas enzimas con actividad transpeptidasa que se localizan en el espacio periplásmico. El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas (el extremo D-Alanina). A estas enzimas, impiden la síntesis de la pared celular. Estas enzimas reciben el nombre de PBP (Penicilin Binding Proteins), porque son la diana de los antibióticos β -lactámicos. 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 (5).



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

1.3.2 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

La presencia del anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos: determina el mecanismo de acción (inhibe la síntesis de la pared celular), su escasa toxicidad (actúa bloqueando las enzimas que sintetizan el peptidoglicano, componente esencial de la pared celular propio de las bacterias) y el principal mecanismo de resistencia (β -lactamasas). Sin embargo, es necesaria la unión de otros radicales al anillo β -lactámico central para obtener diferentes propiedades: mejora de la farmacocinética y farmacodinamia, espectro de acción... Además, esto también da lugar a diferentes grupos de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactams e inhibidores de las β -lactamasas (6).

a) Penicilinas:

Están constituidas por un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, que forman un núcleo "penamo" o 6-amino-penicilánico(6-APA). A este núcleo, en el carbono 6 del anillo β -lactámico, se le une una cadena lateral variable que conferirá a cada β -lactámico las diferentes características farmacocinéticas y antibacterianas.

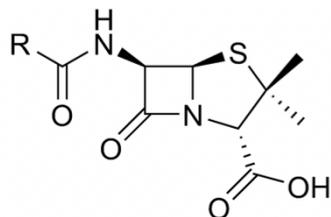


Figura 3.- Estructura química de las penicilinas

Según su espectro de acción, pueden clasificarse en:

- **Penicilinas de primera generación** (bencilpenicilina o penicilina G y fenoxi-alquil-penicilina o penicilina V): su espectro de actividad abarca bacterias Gram positivas y algunos cocos gramnegativos (como *Neisseria meningitidis*).

- **Penicilinas antiestafilocócicas** (metecilina, isoxazolil-penicilinas: cloxacilina): se emplean para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus* resistentes a penicilina por producción de una β -lactamasa plasmidica o penicilinasa.
- **Aminopenicilinas** (ampicilina, amoxicilina): su espectro de acción es un poco más amplio, ya que además de tener el mismo espectro que la penicilina G, actúan también frente a bacterias del género *Enterococcus*, *Listeria*, algunas enterobacterias y *Haemophilus*. Tienen como ventaja que se administran vía oral. Sin embargo, son inestables frente a las β -lactamasas estafilocócicas y de muchos bacilos Gram negativos.
- **Penicilinas antipseudomónicas:** las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) y las ureidopenicilinas (piperacilina) presentan buena actividad frente a bacilos gramnegativos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, sobre todo las ureidopenicilinas.

b) Cefalosporinas:

La estructura de las cefalosporinas se origina de la unión del anillo β -lactámico con un anillo de dihidrotiazina, lo que origina el llamado núcleo cefemo. A partir del hongo *Cephalosporium acremonium* se obtuvieron las cefalosporinas naturales C, N y P, siendo la C la base de las nuevas cefalosporinas. A partir de ella se obtiene el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que ha sido modificado con diferentes cadenas laterales, dando lugar a diferentes generaciones.

Las modificaciones realizadas en la molécula van encaminadas a aumentar el espectro, mejorar las propiedades farmacológicas e incrementar la resistencia frente a las β -lactamasas. Las variaciones introducidas en el carbono 7 (C7) del 7-ACA modifican su actividad antibacteriana, la sustitución en posición 3 del anillo dihidrotiazínico origina modificaciones de carácter farmacocinético, y la presencia del grupo metiltiotetrazol en posición 3 del anillo dihidrotiazolidínico está relacionado con efectos adversos como alteraciones de la coagulación e intolerancia al alcohol. Las moléculas con un grupo metoxi en posición 7 del 7-ACA constituyen el grupo de las cefamicinas.

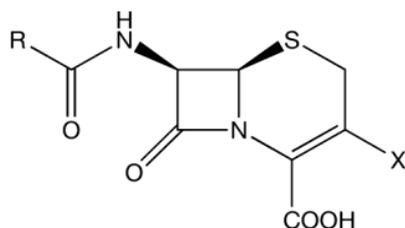


Figura 4.- Estructura química de las cefalosporinas.

Las cefalosporinas se clasifican en cuatro generaciones en función de sus características generales de acción antimicrobiana:

- **Cefalosporinas de primera generación:** su espectro de acción son los cocos grampositivos (*Staphylococcus aureus sensible a meticilina*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*) y tienen una actividad moderada frente a las gramnegativas más sensibles. Dentro de esta generación, se encuentran la cefalotina, cefazolina, cefalexina, etc.
- **Cefalosporinas de segunda generación** incluye un grupo heterogéneo caracterizado por un incremento del espectro de acción frente a gramnegativos. Se caracterizan por ampliar su espectro frente a algunas enterobacterias oportunistas, *H. influenzae* y *Moraxella catharralis*. Sin embargo, disminuye su actividad frente a Gram positivos. Son, por ejemplo, cefuroxima y cefaclor.
Dentro de esta segunda generación cabe destacar un grupo, las cefamicinas o 7- α -metoxi-cefalosporinas. Son activas frente a algunas enterobacterias y, además, proporcionan estabilidad frente a la hidrólisis por β -lactamasas. Cefoxitina y cefotetán representan el grupo de las cefamicinasas.
- **Cefalosporinas de tercera generación** son mucho más activas frente a gramnegativos y anaerobios, y proporcionan un aumento de la resistencia a las β -lactamasas con respecto a las anteriores generaciones. Pero esto supone que sean menos activas que las cefalosporinas de primera generación frente a los cocos Gram positivos. Se caracterizan por una elevada actividad sobre las enterobacterias, y algunas, como ceftazidima, frente a *P. aeruginosa* y otros gramnegativos no fermentadores. Las más importantes son cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefixima.
- **Cefalosporinas de cuarta generación** son moléculas que se caracterizan por presentar un amplio espectro, tanto frente a grampositivos como estreptococos y estafilococos, aunque con menor actividad que las cefalosporinas de primera generación; como a gramnegativos, incluida *P. aeruginosa*. Las mejores características de las cefalosporinas de cuarta generación se deben a que atraviesan mejor la pared celular y el aumento en la afinidad por PBP. Cefepime y cefpirome son las únicas cefalosporinas que pertenecen a este grupo.
- **Cefiderocol (7):** es la primera cefalosporina siderófora aprobada para el tratamiento de infecciones graves de bacterias gramnegativas. Es estable frente a las cuatro clases de β -lactamasas de Ambler, incluidas las metalobetalactamasas. La estructura química del cefiderocol es similar a la cefepima, una cefalosporina de cuarta generación, con una diferencia importante en la presencia de un grupo catecol en la cadena lateral en la posición 3 de cefiderocol. Este catecol actúa como un compuesto sideróforo que se une al hierro libre y se transporta activamente a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas hacia el espacio periplásmico utilizando el sistema de transporte activo de sideróforo de la bacteria.

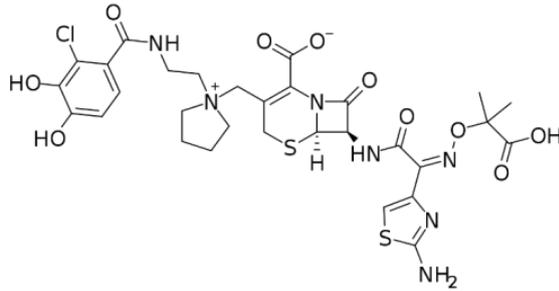


Figura 5.- Estructura química del cefiderocol.

c) Monobactams

Los monobactams se caracterizan por ser monocíclicos, es decir, tienen en su estructura un solo anillo β -lactámico(8). Son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA), y el único con actividad clínica es el aztreonam. Este compuesto posee actividad únicamente frente a bacterias gramnegativas aerobias como enterobacterias, *Pseudomonas spp.*, *Neisseria spp.* y *Haemophilus influenzae*, pero carece de actividad contra grampositivos y anaerobios.

El aztreonam, a diferencia de otros β -lactámicos, es una monobactama que contiene un grupo sulfónico que le confiere su actividad. Es sobre todo bactericida, actuando principalmente en el tercer y último paso de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose de forma irreversible a determinadas PBPs. De los varios tipos de PBPs, el aztreonam muestra mayor afinidad con la PBP-3, responsable de la producción del septum durante la división celular. La inhibición de la pared celular ocasiona la elongación de la bacteria con rotura de la pared y finalmente acaba con la lisis y muerte de la bacteria. Además, el aztreonam no favorece la producción de β -lactamasas inducibles.

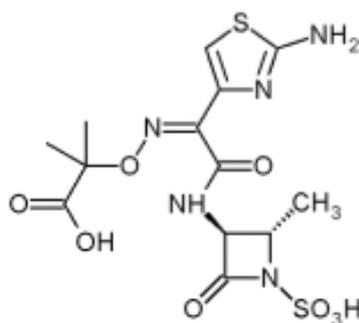


Figura 6.- Estructura química del Aztreonam.

- **Meropenem:** Es un derivado dimetilcarbamoílico pirolidinílico de la tienamicina, y tiene la ventaja de no necesitar ser administrado con cilastatina porque no es sensible a la dehidropeptidasa renal (12). Su acción es similar al imipenem pero es más activo contra *Acinetobacter spp.* y algunas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, pero muestra menor actividad contra cocos grampositivos.
- **Ertapenem:** su espectro de actividad contra grampositivos, enterobacterias y anaerobios lo convierte en un fármaco muy empleado en infecciones graves de adquisición comunitaria, ya que carece de actividad frente a *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores.
- **Doripenem:** es similar o ligeramente superior a meropenem en gramnegativos, equivalente a imipenem en grampositivo.

Frente a enterobacterias todos los carbapenémicos poseen una elevada actividad intrínseca, tanto en cepas sensibles como en resistentes a otros antimicrobianos, incluidos los β -lactámicos.

Todos los carbapenem son estables frente a la mayoría de las β -lactamasas clínicamente significativas: β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y cefamicinasas plasmídicas tipo AmpC si bien, son sensibles a la acción de las carbapenemasas (13).

e) Inhibidores de las β -lactamasas

El mecanismo más importante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción bacteriana de enzimas que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos, se denominan β -lactamasas.

Desde que se detectó la primera β -lactamasa, se han desarrollado diferentes moléculas que son capaces de unirse de forma irreversible a las β -lactamasas e inhibir su acción. Además, cuentan con una baja actividad antibacteriana. Los inhibidores de β -lactamasas se comportan como inhibidores suicidas de los antibióticos β -lactámicos, y para ejercer su acción deben ser hidrolizados previamente por una β -lactamasa. Debido a que el centro activo de la enzima está preparado para actuar específicamente en el anillo β -lactámico, las sustancias inhibidoras de las β -lactamasas se parecen estructuralmente al antibiótico. Por tanto, cuando la enzima bacteriana rompe e hidroliza el anillo, la enzima queda unida de forma covalente y no puede seguir actuando sobre otras moléculas(14).

Estos agentes se asocian a un β -lactámico de forma que lo protege de la destrucción por β -lactamasas, aumentando así su espectro. Los empleados en clínica son el ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam, avibactam y recientemente se han incorporado el vaborbactam y relebactam (15).

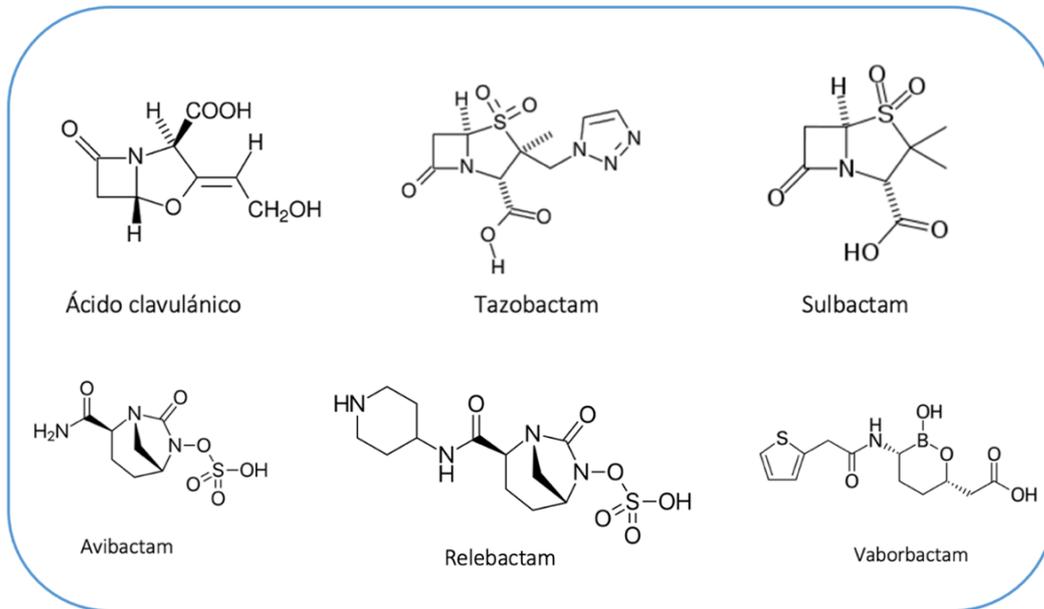


Figura 8.- Inhibidores de β -lactamasas.

- **Ácido clavulánico.** El ácido clavulánico fue el primer inhibidor suicida descrito en la literatura (16), se obtiene de *Streptomyces clavuligerus*. Contiene un anillo β -lactámico en su estructura química y difiere de las penicilinas G y V en el segundo anillo, que es una oxazolidina en vez de tiazolidina. El ácido clavulánico se une fuertemente cerca del sitio activo de las β -lactamasas, bloqueando su actividad y mejorando los efectos antibacterianos. En la práctica clínica se combina con amoxicilina.
- **Sulbactam:** es un inhibidor semisintético, su anillo β -lactámico se une irreversiblemente a la enzima y previene la degradación del antibiótico β -lactámico. Se combina con ampicilina y cefoperazona. Su espectro es similar al de amoxicilina/clavulánico, con la diferencia que ésta tiene actividad frente a *Acinetobacter baumannii* cuando se combina con ampicilina y sobre *P. aeruginosa* cuando se combina con cefoperazona.
- **Tazobactam.** Pertenece a la clase de ácidos penicilánicos en donde uno de los metilos unidos al anillo β -lactámico ha sido sustituido por un grupo triazol. Se combina habitualmente con piperacilina.
- **Avibactam:** pertenece a la clase de los azabicicloalcanos, en donde un hidrogeno del grupo amino en posición 6 es sustituido por un grupo

sulfóxido. Es estructuralmente diferente de otros inhibidores porque no contiene el anillo β -lactámico clásico. Presenta un mecanismo de acción novedoso, en donde el anillo se abre, pero su unión es reversible. Este mecanismo favorece una gran eficacia para inhibir la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos que ejercen tanto las β -lactamasas plasmídicas como las cromosómicas. Se combina con ceftazidima y meropenem.

- **Relevactam:** es un diazabicyclooctano que difiere de la estructura del avibactam por la presencia de piperidina en el carbono 2 del grupo carbamoil. Este anillo se carga positivamente a pH fisiológico, lo que favorece su retención en el interior celular bacteriano, debido a que no puede ser expulsado gracias a su carga, mejorando su actividad. Se combina con imipenem/cilastatina.
- **Vaborbactam:** su estructura la constituye un ácido borónico cíclico. que tiene alta afinidad sobre las serin β -lactamasas, gracias a la formación de una unión covalente entre el boro y el resto de serina de la enzima. Se utiliza en combinación con meropenem.

Existen otros nuevos inhibidores de β -lactamasas. **Zidebactam**, que se combina con cefepime, ha demostrado eficacia en la inhibición de enterobacterias productoras de β -lactamasas tipo AmpC, ESBL, K1, KPC y OXA-48 like, *P. aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. En la actualidad, no está comercializado en España. Otro es **Nacubactam** (aún en ensayos clínicos). Tiene un mecanismo de acción dual: inhibe a las serin β -lactamasas (clase A, C y algunas de clase D) y también presenta alta afinidad de unión por las PBP₂ de las bacterias Gram negativas. Esta combinación también es efectiva frente a *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos y frente a las metalo- β -actamasas por un mecanismo de acción similar a avibactam (17).

e) Nuevas combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas (17):

- **Ceftolozano/tazobactam:** esta combinación tiene un amplio espectro frente a Gram positivos y Gram negativos aerobios y anaerobios, incluyendo aquellas productoras de β -lactamasas plasmídicas, como las de espectro extendido y *Pseudomonas spp.*
- **Ceftazidima/avibactam:** presenta actividad invitro frente a infecciones graves causadas por gramnegativos, incluyendo una amplia gama de β -lactamasas de amplio espectro, AMPc, carbapenemasas de *K. pneumoniae*, OXA-48 producida por enterobacterias y aislados de *P. aeruginosa* multiresistente. Avibactam no es activo frente a metalo- β -lactamasas producidas por *Acinetobacter baumannii*. La eficacia clínica de ceftazidima/avibactam ha demostrado no ser menor que la terapia con carbapenémicos.

- **Imipenem-cilastatina/relebactam:** presenta actividad frente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y frente a enterobacterias productoras de ESBL y resistentes a carbapenémicos. La combinación no es activa frente a OXA-48 ni metalo- β -lactamasas.
- **Meropenem/vaborbactam:** su uso se restringe al tratamiento de gramnegativos resistentes a carbapenémicos. Tiene actividad in vitro frente enterobacterias productoras de KPC, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Aunque estas combinaciones han demostrado tener un amplio espectro de acción, recientemente se están notificando casos de resistencia, lo que aumenta el problema, ya creciente, en la búsqueda de alternativas terapéuticas para bacterias multiresistentes (18).

1.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antimicrobianos es un problema con implicaciones terapéuticas, epidemiológicas, microbiológicas y de salud pública (19).

La resistencia a los antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La primera de ellas la presentan las bacterias de forma natural y se asocia a genes cromosómicos. La resistencia adquirida puede obtenerse como consecuencia de la adquisición de nuevo material genético procedente de otras bacterias. Esta información puede estar contenida en plásmidos, transposones o integrones, que se transfieren de manera horizontal entre bacterias; o alcanzarse por mutaciones cromosómicas en el DNA originadas por errores en su replicación en presencia del antibiótico, y se transmitirá de manera vertical a sus células hijas.

Con frecuencia, estos mecanismos no se desarrollan de forma aislada, sino que nos encontramos que las cepas resistentes a una familia de antibióticos también lo es a otras familias con mecanismos de acción o resistencia diferentes, proporcionando a la bacteria un nivel de resistencia mayor a los antibióticos. Esto produce que los tratamientos sean insuficientes, lo que conlleva un fracaso terapéutico (20,21).

1.4.1 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Las bacterias pueden intercambiar material genético y así adquirir los distintos genes de resistencia lo que se denomina transferencia horizontal de resistencia. Estos mecanismos pueden ser:

a) Transformación. Consiste en la adquisición de ADN por parte de la bacteria receptora a partir de ADN libre en el medio. Para que el fragmento de ADN pueda incorporarse al material genético de la bacteria receptora, es necesario que posea cierta homología.

b) Transducción. En este caso, la transferencia del material genético se realiza de una bacteria a otra a través de un bacteriófago, virus que infectan exclusivamente a las bacterias.

c) Conjugación. Para que se produzca es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo. En los microorganismos gramnegativos participa en el proceso un pili conjugativo, a través del cual se produce el intercambio de material genético. Este mecanismo es el más frecuente en las bacterias gramnegativas para la movilización de genes de resistencia de antibióticos.

La transferencia horizontal de ADN mediante conjugación está mediada por plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, bicateriano, circular y autorreplicativas. No codifica funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria que lo contiene. Sin embargo, le aporta ventajas a la bacteria, ya que puede proporcionarle, por ejemplo, genes de resistencia a diferentes antibióticos. Algunos plásmidos son transferibles mediante conjugación (plásmidos conjugativos) y otros necesitan la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria (plásmidos no conjugativos móviles)(22).

Además de los mecanismos de transmisión horizontal, el ADN exógeno puede adquirirse mediante otros elementos genéticos móviles o transponibles. Estos tienen la propiedad de traslocarse e insertarse sitio de un genoma a otro del mismo genoma, cromosómico o plasmídico, o de otra bacteria. En este proceso, estos elementos pueden movilizar junto a ellos genes de resistencia que estaban en su interior, o crear una delección o pérdida de bases, lo que puede traducirse en una inactivación de los genes. Dentro de los elementos transponibles encontrados destacan dos: las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn).

1.4.2 MECANISMO DE RESISTENCIA A B-LACTÁMICOS

Los mecanismos de resistencia a antimicrobianos que se conocen en las bacterias son: alteración de la permeabilidad de la membrana y pérdida de porinas, modificación enzimática del antimicrobiano, rotura enzimática del antimicrobiano, expulsión activa del antimicrobiano, modificación o hiperproducción de la diana de acción y/o desarrollo de nuevas vías metabólicas (19) (Figura 9).

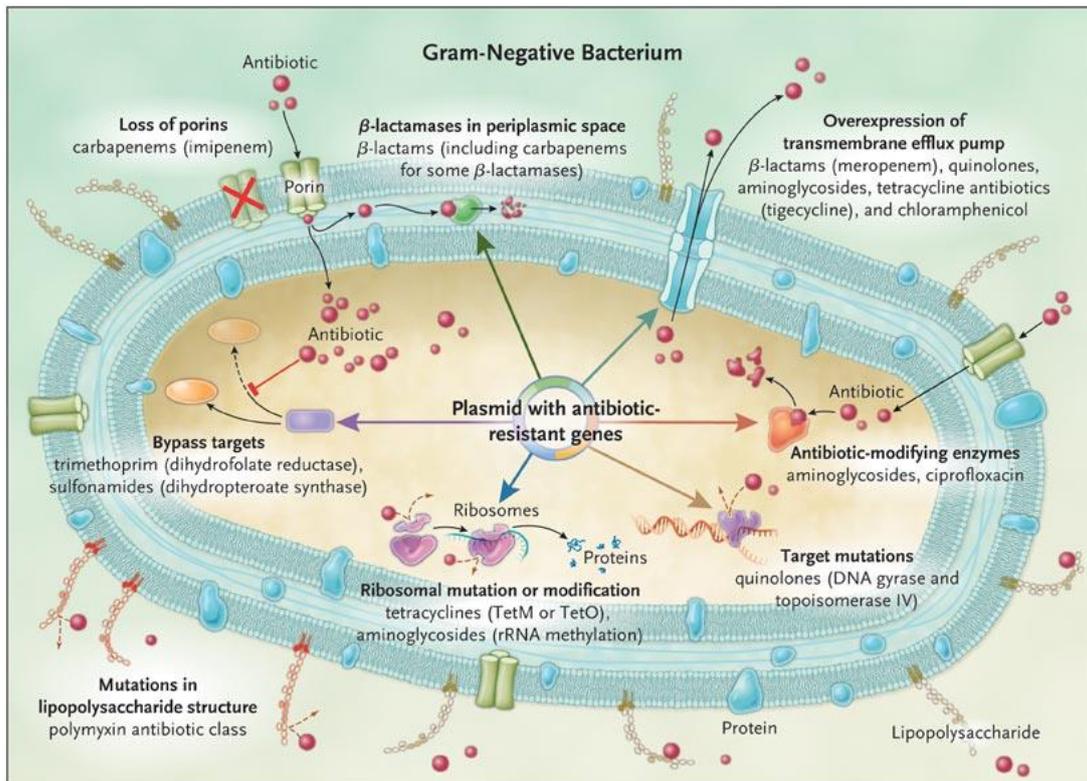


Figura 9.- Mecanismos de resistencias en bacterias Gram negativas (19).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a esta familia de antibióticos por diferentes mecanismos:

- Reducción de la permeabilidad de la membrana:** los β -lactámicos son sustancias poco lipófilas, por lo que necesitan proteínas (poros) para facilitar la entrada al espacio periplásmico para unirse a su diana. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión, dando en consecuencia bacterias deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de los β -lactámicos. Esta barrera es una defensa que utilizan muchas bacterias. En el caso de los carbapenems, la pérdida de porinas no suele conferir una resistencia propiamente dicha, sino que eleva los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) sin superar los puntos de corte de resistencia. En enterobacterias, intervienen diferentes porinas en el transporte de carbapenémicos, pero son las porinas de gran tamaño las más importantes en este proceso, siendo las que deben perderse para disminuir significativamente la permeabilidad de la membrana externa a los carbapenémicos (19).

