

UAH

# Caracterización de aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos procedentes de hospitales españoles entre 2018 y 2022

Characterization of carbapenem-resistant isolates from *Enterobacter cloacae* complex from Spanish hospitals between 2018 and 2022

Máster Universitario en Microbiología Aplicada a la Salud Pública e Investigación en Enfermedades Infecciosas

Presentado por:

D. BRUNO BARRIO PANTÍN

Dirigido por:

Dra. MARÍA BELÉN ARACIL GARCÍA

Dra. MARÍA DOLORES PÉREZ VÁZQUEZ

Alcalá de Henares, a 19 de junio de 2023

## ÍNDICE

RESUMEN .....	- 1 -
<b>Palabras clave</b> .....	- 1 -
ABSTRACT.....	- 2 -
<b>Keywords</b> .....	- 2 -
INTRODUCCIÓN .....	- 3 -
<b>Antibióticos betalactámicos</b> .....	- 3 -
<b>Betalactamasas</b> .....	- 4 -
1.    Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	- 5 -
2.    Betalactamasas de tipo AmpC.....	- 5 -
3.    Carbapenemasas .....	- 6 -
a.    Carbapenemasas de clase A.....	- 7 -
• <b>KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase)</b> .....	- 7 -
• <b>GES (<i>Guiana Extended-Spectrum beta-lactamase enzymes</i>)</b> .....	- 7 -
b.    Carbapenemasas de clase B .....	- 7 -
• <b>VIM (<i>Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>)</b> .....	- 8 -
• <b>NDM (<i>New Delhi metallo-beta-lactamase</i>)</b> .....	- 8 -
• <b>IMP (<i>Imipenemase metallo-beta-lactamase</i>)</b> .....	- 8 -
c.    Carbapenemasas de clase D.....	- 8 -
<b>Complejo <i>Enterobacter cloacae</i> productor de carbapenemasas</b> .....	- 9 -
HIPÓTESIS.....	- 10 -
OBJETIVOS.....	- 10 -
MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 11 -
<b>Diseño del estudio y selección de muestras</b> .....	- 11 -
<b>Estudio de sensibilidad a antibióticos</b> .....	- 11 -
<b>Estudio de producción de carbapenemasas</b> .....	- 12 -
1.    Pruebas fenotípicas .....	- 12 -

a. Recuperación de la actividad antibiótica de carbapenémicos mediante tabletas de antibiótico con inhibidores .....	- 12 -
b. Recuperación de la actividad antibiótica de carbapenémicos mediante la adición manual de inhibidores a discos de antibiótico comerciales.....	- 13 -
c. Inmunocromatografía.....	- 13 -
d. Test de Hodge y test $\beta$ CARBA™ .....	- 14 -
2. Pruebas genóticas .....	- 14 -
<b>Secuenciación masiva: preparación de librerías y análisis de secuencias .....</b>	<b>- 16 -</b>
<b>Análisis filogenético y análisis de los genes de resistencia a antibióticos .....</b>	<b>- 16 -</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Selección de muestras .....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Estudio de sensibilidad a antibióticos.....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Identificación de especie y producción de carbapenemasas .....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>Análisis filogenético.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>ANEXO 5. INFORME TURNITIN .....</b>	<b>- 45 -</b>

## RESUMEN

El uso masivo e inadecuado de antibióticos en la práctica clínica durante las últimas décadas ha provocado la aparición y diseminación de bacterias multirresistentes. El desarrollo de resistencias frente a carbapenémicos constituye una grave amenaza, al ser considerados antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias resistentes al resto de betalactámicos.

El principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos es la producción de carbapenemasas y es especialmente preocupante en enterobacteriales, ya que dicho mecanismo se ha distribuido rápidamente a nivel global. Esto se debe principalmente a la capacidad que tienen los genes que codifican carbapenemasas de ser transferidos horizontalmente entre bacterias mediante plásmidos. Esta resistencia también puede deberse a una combinación de expresión de AmpC y/o BLEE junto con una disminución en la expresión de porinas.

En el presente estudio se caracterizaron los principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos y otros antibióticos en 75 aislados de origen clínico del complejo *Enterobacter cloacae*, procedentes de diferentes hospitales españoles durante 2018-2022. Mediante secuenciación del genoma completo y análisis filogenético por cgMLST, se caracterizaron genotípicamente los principales clones circulantes a nivel de su estructura poblacional, así como los principales genes de resistencia.

La detección de genes que codifican carbapenemasas en numerosos aislados, así como otros genes plasmídicos que confieren resistencia frente a otros antibióticos resulta alarmante, al reducir considerablemente las opciones terapéuticas. VIM-1 y OXA-48 fueron las carbapenemasas más comunes y se detectó la presencia en España de clones internacionales de alto riesgo, como el ST114 y el ST78.

**Palabras clave:** Complejo *Enterobacter cloacae*, resistencia antibiótica, genes de resistencia, betalactámicos, carbapenemasas, BLEE, AmpC, cgMLST, ST

## **ABSTRACT**

The massive and inappropriate use of antibiotics in clinical practice over the last decades has led to the emergence and spread of multidrug-resistant bacteria. The development of resistance to carbapenems is a serious threat as they are considered last-step antibiotics for treating infections caused by bacteria resistant to other beta-lactams.

The main mechanism of resistance to these antibiotics is the production of carbapenemases, and it is particularly concerning in *Enterobacteriaceae*, as this mechanism has rapidly spread globally. This is mainly due to the ability of carbapenemase-encoding genes to be horizontally transferred between bacteria through plasmids. This resistance can also be due to a combination of AmpC and/or ESBL expression along with a decrease in porin expression.

In this study, the main mechanisms of resistance to carbapenems and other antibiotics was characterized in 75 clinical isolates of *Enterobacter cloacae* complex from different Spanish hospitals recovered during 2018-2022. Genotypic characterization of the major circulating clones and the population structure of carbapenem-resistant strains in Spain was performed using whole-genome sequencing and cgMLST (core genome multilocus sequence typing) analysis.

The detection of carbapenemase-encoding genes in numerous isolates, as well as other plasmid-borne resistance genes related with resistance to other antibiotics, is deeply alarming as it significantly reduces therapeutic options. VIM-1 and OXA-48 were the most common carbapenemases, and the presence of internationally high-risk clones, such as ST114 and ST78, was detected in Spain.

**Keywords:** *Enterobacter cloacae* complex, antibiotic resistance, resistance genes, beta-lactams, carbapenemases, ESBL, AmpC, cgMLST, ST.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia antibiótica se define como la capacidad que presenta una bacteria para resistir la acción de una o varias familias de antibióticos. Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, los antibióticos se han empleado de manera continua en el tratamiento de infecciones bacterianas, provocando una disminución drástica de la mortalidad asociada a estas infecciones, el aumento de la esperanza de vida promedia y permitiendo la realización de procedimientos médicos esenciales en la medicina moderna (tratamiento inmunosupresor, grandes cirugías invasivas y trasplantes de órganos, entre otros).<sup>1,2</sup>

Sin embargo, durante las últimas décadas, el uso masivo e indiscriminado de antibióticos en la práctica clínica ha permitido la aparición, selección y diseminación de cepas resistentes a antibióticos. A su vez, la aparición de bacterias resistentes se ha visto potenciada gracias a la capacidad que poseen las bacterias de transferir horizontalmente genes de resistencia a otras bacterias a través de elementos genéticos móviles como plásmidos, generando una diseminación más efectiva de los mecanismos de resistencia. El grado de resistencia de una bacteria ha permitido clasificar las mismas en: cepas multirresistentes (resistente al menos a tres familias de antibióticos), extremadamente resistentes (resistente a todas las familias de antibióticos excepto a dos o menos) e incluso panresistentes (resistente a todas las familias de antibióticos).<sup>3,4</sup>

La aparición de bacterias multirresistentes continúa aumentando a nivel mundial a un ritmo alarmante, constituyendo una de las principales amenazas para la salud y economía global, al asociarse directamente con fallo terapéutico, aumento de la mortalidad y aumento del coste de la atención médica.<sup>5</sup>

### **Antibióticos betalactámicos**

Los antibióticos betalactámicos se definen químicamente por la presencia de un anillo betalactámico y constituyen una de las familias antibióticas más utilizada en la práctica clínica, especialmente cuando se sospecha de una infección por bacterias Gram-negativas. Dado que la diana de estos antibióticos es la pared celular, la cual está presente en todas las bacterias (excepto en el género *Mycoplasma*) y ausente en las células eucariotas, presentan un amplio espectro de actuación, una baja toxicidad y son muy efectivos.<sup>6</sup>