- **Expulsión del antibiótico mediante bombas de expulsión:** algunos microorganismos desarrollan unos sistemas de bombeo muy eficaces mediante los cuales expulsan al exterior de la célula bacteriana los antibióticos (ej: *Pseudomonas aeruginosa*). En enterobacterias no se ha descrito la participación de este tipo de bombas en el desarrollo de resistencia a carbapenémicos.
- **Modificación de la diana de acción,** las PBP (Penicilin Binding Protein), mediante mutaciones o modificación de la afinidad, que dificulta la unión del β -lactámico a la proteína. Este mecanismo es muy frecuente en los microorganismos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).
- **Por hidrólisis enzimática del anillo β -lactámico** por enzimas β -lactamasas: se inactiva al antibiótico antes de su unión con las PBP. Este mecanismo de resistencia es el principal en bacterias Gram negativas (5). Su producción puede estar mediada por plásmidos o codificada en el cromosoma. En el primer caso, pueden ser transferibles y suelen ser inactivadas por los inhibidores de las β -lactamasas.

1.4.3 β -LACTAMASAS

El mecanismo de acción de las β -lactamasas se basa en la formación de un complejo no covalente con el anillo β -lactámico. En esta unión enzima-sustrato se forma una estructura acil-enzima por unión del antibiótico con el grupo hidroxilo de la serina del centro activo. Finalmente se libera el producto de la hidrólisis, quedando la enzima nuevamente libre para su acción.

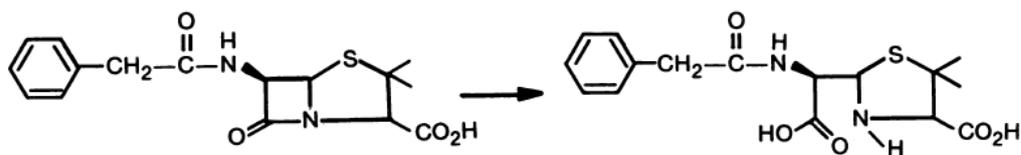


Figura 10.- Hidrólisis de la bencilpenicilina por una β -lactamasa (23).

En 1983 se descubrió en Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más amplio espectro (SHV-2), inaugurando el capítulo de las BLEE (6) Entre 1986 y 1992 aparecieron, casi simultáneamente, las primeras CTX-M en diferentes países. El grupo CTX-M ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria. Se han aislado en casi todas las enterobacterias, en particular en *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter*. Actualmente se detectan, sobre todo, en *E. coli* y en pacientes con infecciones contraídas en la comunidad, produciéndose un flujo de

aislados desde este ambiente al medio hospitalario. Su éxito epidemiológico se debe a la presencia de genes bla_{BLEE} en elementos móviles (plásmidos o transposones) y su asociación a integrones, más que a su diseminación clonal, como SHV y TEM.

En 1991, en Turquía, y más tarde en Francia, se detectaron por primera vez oxacilinasas, que se inhibían débilmente por el ácido clavulánico pero que conferían, por lo demás, un fenotipo similar al de las BLEE. Resultaron ser mutantes de las β -lactamasas tipo OXA, la mayoría de OXA-10. Estas, aunque principalmente afectan a *Pseudomonas*, también se han descrito en enterobacterias (24).

Las β -lactamasas se han clasificado en función a su estructura molecular o según su función:

Clasificación molecular: en función de su estructura proteica(25) , 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 (o metalobetalactamasas) requieren un ión de zinc divalente, y son las llamadas metaloenzimas.

Clasificación funcional: en función de sus características bioquímicas y funcionales (23). 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 esta clasificación, las β -lactamasas quedan divididas en 4 grupos, que se relacionan más fenotípicamente con lo que se ve en la clínica. Estos grupos son:

- Grupo 1: tienen acción cefalosporinasa, no se inhiben ni con ácido clavulánico ni EDTA.
- Grupo 2: formado por enzimas con acción cefalosporinasa y penicilinasas, ni con posibilidad de ser inhibidas por ácido clavulánico.
- Grupo 3: se correlacionan con las metaloproteasas (grupo B) y por lo tanto, se inhiben con EDTA pero no con ácido clavulánico.
- Grupo 4: son las penicilinasas no inhibibles por ácido clavulánico, como algunas producidas alguna *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 3.- Clasificación de β -lactamasas (adaptada de Bush & Jacoby (23))

Grupo Bush	Clase Ambler	Sustratos preferidos	Inhibidos por:		Enzimas representativas
			Ác. 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	Carbencilinas	Sí	No	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencilinas, 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, IND-1
3b	B	Carbapenémicos	No	Sí	CphA, Sfh-1

La resistencia a los carbapenémicos en bacterias Gram negativas ocurre principalmente por la combinación de dos o más de los mecanismos de resistencia antes mencionados. Si bien, lo más frecuente es la producción de carbapenemasas o β -lactamasas del grupo AmpC.

Las β -lactamasas tipo AmpC o cefalosporinas pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros y a la clase C de la clasificación

estructural de Ambler. Se caracterizan por hidrolizar penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactams, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. 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 carbapenem. Los genes *bla*_{AmpC}, que se encuentran en el cromosoma de algunos bacilos gramnegativos, se han integrado en elementos genéticos transferibles, lo que ha permitido su difusión a microorganismos que carecen de forma natural de *ampC* cromosómico o lo expresan a bajo nivel. La prevalencia de las infecciones causadas por bacterias productoras de AmpC plasmídica varía en función del tipo de enzima y la localización geográfica, siendo *bla*_{CMY-2} la enzima de distribución más universal (26). 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 (26).

1.4.4. CARBAPENEMASAS

El mecanismo más importante de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias es la producción de carbapenemasas, aunque dicha resistencia también puede ser debida a la combinación de β -lactamasas tipo AmpC o, en menor medida, β -lactamasas de espectro extendido, combinadas, como hemos indicado, con la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, ya que por sí solas su capacidad hidrolítica frente a carbapenems es muy pobre (18). Algunos estudios han identificado la alteración de las PBP como otro posible mecanismo causante de la resistencia a carbapenems en enterobacterias (27,28).

Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan carbapenémicos, pero también actúan frente a otros β -lactámicos, aunque su espectro depende de la especificidad de cada enzima. Además, son resistentes a la acción de inhibidores de β -lactamasas (como el ácido clavulánico o el tazobactam). 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.

Tabla 4.- Perfiles hidrolíticos de carbapenemasas descritas en Enterobacterias (29).

Clase molecular	Penicilinas	Cefalosporinas de 1 y 2	Cefalosporinas de 3 y 4	Ácido clavulánico/ EDTA	Aztreonam
A	+	+ ^a	+/V	±/-	+ ^b
B	+	+	+	-/+	-
D	+	+	-	-/±	±

V: variable. ^aCefamicinas no suelen ser sustrato de las carbapenemasas de clase A. ^b Algunas enzimas tipo GES no hidrolizan Aztreonam.

En un principio, la resistencia a carbapenémicos sólo fue descrita en algunas especies de bacilos Gram negativos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*, pero cada vez se encuentra en la literatura más casos de enterobacterias portadoras de estas enzimas, aunque de manera casual (30). La situación es cada vez más preocupante dado que estas enzimas se localizan en elementos genéticos móviles pudiendo diseminarse entre diferentes especies. Además, otros determinantes de resistencia suelen estar albergados en las mismas estructuras pudiendo transferirse de forma conjunta y provocar la multiresistencia (31).

Las carbapenemasas se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler (25) que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010, en la que se establecen 3 grupos (23):

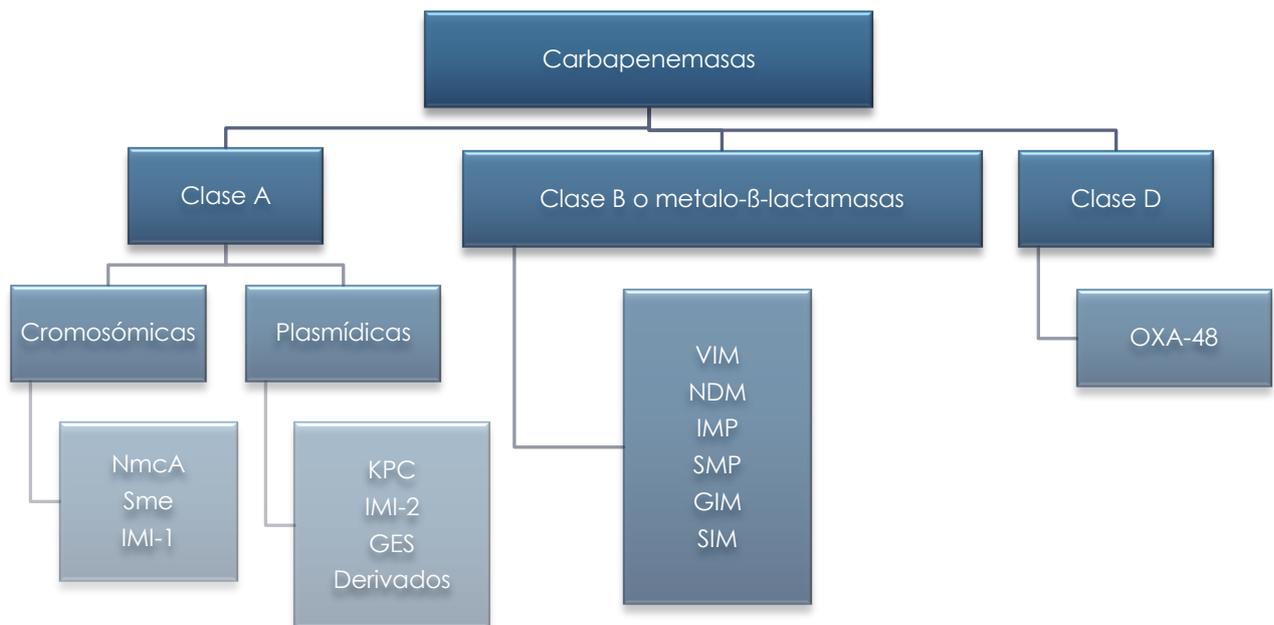


Figura 11.- Clasificación de carbapenemasas.

La clase A de Ambler corresponde con el grupo 2f de Bush y Jacoby. Son las que presentan mayor diversidad y distribución. Se caracterizan por la capacidad para hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenems; y han sido identificadas en enterobacterias y en bacilos gramnegativos no fermentadores. Su actividad es inhibida por ácido borónico, pero parcialmente por ácido clavulánico y tazobactam.

- **Sme** (“*Serratia marcescens* enzyme”), **IMI-1** (imipenem-hydrolyzing β -lactamasas), **NmcA** (“not metallo enzyme carbapenemase”): estos tres grupos enzimáticos están codificados por genes cromosómicos. Hidrolizan a diferentes sustratos como penicilinas, algunas cefalosporinas, aztreonam y carbapenems. Las enzimas IMI fueron descubiertas en 1984 en Estados Unidos en *Enterobacter cloacae* (30).
- **GES** (Guiana Extended-Spectrum β -lactamasas): fueron descubiertas en el año 2000. 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 (22).
- **KPC** “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”: Dentro de las carbapenemasas de clase A, son las enzimas con mayor importancia epidemiológica. Desde la primera descripción en 1996 en Carolina del Norte en *Klebsiella pneumoniae*, las bacterias productoras de KPC se han propagado por todo el mundo. En la actualidad se han descrito 24 alelos del gen bla_{KPC} (32). La enzima KPC se encuentra codificada por el gen bla_{KPC} , localizado en el transposón Tn4401, derivado de Tn3, o en elementos genéticos similares a Tn4401, el que a su vez se encuentra portado, principalmente en plásmidos, aunque también ha sido informado en el cromosoma (33).

La clase B de Ambler (grupos 3a y 3b) comprende las carbapenemasas que actúan frente a todos los β -lactámicos excepto aztreonam. Son las llamadas metalo- β -lactamasas (MBLs), ya que son inhibidas por quelantes de cationes divalentes como el EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) 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 afectados por los inhibidores clásicos (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam). Entre ellas, encontramos diferentes enzimas como VIM, IMP, NDM, SPM, SIM y GIM, siendo las más importantes las tres primeras (33), las cuales se han descrito en todo el mundo y en Europa cobran especial importancia en Grecia, Francia y España.

- **VIM** (“Verona integron-encoded metallo- β -lactamase”): las primeras VIM fueron aisladas de una cepa de *P. 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*. Suelen estar codificadas en integrones de clase 1, dentro de transposones, junto con otros genes de resistencia como a aminoglucósidos, cloranfenicol y sulfonamidas dando lugar a cepas multirresistentes (34).

- **NDM** ("New Delhi metallo-beta-lactamase"): estas enzimas se han propagado rápidamente y ahora las encontramos en diferentes países, sobre todo en enterobacterias(35). En comparación con otras carbapenemasas, NDM-1 tiene unas características que son muy desconcertantes para la salud pública mundial debido a que el gen bla_{NDM-1} se encuentra en diferentes especies no relacionadas, y se propagan con frecuencia creciente en especies muy prevalentes como *K. pneumoniae* y *E. coli*.
- **IMP** ("active on imipenem"): la primera enterobacteria con el gen bla_{IMP} fue aislada en *Serratia marcescens* en Japón (36). 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. Suelen estar localizados en transposones y plásmidos, lo que facilita su diseminación.

La clase D de Ambler (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, siendo difícil su estudio por test fenotípicos con inhibidores. 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 ser subestimada (24). Estas enzimas han sido identificadas en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y enterobacterias (37). Hay descritas más de 400 tipos de β -lactamasas tipo OXA, de las cuales solo se consideran carbapenemasas 127 (grupo 2df de Bush), entre ellas, OXA-23, 27, 40, 48, 50, 51, 55 y 58, que se han identificado en el género *Acinetobacter* (38). El primer productor de OXA-48 fue identificado en una cepa de *K. pneumoniae* en Turquía en 2003 (39), y desde entonces su distribución ha sido tal que numerosos países de Europa y África.

1.4.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A OTROS ANTIBIÓTICOS RELACIONADOS.

La resistencia a β -lactámicos en enterobacterias y otros gramnegativos está mediada principalmente por β -lactamasas. Muchos tipos de estas enzimas son de gran relevancia clínica, y su producción origina microorganismos multiresistentes. El tratamiento antimicrobiano frente a estas cepas multiresistentes es cada vez más limitado, de forma que la selección de los agentes antimicrobianos adecuados depende de la sensibilidad in vitro de los mismos y del foco de la infección.

Además, estos microorganismos suelen presentar de forma concomitante resistencia a otros antimicrobianos usados en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones por enterobacterias productoras de β -lactamasas. Entre estos antimicrobianos figuran los aminoglucósidos, fluorquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol y la resistencia a los mismos suele ser por otros mecanismos asociados(40,41). Muchos aislados son sensibles a amikacina o gentamicina y la mayoría ~~de los aislados~~ son sensibles a tigeciclina y colistina (48). Existen estudios que demuestran la sinergia con el uso de tratamientos combinados, en especial con un carbapenémico más un agente activo (aminoglucósidos, colistina o tigeciclina)(42).

Las fluorquinolonas actúan sobre las enzimas topoisomerasas. Son antimicrobianos de amplio espectro muy usados en la práctica clínica. En los últimos años se ha observado un aumento en la tasa de resistencias, sobre todo en bacterias Gram negativas. En éstas, la diana principal es la ADN girasa (topoisomerasa II), codificada por el gen *gyrA*, primero en el que aparecieron mutaciones en una región concreta denominada «región determinante de la resistencia a quinolonas» (*quinolone resistance determining region (QRDR)*). El uso continuado de fluorquinolonas en bacterias que presentan primeras mutaciones en los genes *gyrA* producen consiguientes mutaciones en el gen *parC* (codificante de la topoisomerasa IV) finalizando con la resistencia a todas las quinolonas.

Otros mecanismos de resistencia que afectan a las fluorquinolonas son la pérdida de porinas y la sobreexpresión de bombas de eflujo. Como la alteración en la expresión de las bombas de eflujo *acrAB* que se ve afectada cuando se producen mutaciones en *acrA*, un represor de esta bomba, aumentando así su expresión y generando resistencia a quinolonas (43–45).

Hasta la fecha se han descrito 3 tipos de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas (DPRQ): los genes *qnr*, que codifican proteínas de repeticiones pentapeptídicas; la variante de una acetiltransferasa, *aac(6')-Ib-cr*, que afecta a quinolonas con un grupo piperazinil (por ejemplo, ciprofloxacino y norfloxacino), y las bombas de expulsión activa *OqxAB* (muy

frecuente en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae*) y QepA. En las 2 últimas décadas se está observado un aumento a nivel global de la prevalencia de los DPRQ (46,47). La resistencia a quinolonas es más frecuente en enterobacterias que presentan resistencia a β -lactámicos por producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), β -lactamasas de clase C adquiridas o carbapenemasas (48).

Los aminoglucósidos son antimicrobianos cuya diana de acción es el ribosoma, e interfieren en la síntesis de proteínas. Las bacterias Gram negativas pueden generar resistencia a estos antibióticos mediante tres mecanismos: alteración de la diana por mutaciones en el sitio de acción, disminución de la entrada del antibiótico por alteración de la membrana o por la producción de enzimas modificantes del aminoglucósido (AMEs). El principal mecanismo de resistencia en bacterias gramnegativas a estos antimicrobianos es la producción de una 16S RNA ribosilmetiltransferasa, que modifica el sitio activo de la diana, el sitio A del 16S RNA ribosómico (49). Este enzima esta codificado por el gen *armA*, y se ha demostrado que en *K. pneumoniae* puede transmitirse por plásmidos, generando resistencia a prácticamente todos los aminoglucósidos, incluido plazomicina (50).

Los genes codificantes de AMEs se dividen en tres grupos: gen *aac* que codifica para N-acetiltransferasas, *aad* (también denominadas *ants*) codifican para O-nucleotidiltransferasas y *aph* que codifican para fosfotransferasas. Estos genes se localizan en integrones o trasposones de plásmidos que codifican a su vez con frecuencia BLEE y carbapenemasas (51).

2. OBJETIVOS

Este estudio pretende contribuir a mejorar el tratamiento clínico de los pacientes con infecciones producidas por bacilos Gram negativos resistentes a antibióticos β -lactámicos y a estudiar su epidemiología y prevalencia con el fin de detectar su emergencia y limitar su propagación. El objetivo principal de este estudio es conocer cuál es la situación del Sector Sanitario de Zaragoza III en cuanto a los mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias de origen clínico, especialmente productoras de carbapenemasas, y su posible asociación con mecanismos de resistencia a otras familias de antimicrobianos como aminoglucósidos y fluorquinolonas.

Para lo que se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudiar las características epidemiológicas y clínicas de las infecciones causadas por cepas productoras de carbapenemasas.
- 2- Determinar la prevalencia de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de enterobacterias
- 3- Identificar las carbapenemasas producidas por enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems durante los años 2016-2022 en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
- 4- Estudiar la sensibilidad antibiótica de todas las cepas bacterianas seleccionadas.
- 5- Estudiar la sensibilidad de las cepas resistentes a carbapenémicos a las nuevas combinaciones de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasas y a Cefiderocol.
- 6- Determinar los fenotipos de resistencia a β -lactámicos por la producción de enzimas inactivantes en las cepas con sensibilidad disminuida a carbapenems.
- 7- Evaluar la eficacia de una nueva técnica inmunocromatográfica (Certest) para la detección de carbapenemasas.

- 8- Evaluar la eficacia y aplicabilidad de los métodos fenotípicos frente a los métodos moleculares utilizados para la detección de carbapenemasas en enterobacterias y de otros mecanismos de resistencia a β -lactámicos (producción de ESBL y AmpC).

- 9- Secuenciación genómica completa para el estudio de genes de resistencia, estudio del secuenciotipo y elementos de transmisión génica de las cepas de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenémicos aisladas durante ese periodo de tiempo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS.

Para el estudio de las características clínicas y epidemiológicas se han recopilado los datos demográficos de los pacientes y los microbiológicos de las cepas productoras de carbapenemasas mediante la Historia Clínica Electrónica de Aragón y el programa informático de laboratorio Modulab®.

Los datos se analizaron mediante Microsoft Excel (Microsoft Office).

3.2 SELECCIÓN DE CEPAS

Se ha estudiado la sensibilidad a β -lactámicos de un total de 46645 aislados de *Enterobacteriaceae* obtenidos de muestras clínicas entre enero de 2016 a julio de 2022 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Las cepas seleccionadas fueron aquellas con un perfil compatible con una sensibilidad disminuida a carbapenems según el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST):

Tabla 5.- Puntos de corte clínico y para el screening de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (EUCAST).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 μ g disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤ 2	> 0.125	≥ 22	$< 28^2$
Ertapenem ³	≤ 0.5	> 0.125	≥ 25	< 25

3.3 IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

La identificación bacteriana se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany). Posteriormente, se realizaron los estudios de sensibilidad por el sistema semiautomático de microdilución en caldo (MicroScan Walkaway®, Beckman Coulter).

Los criterios de sensibilidad del sistema Microscan están adaptados a las recomendaciones del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), clasificando las cepas como sensibles (S), con sensibilidad incrementada (EI) o resistentes (R).

En función de la muestra de la que proceden los aislados, se procede a seleccionar diferentes paneles en los que se testan un pool de antibacterianos, con diferencias en función de la vía de administración y la concentración ($\mu\text{g/mL}$). Estos se recogen en las siguientes tablas:

Antimicrobiano	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Antimicrobiano	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	8-16	Ampicilina	8-16
Amoxicilina/ácido clavulánico	8/4 – 16/8	Amoxicilina/ácido clavulánico	8/4 – 16/8
Piperacilina/ tazobactam	8-64	Piperacilina/ tazobactam	8-64
Cefuroxima	4-16	Cefuroxima	4-16
Cefoxitina	8-16	Cefoxitina	8-16
Ceftazidima	1-16	Ceftazidima	1-16
Cefotaxima	1-32	Ceftazidima/ác. Clavulánico	0,25/4-2/4
Cefepime	1-16	Cefotaxima	1-32
Imipenem	1-8	Cefotaxima/ác. Clavulánico	0,5/4-4/4
Ertapenem	0,5-4	Cefepime	0,5-4
Gentamicina	2-8	Aztreonam	1-16
Tobramicina	2-8	Imipenem	0,5-4
Amikacina	8-32	Meropenem	0,12-32
Nitrofurantoina	64	Ertapenem	0,5-4
Ácido nalidixico	16	Gentamicina	2-8
Norfloxacin	0,5-1	Tobramicina	2-8
Ciprofloxacino	0,5-2	Amikacina	0,5-2
Levofloxacino	0,5-2	Ácido nalidixico	16
Trimetoprim/sulfametoxazol	2/32	Ciprofloxacino	0,5-2
Fosfomicina	32-64	Levofloxacino	0,5-2
Colistina	4	Tigeciclina	1-2
		Trimetoprim/sulfametoxazol	2/32
		Fosfomicina	32-64

Tabla 6.- Antimicrobianos y concentraciones testadas en los paneles. A la izquierda, paneles orina. A la derecha, paneles para muestras invasivas.

Antimicrobiano	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	4-8
Ticarcilina	8-16
Piperacilina	8-16
Piperacilina/ tazobactam	8-16
Cefazolina	16
Cefuroxima	4-8
Cefoxitina	1-32
Ceftazidima	1-32
Ceftazidima/ác. Clavulánico	0,25-4
Cefotaxima	1-32
Cefotaxima/ác. Clavulánico	0,5-4
Cefixima	1
Cefepime	0,5-8
Aztreonam	1-4
Imipenem	1-8
Meropenem	0,12-32
Ertapenem	0,12-1
Gentamicina	2-4
Tobramicina	2-4
Amikacina	8-16
Nitrofurantoina	64
Norfloxacin	0,5-1
Ciprofloxacino	0,06-1
Levofloxacino	0,5-1
Tigeciclina	1-2
Trimetoprim/sulfametoxazol	2/38-4/76
Fosfomicina	16-64
Colistina	2-4
Mecilina	8
Trimetoprim	2-4
Ceftazidima/avibactam	2-8

Tabla 7.- Antimicrobianos para cepas multirresistentes.

3.4 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A NUEVAS COMBINACIONES DE β -LACTÁMICOS E INHIBIDORES DE β -LACTAMASAS Y A CEFIDEROCOL.

Se testó la sensibilidad a las nuevas combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas y Cefiderocol, con tiras de E-test, disponibles en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa para la determinación de CMI de ceftazidima/avibactam, ceftolozano/tazobactam y Meropenem/vaborbactam.

Para el estudio de la sensibilidad a Cefiderocol se usaron discos impregnados de antibiótico y se midió el halo de inhibición(52) .

Para la clasificación de las cepas en resistente, ATU (area of technical uncertainty) o sensible, se siguieron los criterios de EUCAST (clinical breakpoints para enterobacterias. Tabla 8).

- Ceftazidima/avibactam (0,016/4-256/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Ceftolozano/tazobactam (0,016/4-256/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Meropenem/vaborbactam (0,0.04-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Cefiderocol (30 μg).
-

Tabla 8.- Puntos de corte clínicos según criterios EUCAST.

	\leq	$R >$	ATU
<i>Ceftazidima/avibactam</i>	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
<i>Ceftolozano/tazobactam</i>	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
<i>Meropenem/vaborbactam</i>	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
<i>Cefiderocol</i>	22 mm	22 mm	18-22 mm

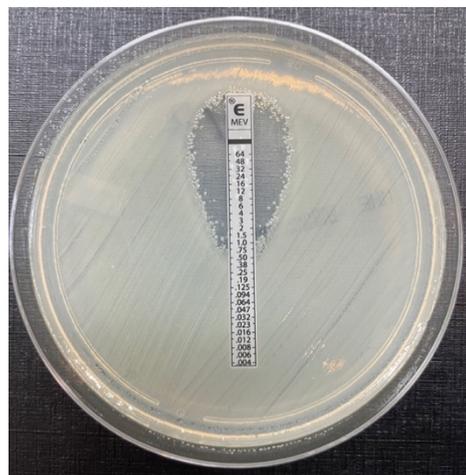


Figura 12.- E-test Meropenem/vaborbactam de una cepa sensible.

3.5 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

Para la detección fenotípica de diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos, se pueden emplear diferentes métodos. A continuación, se describen los que hemos empleado en todas las cepas que mostraron sensibilidad disminuida a carbapenems. En ellas se estudió la presencia de carbapenemasas, posible presencia de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) y/o de cefamicinasas o AmpC plasmídicas.

3.5.1 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

3.5.1.1 SIEMBRA EN MEDIO CHROMAGAR CPE® (BIOMÉRIEUX).

Se trata de un medio selectivo de alta sensibilidad en la detección de enterobacterias productoras de cualquier carbapenemasa, porque contiene una concentración de antibiótico carbapenémico ajustada a los criterios de EUCAST y CLSI para permitir el crecimiento de aquellas bacterias con sensibilidad disminuida a carbapenémicos. Además, es un medio diferencial, porque al ser cromogénico nos permite orientar la identificación entre diferentes especies de enterobacterias en función del que toman sus colonias:

- Azul: *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp.
- Rosa: *E. coli*.
- Blanco: *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp.

La identificación de género y especie se realizó, a partir del crecimiento en el agar cromogénico, por MALDI-TOF.



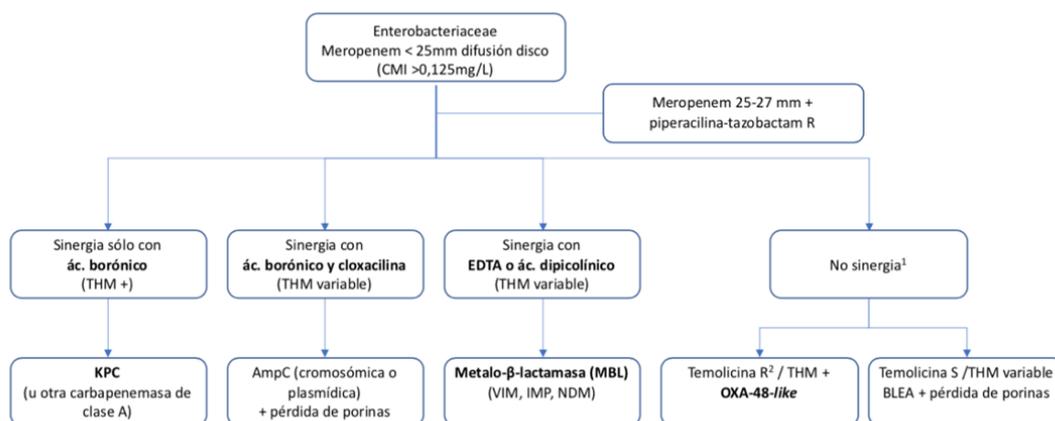
Figura 13.- Crecimiento de *Citrobacter freundii* en agar cromogénico CRE Brilliance (Oxoid®).

3.5.1.2 ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS

Este método permite determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas mediante difusión en agar con discos formados por compresión de granulados que contienen agentes antimicrobianos a una determinada concentración asociados a diferentes inhibidores de β -lactamasas. Se utilizó Neosensitab® Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) que incluye discos de meropenem 10 μ g, meropenem/ácido dipicolínico (DPA), meropenem/ácido borónico, meropenem/cloxacilina y temocilina 30 μ g.

Para ello, se prepara una suspensión bacteriana de la cepa a estudio con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland en solución salina estéril. Se siembra en una placa de agar Mueller-Hinton (bioMérieux) en forma de césped con ayuda de un hisopo estéril. A continuación se colocan los discos en la placa con distancia suficiente para no producir sinergias entre ellos. El antibiótico difundirá en un gradiente radial alrededor del disco. La placa se incuba a 37C° durante 18-24 horas.

El microorganismo que estamos estudiando crecerá en la placa, formando unos halos de inhibición (sin crecimiento) alrededor del disco, con diferente diámetro en función de la inhibición que puede, o no, ejercer el inhibidor de β -lactamasas. Esa distancia se mide en milímetros (mm) y la interpretación viene recogida en la Figura 14.



¹La combinación de varias carbapenemasas puede dar lugar a la no sinergia – ej. producción conjunta de MBL y KPC. La caracterización molecular es necesaria en estos casos.

²Alto nivel de resistencia a temolicina (>128 mg/L, diámetro de inhibición < 11mm) es un marcador fenotípico de OXA-48.

THM: test de hodge modificado.

Figura 14.- Algoritmo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Adaptado de EUCAST (53) y del procedimiento nº 38 de la SEIMC.

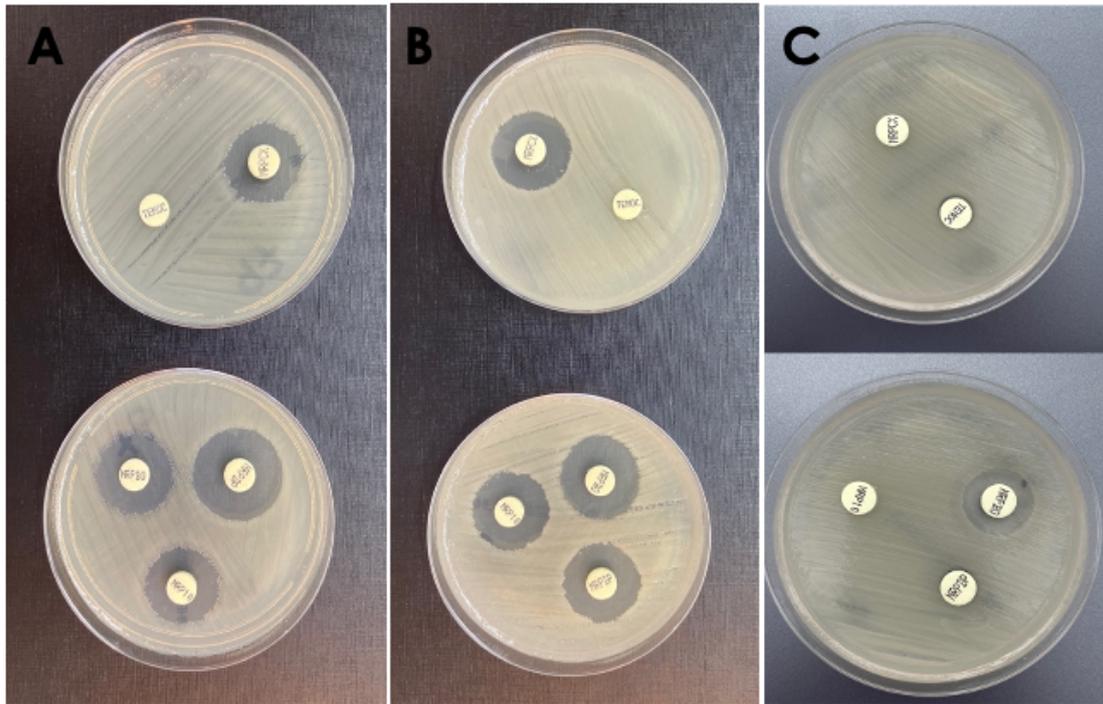


Figura 15.- Test sinergia de disco. A) Metallo-β-lactamasa. B) Carbapenemasa D OXA-48 like. C) Carbapenemasa clase A.

3.5.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE ESBL Y AMPC

3.5.2.1 SIEMBRA EN MEDIO CHROMID® ESBL (BIOMERIEUX).

Consiste en la siembra en un medio cromogénico, como se ha descrito previamente. En este caso contiene una concentración de una cefalosporina de acuerdo con los criterios de EUCAST y CLSI para permitir el crecimiento de bacterias productoras de ESBL. También nos permite orientar la identificación entre diferentes especies de enterobacterias en función del que toman sus colonias:

- Azul/verde o verde/amarronado: *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp. En cepas productoras de β-glucosidasa.
- Rosa o burdeos: *E. coli* productoras de betaglucuronidasa.
- Marrón oscuro a claro: *Proteus* spp, *Providencia* spp y *Morganella* spp. En cepas expresantes de deaminasa.

La identificación de género y especie se realizó tras el crecimiento en el agar cromogenico por MALDI-TOF.

Cabe destacar que este medio permite también el cribado de aquellas enterobacterias que portan una resistencia tipo AmpC.



Figura 16.- Crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en agar cromogénico ESBL CHROMOID (bioMérieux).

3.5.2.2 EPSILON-TEST (E-TEST®).

El cribado de enterobacterias productoras de ESBL y ampC se realizó mediante el sistema automatizado Microscan Walkaway de dilución en caldo. Para confirmar la presencia de ESBL se realizó el método E-test con una tira de celulosa impregnada en diluciones crecientes, con cefalosporinas diferentes con y sin distintos inhibidores de β -lactamasas:

- Cefotaxima, CT (0,25-16 μ g/mL) y cefotaxima-ácido clavulánico, CTL (0,016-1 μ g/mL) (bioMérieux).
- Ceftazidima, TZ (0,5-32 μ g/mL) y ceftazidima-ácido clavulánico, TZL (0,064-4 μ g/mL) (bioMérieux).
- Cefepime, PM (0,25-16 μ g/mL) y cefepime-ácido clavulánico, PMI (0,064-4 μ g/mL) (bioMérieux).
- Cefotetan, CN, (0,5-32 μ g/mL) y cefotetán/cloxacilina, CNI, (0,5-32 μ g/mL) (bioMérieux).

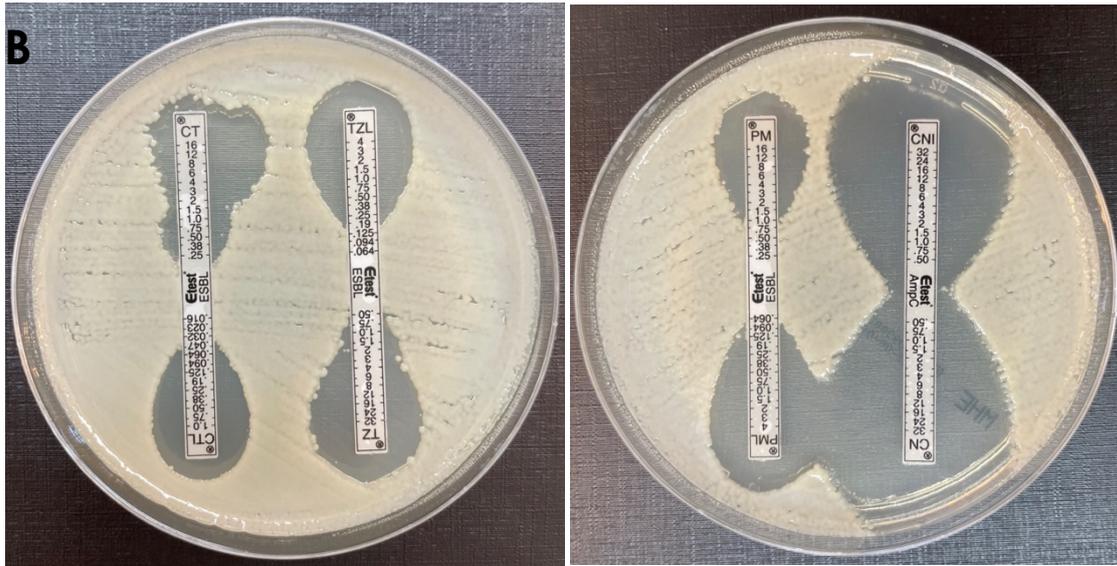


Figura 17.- E-test para la detección de ESBL con A) cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulánico y ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulánico de una cepa productora de BLEE. B) E-test de Cefepime/Cefepime-ácido clavulánico y para la detección de AmpC se añade la tira de E-test de cefotetán/cefotetán-cloxacilina. Resultado positivo para BLEE, negativo para AmpC.

3.6 CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIAS POR INMUNOCROMATOGRAFÍA

Para confirmar la presunción fenotípica de carbapenemasas y/o ESBL diferentes tipos de ESBL y carbapenemasas se hizo uso de inmunocromatografías. Se trata de una prueba rápida de inmunoensayo, cualitativa, para la detección de ESBL del grupo CTX-M y carbapenemasas. La prueba se realiza mediante la suspensión de una colonia en los reactivos y la dispensación de esta mezcla en el pozo de una placa. Esta placa está compuesta por una membrana de nitrocelulosa donde se encuentran inmovilizados en la "zona T" anticuerpos monoclonales anti-enzimas de resistencia (CTX-M, OXA...). Existe una línea control C formada por estreptavidina marcada y anticuerpos monoclonales que reaccionan con biotina-BSA y anticuerpos policlonales inmovilizados en la membrana, esta "zona C" actúa de control positivo. La muestra migra a lo largo de la placa hacia la almohadilla de conjugado, y si están presentes las enzimas de resistencia, estas reaccionan con los anticuerpos, generando una línea roja que se interpreta como "positivo".

3.6.1 PARA LA DETECCIÓN DE ESBL CTX-M (NG-TEST CTX-M MULTI, NEXT GENERATION, BIOTECH).

La inmunocromatografía es una prueba rápida que permite detectar enzimas CTX-M de los grupos mas relevantes clínicamente y de sus variantes pertenecientes al mismo cassette: grupo 1 (CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101 y -182), grupo 2 (CTX-M-2), grupo 8 (CTX-M-8), grupo 9 (CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -38, -65, -93) y 25 (CTX-M-94, -100).

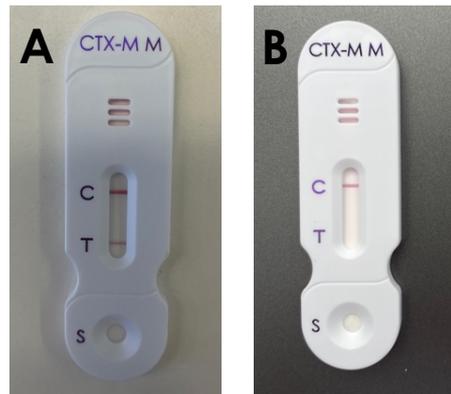


Figura 18.- Inmunocromatografía CTX-M. A) Resultado positivo. B) Resultado negativo.

3.6.2 PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CARBAPENEMASAS (NG-TEST CARBA 5, NEXT GENERATION, BIOTECH).

La inmunocromatografía Carba 5 permite la detección y diferenciación de las 5 carbapenemasas mas prevalentes: NDM, IMP, VIM, OXA-48 y KPC.

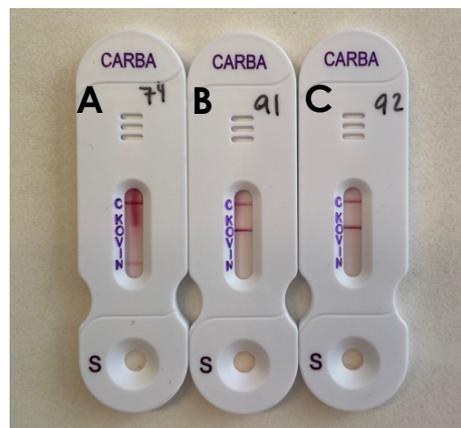


Figura 19.- Inmunocromatografía para la detección de carbapenemasas: A) Cepa productora de NDM. B) y C) Cepas productoras de OXA-48.

3.7 DETECCIÓN MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTENCIA.

3.7.1 TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN.

A raíz del hallazgo y desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han ido surgiendo variantes de esta técnica, entre las que se encuentra la técnica de “amplificación isotérmica mediada por bucle” (LAMP). LAMP es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos que, a diferencia de la PCR, se lleva a cabo a una temperatura constante y no requiere un termociclador. Diversos estudios han demostrado que LAMP es una herramienta muy útil para la rápida detección de mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas, incluso de muestra directa de orina y sangre (54,55).

La detección genotípica se llevó a cabo en todas las cepas archivadas (n=15). Para ello se empleó la técnica de amplificación molecular LAMP (Eazyplex® Superbug CRE, Amplex), en la que además de las carbapenemasas más prevalentes (NDM, VIM, OXA-48 y KPC), se detectan y distinguen diferentes ESBL (CTX-M de los grupos 1 y 9 y OXA-181).

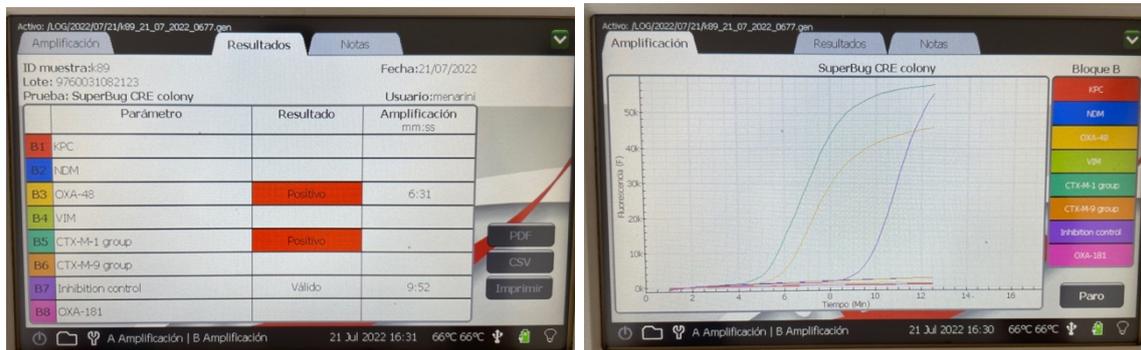


Figura 20.- Resultado positivo de una cepa productora de OXA-48 y BLEE CTX-M del grupo 1 en Eazyplex® Superbug CRE (Amplex).

3.7.2 SECUENCIACIÓN MASIVA

3.7.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y MEDIDA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DEL ÁCIDO NUCLEICO.

Las cepas a estudio se resembraron en agar Muller-Hinton (Biomériéux) con un disco de Ertapenem (30 µg). A las 24h se realizó la suspensión de colonias en 200 µL de agua libre de DNasas y se realizó la extracción en el extractor

automático magLEAD® 12cG (Precision System Science Co). Se eluyó a volúmenes de 100 µL.

La cuantificación y medida de la calidad del ácido nucleico obtenido fueron determinadas por un método fluorimétrico (QUBIT, INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific).

3.7.2.2 SECUENCIACIÓN POR SÍNTESIS DE ILLUMINA

Se realizó secuenciación masiva de las cepas seleccionadas (n=13) siguiendo el protocolo ARTIC por la plataforma Illumina iSeq 100, que proporciona lecturas pareadas de 150 pb.

3.6.2.3 ANÁLISIS DE DATOS.

Los datos finales de la secuenciación, tras el estudio de la calidad mediante el programa FastQC, se analizaron en la página oficial de "Center for Genomic Epidemiology" (<https://www.genomicepidemiology.org>), un recurso gratuito para poder analizar secuencias concretas del genoma. A partir de los datos obtenidos en formato FASTq se recurrió a los recursos disponibles: RESfinder para el estudio de genes de resistencia (56) y Multi Locus Sequence Typing (MLST) para determinar el secuenciotipo.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.

4.1.2 DISTRIBUCIÓN DE LAS CEPAS PORTADORAS DE CARBAPENEMASAS.

Durante el periodo de estudio controlamos la aparición de las enterobacterias portadoras de carbapenemasas y su distribución temporal. Las 15 cepas detectadas, pertenecen a 9 pacientes. La edad media fue de 66 años y en su mayoría (67%) eran hombres.

Los casos se han distribuido a lo largo de todo el periodo de estudio, observando una distribución homogénea en su presentación anual, con un ligero aumento, con 4 casos, en el 2018.

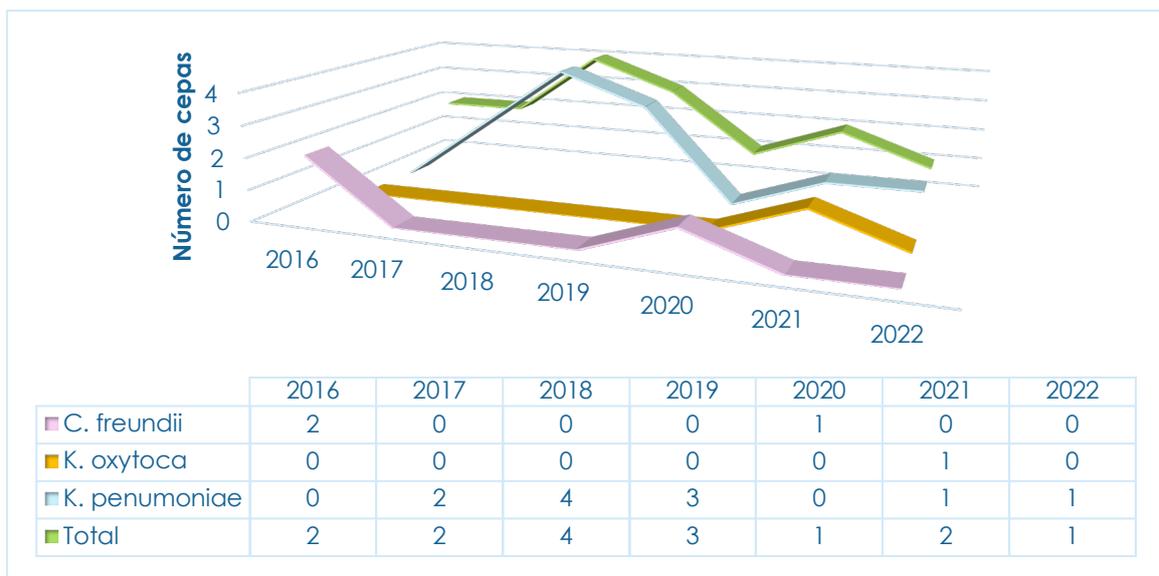


Figura 21.- Distribución del número de casos por especie a lo largo del periodo de estudio.

Según su procedencia, 1 caso (6,7%) fue de origen ambulatorio y 14 (93,3%) de origen hospitalario. Los servicios de los que procedían las muestras fueron: principalmente UCI (56%), seguida de angiología vascular, cirugía general, traumatología y urología, en igual proporción (11%); representados en la Figura 23.