Los betalactámicos son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las PBPs (*penicillin binding proteins*), unas transpeptidasas localizadas en el espacio periplásmico que participan en la última etapa de la formación de la

pared celular. Gracias al anillo betalactámico, son capaces de unirse de manera irreversible a las PBPs y bloquear la síntesis de pared celular, provocando la muerte de la bacteria por cambios de presión osmótica.<sup>7, 8</sup>

En función del anillo betalactámico que presenten, los betalactámicos se pueden clasificar en: penicilinas, cefalosporinas (de primera, segunda, tercera y cuarta generación), carbapenémicos y monobactámicos. Los carbapenémicos son los betalactámicos más potentes y con mayor espectro de actividad, por lo que se suelen emplear como “antibióticos de última línea” frente a bacterias resistentes al resto de betalactámicos.<sup>8</sup> El aumento en los últimos años de infecciones provocadas por bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenémicos supone una gran amenaza para la Salud Pública, ya que la resistencia a carbapenémicos implica también, en la mayoría de los casos, la resistencia al resto de betalactámicos, limitando drásticamente las opciones terapéuticas para tratar este tipo de infecciones.<sup>9, 10</sup>

Los mecanismos de resistencia a betalactámicos más comunes son la producción de betalactamasas, la modificación de la diana de acción (mutaciones en las PBPs), la expresión de bombas de expulsión y la pérdida de permeabilidad celular por alteración en la expresión de porinas. Mientras que en los cocos Gram-positivos el principal mecanismo de resistencia es la modificación de las PBPs, en los bacilos Gram-negativos es la expresión de betalactamasas (aunque se pueden encontrar también el resto de mecanismos de resistencia).<sup>11</sup>

### **Betalactamasas**

El principal mecanismo de resistencia a antibióticos betalactámicos en bacilos Gram-negativos es la producción de betalactamasas, unas enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico e inactivar el antibiótico antes de que ejerza su acción al unirse a las PBPs. La producción de estas enzimas puede estar codificada por genes cromosómicos o por genes plasmídicos, de manera que las bacterias pueden adquirir la capacidad de producir estas enzimas mediante la transferencia de plásmidos con los genes que las codifican.<sup>12</sup>

Las betalactamasas se pueden clasificar siguiendo dos esquemas:

- Según la clasificación de Ambler, se clasifican en cuatro grupos (A, B, C, D) de acuerdo con la similitud estructural de su secuencia de aminoácidos. Según esta clasificación, las betalactamasas de clase A, C y D son serin-betalactamasas (presentan una molécula de serina en el sitio activo), mientras que las betalactamasa de clase B son metalo-betalactamasas (presentan una o dos moléculas de cinc en el sitio activo).<sup>13, 14</sup>

- Según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, las betalactamasas se clasifican en cuatro grupos (1, 2, 3, 4) según sus pesos moleculares, perfiles de sustratos y la capacidad de inhibirse o no, por la acción de sustancias como el ácido clavulánico o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).<sup>13, 15</sup>

Ambos esquemas estas correlacionados y ayudan a definir los distintos tipos de betalactamasas que podemos encontrar. Las betalactamasas más relevantes clínicamente son las siguientes:

### **1. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Las BLEE son betalactamasas de clase A (serin-betalactamasas) capaces de conferir resistencia frente a penicilinas, cefalosporinas (de primera, segunda, tercera y cuarta generación) y aztreonam (monobactámico), al ser capaces de hidrolizar estos betalactámicos. Sin embargo, no confieren resistencia frente carbapenémicos y su actividad es inhibida en presencia del inhibidor ácido clavulánico.<sup>16</sup>

Las BLEE se pueden agrupar en diferentes familias en función de los genes que codifican estas enzimas, siendo actualmente la familia CTX-M la más importante.<sup>17</sup> En los últimos años se ha incrementado drásticamente el número de cepas productoras de CTX-M, siendo detectada su producción en muchas bacterias patógenas. Dentro de la familia CTX-M, las variantes CTX-M-15 y CTX-M-14 son las más detectadas a nivel mundial en bacterias clínicamente relevantes. El principal motivo por el que se han conseguido expandir de manera tan rápida a tantas especies bacterianas, es la transferencia horizontal de genes de resistencia mediada por plásmidos.<sup>18</sup>

### **2. Betalactamasas de tipo AmpC**

Las betalactamasas de tipo AmpC (clase C) son cefalosporinasas codificadas en el cromosoma de numerosos enterobacteriales (incluido el género *Enterobacter*) que confieren resistencia frente a penicilinas, combinaciones de penicilinas con inhibidores clínicos y cefalosporinas (de primera y segunda generación). Esta betalactamasa se expresa en muchos enterobacteriales de manera constitutiva a unos niveles basales, sin embargo, su expresión es inducible frente a la exposición a betalactámicos, de manera que una cepa inicialmente sensible puede volverse resistente tras el tratamiento.<sup>19</sup>

Las AmpC no se inhiben en presencia del inhibidor ácido clavulánico ni confieren resistencia frente a carbapenémicos, pero puede conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación si se producen mutaciones en los genes que regulan la producción de AmpC, las cuales conducen a una hiperproducción de esta enzima.<sup>20</sup>

Pese a que los genes que codifican la producción de AmpC suelen ser cromosómicos, se ha descrito también su presencia en plásmidos, de manera que muchas bacterias han adquirido la capacidad de expresar esta betalactamasa.<sup>21</sup> Se han descrito más de 20 familias de AmpC plasmídicas, pero las más comunes se clasifican en seis familias (ACC, CIT, DHA, EBC, FOX y MOX) y derivan de genes *ampC* cromosómicos de diferentes bacterias, que han sido integrados en plásmidos.<sup>22, 23</sup>

### 3. Carbapenemasas

Las carbapenemasas son las betalactamasas más potentes y confieren resistencia en la mayoría de ocasiones frente a carbapenémicos. Estas enzimas constituyen uno de los mecanismos de resistencia antibiótica más preocupantes a nivel mundial, debido a que limita mucho las opciones terapéuticas. Este mecanismo de resistencia es especialmente alarmante en enterobacteriales, ya que se encuentran ampliamente distribuidas a nivel global, llegando a ser endémico en algunos países.<sup>24</sup>

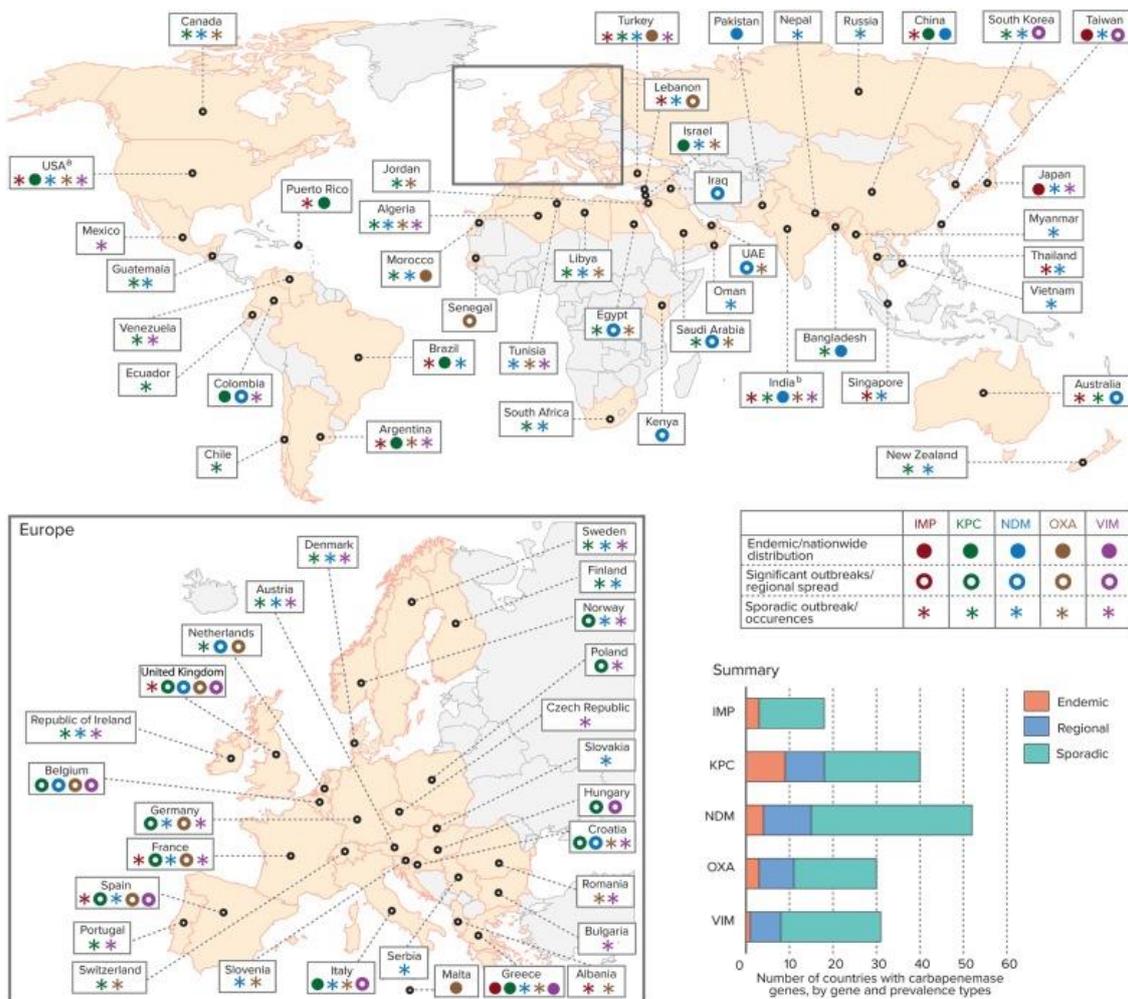


Figura 1. Distribución mundial de las carbapenemasas en enterobacteriales.<sup>24</sup>