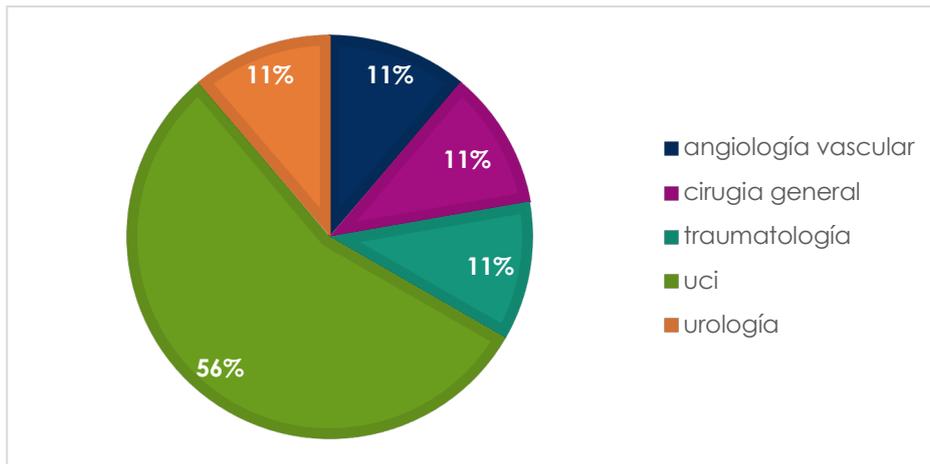


Figura 22.- Distribución por servicios de origen de las cepas portadoras de carbapenemasas.

En cuanto a las muestras clínicas, las cepas portadoras de carbapenemasas se aislaron en su mayoría de orina (31%), hemocultivo (15%), broncoaspirado (15%), esputo (15%), líquido articular (8%), lesión de piel (8%), líquido peritoneal (8%).

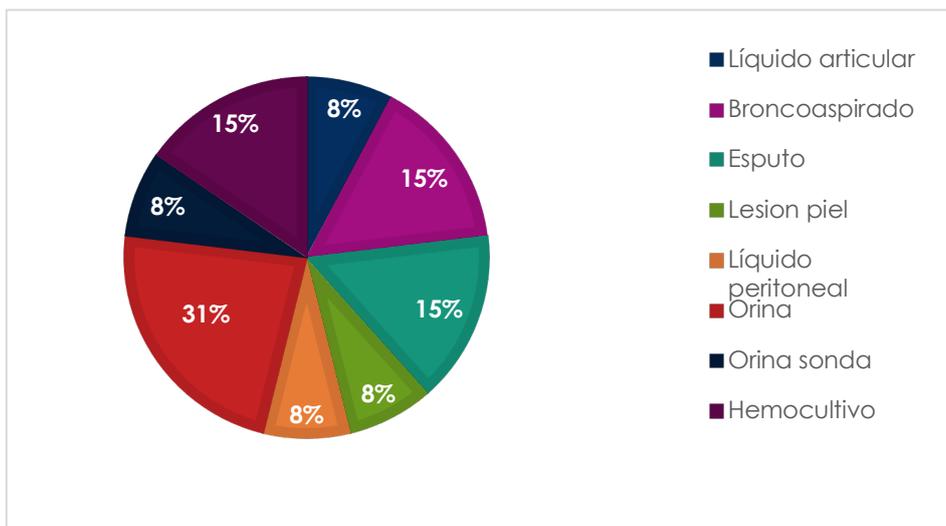


Figura 23.- Distribución de muestras clínicas de procedencia de las cepas portadoras de carbapenemasas.

4.2 ESTUDIO DE CEPAS PORTADORES DE MECANISMOS DE RESISTENCIA PARA ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS.

Desde 2016 hasta julio de 2022 se estudiaron 55418 cepas de enterobacterias procedentes de muestras clínicas aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Como se observa en el gráfico (Figura 25), la especie más frecuente fue *E. coli* seguida de *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* y *P. mirabilis*.

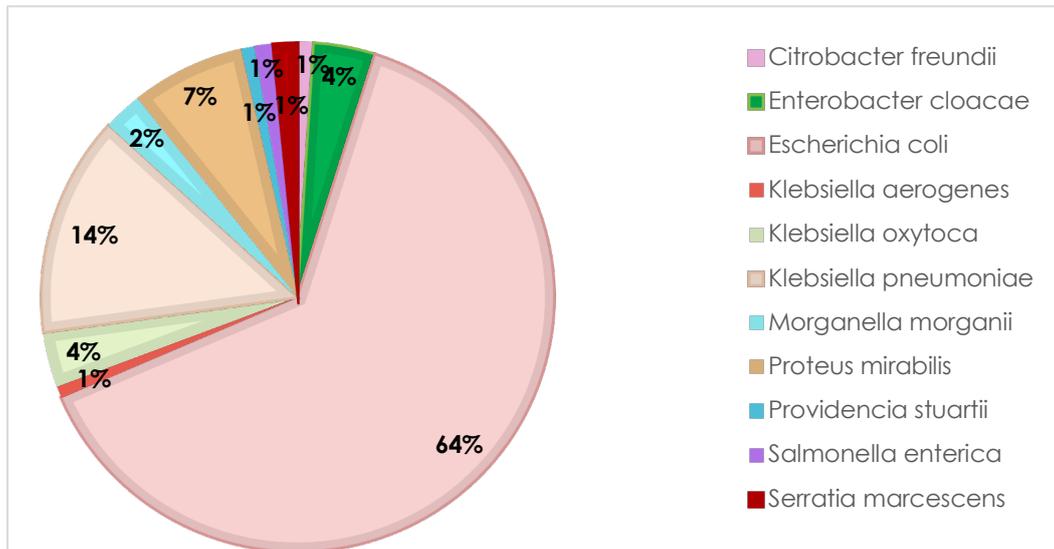


Figura 24.- Clasificación por especie de los aislados de enterobacterias más prevalentes aisladas en muestras clínicas en el servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa durante el periodo de estudio.

El número de cepas de aislados clínicos se ha mantenido en el tiempo, como se observa en la Figura 26., siendo la bacteria más frecuente cada año *E. coli* seguida de *K. pneumoniae*. El número de aislados se ha mantenido constante a lo largo de los años, con la excepción de los años 2020 y 2021 en los que el número de cepas aisladas se ha visto ligeramente disminuido respecto a los años anteriores, lo que puede guardar relación con los cambios asistenciales inducidos por la pandemia de COVID-19.

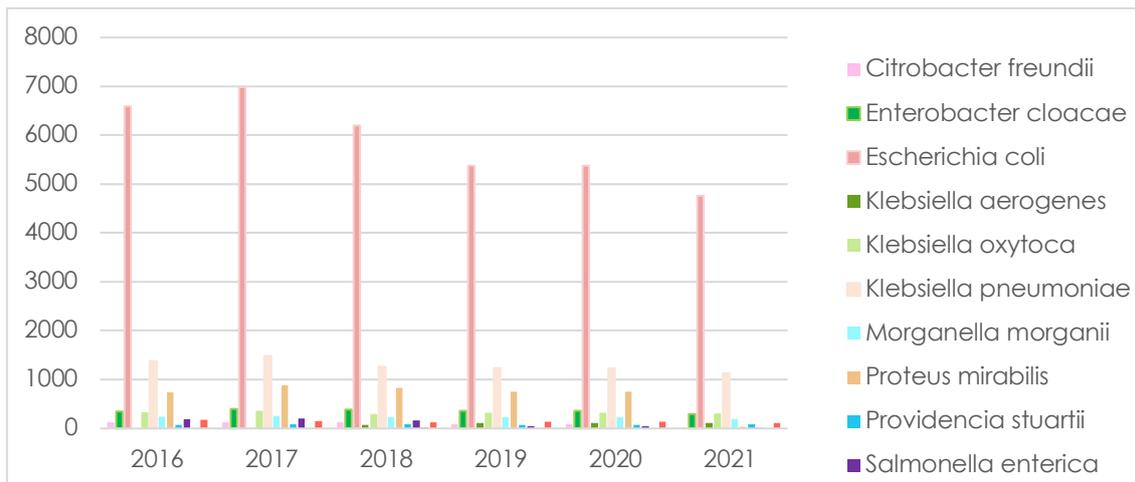


Figura 25.- Distribución anual del número de aislados clasificados por especie de las enterobacterias más prevalentes aisladas en muestras clínicas en el servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa durante el periodo de estudio.

A partir de las bases de datos de todos los aislamientos a los que se realizó el antibiograma, se elaboraron los mapas de sensibilidad de los años 2016-2021 de las especies de enterobacterias más prevalentes. En la Tabla 9 se representan los porcentajes de sensibilidad a los antibióticos testados. Se incluyen en la revisión los antibiogramas correspondientes a los microorganismos de mayor importancia a nivel clínico, excluyendo aislados duplicados de cepas que provienen del mismo paciente en el mismo periodo. Se han resaltado las sensibilidades por colores: $\geq 85\%$ de las cepas sensibles se muestra en color verde, del 50-84% en amarillo y $< 50\%$ en rojo. En azul se encuentran las cepas que mostraron sensibilidad intermedia una sensibilidad dependiente de exposición incrementada al antibiótico (Sensible EI, según criterios EUCAST(57)).

Tabla 9.- Mapa de sensibilidad antibiótica de los años de estudio (2016-2021) del porcentaje de sensibilidad de los aislados más frecuentes de enterobacterias a diferentes antimicrobianos.

	<i>E. coli</i> (n=31228)	<i>K. pneumoniae</i> (n=6850)	<i>K. oxytoca</i> (n=1527)	<i>P. mirabilis</i> (n=1527)	<i>E. cloacae</i> (n=1993)	<i>C. freundii</i> (n=624)
Ampicilina	42	0	0	50	0	0
Amoxi/clav	84	84	91	91	0	0
Pipe/tazo	97	93	95	99	85	88
Cefuroxima	89	87	84	97	40	71
Cefotaxima	91	87	96	98	76	69
Ceftazidima	92	87	97	99	78	79
Cefepime	91	86	96	98	88	93
Ertapenem	100	99	100	99	94	98
Imipenem	100	100	100	100	99	99
Meropenem	100	100	100	100	99	99
Gentamicina	91	90	98	88	98	95
Tobramicina	89	87	98	89	97	94
Amikacina	99	99	100	94	99	99
Fosfomicina	96	72	71	63	76	97
Ciprofloxacino	73	83	95	65	95	93
Levofloxacino	74	86	96	73	97	94
Cotrimoxazol	71	83	94	55	93	92
Colistina	99	99	99	0	85	97

Las enterobacterias con perfil de resistencia a antibióticos β -lactámicos de mayor espectro para gram-negativos fueron seleccionadas y de las 55418 enterobacterias procedentes de muestras clínicas aisladas en el Laboratorio de Microbiología, 4780 (8,6%) presentaron perfiles que permiten incluirlos en esta categoría. Como se observa en la Figura 27, 4196 (88%) presentaron fenotipo

BLEE, 471 (10%) presentaban fenotipo compatible con AmpC adquirida (cefamicinasa) y 113 (2%) presentaban resistencia a todos los β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos, teniendo un perfil compatible con posible producción de carbapenemasas:

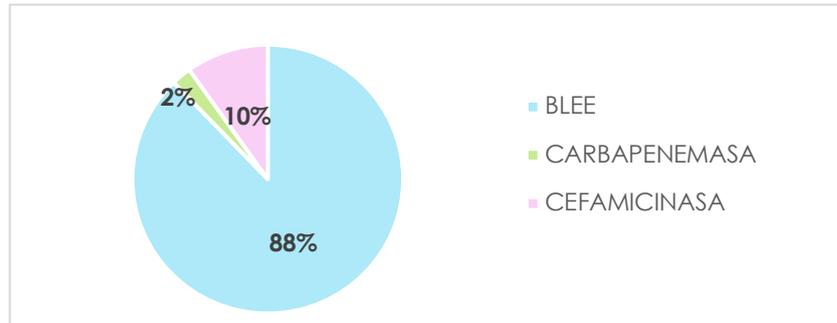


Figura 26.- Representación de fenotipos de resistencia de las enterobacterias con perfiles de resistencia a los betalactámicos de espectro más amplio para gram-negativos.

La distribución por especies de las 4.780 cepas seleccionadas fue la siguiente: 3354 (70,20%) *E. coli*, 1060 (22,17%) *Klebsiella pneumoniae*, 186 (3,89%) *Proteus mirabilis*, 78 (1,63%) *Klebsiella oxytoca*, 53 (1,10%) *Enterobacter cloacae*, 22 cepas (0,46%) *Citrobacter freundii*. Ventisiete (0,57%) pertenecen a otras especies: 14 (0,3%) *Salmonela entérica*, 8 (0,17%) *Klebsiella aerogenes*, 4 (0,08%) *Morganella morganii* y 1 (0,02%) *Serratia marcescens* (Figura 28).

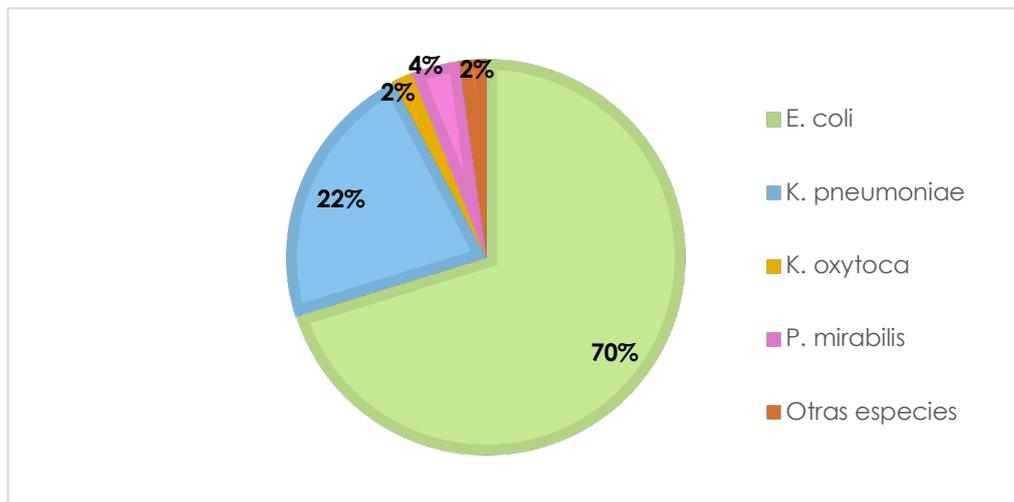


Figura 27.- Clasificación por especie de los aislados productores de β -lactamasas de las enterobacterias más relevantes en la práctica clínica.

En la figura 29 se muestra la distribución de BLEE, cefamicinasa y carbapenemasas por especie tras el estudio del antibiograma de las cepas con sensibilidad disminuída a β -lactámicos.

De las 4196 cepas productoras de BLEE fueron 3033 (72,3%) *E. coli*, 1004 (23,9%) *K. pneumoniae*, 74 (1,8%) *K. oxytoca*, 63 (1,5%) *P. mirabilis*, 9 (%) *Salmonella* entérica, 6 (0,1%) de *K. aerogenes*, 6 (0,1%) de *C. freundii*, 1 (0,02%) *S. marcescens*.

De 471 cepas productoras de cefamicinasas, fueron 303 (64,3%) *E. coli*, 119 (25,3%) *Proteus mirabilis*, 43 (9,1%) *K. pneumoniae* y 5 (1,1%) *Salmonella* entérica y 1 (0,2%) *Proteus vulgaris*.

Ciento trece cepas presentaron características fenotípicas de portar genes codificantes de carbapenemasas, fueron 153 (46,9%) de *E. cloacae*, 17 (15%) *E. coli*, 16 (14,2%) *C. freundii*, 13 (11,5%) *K. pneumoniae*, 4 (3,5%) *K. oxytoca*, 4 (3,5%) *P. mirabilis*, 4 (3,5%) *M. morgani* y 2 (1,8%) *K. aerogenes*.

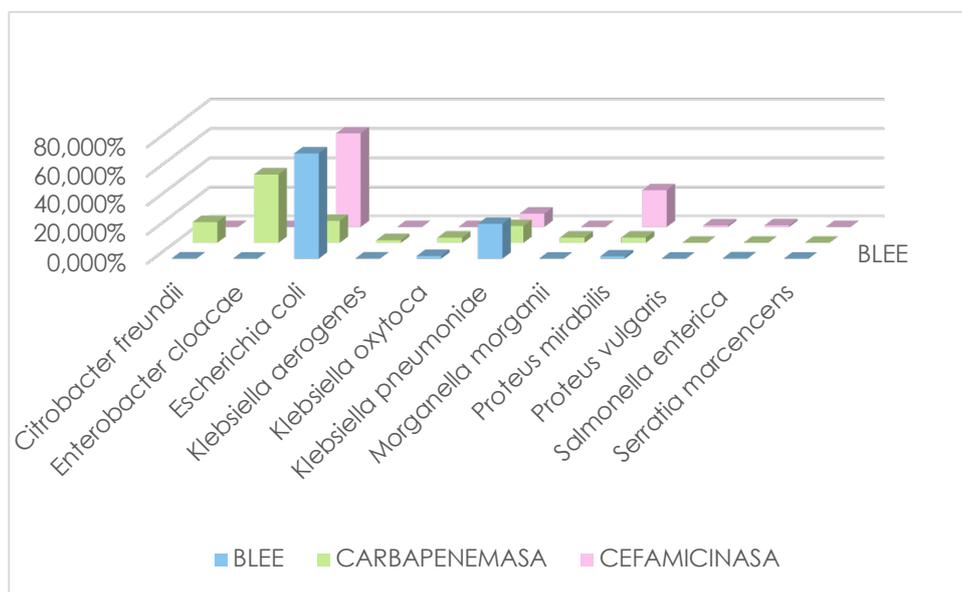


Figura 28.- Distribución de fenotipos de resistencia por especie de enterobacteria.

Recogidas en la Figura 30, se puede observar la distribución porcentual por especies de las 113 cepas que presentaron pérdida de sensibilidad a antibióticos carbapenémicos: *E. cloacae* (47%), *E. coli* (15%), *C. freundii* (14%) y *K. pneumoniae* (11%).

Enterobacter cloacae posee AmpC cromosómica inducible, que puede dar un perfil de sensibilidad disminuida a carbapenems si se suman otros mecanismos que contribuyen a la resistencia, lo que explica el alto número de *E. cloacae* (n=53, 47%) incluídas en este grupo. Se comprobó con pruebas fenotípicas y genotípicas que ninguna de estas cepas fue productora de carbapenemasas. En *E. coli* (n=17, 15%) no detectamos producción de carbapenemasas por métodos fenotípicos atribuyendo el perfil de resistencia a carbapenems a portadores de BLEE con posible pérdida de porinas. *C. freundii*

también posee una AmpC cromosómica, lo que contribuiría a su tasa de resistencia a carbapenémicos (Figura 30).

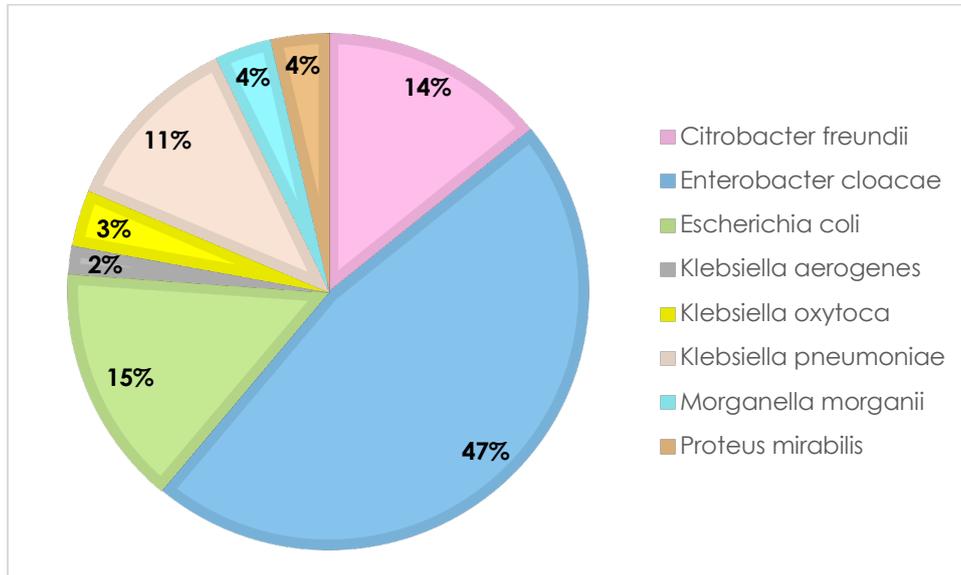


Figura 29.- Distribución prcentual por especies de las cepas con sensibilidad disminuída a carbapenems.

4.3 SELECCIÓN DE CEPAS.

Tras un detallado estudio de los perfiles de las 113 cepas inicialmente escogidas seleccionamos 15 cepas (13%) con sospecha de haber adquirido genes de resistencia a carbapenémicos, por tener una sensibilidad disminuida a carbapenems (CMI meropenem $>0,125 \mu\text{g/mL}$ y ertapenem $>0,125 \mu\text{g/mL}$, EUCAST). Las cepas se recuperaron de archivos congelados a -80° . Las especies seleccionadas, recogidas en la Figura 31, fueron: 3 *Citrobacter freundii*, 1 *Klebsiella oxytoca* y 11 *Klebsiella pneumoniae*.

El 20% de las cepas pertenecen a la especie *Citrobacter freundii*. Poseen una AmpC cromosómica inducible, lo que les confiere una resistencia natural característica que incluye las cefalosporinas de primera y segunda generación. Si está hiperproducida, su espectro de resistencia aumenta para incluir a las cefalosporinas de tercera generación sin que se vean afectadas las de cuarta generación, como cefepime. Aunque aisladamente la hiperproducción de AmpC no produce resistencia a carbapenems, puede causar una reducción de sensibilidad que sumada a otros mecanismos lleve a la resistencia.

El 73% de las cepas pertenecen a *K. pneumoniae* y 7% a *K. oxytoca*. Las cepas primitivas de este género presentan como única resistencia natural la producción de una β -lactamasa de espectro ampliado, denominada SHV-1 (clase A de Ambler, grupo 2b de Karen Bush). Esta enzima es producida a bajos niveles de forma cromosómica y constitutiva. La SHV-1 hidroliza amino y carboxipenicilinas, haciendo a la especie intrínsecamente resistente a ampicilina y amoxicilina. *K. oxytoca* también produce constitutivamente una β -lactamasa cromosómica clase A, que confiere un perfil similar al de SHV-1 de *K. pneumoniae*, la enzima se denomina K1 y forma parte de la familia OXY-2 (58).

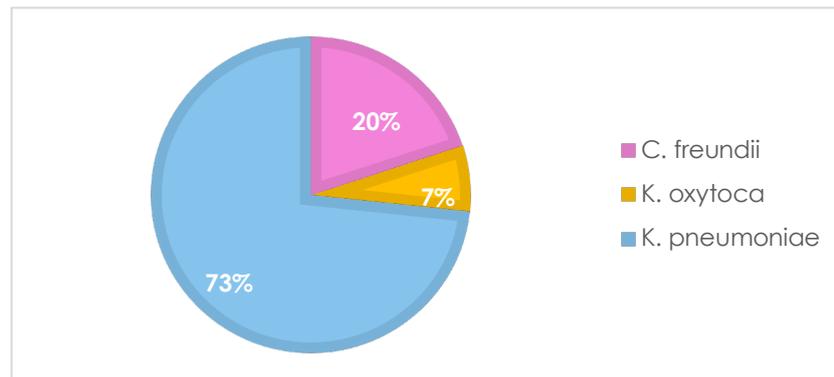


Figura 30.- Clasificación por especie de los aislados seleccionados con sospecha de haber adquirido genes codificantes de carbapenemasas plasmídicas.

4.4 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.

4.4.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.

Respecto a los antibióticos β -lactámicos, como se observa en la Figura 32, ninguna de las cepas seleccionadas fue sensible a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefotaxima y cefuroxima. Una cepa (7%) presentó sensibilidad a ceftazidima, 5 cepas (33%) a cefoxitina, 5 cepas (33%) a cefepime. Tres cepas (20%) fueron sensibles a aztreonam. Respecto a los carbapenémicos, 7 cepas (47%) mostraron sensibilidad a imipenem, 1 (7%) a ertapenem y 2 (13%) a meropenem.

Entre los aminoglucósidos, las cepas sensibles a gentamicina fueron 2 (13%) y 1 (7%) a tobramicina. La Amikacina fue el aminoglucósido que mostró tasas más altas de sensibilidad, con 10 cepas (66%) sensibles.

Tan solo 2 cepas (13%) presentaron sensibilidad a ciprofloxacino y 7 cepas (47%) frente a cotrimoxazol. Los antimicrobianos que presentaron mayores tasas de sensibilidad fueron la fosfomicina con 14 (93%) cepas sensibles y colistina (todas las cepas fueron sensibles).



Figura 31.- Perfil de sensibilidad antibiótica de las 15 cepas seleccionadas productoras de carbapenemasas plasmídicas.

4.4.2 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A CEFIDEROCOL Y NUEVAS COMBINACIONES DE B-LACTÁMICOS/INHIBIDORES DE B-LACTAMASAS

Se estudió la sensibilidad de las 15 cepas seleccionadas para ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, Cefiderocol y Meropenem/vaborbactam. Todas ellas fueron resistentes a ceftolozano/tazobactam (Figura 33).

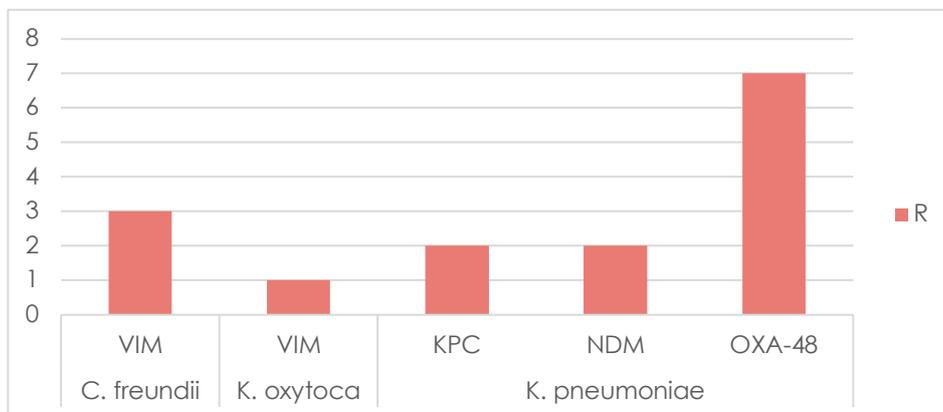


Figura 32.- Sensibilidad a Cefolozano/tazobactam por especies y tipo de carbapenemasa identificada.

Tres cepas de *C. freundii* y una de *K. oxytoca*, no mostraron sensibilidad a ceftazidima/avibactam. De 11 *K. pneumoniae*, 10 (91%) eran sensibles (Figura 34). Por tanto, todas las cepas productoras de metalobetalactamasas (VIM y NDM) fueron resistentes y solo una de las cepas productoras de serinobetalactamasas, concretamente de KPC, mostró resistencia a la combinación.

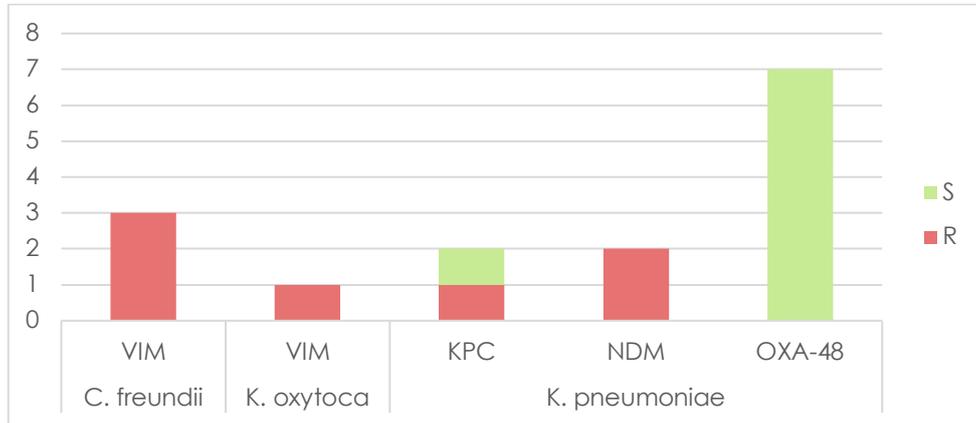


Figura 33.- Sensibilidad a Ceftazidima/avibactam por especies y tipo de carbapenemasa identificada.

Tres cepas de *C. freundii*, la *K. oxytoca* y las *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 y NDM, fueron resistentes a meropenem/vaborbactam, mientras que solo las dos cepas de cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC presentaron sensibilidad frente meropenem/vaborbactam (Figura 35). Se confirma así que el inhibidor solo fue activo frente a carbapenemasas de clase A (KPC)

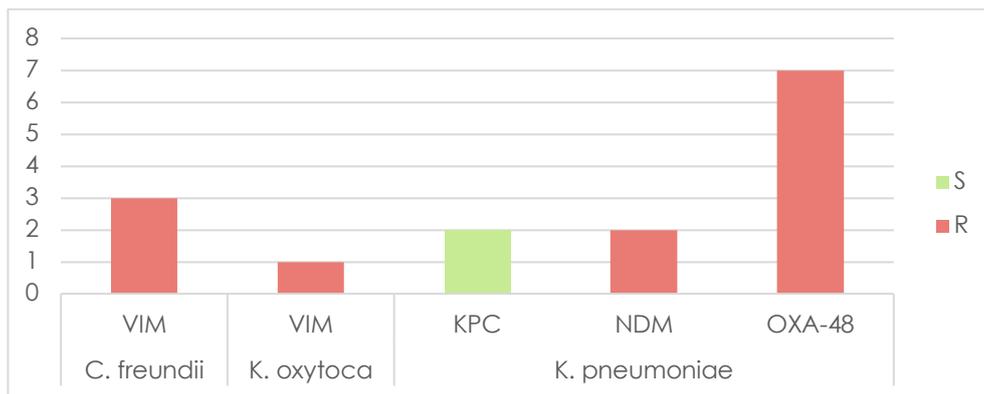


Figura 34.- Sensibilidad a Meropenem/vaborbactam por especies y tipo de carbapenemasa identificada.

Las 3 cepas de *C. freundii* (100%), la cepa de *K. oxytoca* (100%) y 4 (36,4%) de *K. pneumoniae* eran sensibles a Cefiderocol. La CMI de 5 cepas (45,5%) de *K. pneumoniae* se encontraba en la zona ATU (área de incertidumbre técnica, EUCAST) (Figura 36). Por tanto, este antimicrobiano se muestra

especialmente eficaz frente a cepas productoras de metalobetalactamasas (VIM y NDM) siendo más variable su eficacia frente a las carbapenemasas de clase A (KPC) y de clase D (OXA-48).

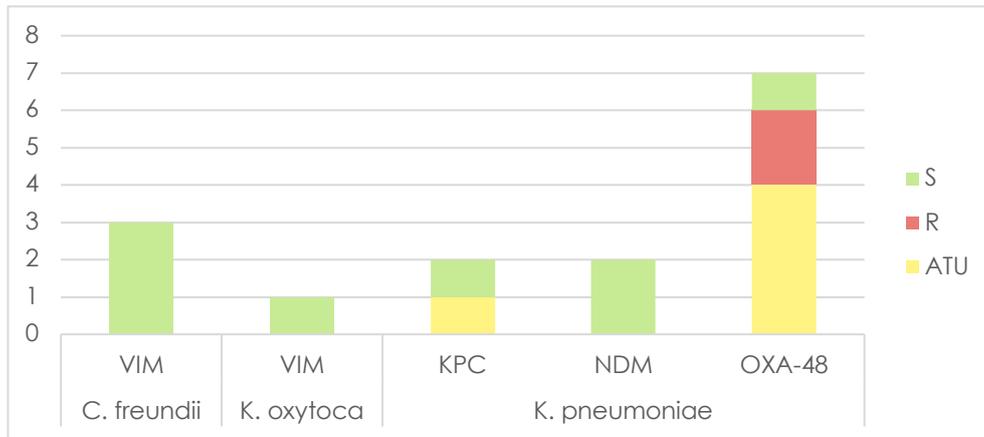


Figura 35.- Sensibilidad a cefiderocol por especies y tipo de carbapenemasa identificada.

4.5 DETECCIÓN DE LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA.

Se estudió el fenotipo de resistencia de las 15 cepas que tenían sensibilidad disminuida a carbapenémicos por posible producción de carbapenemasas.

El 100% de las cepas crecieron en agar cromogénico CHROMOID ESBL (bioMérieux) y en CRE Brilliance (Oxoid®) para la detección de BLEEs y carbapenemasas, respectivamente.

Los resultados para los métodos fenotípicos mediante la prueba de E-test para la detección de BLEE se recogen en la Figura 37: 5 cepas (33%) no producían carbapenemasas y mostraron resultados positivos como productoras de BLEE con posible pérdida de porinas. De las otras 10 cepas (67%), 2 (13,3%) portaban carbapenemasa KPC, 2 NDM (13,3%), 4 (27%) VIM y 2 (13,3%) OXA-48; para estas cepas los resultados fueron no concluyentes mediante el uso de tests fenotípicos en el estudio de BLEE y AmpC. Esto se explica porque la superposición de otros mecanismos de resistencia, como son la producción de carbapenemasas, pueden enmascarar la detección fenotípica de otros mecanismos de resistencia concomitantes.

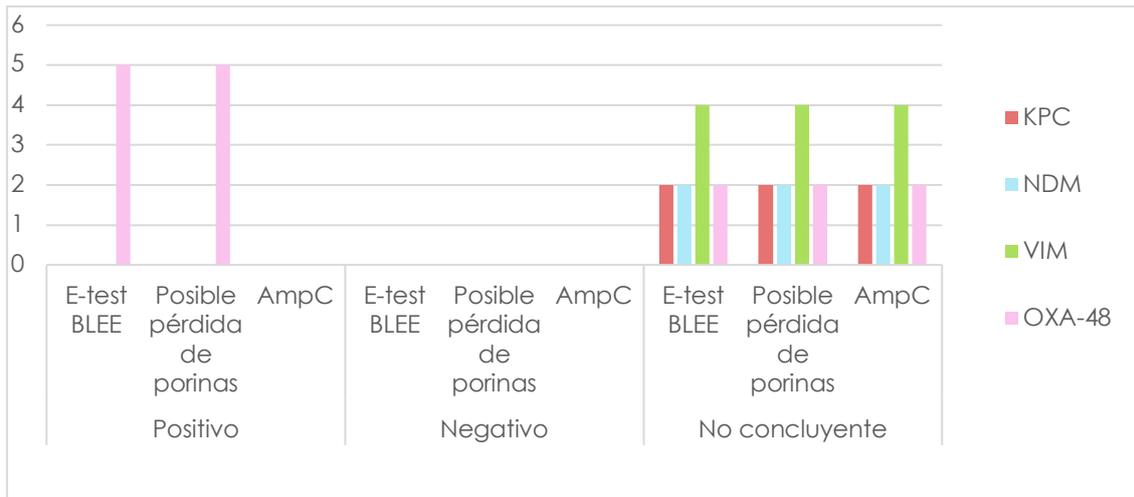


Figura 36.- Distribución de los resultados del estudio fenotípico de BLEE y AmpC en las 15 cepas seleccionadas.

En la Figura 38 se puede observar como mediante la técnica de difusión en agar con discos (test de sinergia de discos Neosensitab® Confirm Kit de Rosco Diagnostica) para el estudio de carbapenemasas, se identificaron 2 (13%) carbapenemasas de clase A, 5 (33%) carbapenemasas de clase B y 7 (47%) carbapenemasas de clase D. Un resultado (7%) fue no concluyente.

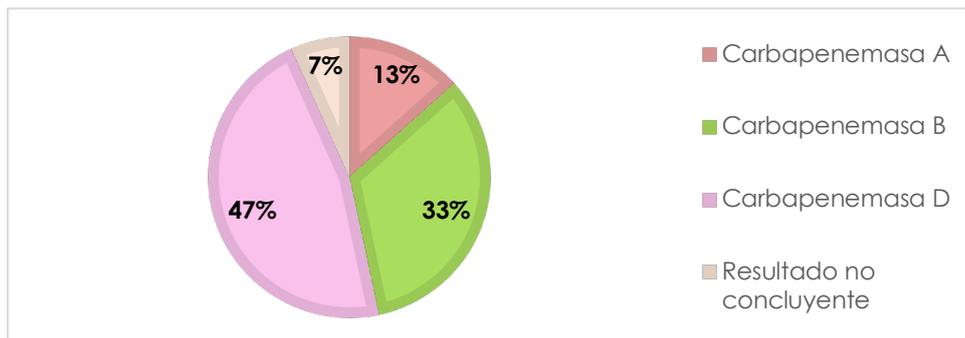


Figura 37.- Representación del estudio fenotípico de clases de carbapenemasas detectado por test de sinergia de discos.

4.6 CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIAS POR INMUNOCROMATOGRAFÍA.

Se emplearon inmunocromatografías para la detección de BLEE (CTX-M) y para la detección y caracterización de carbapenemasas en aquellas cepas seleccionadas como posibles productoras de carbapenemasas.

4.6.1 CARBAPENEMASAS

Las 15 cepas (100%) dieron resultados positivos por inmunocromatografía: Encontramos 4 metalobetalactamasas de tipo VIM, en las 3 cepas de *C. freundii* y en la *K. oxytoca*. En las 11 cepas de *K. pneumoniae* encontramos una productora de carbapenemasa de clase B (NDM), dos de clase A (KPC) y siete de clase D (OXA-48).

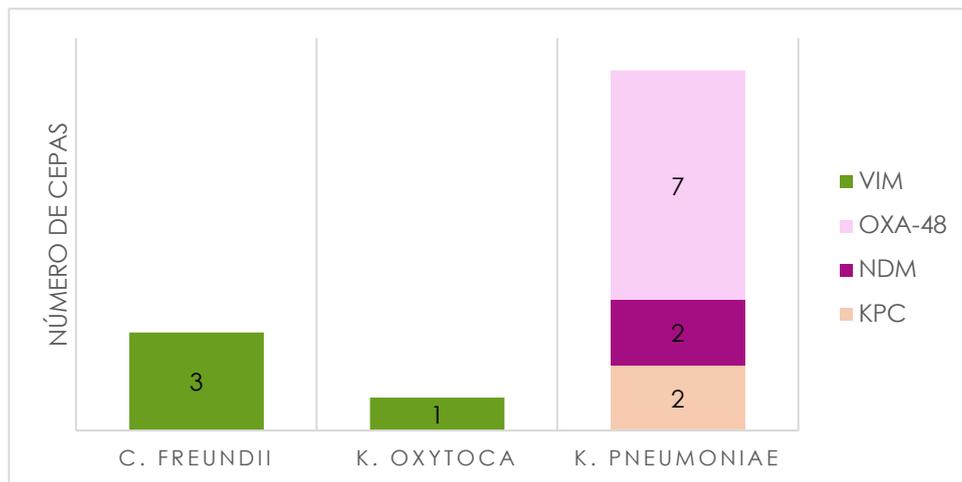


Figura 38.- Distribución de las carbapenemasas detectadas por inmunocromatografía (NG-Test Carba 5, Next Generation, Biotech) según la especie productora de carbapenemasa.

4.6.2 BLEE CTX-M

En todas las cepas productoras de carbapenemasas, se estudió por inmunocromatografía (NG-Test CTX-M MULTI, Next Generation, Biotech) la presencia de BLEE tipo CTX-M. Cuatro quintas partes de los aislados (12, 80%) producían esta enzima (Figura 40).

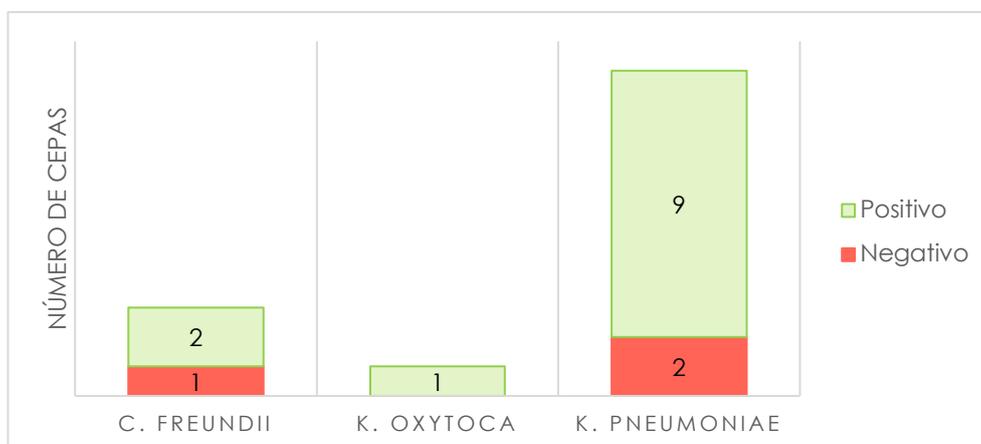


Figura 39.- Distribución de BLEE CTX-M entre las cepas productoras de carbapenemasas (NG-Test CTX-M MULTI, Next Generation, Biotech).

4.6.3 ESTUDIO Y VALIDACIÓN DE UNA NUEVA INMUNOCROMATOGRAFÍA (CERTEST).

Se evaluó una nueva inmunocromatografía (Certest, Biotec SL.) para la detección y caracterización de diferentes carbapenemasas: KPC, IMP, NDM, VIM, OXA-48.

Se analizaron las 15 cepas portadoras de carbapenemasas y 73 cepas de enterobacterias no portadoras de carbapenemasas para evaluar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba. Los resultados de la nueva inmunocromatografía (Certest) utilizando como prueba de referencia la inmunocromatografía NG-Test Carba 5, Next Generation, Biotech, fueron: 100% de sensibilidad, 100% especificidad, 100% valor predictivo positivo, 100% valor predictivo negativo.

Tabla 10.- Resultados obtenidos con las pruebas de inmunocromatografía de las dos casas comerciales probadas. Positivo (+) y negativo (-).

	IC NG-Test Carba 5 +	IC NG-Test Carba 5 -
IC Certest +	15	0
IC Certest -	0	73

4.7 PRESENCIA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS POR MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN DE ADN.

Para la confirmación y caracterización de BLEE y carbapenemasas se realizó la prueba comercial Eazyplex® Superbug CRE (Amplex) en las 15 cepas seleccionadas. Las cepas de *C. freundii* 3 (100%) fueron positivas para carbapenemasa tipo VIM y 2 de ellas también fueron positivas para CTX-M-1. *K. oxytoca* presentó VIM más CTX-M-9. De las 11 cepas de *K. pneumoniae*, 2 (18%) presentaron solo NDM, en 1 (9%) sólo se detectó OXA-48, y en 6 cepas (54%) se detectaron OXA-48 y CTX-M-1 (Figura 41).

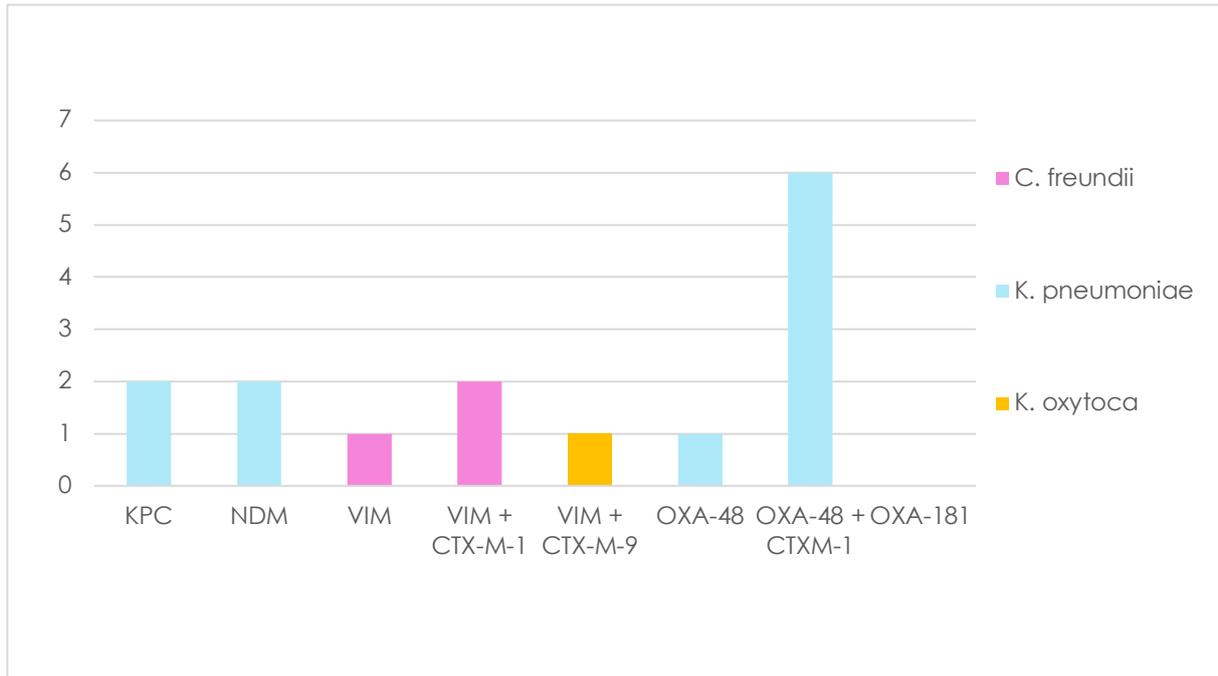


Figura 40.- Distribución de los resultados obtenidos en Eazyplex® Superbug CRE (Amplex) según especie.

4.8 ESTUDIO DE GENES DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS DE LAS CEPAS PORTADORAS DE CARBAPENEMASAS POR SECUENCIACIÓN MASIVA.

Una vez estudiada la presencia de genes que codifican para β -lactamasas mediante métodos fenotípicos y otros métodos moleculares, se procedió al estudio en profundidad de los aislados seleccionados mediante secuenciación masiva del genoma completo en 13 aislados seleccionados de diferentes muestras clínicas que pertenecían a 7 pacientes. Se estudiaron los genes de resistencia y el secuenciotipo. Los microorganismos que portaban estos genes fueron 11 *K. pneumoniae*, una *K. oxytoca* y un *C. freundii*.

4.8.1 DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A β -LACTAMASAS.

4.8.1.1 BLEE

Los resultados de secuenciación para detección de genes portadores de BLEE están recogidos en la Figura 42. De las 13 cepas, 11 (84,6%) portaban genes bla_{SHV} codificante de β -lactamasas del tipo SHV-100 (72,7%, n=8), SHV-11 (9,1%, n=1), SHV-12 (9,1%, n=1) y SHV-182 (9,1%, n=1). Siete cepas (53,8%) fueron productoras de bla_{TEM} , TEM-1A (14,3%, n=1) y TEM-1B (85,7%, n=6). Ocho cepas (61,5%) fueron productoras de bla_{CTX-M} , CTX-M-9 (12,5%, n=1) y CTX-M-15 (7,5%, n=7). Por último, 10 cepas (76,9%) portaban genes para oxacilinasas del tipo bla_{OXA-1} (90%, n=9) y bla_{OXA-9} (10%, n=1).