Las carbapenemasas pertenecen a tres clases diferentes de betalactamasas según la clasificación de Ambler, de manera que podemos encontrar carbapenemasas de clase A, B y D:<sup>25</sup>

#### **a. Carbapenemasas de clase A**

Dentro de esta familia de carbapenemasas, principalmente encontramos:

- **KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)**

Se trata de la carbapenemasa de clase A más frecuente y relevante clínicamente. Fue descrita por primera vez en 1996 en Estados Unidos a partir de un asilado de *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, desde su descubrimiento se ha descrito su producción en multitud de especies bacterianas (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., entre otros). Se han identificado múltiples variantes, siendo las más predominantes a nivel mundial las variantes KPC-2 y KPC-3. Pese a ser una carbapenemasa, únicamente confiere una resistencia moderada a los carbapenémicos, siendo mucho más eficaz frente a penicilinas y cefalosporinas. Su acción se inhibe en presencia de ácido fenil borónico y ácido clavulánico, al igual que las BLEE, que también pertenecen a la clase A.<sup>26</sup>

Está codificada por genes *bla<sub>KPC</sub>*, los cuales se han encontrado en plásmidos transferibles, lo que explica la rápida diseminación que ha sufrido esta carbapenemasa en pocos años a nivel mundial. Además, los plásmidos en los que suelen encontrarse los genes *bla<sub>KPC</sub>*, suelen portar simultáneamente otros genes que confieren resistencia a otras familias antibióticas, potenciando el riesgo de generar cepas multirresistentes.<sup>26, 27</sup>

- **GES (*Guiana Extended-Spectrum beta-lactamase enzymes*)**

Fue descrita por primera vez en el año 2000, y pese a que las primeras variantes descritas presentaban un perfil de BLEE, se ha visto que algunas variantes (GES-4, GES-5 y GES-6, entre otras) actúan realmente como carbapenemasas. Está codificada por genes *bla<sub>GES</sub>*, los cuales se han encontrado en plásmidos transferibles, e incluso en el cromosoma de algunos enterobacteriales.<sup>26</sup>

#### **b. Carbapenemasas de clase B**

Las carbapenemasas de clase B son metalo-betalactamasas que confieren resistencia frente a todos los betalactámicos, a excepción de los monobactámicos. Al ser dependientes de cinc, estas enzimas son inhibidas en presencia de EDTA o ácido dipicolínico, pero no en presencia de ácido clavulánico o ácido fenil borónico.<sup>28</sup> Las metalo-betalactamasas más frecuentes son:

- **VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*)**

Fue descrita por primera vez en 1997 en Italia a partir de un aislado de *Pseudomonas aeruginosa*. Se han descrito numerosas variantes, siendo la variante VIM-2 la predominante y más distribuida a nivel mundial. Se ha identificado la producción de VIM en múltiples especies bacterianas, entre las que se encuentra *Enterobacter cloacae*. Está codificada por genes *bla<sub>VIM</sub>*, los cuales se suelen encontrar en forma de casetes genéticos en integrones, de manera que pueden transferirse horizontalmente a través de plásmidos.<sup>29</sup>

- **NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*)**

Fue descrita por primera vez en 2008 en un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae* de un paciente sueco que estuvo hospitalizado en la India. Desde su descubrimiento se han descrito numerosas variantes, siendo la más frecuente en la práctica clínica la variante NDM-1. Esta carbapenemasa ha mostrado una rápida diseminación global y su producción se ha extendido principalmente a múltiples enterobacteriales. Esto se debe a que está codificada por genes *bla<sub>NDM</sub>*, los cuales se encuentran en diferentes plásmidos grandes fácilmente transferibles a otras bacterias. Al encontrarse en plásmidos grandes, suelen portar simultáneamente otros genes que confieren resistencia a otras familias antibióticas.<sup>30, 31</sup>

- **IMP (*Imipenemase metallo-beta-lactamase*)**

Fue la primera carbapenemasa codificada por genes plasmídicos detectada. Se identificó por primera vez en 1993 en Japón a partir de un aislado de *Pseudomonas aeruginosa*. Es un grupo de carbapenemasas muy diverso, con más de 50 variantes identificadas, siendo la variante IMP-1 la más predominante.<sup>32</sup> Se ha descrito en numerosos enterobacteriales y se ha diseminado a nivel mundial, provocando brotes o casos esporádicos en muchos países, con mayor prevalencia en Asia. Está codificada por genes *bla<sub>IMP</sub>*, los cuales se suelen encontrar en forma de casetes genéticos en integrones, de manera que pueden transferirse horizontalmente a través de plásmidos.<sup>26</sup>

### c. Carbapenemasas de clase D

Dentro de esta familia de carbapenemasas, también conocidas como oxacilinasas, las más importantes son las denominadas carbapenemasas OXA-48-like, ya que, pese a que hidrolizan de manera poco eficiente los carbapenémicos, es suficiente en muchos casos para conferir resistencia a estos antibióticos.<sup>33</sup> En contraposición con el resto de beta-lactamasas, estas enzimas no son inhibidas por ningún inhibidor.

La carbapenemasa OXA-48 fue descrita por primera vez en 2003 en Turquía a partir de un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae*. Desde su descubrimiento han aparecido otras oxacilinasas, con una secuencia aminoacídica similar a OXA-48, que son capaces de hidrolizar carbapenemasas. Todas estas oxacilinasas con capacidad de conferir resistencia a carbapenémicos se han agrupado bajo el término OXA-48-like.<sup>26</sup>

Las carbapenemasas OXA-48-like se han diseminado rápidamente por Europa, llegando a ser las carbapenemasas predominantes en muchos países, entre los que se encuentra España. Esto se debe principalmente a que el gen *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, localizado en el transposón compuesto Tn1999 se ha movilizó en plásmidos conjugativos a diferentes enterobacteriales.<sup>34</sup>

### **Complejo *Enterobacter cloacae* productor de carbapenemasas**

Las bacterias del género *Enterobacter* son bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos pertenecientes al orden Enterobacterales. Se pueden encontrar en una gran variedad de hábitats ambientales y forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales y humanos. En la actualidad se han descrito 22 especies dentro del género *Enterobacter*, entre las que se encuentran *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter roggkampii*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* y *Enterobacter bugandensis*, las cuales se agrupan dentro del complejo *Enterobacter cloacae* por la homología de su ADN.<sup>35, 36</sup>

Ciertas especies pueden actuar como patógenos oportunistas y se asocian a menudo con infección y brotes hospitalarios, siendo *Enterobacter hormaechei* la especie más frecuentemente aislada en la práctica clínica.<sup>37</sup>

*Enterobacter* spp. puede causar una gran variedad de infecciones: neumonía, meningitis, bacteriemia, infecciones del tracto urinario e infecciones gastrointestinales, siendo especialmente relevantes las infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (donde es responsable de hasta el 36% de las infecciones en algunos hospitales).<sup>38</sup>

Cada vez se está observando un mayor número de infecciones provocadas por *Enterobacter* spp. multirresistente, siendo especialmente preocupantes los casos producidos por especies pertenecientes al complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos. La resistencia a carbapenémicos en el complejo *Enterobacter cloacae* se ha extendido a nivel mundial y se ha notificado en todas las regiones sanitarias de la OMS.<sup>39</sup>