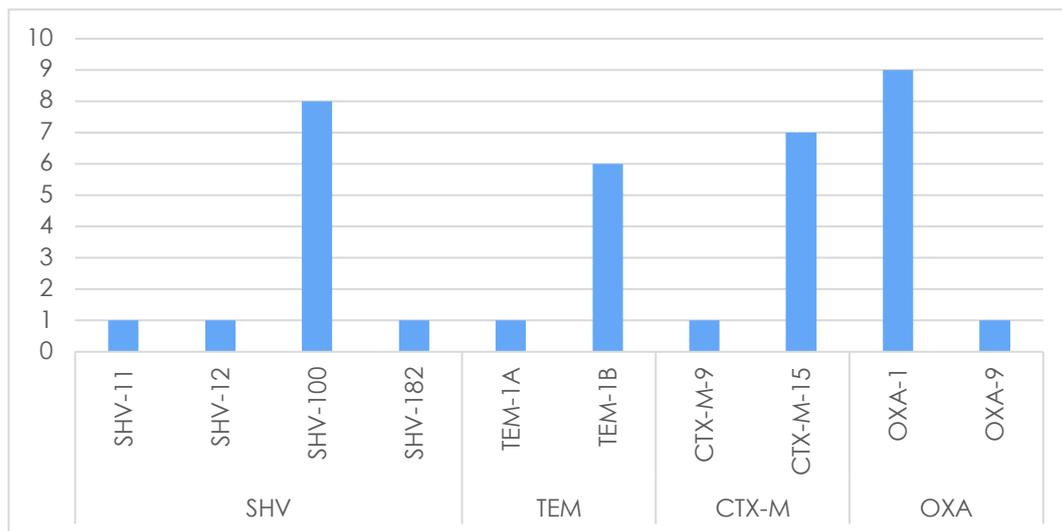


Figura 41.- Resultados del número de cepas que presentaban genes que codifican para diferentes tipos de BLEE detectadas mediante secuenciación masiva.

De las 13 cepas portadoras de BLEE recogidas en la Figura 43, 11 (84,6%) eran cepas de *K. pneumoniae*. Cinco (45%) de estas cepas portaban genes bla_{SHV} junto con genes bla_{TEM} y bla_{CTX-M} , más concretamente, los tipos SHV-100, TEM-1B y CTX-M-15, respectivamente. Otras 2 cepas de *K. pneumoniae* portaban genes bla_{SHV} , junto con otros genes codificantes de β -lactamasas: una (10%) SHV-11 junto con CTX-M-15 y otra (10%) SHV-12 y TEM-1A. El resto de las cepas de *K. pneumoniae* portaban solo 1 gen codificante de β -lactamasas, 2 (20%) SHV-100 y 1 (10%) SHV-182.

La cepa de *K. oxytoca* portaba el gen $bla_{CTX-M-9}$ y la cepa de *C. freundii* portaba el gen bla_{OXA-1} .

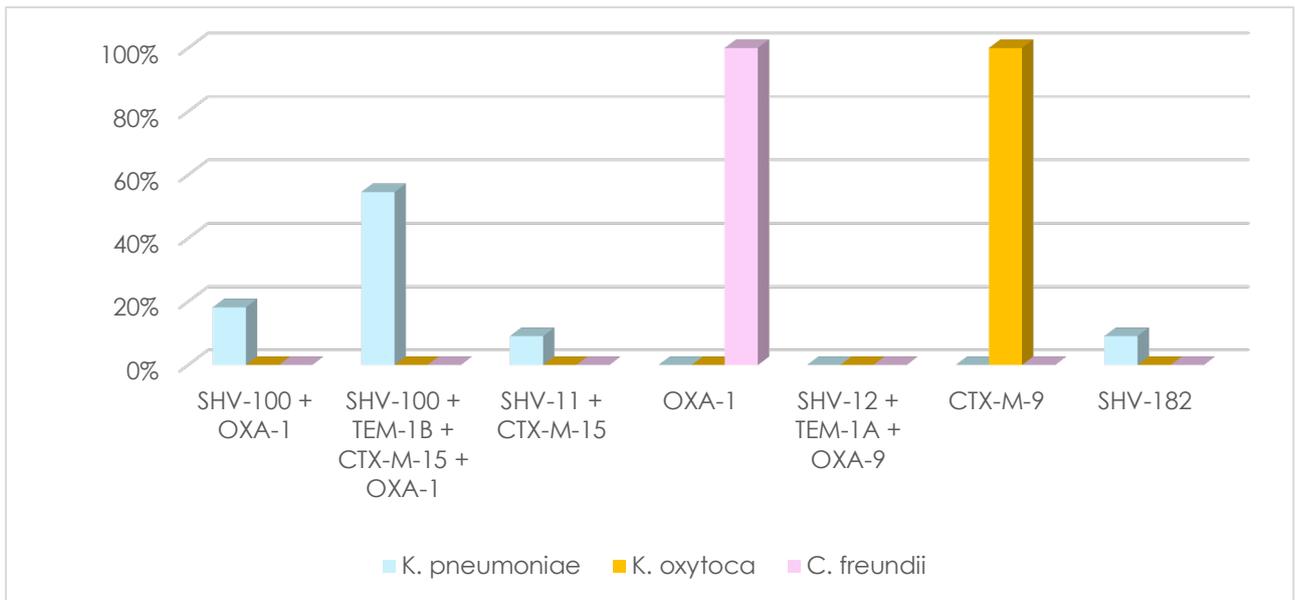


Figura 42.- Distribución de las distintas BLEE entre las especies de enterobacterias portadoras de genes codificantes de carbapenemasas.

4.8.1.2 AMPC

De las 13 cepas secuenciadas, como era de esperar por su carácter cromosómico, se pudieron detectar y caracterizar mediante secuenciación la presencia de genes codificantes de AmpC en 2 cepas: *C. freundii* portador del gen *bla*_{CMY-51} y *K. oxytoca* portador de *bla*_{ACC-1}.

4.8.1.3 CARBAPENEMASAS

Se confirmó la presencia de genes codificantes de carbapenemasas en las 13 cepas secuenciadas, como muestra la Figura 44. De las 11 *K. pneumoniae*, en 7 (63,6%) se detectaron genes *bla*_{OXA-48}, en 2 (18,2%) *bla*_{NDM-1}, en 1 (9,1%) para *bla*_{KPC-2} y en 1 (9,1%) para *bla*_{KPC-3}. La cepa de *K. oxytoca* es portadora del gen *bla*_{VIM-1} y la cepa de *C. freundii* *bla*_{VIM-2}.

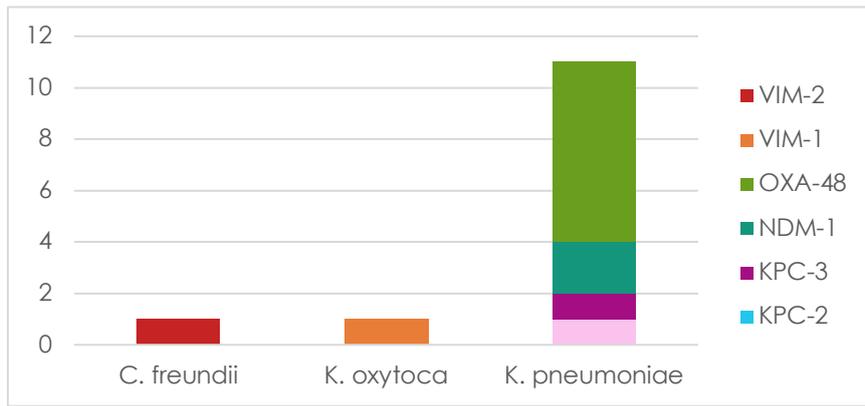


Figura 43.-Distribución de carbapenemasas por especie mediante detección de genes bla por secuenciación masiva.

4.8.2 CARACTERIZACIÓN DEL SECUENCIOTIPO Y CARBAPENEMASA

Se han investigado los secuenciotipos (ST) mediante secuenciación masiva, con el estudio de 7 genes conservados (MLST), recogidos en la Figura 45.

En las 11 cepas de *K. pneumoniae*, el clon más frecuente ha sido ST307 (54,5%, n=6), seguido de ST147 (27,3%, n=3), ST258 (9,1%, n=1) y ST512 (9,1%, n=1). Las 6 cepas portadoras del gen *bla*_{OXA-48} pertenecen al secuenciotipo ST307, las 2 *bla*_{NDM-1} y 1 *bla*_{OXA-48} pertenecen a ST147, la *bla*_{KPC-2} al ST258 y la *bla*_{KPC-3} al clon ST512. La cepa de *C. freundii* pertenece al clon ST95 y es portadora del gen *bla*_{VIM-2} y *K. oxytoca* al ST43 y es portadora de *bla*_{VIM-1}.

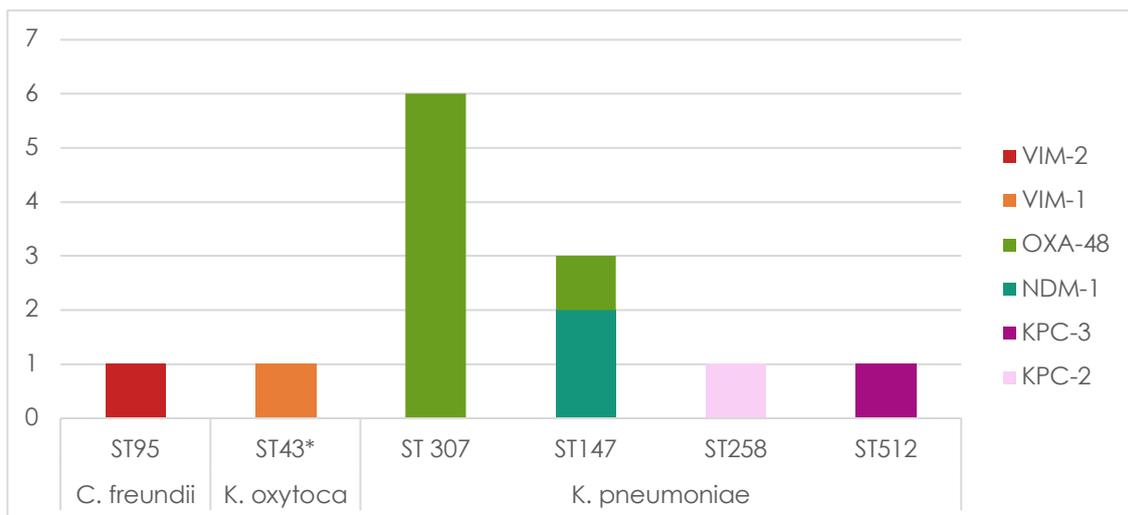


Figura 44-Distribución de genes bla en función del secuenciotipo y la especie productora de carbapenemasa.

4.8.3 DETECCIÓN DE MECANISMOS ASOCIADOS DE RESISTENCIA A OTROS MICROORGANISMOS.

Se ha estudiado la distribución de mecanismos de resistencia asociados 2 cepas *C. freundii*, 1 *K. oxytoca* y 11 *K. pneumoniae*.

Hemos encontrado genes de resistencia a aminoglucósidos en todas las cepas estudiadas. El gen más frecuente y de amplia distribución clonal (84,6%, n=11) ha sido *aac(6')-Ib-cr*, que también genera resistencia a las quinolonas, seguido de *aac(3)-IIa* (61,5%, n=8), *aph(6)-Id* (46,1%, n=6), *aph(3'')-Ib* (46,1%, n=6), *rmfF* (23,1%, n=3) y *aadA2* (15,4%, n=2). Siendo los menos frecuentes *aadA16*, *aadA1*, *aadA2*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-Ia*.

De igual manera, se han encontrado mecanismos de resistencia a quinolonas en todas las cepas, siendo los más frecuentes las mutaciones cromosómicas en *acrR* y *gyrA* que hemos encontrado en los 11 aislados (84,6%) de *K. pneumoniae*, seguido de mutaciones en *parC* (61,5%, n=8) y *gyrB* (15,4%, n=2). Los mecanismos de resistencia a quinolonas asociados a plásmidos (PQMR) se encontraron en menor proporción que las mutaciones cromosómicas: *qnrB1* (46,12%, n=6) y *qnrB2* (7,7%, n=1) en 7 cepas de *K. pneumoniae*; *qnrB6* en la cepa *C. freundii* y *qnrA1* en *K. oxytoca*.

Las resistencias a cotrimoxazol han sido menos prevalentes. El gen *drfA14* ha sido el más frecuente (53,8%, n=7) seguido de *sul2* (46,15%, n=6), aunque este último está menos distribuido entre los diferentes clones. Otros genes menos frecuentes han sido *drfA12*, *drfA16*, *drfA27* y *sul1*.

La resistencia a fosfomicina por *fosA* se ha detectado en todos los clones de *K. pneumoniae*, pero no en *C. freundii* ni *K. oxytoca*. Lo mismo ocurre con las bombas de eflujo *oqxAB*, así como con las mutaciones cromosómicas en los genes que codifican para porinas: *OmpK35*, *OmpK36* y *OmpK37*. Cabe destacar que en el clon ST307/OXA-48 al que pertenecen 6 cepas de *K. pneumoniae* se han encontrado mutaciones cromosómicas para la porina *OmpK35* en todas las cepas.

Tabla 11.- Genes de resistencia a otros antimicrobianos y su distribución entre los diferentes clones.

Microorganismo	ST/gen bla	Genes de resistencia					Mutaciones cromosómicas		
		AMG	FQ	STX	FOS	Bombas ^E	FQ	Porinas	
<i>K. pneumoniae</i>	ST307/OXA-48 (n=6)	aac(6')-Ib-cr aph(6)-Ia aph(3'')-Ib aac(3)-IIa	qnrB1	dfrA14 sul2	fosA	OqxAB	acrR gyrA parC	OmpK35 OmpK36 OmpK37	
	ST147/NDM-1 (n=2)	aac(6')-Ib-cr rmtF aac(3)-IIa			fosA	OqxAB	acrR gyrA gyrB parC	OmpK36 OmpK37	
	ST147/OXA-48 (n=1)	aac(6')-Ib-cr rmtF	qnrB2	dfrA14 sul1	fosA	OqxAB	acrR gyrA	OmpK36 OmpK37	
	ST258/KPC-2 (n=1)	aadA2		dfrA12 sul1	fosA	OqxAB	acrR gyrA	OmpK36 OmpK37	
	ST512/KPC-3 (n=1)	aac(6')-Ib-cr aadA2				fosA	OqxAB acrR gyrA	OmpK36 OmpK37	
	<i>C. freundii</i>	ST95/VIM-2 (n=1)	aac(6')-Ib-cr aadA16	qnrB6	dfrA27, sul1				
<i>K. oxytoca</i>	ST43/VIM-1 (n=1)	aadA1 aadA2 ant(2'')-Ia aph(3')-Ia	qnrA1	dfrA16, sul1					

AMG: aminoglucosidos, FQ: fluorquinolonas, STX: cotrimoxazol, FOS: Fosfomicina, Bombas^E: bombas de eflujo, POR: porinas.

4.9 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS FENOTÍPICOS, INMUNOCROMATOGRÁFICOS Y MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS.

Para evaluar diferentes métodos de screening de enterobacterias productoras de carbapenemasas se realizaron 2 test fenotípicos en las 15 cepas: crecimiento en el medio cromogénico CHROMagar CPE® (bioMérieux) y test de sinergia de discos Neosensitab® Confirm Kit (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) que incluye discos de meropenem, meropenem/ácido dipicolínico (DPA), meropenem/PBA (ácido borónico), meropenem/cloxacilina y temocilina. Estos métodos se compararon con la caracterización por inmunocromatografía (NG-Test Carba 5, Next Generation, Biotech) y los métodos moleculares (Eazyplex® Superbug (Amplex)). Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 12.

Tabla 12.-Resultados positivos de la comparación de cuatro métodos fenotípicos para la caracterización de carbapenemasas.

	Chromagar CPE	Test sinergia CPE	ICT CPE	Amplex CPE
<i>K. pneumoniae</i> (n=11)	11/11	11/11	11/11	11/11
<i>C. freundii</i> (n=3)	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>K. oxytoca</i> (n=1)	1/1	0/1	1/1	1/1
Total	15	14	15	15

BLEE: betalactamasas de espectro extendido. CPE: carbapenemasas. OMP: posible pérdida de porinas. ICT: inmunocromatografía.

De las 15 cepas estudiadas, las 15 (100%) crecieron en los medios selectivos para productores de carbapenemasas. Estos medios selectivos tienen muy buena sensibilidad (100%) y especificidad (100%) en esta serie reducida.

En cuanto al test de sinergia para la detección de carbapenemasas fue positivo en 14 (93,3%) de las cepas: en las 11 (100%) *K. pneumoniae* y los 3 (100%) de *C. freundii*. El resultado de este test para *K. oxytoca* productora de VIM fue no concluyente, el halo de meropenem con ácido dipicolínico (inhibidor de metaloβlactamasas) no aumentó lo suficiente en comparación con el de meropenem.

Las ICT de carbapenemasas fueron positivas en las 15 (100%) de las cepas, al igual que el estudio molecular de amplificación de ADN mediante Amplex SuperbugCRE®.

5. DISCUSIÓN

5.1 EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIACEAE EN LA ACTUALIDAD: UN PROBLEMA CADA VEZ MÁS PREOCUPANTE.

La propagación mundial de enterobacterias multirresistentes ha ido creciendo de forma preocupante en los últimos años, convirtiéndose en uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia. El uso indiscriminado de antibióticos, la aparición de genes de resistencia y el aumento en la transmisión por elementos genéticos móviles, se han descrito como las principales causas del aumento en su prevalencia.

A principios de los años 2000, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) eran las más importantes enzimas producidas por las enterobacterias, generando resistencia a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Los antibióticos carbapenémicos se convirtieron en el tratamiento de elección para las infecciones graves producidas por enterobacterias productoras de BLEE. Debido al aumento en su consumo y la transmisión de genes de resistencia por elementos genéticos móviles, comenzaron a surgir las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC). Además, EPC son también resistentes a múltiples antimicrobianos de otras familias como las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y el cotrimoxazol, lo que reduce las opciones terapéuticas clásicas a colistina, aztreonam, fosfomicina y tigeciclina (59).

La prevalencia de las diferentes carbapenemasas es muy variable de forma global. Las principales carbapenemasas distribuidas a nivel mundial en enterobacterias pertenecen a los tipos KPC y NDM; siendo menos frecuentes VIM, IMP y OXA-48 (60,61).

Como se puede observar en la Figura 46, las metalo- β -lactamasas o carbapenemasas de clase B más prevalentes son IMP, VIM y NDM (3). IMP es endémica en Japón y en Taiwán, y ha aparecido en brotes esporádicos en otros países. VIM-1 es la más prevalente en enterobacterias, siendo Grecia el país de mayor prevalencia (5). Pero la metalobetalactamasa de mayor distribución es NDM, de la cual se han descrito hasta 16 variantes y predomina en la India (62).

Actualmente, es muy preocupante la aparición y la rápida diseminación de la carbapenemasa de clase D, OXA-48 (63). Además, debido a su variable perfil de sensibilidad antibiótica y heterogenicidad de hidrólisis de los β -lactámicos, se considera que la prevalencia de estas enzimas puede estar subestimada. La enzima OXA-48 es endémica en Turquía, Oriente Medio y Norte de África; y es responsable de numerosos brotes en diferentes países del mundo (39,64).

A pesar de la importante distribución de las carbapenemasas previamente descritas, la aparición de KPC es, sin duda, el mayor problema epidemiológico. El primer caso se detectó en Carolina del norte en 1996 (65) y desde entonces se han identificado EPC productores de KPC de forma global, siendo los países de mayor prevalencia España, Grecia, Israel, China, Colombia, Brasil, Argentina y Estados Unidos (66). *K. pneumoniae* es la principal especie productora de esta enzima, pero también se ha detectado su presencia en otras enterobacterias como *K. oxytoca*, *Morganella morganii*, *E. coli*, *C. freundii* e incluso en bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* (67).

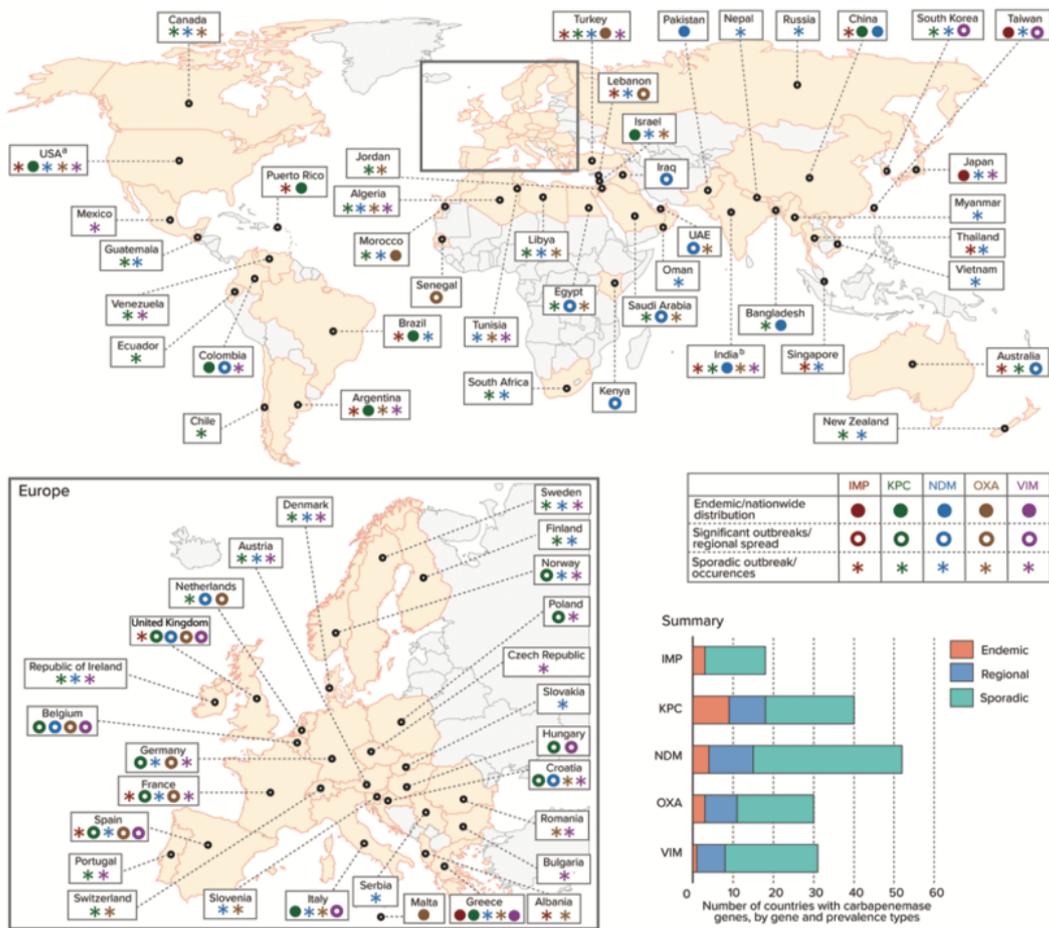


Figure 1. Global distribution of carbapenemases in Enterobacteriaceae, by country and region. Data are adapted from [8, 12, 13, 15, 25, 32–40]. ^aKPCs are endemic in some US states; ^bOXA mainly refers to OXA-48, except in India, where it refers to OXA-181. Abbreviations: IMP, active on imipenem metallo-β-lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; OXA, oxacillinase-type carbapenem-hydrolyzing β-lactamase; VIM, Verona integron-encoded metallo-β-lactamase.

Figura 45.-Distribución mundial de carbapenemasas en enterobacterias (61).

A partir del proyecto EuSCAPE para el estudio y control de EPC en Europa, se publicó un documento técnico por el *European Center for Disease Control and Prevention* (ECDC) en 2013 en el que se detectó que en 36 de los 39 países europeos participantes, incluyendo a España, había habido un incremento en la detección de EPC, siendo la situación particularmente preocupante en

Grecia y en Italia, debido a la alta prevalencia de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa KPC(68). En 2017, del seno de este mismo proyecto, se publicó en The Lancet un estudio en el que se caracterizaron las diferentes carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* de 455 hospitales de 34 países europeos, Turquía e Israel(69). El ratio de producción de carbapenemasas entre *K. pneumoniae* y *E. coli* fue de 11:1, siendo los países de mayor prevalencia aquellos situados en el sur y en el sureste de Europa: Grecia, Italia, Montenegro y España; siendo nuestro país el cuarto con mayor incidencia de Europa (0,04 casos por 100 habitantes). Las carbapenemasas más frecuentes fueron del tipo KPC seguidas de OXA-48. Las cepas de *K. pneumoniae* seguían la misma distribución, encontrándose en mayor prevalencia en Italia, Israel, Grecia y Portugal. Las cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 fueron más comunes en Malta, Francia, Bélgica y España, siendo las más frecuente en nuestro país por delante de las KPC, seguida de las del tipo VIM. *K. pneumoniae* productora de NDM fue la enzima prevalente en los países bálticos (69,70).