El mecanismo de resistencia a carbapenémicos más frecuente en el complejo *Enterobacter cloacae* es la producción de carbapenemasas transferidas horizontalmente mediante plásmidos.<sup>40</sup> En los hospitales españoles las carbapenemasas más frecuentes en especies del género *Enterobacter* son VIM-1 y OXA-48.<sup>37</sup>

En relación con la resistencia a otros betalactámicos, todas las especies del género *Enterobacter* presentan un gen *ampC* cromosómico<sup>41</sup> y en las especies pertenecientes al complejo *Enterobacter cloacae* se ha descrito la presencia de BLEE, destacando las familias CTX-M, TEM y SHV. Además, se han descrito numerosas cepas de *Enterobacter* spp. resistentes a carbapenémicos debido a una pérdida de permeabilidad por una alteración en la expresión de porinas y/o sobreexpresión de bombas de expulsión, en combinación con la síntesis de BLEE o AmpC.<sup>42</sup>

Es necesaria la vigilancia epidemiológica y caracterización de las cepas multirresistentes del complejo *Enterobacter cloacae*, con el objetivo de poder tomar medidas de control que permitan evitar su diseminación intra e interhospitalaria, disminuir el número de casos y buscar alternativas terapéuticas diferentes, tales como la terapia combinada con dos o más antibióticos.<sup>43</sup>

### **HIPÓTESIS**

Se está produciendo un aumento del número de infecciones provocadas por especies pertenecientes al complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a antibióticos carbapenémicos en el territorio español. Este aumento puede deberse a la diseminación de algún clon de alto riesgo asociado a la resistencia a carbapenémicos, con genes de resistencia probablemente localizados en elementos genéticos móviles que facilitan su transferencia

### **OBJETIVOS**

- Caracterización de los principales mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos y otros antibióticos usados en la práctica clínica en aislados clínicos del complejo *Enterobacter cloacae* procedentes de diferentes hospitales españoles durante los años 2018-2022.
- Caracterización de los principales clones circulantes y de la estructura poblacional de los aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos en España.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio y selección de muestras**

La colección de estudio se obtuvo a partir de aislados del complejo *Enterobacter cloacae* enviados al Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid, España) a través del Programa de Vigilancia de la Resistencia a Antibióticos (PVRA-CNM), en el periodo de tiempo comprendido entre el 01/01/2018 y el 31/12/2022. El número de aislados del complejo *Enterobacter cloacae* recibidos en ese periodo ascendía a 581, de los cuales únicamente 301 presentaban resistencia al menos a un carbapenémico.

Para realizar un análisis representativo de la epidemiología del complejo *Enterobacter cloacae* resistente a carbapenémicos en toda España, se seleccionó un aislado por hospital y año (desde 2018 hasta 2022), priorizando las muestras más invasivas. De esta manera, se obtuvo un total de 75 aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos. En el Anexo 1 se muestra la procedencia de los aislados seleccionados.

Para comprobar la viabilidad de los aislados, se realizó un subcultivo de cada uno en una placa agar MacConkey a partir del cepario original del Centro Nacional de Microbiología. Una vez comprobada su viabilidad, con el objetivo de poseer una colección propia, los aislados fueron congelados en viales de leche descremada a partir de las colonias obtenidas en las placas de agar MacConkey. Esta colección se mantuvo durante todo el estudio en congeladores a una temperatura de -20°C.

### **Estudio de sensibilidad a antibióticos**

Se determinó el perfil de sensibilidad a antibióticos de las cepas seleccionadas mediante microdilución en caldo. Se emplearon paneles de antibióticos específicos para bacterias Gram negativas de la casa comercial Thermo Fisher Scientific, España (paneles DKMGN™ de 96 pocillos).

Estos paneles permiten determinar el valor de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de los aislados frente a una gran variedad de antibióticos: penicilinas (amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam), cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam), carbapenémicos (meropenem, imipenem y ertapenem), monobactámicos (aztreonam), aminoglucósidos (amikacina, tobramicina y gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), polimixinas (colistina), tetraciclinas (tigeciclina) y cotrimoxazol (trimetoprima-sulfametoxazol).

Para realizar este estudio, en primer lugar, se subcultivó cada cepa en una placa de agar Müller-Hinton. Se dejaron incubar durante 18-24 horas en estufa a  $37,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y una vez transcurrido este tiempo, se realizó una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez de 0,5 McFarland (correspondiente a una suspensión aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) en 29 mL de agua desmineralizada.

Una vez preparada la suspensión bacteriana, se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  a 11 mL de caldo Müller-Hinton Broth. Por último, se procedió a la inoculación de cada suspensión en los paneles de antibióticos, empleando el sistema de dosificación de inóculo automatizado Thermo Scientific Sensititre AIM™ (Thermo Fisher Scientific, España); inoculando 50  $\mu\text{L}$  en cada pocillo del panel. Una vez inoculados, los paneles se dejaron incubar durante 18-24 horas en estufa a  $37,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Transcurrido este tiempo, se procedió a la interpretación de los resultados obtenidos en los paneles de forma manual, empleando un lector de placas de microtitulación con espejo Sensititre™, (Sensititre, Werfen, España) y se determinó la CMI de cada cepa frente a los diferentes antibióticos estudiados. Para discernir entre cepas sensibles y cepas resistentes frente a un antibiótico, se consultaron los puntos de corte del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

## **Estudio de producción de carbapenemasas**

Se realizó este estudio para saber si las cepas estudiadas (resistentes al menos a un carbapenémico) eran productoras de carbapenemasas. Se llevaron a cabo una serie de pruebas fenotípicas y genotípicas:

### **1. Pruebas fenotípicas**

Se determinó la producción de carbapenemasas mediante el desarrollo de diferentes pruebas fenotípicas:

#### **a. Recuperación de la actividad antibiótica de carbapenémicos mediante tabletas de antibiótico con inhibidores**

Se determinó la producción de carbapenemasas empleando las tabletas Neo-Sensitabs™ de la casa comercial ROSCO, España, las cuales contienen un antibiótico carbapenémico y diferentes inhibidores de carbapenemasas. En nuestro caso, empleamos tabletas de meropenem, meropenem + cloxacilina, meropenem + ácido fenil borónico y meropenem + ácido dipicolínico.

Se determinó y caracterizó la producción de carbapenemasas en función de la recuperación de actividad que mostrara el meropenem en presencia de los diferentes inhibidores de

carbapenemasas. Los criterios empleados para la interpretación de los resultados fueron los siguientes:

- Recuperación de la actividad del meropenem en presencia de ácido fenil borónico: indica la producción de una carbapenemasa de clase A.
- Recuperación en presencia de ácido dipicolínico: indica la producción de una carbapenemasa de clase B.
- Recuperación en presencia de ácido fenil borónico y cloxacilina: indica la hiperproducción de una AmpC cromosómica o la producción de una AmpC plasmídica, de manera que se confiere resistencia al carbapenémico.
- No recuperación en presencia de ningún inhibidor: indica la producción de una carbapenemasa de clase D.

Se consideró que el antibiótico recuperaba su actividad cuando, en presencia de un inhibidor, aumentaba el halo de inhibición obtenido un mínimo de 5 mm con respecto al halo de inhibición obtenido en presencia exclusiva del antibiótico. Para llevar a cabo esta metodología, se preparó una suspensión bacteriana en PBS con un patrón de turbidez de 0,5 McFarland y se realizó una siembra en césped de esta sobre una placa de agar Müeller-Hinton. Posteriormente se colocaron las cuatro tabletas mencionadas anteriormente, y tras una incubación en estufa a  $37,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas, se procedió a su lectura.

#### **b. Recuperación de la actividad antibiótica de carbapenémicos mediante la adición manual de inhibidores a discos de antibiótico comerciales**

Se determinó la producción de carbapenemasas empleando discos de antibióticos modificados en el laboratorio, los cuales se prepararon utilizando discos de antibiótico ertapenem comerciales de la casa Biorad™, España, a los que se añadieron diferentes inhibidores en dosis de 10  $\mu\text{L}$  de inhibidor por disco. En este caso, los discos empleados fueron de ertapenem, ertapenem + cloxacilina, ertapenem + ácido fenil borónico y ertapenem + EDTA. Los criterios empleados para la determinación y caracterización de producción de carbapenemasas, así como la metodología, fue la misma que para las tabletas Neo-Sensitabs™.

#### **c. Inmunocromatografía**

Se determinó la producción de carbapenemasas empleando la prueba rápida para detección de carbapenemasas NG-TEST CARBA 5™, de la casa comercial NG Biotech, España. Se trata de una inmunocromatografía que permite determinar de manera simultánea la producción de las principales carbapenemasas (KPC, VIM, NDM, IMP y OXA-48-like). Se siguieron las indicaciones

del fabricante para la realización de esta prueba, así como para la interpretación de los resultados.