De las EPC, *K. pneumoniae* es considerada como la especie más relevante clínicamente y con alta predisposición en la adquisición de genes de resistencia y transmisibilidad. Durante los años 60-70 se estableció como uno de los patógenos más importantes relacionado con las infecciones por microorganismos multirresistentes, especialmente en infecciones del tracto urinario, respiratorias y sepsis(71). En la actualidad, se encuentra en el ranking de la OMS como uno de los principales patógenos nosocomiales. Según los datos epidemiológicos del ECDC para el año 2021, en la Figura 47 se muestran los países con mayor prevalencia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems. Se puede observar que la prevalencia es mayor en los países del sureste europeo. España se sitúa entre los países con una prevalencia media (5,9%), siendo la carbapenemasa OXA-48 la más frecuente, seguida de VIM y KPC, con casos esporádicos de NDM (<https://www.ecdc.europa.eu/en>).

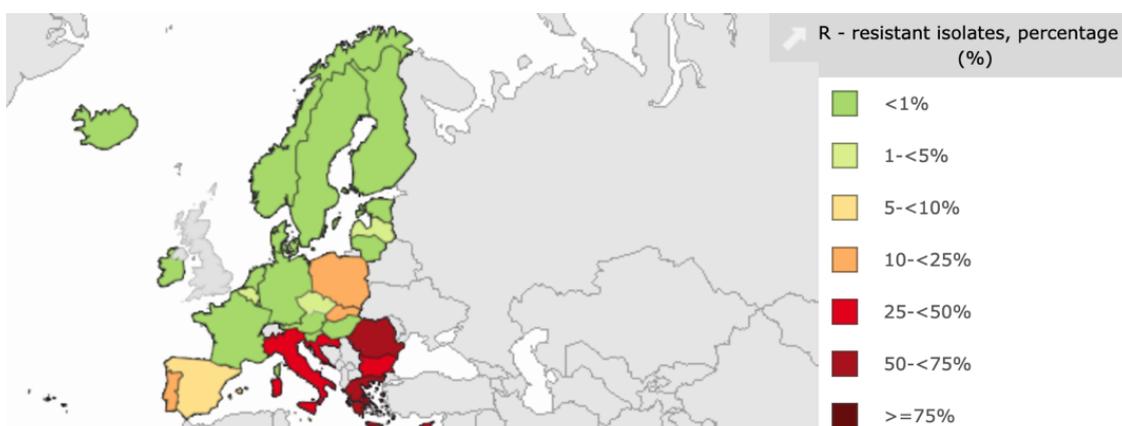


Figura 46.- Prevalencia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems en Europa en el año 2021 (<https://www.ecdc.europa.eu/en>).

En España, los primeros casos detectados de EPC se describieron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadoras de VIM-1 en Barcelona en 2003 (72). Un estudio multicéntrico en 2009 llevado a cabo en 35 hospitales españoles demostró una baja prevalencia (0,04%) de enterobacterias productoras de carbapenemasas, siendo las más frecuentes las metalobetalactamasas VIM-1 e IMP-22 (48). Sin embargo, a lo largo de los años, ha habido un cambio drástico en la prevalencia, con un aumento significativo de las EPC y también en el tipo de carbapenemasas más frecuentes.

Entre septiembre de 2009 y febrero de 2010, se describieron las primeras KPC en España(73), aislándose dos clones de *K. pneumoniae* con el gen *bla_{KPC-3}* en un hospital de Madrid. Al poco tiempo, en otro hospital se encontró el gen *bla_{KPC-2}* en tres clones de *C. freundii* (74). El primer caso de NDM en España se aisló en 2012 (75) de un absceso intraabdominal en Madrid en un paciente procedente de la India. Desde entonces los casos descritos de NDM en nuestro país son anecdóticos(76).

El gran impacto epidemiológico en nuestro país de EPC se produce a raíz de la emergencia de 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 en 2009 (77). Desde entonces se han descrito varios brotes en diferentes hospitales del país (78,79) y en el estudio de infecciones/colonización de carbapenemasas en Madrid era la más prevalente(80). En la actualidad, es la carbapenemasa con mayor prevalencia y alta distribución en nuestro país, encontrada con mayor frecuencia en *K. pneumoniae*, como se observa en la Figura 48 obtenida del proyecto CARB-ES-19 (81).

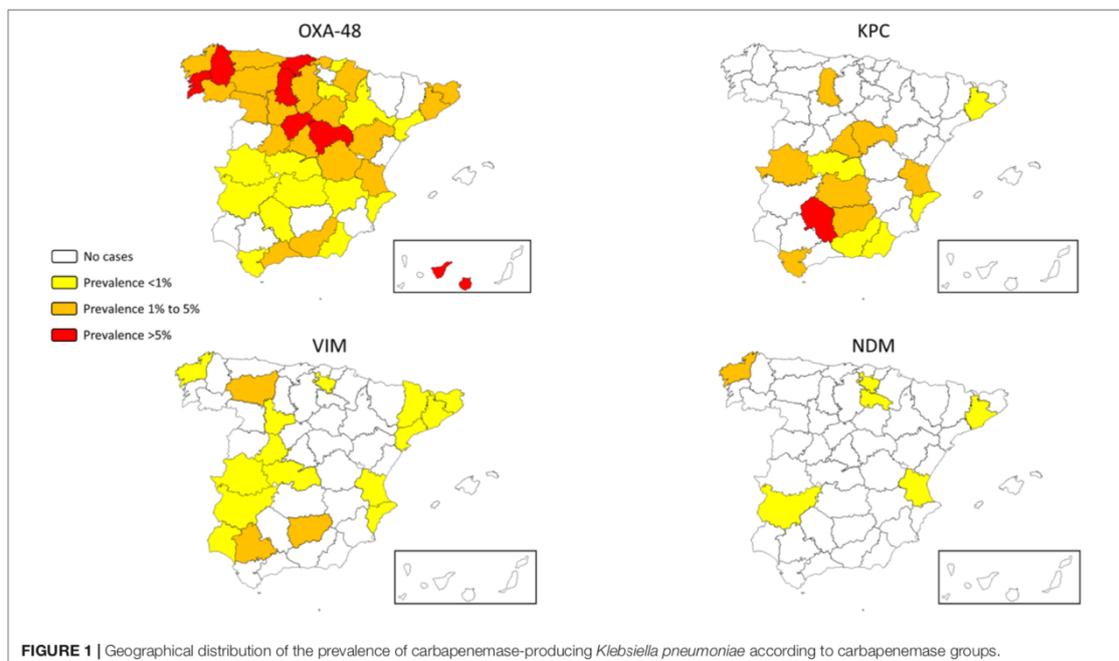


Figura 47.-Distribución geográfica y prevalencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (81).

En 2019, se realizó un estudio multicéntrico, el proyecto CARB-ES-19, previamente mencionado (81). Se llevó a cabo en 71 hospitales que representaban 50 provincias españolas. Se recogieron los 10 primeros aislados procedentes de cada hospital desde febrero a mayo de 2019. Se detectaron 403 EPC, con un claro predominio de *K. pneumoniae* (93,5%), seguida de *E. coli* (6,5%), con una prevalencia de 2,5% y 0,04%, respectivamente. La incidencia acumulada de 0,05 por 100 habitantes venía a demostrar un aumento del 25% en comparación con el último estudio europeo de 2017 (69). La carbapenemasa más frecuente fue OXA-48, seguida de KPC-3, VIM-1 y NDM-1. La distribución de estas difería geográficamente, encontrando en las Islas Canarias y el norte de España una mayor prevalencia de OXA-48 y de KPC en el sur de España (70).

En nuestro hospital y durante el periodo de estudio, la prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas ha sido del 0,027%, menor que la prevalencia estimada por los dos estudios multicéntricos de mayor envergadura CARB-ES-19 (81) y ECDC (69). *K. pneumoniae* ha sido la especie más frecuente aislada en muestra clínica en nuestro trabajo, dato comparable con el resto de España y Europa. En esta especie la carbapenemasa más frecuente ha sido OXA-48, seguida de KPC y NDM. *C. freundii* ha sido la segunda enterobacteria más frecuentemente aislada en muestras clínicas en nuestro medio, detectándose 3 cepas productoras de VIM. Esta metalobetalactamasa la identificamos también en un aislado de *K. oxytoca*.

En nuestro entorno solo se habían descrito previamente 8 cepas productoras de carbapenemasas. La primera fue una *K. aerogenes* productora de VIM-2, procedente de un paciente ingresado en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa en 2012 (82). También identificamos 2 aislados de *K. aerogenes* productoras de VIM-2 y VIM-1.

5.2 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO β -LACTÁMICOS.

Las cepas productoras de carbapenemasas suelen presentar corresistencias a otros antibióticos no β -lactámicos, debido a que los genes de resistencia se incluyen dentro de las plataformas genéticas móviles como integrones o plásmidos, favoreciendo su expresión conjunta y su diseminación. Es habitual la existencia de casos de múltiples resistencias o incluso panresistencias que limitan de forma drástica los tratamientos frente a estas bacterias multirresistentes. Las opciones terapéuticas en estos casos son limitadas, siendo los fármacos de elección aminoglucosidos, aztreonam, colistina y, de manera menos frecuente, las quinolonas y cotrimoxazol (83).

En nuestro estudio, la resistencia frente a antibióticos no β -lactámicos en las enterobacterias productoras de carbapenemasas es elevada. Se observaron altos porcentajes de resistencia a aminoglucósidos (gentamicina 86,7%, tobramicina 93,3%), quinolonas (ciprofloxacino 86,7%), y cotrimoxazol (53,3%). Amikacina tuvo un porcentaje de resistencia menos acusado pero muy importante, ya que alcanzó a un tercio de los aislados (33,3%). Es destacable que solo se encontró una cepa resistente a fosfomicina y no se encontró ningún aislamiento resistente a colistina. En el estudio multicéntrico CARB-ES-19 realizado en España, en el que estudiaron diferentes aislados de enterobacterias productoras de carbapenemasas, los porcentajes de resistencia a gentamicina (54,4%) y tobramicina (74,3%) fueron inferiores a los resultados obtenidos en nuestro estudio, mientras que los de ciprofloxacino (94,2%), y amikacina (27,1%) fueron más semejantes.

Como respuesta al aumento de resistencias a muchos antimicrobianos disponibles entre las EPC, han ido apareciendo en el mercado nuevas combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos multiresistentes (84–87).

El 100% de las cepas fueron resistentes a ceftolozano/tazobactam. Aunque esta nueva combinación tiene actividad frente a las AmpC y la resistencia tributaria de las bombas de eflujo y las mutaciones de porinas, no tiene apenas actividad frente a las carbapenemasas de enterobacterias, lo que lo sitúa más bien como un antipseudomónico muy potente y específico.

Todas las cepas productoras de metalobetalactamasas fueron resistentes a Ceftazidima/avibactam, combinación que se ha desarrollado para inhibir serin- β -lactamasas(88). El espectro de acción de la ceftazidima incluye AmpC, que junto a la actividad inhibitoria del avibactam, amplían su actividad frente a carbapenemasas tipo KPC y OXA-48, lo que se demuestra en nuestro estudio mostrándose sensibles todas las cepas productoras de OXA-48. Se han descrito resistencias mediadas por enterobacterias portadoras de KPC-2 y KPC-3(89), lo que podría justificar la resistencia de la cepa KPC-2 de *K. pneumoniae*.

Todas las cepas no productoras de KPC (86,7%, n=13) fueron resistentes a meropenem/vaborbactam. Esta combinación tiene una potente actividad frente a KPC y AmpC. Sin embargo, no ha mostrado suficiente actividad frente a metalobetalactamasas (NDM, IMP o VIM) ni frente a las pertenecientes a la clase D de Ambler, como OXA-48 (86).

El Cefiderocol fue sensible en la mayoría de las cepas (66,7%), aunque 5 de ellas mostraron una sensibilidad en "area de incertidumbre".

Las 2 (18,2%) cepas resistentes a Cefiderocol fueron *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 y CTX-M-15. Un estudio reciente (90) demostró que la producción de CTX-M-15 aumenta la CMI frente a cefiderocol.

Una de las cepas que tenía CMI en "área de incertidumbre" era productora de KPC, varios estudios han demostrado que existe resistencia cruzada a ceftazidima/avibactam y Cefiderocol en algunas cepas productoras de KPC (91).

Hemos encontrado que en el 86,7% de las cepas seleccionadas con sensibilidad disminuida a carbapenems, tan solo 15 fueron productoras de carbapenemasas (13,3%). Esto nos lleva a pensar que, en nuestro entorno, la sensibilidad disminuida a carbapenemas se puede atribuir principalmente, a otros mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas, entre los que predominan la asociación de β -lactamasas (tanto cromosómicas como adquiridas) junto con posibles mecanismos concomitantes que contribuyan a reducir la permeabilidad de la membrana externa.

5.3 CLONES DE ALTO RIESGO: *K. PNEUMONIAE*.

De las once cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas, seis pertenían al mismo paciente, aunque se aislaron de muestras clínicas diferentes (lesión de piel, urocultivo, esputo y hemocultivo), y eran portadoras de los genes: *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-100}, *bla*_{TEM-1B} y *bla*_{OXA-1}. Las dos cepas portadoras de *bla*_{NDM-1} pertenecen al mismo paciente, pero fueron aisladas en diferente muestra clínica (urocultivo y hemocultivo). También portan genes *bla*_{SHV-100} y *bla*_{OXA-1}. Una cepa de *K. pneumoniae* procedente de un broncoaspirado de un paciente, porta genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-1A} y *bla*_{OXA-9}. Una cepa de *K. pneumoniae* procedente de un líquido peritoneal de un paciente, porta genes *bla*_{KPC-3} y *bla*_{SHV-182}. Una cepa de *K. pneumoniae* procedente de un líquido articular de un paciente, porta genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{SHV-11}.

Un problema añadido a la difusión de las EPC es la creciente emergencia y propagación de esta resistencia en los llamados clones de alto riesgo. Estos clones suponen un gran problema epidemiológico debido a su demostrada capacidad para acumular múltiples determinantes de resistencia, virulencia y capacidad adaptativa. Se han identificado en diferentes patógenos y en las más variadas áreas geográficas y se caracterizan por colonizar y persistir durante largos periodos de tiempo, causando infecciones graves o recurrentes. Estos clones encuentran un medio propicio para adquirir nuevos genes de

resistencia, gracias a su mayor patogenicidad y/o fitness en entornos como las UCIs, debido a la elevada presión antibiótica selectiva (92).

Los clones de alto riesgo de *K. pneumoniae*, de más amplia distribución mundial pertenecen a los “clásicos” complejos clonales CC258 (ST258, ST512, ST11 y ST340) y CC14 (ST 14 y ST15) y han estado implicados en la diseminación mundial de carbapenemasas (93) Figura 49.

Cabe destacar que, aunque las KPC se han descrito en más de 100 secuenciotipos, la distribución mundial de esta carbapenemasa de clase A ha sido debida principalmente a la difusión de cepas pertenecientes al complejo clonal CC258 (94). En concreto, en España, se han descrito brotes de ST258, como el acaecido en un hospital terciario en Granada causado por una cepa de *K. pneumoniae* ST258 productora de KPC-3 (95) o el primer caso descrito de *K. pneumoniae* resistente a colistina en Madrid causado por una cepa del secuenciotipo ST258/KPC-2 (96).

En una revisión de 2016 (97) se estudió la diseminación de los clones productores de KPC más prevalentes: ST101/KPC-2, ST11/KPC-2 y ST512/KPC-3. Este último, se relaciona con la diseminación interregional en nuestro país además de ser el principal clon de diseminación de KPC en Italia. De hecho, se describió un importante brote en Córdoba cuyo paciente índice había estado ingresado en un hospital de una localidad italiana (98).

En nuestro hospital durante el periodo de estudio, se aislaron dos cepas pertenecientes al complejo clonal cc258: ST258/KPC-2 y ST512/KPC-3.

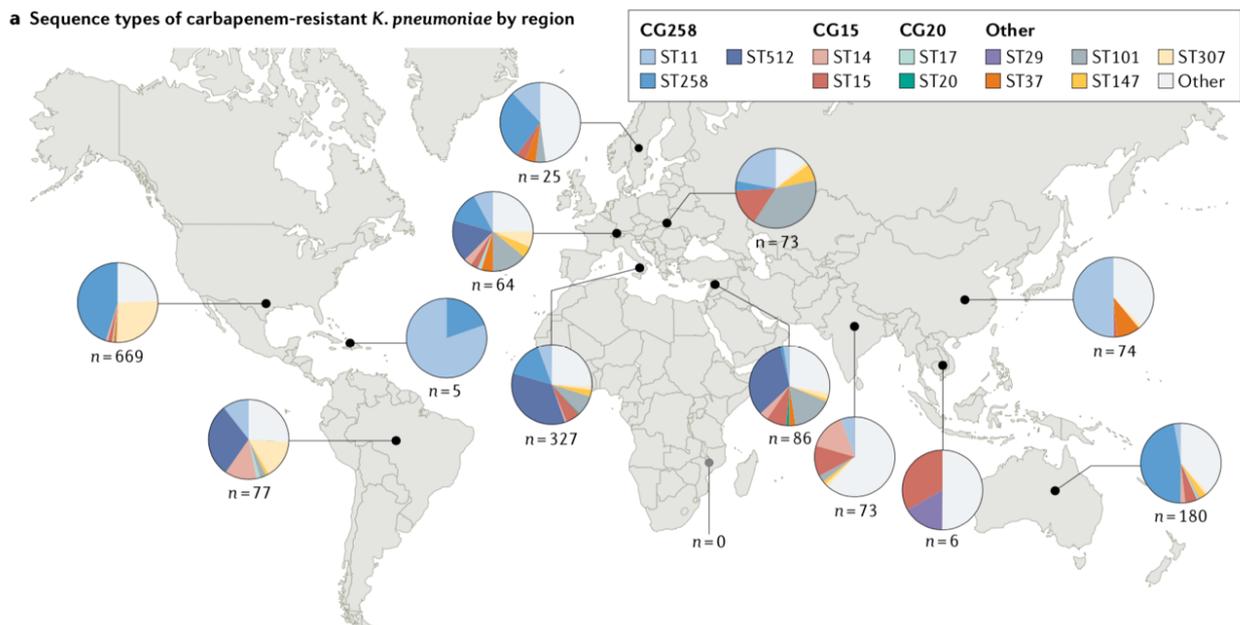


Figura 48.-Distribución mundial de los secuenciotipos de *K. pneumoniae*. Tomada de (71).

En la actualidad, a estos clones de alto riesgo más conocidos se les han unido unos nuevos que preocupan especialmente, como son ST147 y ST307. Ambos clones emergieron en Europa a mediados de los años 90 convirtiéndose en destacados clones de diseminación global en un corto periodo de tiempo. Además, ambos están relacionados con la producción de CTX-M-15 (99), de forma que la progresión en la adquisición de genes de resistencia a carbapenemasas se ha determinado que fue sobre los años 2000 (100). El clon ST307 es endémico en Italia, Colombia, Estados Unidos y Sudáfrica, mientras que ST147 lo es en India, Italia, Grecia y en los países del norte de África (101).

Estos clones han demostrado ser exitosos en la diseminación de determinantes de resistencias. Por ejemplo, ST307 puede portar genes *bla* para la producción de: OXA-48, KPC-3, VIM-1, NDM-1 y también portaban genes codificantes de CTX-M-15 (102). A pesar de la baja prevalencia de ST307, cada vez más se le relaciona con brotes en diferentes países, el registrado en Alemania en 2019 (103) que afectó a 17 pacientes, causando infección en 6, en el que se identificó la misma cepa de *K. pneumoniae* sensible solo a Cefiderocol, cloranfenicol y tigeciclina productora de OXA-48 y NDM-1 del ST307. También se han descrito brotes en España, uno en Cáceres, que afectó a 12 pacientes y otro en un hospital de Madrid con 2 pacientes (102).

La prevalencia de ST147 no está clara, pero se le ha relacionado con numerosos brotes a lo largo del mundo: en Túnez se detectó ST147/NDM-1 asociado a pérdida de porinas OmpK35 y Ompk36 (104) y en Grecia, se detectó ST147 coproductor de KPC-2 y VIM-1 en un brote hospitalario (105). En España, ST147 se ha relacionado con la producción de OXA-48 y sobre todo con NDM-1 (76).

En nuestro estudio, la carbapenemasa más frecuentemente detectada fue OXA-48 y los aislados pertenecían a dos clones: el predominante fue ST307 (n=6), que eran cepas del mismo paciente, pero procedentes de muestras diferentes; y en un caso el clon identificado fue ST147 (n=1). El clon ST307/OXA-48 coincide en el tiempo con el aumento de la distribución global de este clon.

Las 2 cepas productoras de NDM-1 procedían del mismo paciente, y pertenecían al clon ST147, como se ha comentado previamente, la enzima NDM es la menos extendida en nuestro entorno(81).

En dos estudios multicéntricos llevados a cabo en nuestro país en 2015-2016 (106,107)se concluyó que los clones predominantes de *K. pneumoniae* eran ST11-ST405/OXA-48, con una menor frecuencia de ST15/OXA-48. La carbapenemasa OXA-48 pasó a ser la más frecuente en nuestro medio, con una distribución creciente por todo el país.

En el año 2019, en el estudio CARB-ES-19(81)se detectó un aumento significativo desde 2015 de nuevos clones de alto riesgo como el emergente

ST307/OXA-48 y una amplia diseminación de ST512/KPC. Por el contrario, ST11/OXA-48 ha disminuido notablemente y ST15 se ha mantenido estable. Otros clones de alto riesgo fueron ST15/OXA-48, ST147/OXA-48, ST307/KPC-3, ST392/OXA-48 y ST147/NDM-1; siendo Madrid, Cataluña, Andalucía y Castilla La Mancha las comunidades de mayor prevalencia. En Aragón están descritas cepas de ST15/OXA-4, pero no en nuestro hospital.

Los clones de alto riesgo detectados en nuestro hospital coinciden con los de alto riesgo predominantes en nuestro país y de forma global. La especie más frecuente fue *K. pneumoniae* y cada clon se recuperó en pacientes individuales, si bien, algunos de ellos se aislaron en diferentes muestras clínicas, lo que permite concluir que fueron casos esporádicos.

5.4 EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN OTRAS ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS EN NUESTRO ESTUDIO.

De las cepas de *C. freundii*, se pudo secuenciar una procedente de una muestra de broncoaspirado, portadora de gen *bla*_{VIM-2}, *bla*_{CMY-2} y *bla*_{OXA-1}. Las 2 cepas de *C. freundii* que no pudieron ser secuenciadas pertenecen a 2 pacientes diferentes, son productoras de carbapenemasa tipo VIM y se aislaron de muestra clínica (broncoaspirado y hemocultivo).

C. freundii es una enterobacteria que se caracteriza por poseer AmpC cromosómica inducible y en cepas desreprimidas, junto con la posible pérdida de porinas, las CMI de los antibióticos carbapenems pueden verse aumentados o tener resistencia aún en ausencia de carbapenemasas. Como consecuencia, la producción de carbapenemasas en esta especie puede ser subestimada. En el caso de nuestro estudio, solo se pudo secuenciar una de las cepas de *C. freundii*, detectando VIM-2, que además portaba una AmpC plasmídica CMY-2, la más común detectada en el mundo (26).