#### **d. Test de Hodge y test $\beta$ CARBA™**

Se determinó la producción de carbapenemasas mediante la realización de un test de Hodge y un test  $\beta$  CARBA™ o CARBA NP. El test de Hodge permite detectar la producción de carbapenemasas, bajo el fundamento de que la liberación de estas enzimas al medio por parte de nuestra cepa problema, permite el crecimiento de una cepa bacteriana sensible a los antibióticos carbapenémicos en presencia de un disco antibiótico carbapenémico.

Para esta determinación, se realizó en primer lugar una siembra en césped de una cepa de *E. coli* sensible a carbapenémicos (ATCC 25922) en una placa de agar Müller-Hinton (a partir de una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez de 0,5 McFarland en PBS). Posteriormente se colocó un disco antibiótico de meropenem y se realizó una descarga de la cepa problema desde el borde de la placa hasta el disco antibiótico. Tras 18-24 horas de incubación a  $37,5 \pm 2^\circ\text{C}$  se procedió a su lectura y se interpretó el test como positivo (producción de carbapenemasas) únicamente cuando se observaba un crecimiento por parte de la cepa de *E. coli* sensible en forma de “punta de flecha” hacia el centro de la placa, por una deformación del halo de sensibilidad inicial formado por la misma.

El test  $\beta$  CARBA™ o CARBA NP es una prueba colorimétrica cualitativa de la casa comercial Bio-Rad, España, que permite una detección rápida de cepas productoras de carbapenemasas. Esta prueba se basa en el cambio de color de un sustrato cromogénico que se produce en presencia de carbapenemasas por la modificación del pH que confiere la liberación de la enzima. Para la realización de este ensayo, así como para la interpretación de los resultados, se siguieron las instrucciones del fabricante.

## **2. Pruebas genotípicas**

Se realizó una PCR múltiple a tiempo real para detectar la presencia de los genes codificantes de las principales carbapenemasas (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>OXA-48L</sub>*) en la colección. Para llevar a cabo esta PCR, se llevó a cabo la extracción del ADN bacteriano de estas cepas mediante el método de hervido. Para ello se preparó una suspensión con un patrón de turbidez de 2 McFarland de cada una de ellas en agua libre de nucleasas y se incubó en termobloque a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Posteriormente se recogió el sobrenadante con el ADN bacteriano y se procedió a su amplificación.

Los cebadores empleados para cada gen fueron los siguientes:

**Tabla 1.** Cebadores empleados para la caracterización de carbapenemasas mediante PCR a tiempo real.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño amplicón
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC D	5'-GTCGGAGACAAAACCGGAAC-3'	102 pb
	KPC R	5'-GGTGTAGACGGCCAACACAA-3'	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM D	5'-TTCCATAGCGACAGCACRGG-3'	179 pb
	VIM R	5'-GGGCCRGGRTARAACTTC-3'	
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM D	5'-AGGACAAGATGGGCGGTATG-3'	124 pb
	NDM R	5'-GCGAAAGTCAGGCTGGTTG-3'	
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP D	5'-TTCCATAGCGACAGCACRGG-3'	179 pb
	IMP R	5'-GGGCCRGGRTARAACTTC-3'	
<i>bla<sub>OXA-48L</sub></i>	OXA-48 D	5'-TCACAGGGCGTAGTTGTGCT-3'	126 pb
	OXA-48 R	5'-GAGGGCGATCAAGCTATTGG-3'	

Las sondas empleadas para cada gen fueron las siguientes:

**Tabla 2.** Sondas empleadas para la caracterización de carbapenemasas mediante PCR a tiempo real.

Sonda	Secuencia
<b>OXA-48L</b>	Fam-CGGGCGAACCAAGCATTTTT-BHQ-1
<b>VIM</b>	Hex-CCGGCTTTACCAGATTGCCG BHQ 1-3
<b>IMP</b>	Atto-TCCCACGTATGCATCTGAATTA ACA Eclipse TM
<b>NDM</b>	Cyn -GCGGGGATTGCGACTTATGC- BHQ-2-3
<b>KPC</b>	Texas Red -ACTATGCCGTCGTCTGGCCC- BHQ-2

Las condiciones de amplificación de la PCR múltiple fueron:

- Preincubación: 15 minutos a 95°C.
- Amplificación: 6 ciclos de 30 segundos a 94°C, y 90 segundos a 61°C.  
40 ciclos de 20 segundos a 95 °C, y 60 segundos a 58 °C.
- Elongación: 2 minutos 40°C.

## Secuenciación masiva: preparación de librerías y análisis de secuencias

Para la preparación de las librerías, se llevó a cabo la extracción del ADN bacteriano por método de colonia directa. Una vez extraído, se prepararon las librerías empleando Nextera DNA CD Indexes™ (96 Indexes) y NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5™ (300 cycles) de la casa comercial Illumina, España. Una vez preparadas las librerías, fueron secuenciadas en la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro Nacional de Microbiología, empleando el secuenciador de próxima generación Illumina NovaSeq 6000.

La calidad de las secuencias crudas se evaluó empleando el programa FastQC™, Babraham Bioinformatics, Reino Unido. Una vez evaluada la calidad de las lecturas crudas, se llevó a cabo un ensamblado *de novo* (sin genoma de referencia) de esas lecturas empleando el programa Unicycler, probando cinco k-mers diferentes bajo parámetros optimizados para brindar el mejor ensamblaje (referencia de unicycler). La calidad de los ensamblados obtenidos se evaluó mediante el programa QCAST™ (Quast\_Bioinf, San Petesburgo, Rusia).

Para la identificación de la especie bacteriana se empleó la herramienta KmerFinder del CGE (*Center for Genomic Epidemiology*) y el programa Mash<sup>44</sup>, que analiza la similitud de las secuencias con la base de datos RefSeq del NCBI. Este análisis permite identificar la especie del complejo *Enterobacter cloacae* a la que pertenece cada cepa y detectar posibles contaminaciones.

## Análisis filogenético y análisis de los genes de resistencia a antibióticos

Para estudiar la estructura poblacional de las cepas de estudio, se llevó a cabo un análisis filogenético mediante cgMLST (*core genome multilocus sequence typing*). Para el complejo *E. cloacae*, así como para las especies *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter roggenkampii* se crearon esquemas *ad hoc* de cgMLST, utilizando el MLST+ target de SeqSphere+3.5.0 (Ridom, Alemania) con los parámetros predeterminados y las siguientes secuencias de referencia en cada caso: *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 (NC\_014121), *E. hormaechei* (NC\_021046) y *E. roggenkampii* (NZ\_CP022148.1). Se utilizaron un total de 38, 24 y 26 genomas NCBI RefSeq para el complejo *E. cloacae*, *E. hormaechei* y *E. roggenkampii*, respectivamente, como genomas de consulta para validar en una comparación por pares usando BLAST. Los esquemas utilizados estaban formados por 631, 2123 y 2446 para el complejo *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter roggenkampii* respectivamente.

Además, se determinó el secuenciotipo (ST) de cada cepa, y se visualizaron las diferencias alélicas entre ellas mediante la construcción de un árbol filogenético (*minimum-spanning tree*). En

aquellas cepas en las que se detectó una combinación alélica no descrita hasta el momento, se procedió a enviar su secuencia al NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la asignación de un nuevo ST.

Posteriormente, se calculó la diversidad genética de la población de 75 cepas del complejo *Enterobacter cloacae* resistente a carbapenémicos, mediante el cálculo del índice de diversidad simple (SDI).

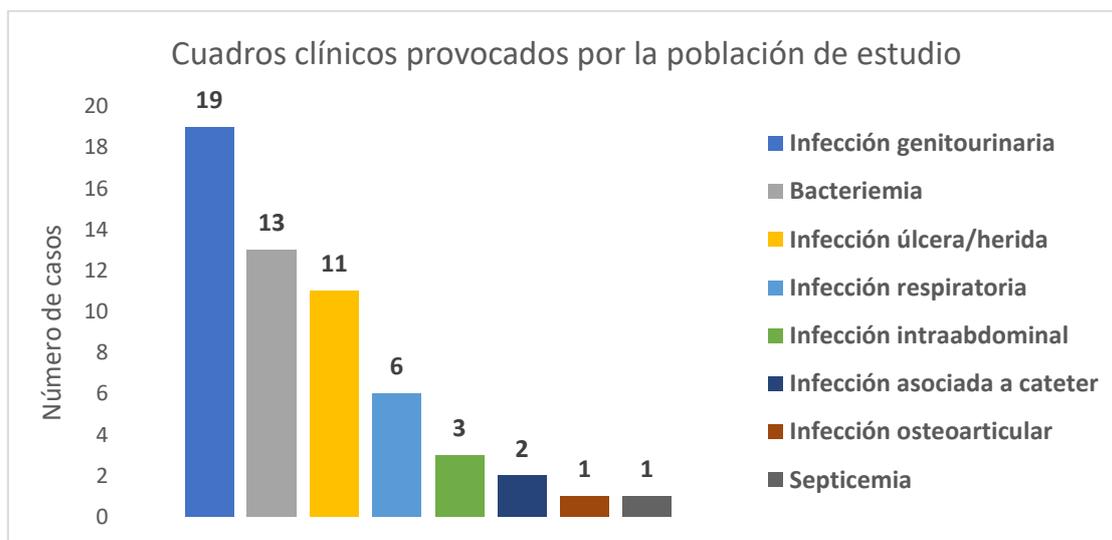
Los genes de resistencia a antibióticos fueron detectados mediante la herramienta ResFinder del CGE (*Center for Genomic Epidemiology*), con un porcentaje mínimo de identidad del 98% para todos los genes, excepto para los genes de betalactamasas, en los que se utilizó el 100%.

## RESULTADOS

### Selección de muestras

Dentro de nuestra colección de 75 aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos enviadas al Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología entre el año 2018 y 2022, tuvieron representación 47 hospitales pertenecientes a 21 provincias. La provincia de Madrid fue la más representada, siendo 25 (33,33%) de los aislados procedentes de sus centros sanitarios.

De los 75 aislados, 54 (72%) pertenecían a infecciones intrahospitalarias, 16 (21,3%) a infecciones adquiridas en la comunidad y 5 (6,7%) a infecciones asociadas a centros de salud. En relación con los cuadros clínicos, 56 (74,7%) produjeron infecciones clínicas, entre las que encontramos: 19 infecciones genitourinarias (25,3%), 13 bacteriemias (17,3%), 11 infecciones de heridas/úlceras (14,7%), 6 infecciones respiratorias (8%), 3 infecciones intraabdominales (4%), 2 infecciones asociadas a catéter (2,7%), 1 infección osteoarticular (1,3%) y 1 septicemia (1,3%). Los 19 aislados restantes (25,3%), produjeron casos de colonización.



**Figura 2.** Cuadros clínicos provocados en los pacientes por los 56 aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos responsables de infecciones clínicas.

### Estudio de sensibilidad a antibióticos

En la Tabla 1 se muestra el rango de CMI, CMI<sub>50</sub> (Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe el crecimiento de al menos el 50% de la población), CMI<sub>90</sub> (Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe el crecimiento de al menos el 90% de la población) y porcentaje de sensibilidad (S), sensibilidad con exposición incrementada (I) y resistencia (R) de la población bacteriana frente a los diferentes antibióticos estudiados.

**Tabla 3.** Resultados del estudio de sensibilidad a antibióticos de la población bacteriana. Rango de CMI<sub>s</sub>, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y porcentaje de susceptibilidad (S, I, R) de la población bacteriana frente a los diferentes antibióticos estudiados. S: Sensibilidad; I: Sensibilidad con exposición incrementada; R: Resistencia.

Antibióticos	Rango CMI <sub>s</sub> (mg/L)	CMI <sub>50</sub> (mg/L)	CMI <sub>90</sub> (mg/L)	S	I	R
Amoxicilina/Clavulánico	> 64/2	> 64/2	> 64/2	0 %	-	100 %
Piperacilina/Tazobactam	16/4 - > 32/4	> 32/4	> 32/4	0 %	-	100 %
Cefotaxima	1 - > 8	> 8	> 8	1,33 %	1,33 %	97,34 %
Ceftazidima	≤ 0.5 - > 16	> 16	> 16	5,33 %	2,67 %	92 %
Ceftazidima/Avibactam	≤ 0.5/4 - > 16/4	> 16/4	> 16/4	46,67 %	-	53,33 %
Ceftolozano/Tazobactam	≤ 0.5/4 - > 32/4	> 32/4	> 32/4	5,33 %	-	94,67 %
Meropenem	≤ 0.12 - > 16	1	16	66,67 %	16 %	17,33 %
Imipenem	≤ 0.5 - > 16	2	16	66,67 %	9,33%	24 %
Ertapenem	0.5 - > 2	2	> 2	1,33 %	-	98,67 %
Aztreonam	≤ 0.5 - > 32	32	> 32	28 %	8 %	64 %
Amikacina	≤ 4 - > 32	≤ 4	8	93,33 %	-	6,67 %
Tobramicina	≤ 1 - > 8	8	> 8	24 %	-	76 %
Gentamicina	≤ 0.5 - > 8	2	> 8	53,33 %	-	46,67 %
Ciprofloxacino	≤ 0.06 - > 2	> 2	> 2	20 %	4 %	76 %
Colistina	≤ 0.25 - > 8	0.5	8	89,33 %	-	10,67 %
Tigeciclina	≤ 0.25 - 4	0.5	2	70,67 %	-	29,33 %
Cotrimoxazol	≤ 1/19 - > 8/152	> 8/152	> 8/152	18,67 %	1,33 %	80 %

Todos los aislados fueron resistentes al menos a un carbapenémico, siendo ertapenem el carbapenémico con una mayor tasa de resistencia, siendo 74 (98,67%) los aislados resistentes a este antibiótico. Respecto al resto de carbapenémicos, 18 aislados (24%) fueron resistentes a imipenem y 13 (17,33%) a meropenem.

Un total de 12 aislados (16%) presentaron resistencia conjunta a los tres carbapenémicos. De estos aislados, 11 eran productores de carbapenemasas (siete producían VIM-1, dos producían NDM-1 y uno producía KPC-2 + OXA-48), mientras que el aislado restante no lo era. Por otro lado, 6 aislados (8%) presentaron resistencia conjunta a dos carbapenémicos (siendo ertapenem

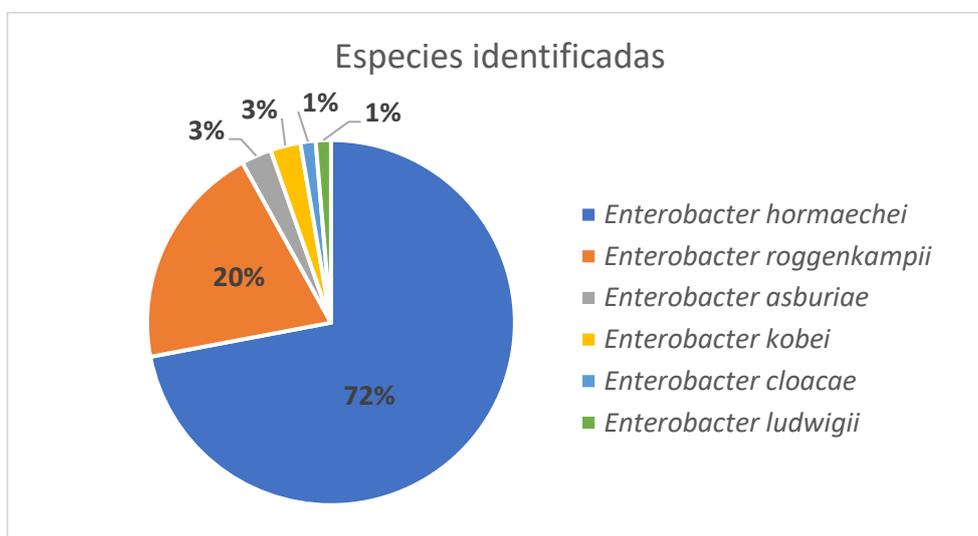
siempre uno de ellos) y 57 aislados (76%) presentaron resistencia únicamente a un carbapenémico.

Las penicilinas y cefalosporinas fueron las familias de antibióticos que mayor porcentaje de resistencia presentaron, con unos valores de 100% y 84,34% de tasa de resistencia, respectivamente. Por el contrario, las polimixinas y tetraciclinas fueron las familias que menor porcentaje de resistencias presentaron, con unos valores de 10,67% y 29,33%, respectivamente. Respecto a los aminoglucósidos, 57 aislados (76%) presentaron resistencia a tobramicina, 35 (46,67%) a gentamicina y 5 (6,67%) a amikacina. Cabe destacar que amikacina fue el antibiótico frente al cual menor porcentaje de resistencias se obtuvo en todo el estudio.

En cuanto al resto de antibióticos, 60 aislados (80%) presentaron resistencia a cotrimoxazol, 57 aislados (76%) a ciprofloxacino y 48 aislados (64%) al aztreonam.