Existen pocos estudios de infecciones relacionadas con *Citrobacter freundii* productor de carbapenemasas. De hecho, se ha estimado que es un patógeno oportunista relacionado en muchas ocasiones con las colonizaciones y que sirve como un reservorio genómico, especialmente de genes de resistencia (48,108). En el resto de Europa se han descrito casos de *C. freundii* productores de carbapenemasas: en Italia han detectado productores de VIM-1 pertenecientes a ST1, ST2, ST3 y ST4 (109). En España, en un estudio multicéntrico en 2015 (106) se detectaron 7 cepas de *C. freundii* productoras de OXA-48, VIM y KPC, y suponían el 1,1% de la muestra total de EPC. Otro estudio llevado a cabo por el *Spanish Antibiotic Resistance Surveillance Programme Collaborating Group* (110), observó que diferentes especies de *Citrobacter* spp., en especial,

C. freundii, sintetizaban diferentes tipos de carbapenemasas: la más frecuente fue VIM-1 seguida de OXA-48, KPC-2, NDM-1 y VIM-2. Un estudio de aislados obtenidos de un paciente de la UCI, se demostró la transmisión del gen *bla*_{VIM-2} desde *P. aeruginosa* a *C. freundii* (111).

En cuanto al secuenciotipo, se ha detectado por WGS que la cepa de *C. freundii* secuenciada pertenece al ST95. En República Checa(112) se describió *C. freundii* resistentes a colistina perteneciente a ST95 portadores de *bla*_{VIM-4} y en República dominicana también se aisló *C. freundii* en un paciente del ST95, pero era productor de KPC-2 (113). Con relación a nuestro estudio, no hay descrito en la bibliografía *C. freundii* ST95 productores de VIM-2.

K. oxytoca está más relacionada con la producción de BLEEs (87,108) que con la producción de carbapenemasas. Aunque existen pocos estudios que abordan la caracterización molecular de *K. oxytoca* productora de carbapenemas, se ha observado que es la especie más prevalente del género como productora de estas enzimas después de *K. pneumoniae* (114). Aunque se han descrito casos esporádicos de cepas productoras de NDM-1, IMP-4 y KPC-2 (115) o, en el estudio ICARE (116) en Estados Unidos para el control de resistencias bacterianas en UCI se aisló una *K. oxytoca* productora de KPC-2 (117).

El secuenciotipo al que pertenece es ST43, que se ha descrito previamente en Israel (118), pero no se ha descrito previamente en España. En nuestro país se detectaron ST2, ST20, ST36 productores de VIM-1. ST2 también se ha relacionado con la producción de OXA-48 y ST36 de KPC-3. ST141 con OXA-48 y ST176 con VIM-1 + KPC-5 y NDM-1(119).

5.5 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS FENOTÍPICOS Y MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS.

Se han descrito varios test fenotípicos para identificar una actividad carbapenemasas (120).En la actualidad, los métodos moleculares están sustituyendo a los métodos fenotípicos para la confirmación de microorganismos multiresistentes, no obstante, para el cribado de pacientes colonizados se siguen utilizando métodos fenotípicos.

Hoy en día existen una amplia variedad de medios cromogénicos en el mercado, pero los medios Chromoid® CARBA, Chromatic™ CRE y CHROMID® OXA-48 (121) son los que ofrecen mejores resultados de sensibilidad. Nuestros resultados han sido de un 100% de sensibilidad y especificidad en el medio CRE Brilliance (Oxoid®).

Los test de sinergia con E-test en la búsqueda de BLEE y AmpC, muestran sensibilidad y especificidad en muy baja si la enterobacteria es productora de carbapenemasa (120), con la excepción en algunos casos de productores de OXA-48, debido a su espectro de hidrólisis.

Se detectaron en 5 cepas (33,3%) productoras de OXA-48 la aparición de BLEEs más posible pérdida de porinas, y mediante secuenciación se confirmó la presencia de CTX-M-15 y mutaciones en las porinas.

Respecto a los test de sinergia de doble disco, la inhibición por ácido borónico para la detección de carbapenemasas de clase A tiene unos resultados con una alta sensibilidad, pero baja especificidad en los aislados con una alta expresión de AmpC (122). Si observamos los resultados obtenidos, no hubo ningún falso positivo, pero si un no concluyente que corresponde a la cepa de *K. oxytoca*, productora de VIM y AmpC plasmídica, por lo que la concentración de 50mg/mL interpretamos que no fue suficiente para inhibir la expresión de AmpC.

Las inmunocromatografías son un método rápido, de alta sensibilidad y especificidad en la detección de BLEE y carbapenemasas, aunque en el caso de las NDM e IMP se ha comprobado que la especificidad decrece a 99,6%(123). En nuestro estudio, las cepas con NDM, los resultados de CTX-M dieron falsos positivos cuando se comprobó mediante métodos moleculares. De las otras cepas, todas mostraron resultados positivos con una alta especificidad respecto a los métodos moleculares.

Los métodos moleculares se caracterizan por su alta sensibilidad y especificidad, con el gran inconveniente de incrementar coste y tiempo. Esto hace que introducirlos en la práctica clínica diaria de los laboratorios de microbiología es difícil en algunos casos. No obstante, cada vez existen métodos más rápidos, versátiles y menos costosos (124–126).

Los medios cromogénicos y los métodos de sinergia requieren tiempo de crecimiento y en ocasiones los resultados no son concluyentes. La inmunocromatografía es una técnica más sensible y específica, pero el rango de detección de diferentes β -lactamasas es limitado. En nuestro estudio se confirmaron las carbapenemasas detectadas mediante los métodos fenotípicos descritos tanto con la técnica molecular LAMP (Amplex®) como mediante la secuenciación del genoma completo. Además, se obtuvo más información para la caracterización de las cepas que mediante métodos convencionales no es posible, como la detección de determinantes de resistencia a otros antimicrobianos, mutaciones del genoma que generan resistencia o, mediante más estudios, genes de virulencia o secuencias genéticas móviles(127).

5.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

La principal limitación de nuestro estudio es que los resultados obtenidos pueden ser poco representativos ya que el número de muestras es bajo. Esto es debido a que en nuestro entorno la prevalencia de cepas con sensibilidad disminuida a carbapenems es baja, por lo que pocos aislamientos cumplían los criterios de selección necesarios para llevar a cabo la investigación.

Los test de sinergia para la detección de BLEE y AmpC no se han realizado con inhibidores de carbapenemasas. Por esta razón, los resultados se han podido ver condicionados, debido a que la producción de carbapenemasas enmascara la producción de BLEE y AmpC.

6. CONCLUSIONES

1. La aparición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, constituye un serio y creciente problema de salud pública. Este estudio constituye un aporte a la epidemiología de las carbapenemasas circulantes en la comunidad de Aragón en los últimos años y a su caracterización epidemiológica y molecular.
2. La mayoría de las enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenémicos en nuestro entorno obedecen a otros mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasas, como la producción de AmpC en combinación con cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana (pérdida, modificación y/o disminución de la expresión de porinas) y/o hiperexpresión de bombas de eflujo.
3. La prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en nuestro sector (0,027%) es menor que en otras regiones españolas y europeas.
4. La implementación de métodos moleculares y la secuenciación del genoma completo constituyen un avance importante para el estudio y control de microorganismos multirresistentes, lo que ayuda a tomar medidas rápidas para evitar su propagación.
5. Pese al bajo número de EPC detectado hasta el momento, es imprescindible realizar una vigilancia activa de estas enzimas en cualquier aislado de enterobacterias con sensibilidad disminuida a cualquier carbapenémico.
6. Conocer nuestra realidad local permite tomar las medidas adecuadas de vigilancia y control, así como estar alerta ante la llegada de nuevas carbapenemasas y/o secuenciotipos de alto riesgo emergentes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Madigan M. T. MJMM, DPV, & CDP. Brock biología de los microorganismos . 12th ed. Madrid: Pearson; 2009.
2. Murray PR RKPMA. Microbiología médica. . In Madrid: Elsevier; 2007. p. 323–38.
3. Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008 Oct 10;6(5):657–69.
4. Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch Med Res.* 2005 Nov;36(6):697–705.
5. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Feb;27(2):116–29.
6. Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2020 Dec;208:112829.
7. El-Lababidi RM, Rizk JG. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin. *Annals of Pharmacotherapy.* 2020 Dec 10;54(12):1215–31.
8. Thu ZM, Sun J, Ji J, He L, Ji J, Iqbal Z, et al. Synthesis and antibacterial evaluation of new monobactams. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021;39:127878.
9. Martínez Lacasa J, Garau J. [The role of carbapenems in the treatment of nosocomial infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1997 Sep;15 Suppl 1:78–85.
10. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs.* 2007;67(7):1027–52.
11. Moellering RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1989 Jan 1;24(suppl A):1–7.
12. Fukasawa M, Sumita Y, Harabe ET, Tanio T, Nouda H, Kohzuki T, et al. Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Jul;36(7):1577–9.
13. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):4943–60.
14. Carcione D, Siracusa C, Sulejmani A, Leoni V, Intra J. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics.* 2021 Aug 17;10(8):995.
15. Khanna NR, Gerriets V. Beta Lactamase Inhibitors. 2022.
16. Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1976 Jun;29(6):668–9.
17. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Microbiol Rev.* 2020;34(1).

18. Papp-Wallace KM, Mack AR, Taracila MA, Bonomo RA. Resistance to Novel β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Infect Dis Clin North Am*. 2020 Dec;34(4):773–819.
19. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med*. 2010 May 13;362(19):1804–13.
20. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
21. Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. Vol. 11, *Drug Discovery Today: Technologies*. Elsevier Ltd; 2014. p. 33–9.
22. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2227–38.
23. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969–76.
24. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1791–8.
25. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*. 1980 May 16;289(1036):321–31.
26. Seral C, Castillo J, Gude MJ. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*. 2012;25(2):89–99.
27. Ranjitkar S, Reck F, Ke X, Zhu Q, McEnroe G, Lopez SL, et al. Identification of Mutations in the *mrdA* Gene Encoding PBP2 That Reduce Carbapenem and Diazabicyclooctane Susceptibility of *Escherichia coli* Clinical Isolates with Mutations in *ftsI* (PBP3) and Which Carry *bla*_{NDM-1}. *mSphere*. 2019 Aug 28;4(4).
28. Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrdA*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016 May;71(5):1188–98.
29. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Dec;32 Suppl 4:4–9.
30. Lutgring JD. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: An emerging bacterial threat. *Semin Diagn Pathol*. 2019 May;36(3):182–6.
31. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. [KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in *Enterobacteriaceae*]. *Rev Chilena Infectol*. 2017 Oct;34(5):476–84.
32. González-Rocha G, Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, et al. Infectología al Día KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in *Enterobacteriaceae* [Internet]. Available from: www.sochinf.cl

33. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*. 2011 Jul 1;53(1):60–7.
34. PÉrez-Vázquez M, Sola-Campoy PJ, Zurita ÁM, Ávila A, Gómez-Bertomeu F, Solís S, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244 carrying blaVIM-2, blaVIM-1, blaIMP-8, blaVIM-20 and blaKPC-2. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Jul;56(1):106026.
35. Lopez-Diaz M, Ellaby N, Turton J, Woodford N, Tomas M, Ellington MJ. NDM-1 carbapenemase resistance gene vehicles emergent on distinct plasmid backbones from the IncL/M family. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(3):620–4.
36. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Apr;39(4):824–9.
37. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15–22.
38. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):241–63.
39. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1369–73.
40. Zhang C, Xu X, Pu S, Huang S, Sun J, Yang S, et al. Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases, quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants in carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* from a teaching hospital in Chongqing, Southwest China. *Infect Genet Evol*. 2014 Oct;27:271–6.
41. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct;25(4):682–707.
42. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin Infect Dis*. 2021;72(7):e169–83.
43. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S120–6.
44. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018;6(4).
45. Wei M, Tu N, Yang K. Resistance Mechanism of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae to Quinolones. *Clin Lab*. 2021 Aug 1;67(8).

46. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat*. 2016;29:13–29.
47. Zeng L, Zhang J, Li C, Fu Y, Zhao Y, Wang Y, et al. The determination of *gyrA* and *parC* mutations and the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST76 strains isolated from patients in Heilongjiang Province, China. *Infect Genet Evol*. 2020;82:104319.
48. Machuca J, Agüero J, Miró E, Conejo MDC, Oteo J, Bou G, et al. Prevalence of quinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae producing acquired AmpC β -lactamases and/or carbapenemases in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Oct;35(8):487–92.
49. Wachino JI, Doi Y, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am*. 2020;34(4):887–902.
50. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):252–75.
51. Bodendoerfer E, Marchesi M, Imkamp F, Courvalin P, Böttger EC, Mancini S. Co-occurrence of aminoglycoside and β -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Jul;56(1):106019.
52. Simner PJ, Patel R. Cefiderocol Antimicrobial Susceptibility Testing Considerations: the Achilles' Heel of the Trojan Horse? *J Clin Microbiol*. 2020;59(1).
53. Cortes-Lara S, Barrio-Tofiño E del, López-Causapé C, Oliver A, GEMARA-SEIMC/REIPI *Pseudomonas* study Group. Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Nov;27(11):1631–7.
54. Sękowska A, Bogiel T, Gospodarek-Komkowska E. Evaluation of eazyplex® SuperBug CRE Test for Beta-Lactamase Genes Detection in *Klebsiella* spp. and *P. aeruginosa* Strains. *Curr Microbiol*. 2020 Jan;77(1):99–103.
55. Sękowska A, Bogiel T. The Evaluation of Eazyplex® SuperBug CRE Assay Usefulness for the Detection of ESBLs and Carbapenemases Genes Directly from Urine Samples and Positive Blood Cultures. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jan 21;11(2).
56. Florensa AF, Kaas RS, Clausen PTLC, Aytan-Aktug D, Aarestrup FM. ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genom*. 2022;8(1).
57. Martínez-Martínez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017.
58. Granier SA, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine MH, Bush K, Goldstein FW. The Extended-Spectrum K1 β -Lactamase from *Klebsiella oxytoca* SC 10,436 Is a

- Member of the *bla*_{OXY-2} Family of Chromosomal *Klebsiella* Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun;46(6):2056–7.
59. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. The problem of multi-resistance in gram-negative bacilli in intensive care units: Treatment and prevention strategies. *Medicina Intensiva (English Edition).* 2022 Jun;46(6):326–35.
 60. Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014 Dec;32:17–23.
 61. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases.* 2017;215:S28–36.
 62. Bose P, Rangnekar A, Desikan P. NDM-beta-lactamase-1: Where do we stand? *Indian J Med Res.* 2022;155(2):243–52.
 63. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1).
 64. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019 Nov 29;4(11):1919–29.
 65. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1151–61.
 66. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. [KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae]. *Rev Chilena Infectol.* 2017 Oct;34(5):476–84.
 67. Sun P, Bi Z, Nilsson M, Zheng B, Berglund B, Stålsby Lundborg C, et al. Occurrence of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M}, and *mcr-1* in Enterobacteriaceae from Well Water in Rural China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Apr;61(4).
 68. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(45).
 69. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):153–63.
 70. Ludden C, Lötsch F, Alm E, Kumar N, Johansson K, Albiger B, et al. Cross-border spread of bla_{NDM-1}- and bla_{OXA-48}-positive *Klebsiella pneumoniae*: a European collaborative analysis of whole genome sequencing and epidemiological data, 2014 to 2019. *Euro Surveill.* 2020;25(20).
 71. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 18, *Nature Reviews Microbiology.* Nature Research; 2020. p. 344–59.

72. Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, González JJ, Larrosa N, Sabaté M, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3492–4.
73. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug;65(8):1608–14.
74. Gómez-Gil MR, Paño-Pardo JR, Romero-Gómez MP, Gasior M, Lorenzo M, Quiles I, et al. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Dec;65(12):2695–7.
75. Oteo J, Domingo-García D, Fernández-Romero S, Saez D, Guiu A, Cuevas O, et al. Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *J Med Microbiol.* 2012 Jun;61(Pt 6):864–7.
76. Pérez-Vázquez M, Sola Campoy PJ, Ortega A, Bautista V, Monzón S, Ruiz-Carrascoso G, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding blaNDM-like genes as determined by WGS. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(12):3489–96.
77. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Sep;55(9):4398–401.
78. Pano-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, et al. 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.* 2013 Jan 1;68(1):89–96.
79. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance.* 2019 Feb 28;24(9).
80. Brañas P, Gil M, Villa J, Orellana MÁ, Chaves F. Epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018 Feb;36(2):100–3.
81. Cañada-García JE, Moure Z, Sola-Campoy PJ, Delgado-Valverde M, Cano ME, Gijón D, et al. CARB-ES-19 Multicenter Study of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* From All Spanish Provinces Reveals Interregional Spread of High-Risk Clones Such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. *Front Microbiol.* 2022 Jun 30;13.
82. Bueno Sancho, Jessica. Vigilancia epidemiológica y caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenems en enterobacterias de origen clínico y de portadores [Tesis doctoral]. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2019.

83. Muro de Zaro Alcalá, Manuela (2017) *Carbapenemasas: un mecanismo de resistencia bacteriana frente las carbapenemas, antibióticos de último recurso*. [Trabajo Fin de Grado]. Madrid: Universidad Complutense, 2017.
84. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*. 2018 Jan;78(1):65–98.
85. Syed YY. Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2021 Sep 24;81(13):1559–71.
86. Ackley R, Roshdy D, Meredith J, Minor S, Anderson WE, Capraro GA, et al. Meropenem-Vaborbactam versus Ceftazidime-Avibactam for Treatment of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(5).
87. Cantón R, Loza E, Arcay RM, Cercenado E, Castillo FJ, Cisterna R, et al. Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* recovered during the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program in Spain (2016-2018). *Revista Española de Quimioterapia*. 2021 May 25;34(3):228–37.
88. Matesanz M, Mensa J. Ceftazidime-avibactam. *Revista Española de Quimioterapia*. 2021 Sep 1;34:38–40.
89. Findlay J, Poirel L, Juhas M, Nordmann P. KPC-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Collateral Effects in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(9):e0089021.
90. Fröhlich C, Sørum V, Tokuriki N, Johnsen PJ, Samuelsen Ø. Evolution of β -lactamase-mediated cefiderocol resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2022 Aug 25;77(9):2429–36.
91. Hobson CA, Cointe A, Jacquier H, Choudhury A, Magnan M, Courroux C, et al. Cross-resistance to cefiderocol and ceftazidime-avibactam in KPC β -lactamase mutants and the inoculum effect. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Aug 1;27(8):1172.e7-1172.e10.
92. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):565–91.
93. López-Cerero L, Almirante B. Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Reservoirs and transmission mechanisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Dec;32:10–6.
94. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):5873–84.
95. Soria-Segarra C, González-Bustos P, López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Rojo-Martín MD, Fernández-Sierra MA, et al. Tracking KPC-3-producing ST-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristics. *Mol Biol Rep*. 2020 Feb;47(2):1089–97.

96. Valentín-Martín A, Valverde-De Francisco A, Bosque-Vall M, Cantón-Moreno R. First report of colistin-resistant KPC-2 producing ST258-Klebsiella pneumoniae in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 31(7):489–91.
97. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Ortega A, Zamarrón P, Saez D, et al. The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of Klebsiella pneumoniae ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(12):3392–9.
98. López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, et al. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Dec;44(6):538–40.
99. Coelho A, Mirelis B, Alonso-Tarrés C, Larrosa MN, Miró E, Abad RC, et al. Detection of three stable genetic clones of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae in the Barcelona metropolitan area, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Oct;64(4):862–4.
100. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk Klebsiella pneumoniae Clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(10).
101. di Pilato V, Errico G, Monaco M, Giani T, del Grosso M, Antonelli A, et al. The changing epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(2):355–61.
102. Oteo-Iglesias J, Pérez-Vázquez M, Sola Campoy P, Moure Z, Sánchez Romero I, Sánchez Benito R, et al. Emergence of blood infections caused by carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae ST307 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(11):3402–5.
103. Haller S, Kramer R, Becker K, Bohnert JA, Eckmanns T, Hans JB, et al. Extensively drug-resistant Klebsiella pneumoniae ST307 outbreak, north-eastern Germany, June to October 2019. *Eurosurveillance*. 2019 Dec 12;24(50).
104. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Maamar E, Fernandez Martinez M, Ferjani S, Hammami S, et al. An Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*, Associated with OmpK35 and OmpK36 Porin Loss in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*. 2018 Oct;24(8):1137–47.
105. Protonotariou E, Poulou A, Politi L, Sgouropoulos I, Metallidis S, Kachrimanidou M, et al. Hospital outbreak due to a Klebsiella pneumoniae ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Sep;52(3):331–7.
106. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3406–12.
107. Esteban-Cantos A, Aracil B, Bautista V, Ortega A, Lara N, Saez D, et al. The Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Population Is Distinct and More Clonal than the Carbapenem-Susceptible Population. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4).

108. Seral C, de la Gándara MP, Castillo FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Jan;28(SUPPL. 1):12–8.
109. Gaibani P, Ambretti S, Farruggia P, Bua G, Berlingeri A, Tamburini MV, et al. Outbreak of *Citrobacter freundii* carrying VIM-1 in an Italian Hospital, identified during the carbapenemases screening actions, June 2012. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013 Sep;17(9):e714–7.
110. Arana DM, Ortega A, González-Barberá E, Lara N, Bautista V, Gómez-Ruiz D, et al. 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. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Dec 1;72(12):3283–7.
111. Porres-Osante N, Estepa V, Seral C, Rojo-Bezares B, Salvo S, Algarate S, et al. First Description of a blaVIM-2 Carrying *Citrobacter freundii* Isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):6331–2.
112. Bitar I, Papagiannitsis CC, Kraftova L, Chudejova K, Mattioni Marchetti V, Hrabak J. Detection of Five *mcr-9* -Carrying *Enterobacteriales* Isolates in Four Czech Hospitals. *mSphere*. 2020 Dec 23;5(6).
113. Fermin RR, Macesic N, Tolari G, Guzman A, Annavajhala M, Uhlemann AC. 1249. Emergence of Diverse Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the Dominican Republic. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Nov 26;5(suppl_1):S380–S380.
114. Dong N, Yang X, Wai-Chi Chan E, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). Available from: <https://doi.org/10.1016/j>.
115. Wang J, Yuan M, Chen H, Chen X, Jia Y, Zhu X, et al. First Report of *Klebsiella oxytoca* Strain Simultaneously Producing NDM-1, IMP-4, and KPC-2 Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Sep;61(9).
116. Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR, Pryor ER, McGowan Jr, JE, Archibald LK, et al. Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in United States Hospitals: Project ICARE Phase 2. *Clinical Infectious Diseases*. 1999 Aug;29(2):245–52.
117. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Dec;47(12):3881–9.
118. Izdebski R, Fiett J, Urbanowicz P, Baraniak A, Derde LPG, Bonten MJM, et al. Phylogenetic lineages, clones and β -lactamases in an international collection of *Klebsiella oxytoca* isolates non-susceptible to expanded-spectrum cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015 Aug 27;dkv273.
119. Pérez-Vazquez M, Oteo-Iglesias J, Sola-Campoy PJ, Carrizo-Manzoni H, Bautista V, Lara N, et al. Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016–2017. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jun;63(6).

120. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Vol. 29, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011. p. 524–34.
121. Dierikx C, Börjesson S, Perrin-Guyomard A, Haenni M, Norström M, Divon HH, et al. A European multicenter evaluation study to investigate the performance on commercially available selective agar plates for the detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods*. 2022 Feb;193:106418.
122. Bou G, Vila J, Seral C, Castillo FJ. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Dec;32:24–32.
123. Zhu Y, Jia P, Li X, Wang T, Zhang J, Zhang G, et al. Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5—a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacteriales diagnosis. *Ann Transl Med*. 2021 May;9(9):769–769.
124. Boolchandani M, D'Souza AW, Dantas G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nat Rev Genet*. 2019;20(6):356–70.
125. Pesesky MW, Hussain T, Wallace M, Patel S, Andleeb S, Burnham CAD, et al. Evaluation of machine learning and rules-based approaches for predicting antimicrobial resistance profiles in gram-negative bacilli from whole genome sequence data. *Front Microbiol*. 2016 Nov 28;7(NOV).
126. Florian Fricke W, Rasko DA. Bacterial genome sequencing in the clinic: Bioinformatic challenges and solutions. Vol. 15, *Nature Reviews Genetics*. 2014. p. 49–55.
127. Pérez-Viso B, Hernández-García M, Ponce-Alonso M, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, del Campo R, et al. Characterization of carbapenemase-producing *Serratia marcescens* and whole-genome sequencing for plasmid typing in a hospital in Madrid, Spain (2016-18). Vol. 76, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2021. p. 110–6.