### Identificación de especie y producción de carbapenemasas

Se identificaron seis especies diferentes pertenecientes al complejo *Enterobacter cloacae* en la población de estudio: 54 aislados (72%) pertenecían a la especie *Enterobacter hormaechei*, 15 (20%) a *Enterobacter roggenkampii*, 2 (3%) a *Enterobacter asburiae*, 2 (3%) a *Enterobacter kobei*, 1 (1%) a *Enterobacter ludwigii* y 1 (1%) a *Enterobacter cloacae*. Las especies *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter roggenkampii* fueron las predominantes en nuestra población.



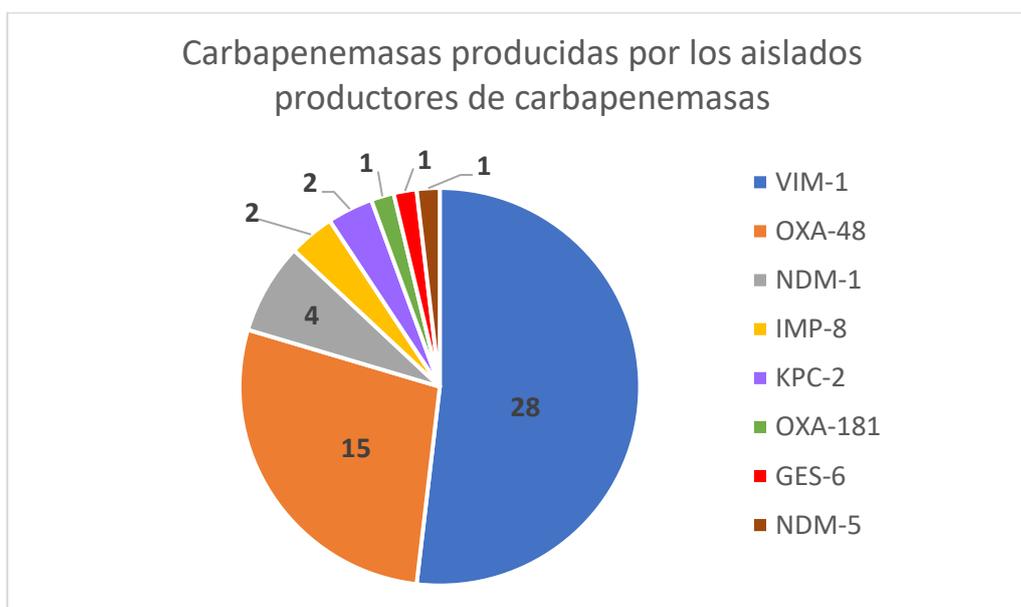
**Figura 3.** Identificación, dentro del complejo *Enterobacter cloacae*, de las especies de la población de estudio.

El promedio de genes de resistencia totales adquiridos en la población de estudio fue de 12,28 genes por aislado, con un rango de 4 - 26 genes.

Todos los aislados presentaron resistencia a carbapenémicos, sin embargo, no todos mostraron el mismo mecanismo de resistencia. Se detectó la producción de carbapenemasas en 52 aislados (69,33%). Por el contrario, los otros 23 aislados (30,67%) no eran productores de carbapenemasas.

La caracterización de genes que codifican carbapenemasas por secuenciación masiva, mostró la presencia de diferentes genes: *bla<sub>VIM-1</sub>* (53,84%), *bla<sub>OXA-48</sub>* (28,85%), *bla<sub>NDM-1</sub>* (7,69%), *bla<sub>IMP-8</sub>* (3,85%), *bla<sub>KPC-2</sub>* (3,85%), *bla<sub>OXA-181</sub>* (1,92%), *bla<sub>GES-6</sub>* (1,92%) y *bla<sub>NDM-5</sub>* (1,92%). También se detectó la presencia simultánea de dos genes que codifican carbapenemasas en dos aislados: *bla<sub>OXA-48</sub>* + *bla<sub>VIM-1</sub>* y *bla<sub>OXA-48</sub>* + *bla<sub>KPC-2</sub>*.

La carbapenemasa VIM-1, seguida de OXA-48 fueron las más frecuentes en nuestra población de estudio, tanto en *Enterobacter hormaechei* como en *Enterobacter roggenkampii*. Sin embargo, se observaron diferencias entre especies en el resto de carbapenemasas: NDM-5, GES-6 y OXA-181 se identificaron únicamente en *Enterobacter hormaechei*; IMP-8 y KPC-2 en *Enterobacter roggenkampii*; y NDM-1 en *Enterobacter cloacae*.



**Figura 4.** Carbapenemasas producidas por los 52 aislados productores de carbapenemasas.

En 29 aislados (38,67%) se detectó la presencia de genes adquiridos que codifican diferentes BLEE: *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (62,07%), *bla<sub>CTX-M-9</sub>* (13,79%), *bla<sub>SHV-12</sub>* (13,79%), *bla<sub>PER-2</sub>* (6,90%), *bla<sub>CTX-M-14</sub>* (3,45%), *bla<sub>CTX-M-3</sub>* (3,45%) y *bla<sub>GES-1</sub>* (3,45%). También se detectó la presencia simultánea de dos genes que codifican BLEE en dos aislados: *bla<sub>CTX-M-15</sub>* + *bla<sub>PER-2</sub>* y *bla<sub>CTX-M-15</sub>* + *bla<sub>SHV-12</sub>*. La BLEE CTX-M-15 fue la más frecuente en nuestra población de estudio, tanto en *Enterobacter hormaechei* como en *Enterobacter roggenkampii*. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de BLEE fue

mucho mayor en *Enterobacter hormaechei* (44,44%) que en *Enterobacter roggenkampii* (26,67%).

En lo que respecta a los genes cromosómicos de cefalosporinas AmpC, se detectó la presencia de genes *bla<sub>ACT</sub>* en todos los aislados de *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei* y *Enterobacter ludwigii*; genes *bla<sub>MIR</sub>* en todos los aislados de *Enterobacter roggenkampii*; y *bla<sub>CMH</sub>* en el aislado de *Enterobacter cloacae*. También se detectó la presencia de genes de cefalosporinas AmpC adquiridos o plasmídicos en cinco aislados de *Enterobacter hormaechei*: *bla<sub>ACC-1</sub>* (n=2), *bla<sub>DHA-1</sub>* (n=2) y *bla<sub>FOX-9</sub>* (n=1).

Pese a que ocho aislados presentaron resistencia a colistina, en siete de ellos (6 *Enterobacter roggenkampii* y 1 de *Enterobacter cloacae*) no se observó la presencia de genes adquiridos *mcr*. Únicamente se detectó la presencia del gen *mcr-10.1* en un aislado de *Enterobacter kobei* resistente a colistina. También se detectó la presencia del gen *mcr-9* en 2 aislados de *Enterobacter hormaechei*, pero estos eran sensibles a colistina (CMI=0.5 en ambos).

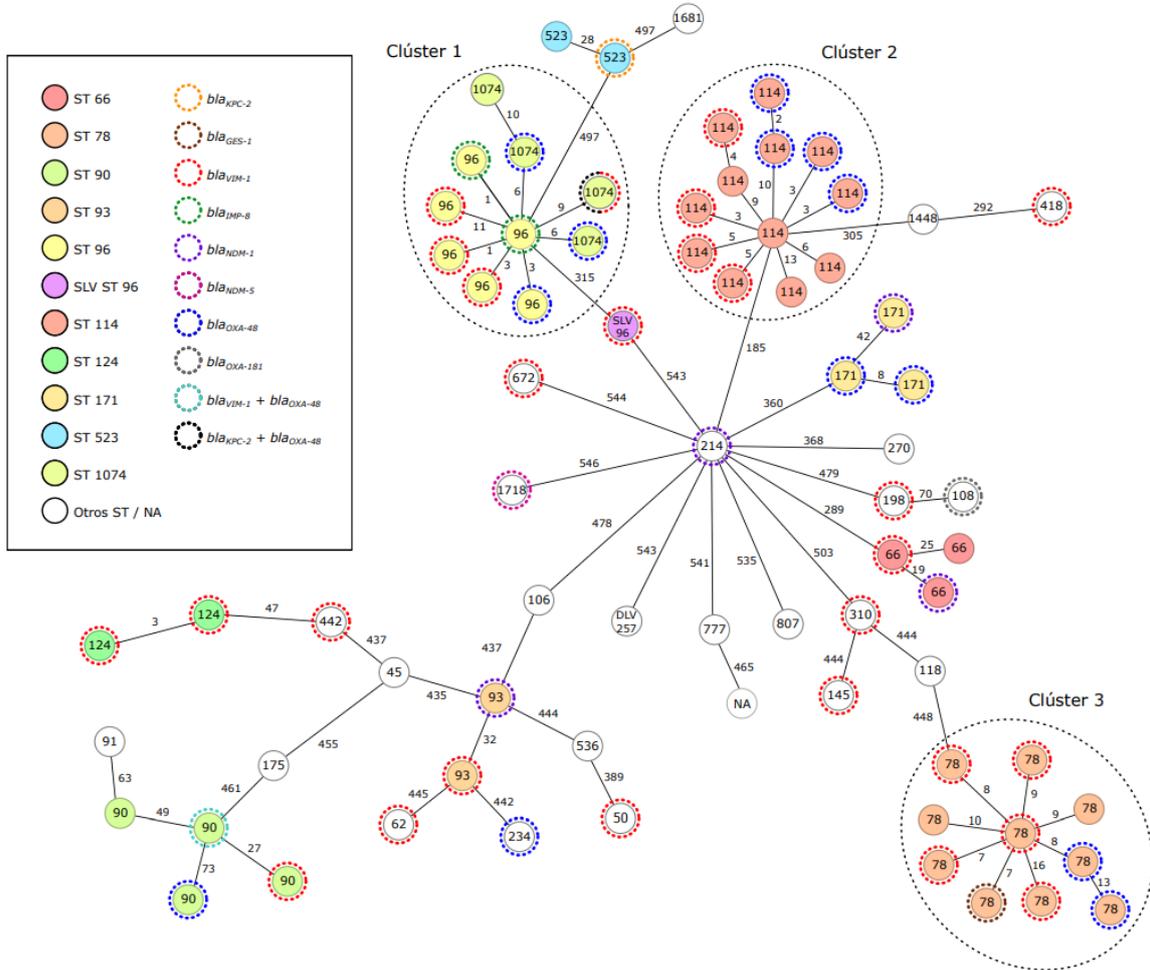
Al analizar los genes que codifican diferentes enzimas modificadoras de aminoglucósidos, los genes más frecuentes fueron aquellos que codifican adeniltransferasas: *aadA1* (42,67% de los aislados) y *aadA2* (18,67%). En cuanto a los genes que codifican N-acetiltransferasas, destaca la presencia de *aac(6')-Ib-cr* (28% de los aislados), *aac(6')-Ib4* (25,33%) y *aac(3)-Ile* (14,67%). También se detectó la presencia de genes codificantes de O-nucleotidiltransferasas (*ant(2'')-Ia* en el 12% de los aislados) y O-fosfotransferasas: *aph(6)-Id* en el 24% de los aislados, *aph(3'')-Ib* en el 22,67 % y *aph(3')-Ia* en el 14,67%. Además, en dos aislados de *Enterobacter hormaechei* productores de NDM-1 se detectó el gen *rmtC*, un gen adquirido codificante de una ARNr metiltransferasa.

Respecto a los genes *qnr* que confieren resistencia a quinolonas, destacó la presencia de *qnrB1* en el 24% de los aislados, *qnrA1* en el 21,33% y *qnrS1* en el 17,33%. En cuanto a los genes que confieren resistencia a tetraciclinas, se detectó la presencia del gen *tet(A)* en el 22,67% de los aislados y *tet(D)* en el 5,33%.

### **Análisis filogenético**

Los 75 aislados del complejo *Enterobacter cloacae* se agruparon en 35 ST, siendo los más prevalentes los ST114 (16%), ST78 (13,33%), ST96 (8%) y ST1074 (6,67%). La población presentaba un índice de diversidad simple (SDI) del 46,66% y una distancia alélica promedio de 531,92 alelos de diferencia, con un rango de 0 – 626 alelos.

La distancia alélica de cgMLST entre los ST obtenidos, se representó mediante la construcción de un árbol filogenético (*minimum-spanning tree*):



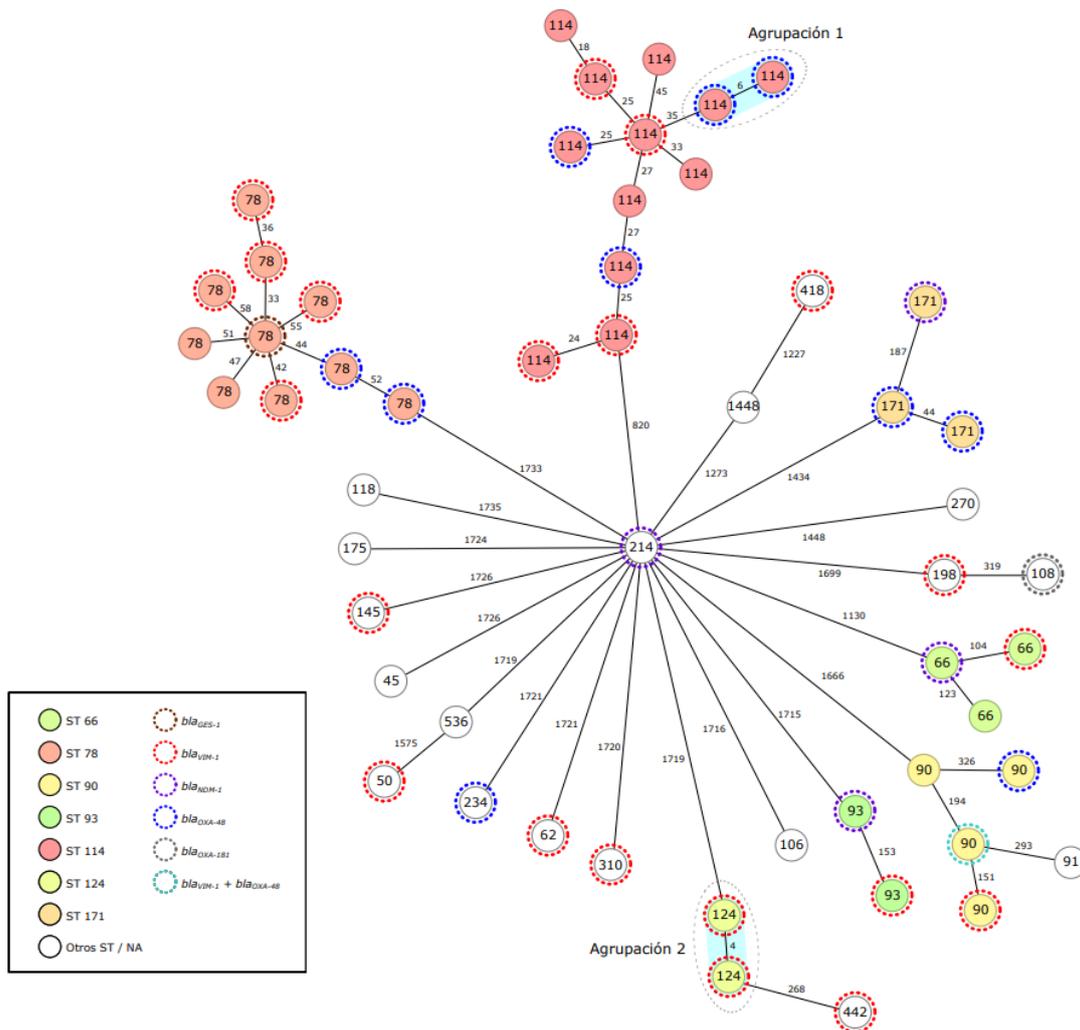
**Figura 5.** Estructura de la población de 75 aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos: *minimum-spanning tree*. Las distancias genéticas mostradas se basan en un cgMLST de 631 genes y no están a escala. Los colores de cada círculo indican el tipo de MLST y el color de la línea discontinua indica el tipo de carbapenemasa. Los óvalos negros representan clusters de 10 o más aislados.

Se pueden observar tres clústers:

- Clúster 1:** Compuesto por 11 aislados de *Enterobacter roggenskampii*, 5 de ellos pertenecientes al ST1074 (dos de ellos no presentan ninguna diferencia alélica y se representan en el mismo círculo) y 6 al ST96. La distancia alélica promedio encontrada en esta agrupación es de 9,69 alelos de diferencia, con un rango de 0 – 22 alelos.
- Clúster 2:** Compuesto por 12 aislados de *Enterobacter hormaechei* pertenecientes al ST114. La distancia alélica promedio encontrada en esta agrupación es de 10,70 alelos de diferencia, con un rango de 2 - 22 alelos.

- **Clúster 3:** Compuesto por 10 aislados de *Enterobacter hormaechei* pertenecientes al ST78. La distancia alélica promedio encontrada en esta agrupación es de 13,27 alelos de diferencia, con un rango de 7 – 25 alelos.

Los 54 aislados de *Enterobacter hormaechei* se agruparon en 25 ST, siendo los más prevalentes ST114 (22,2%), ST78 (18,5%), ST90 (7,4%), ST66 (5,6%) y ST171 (5,6%). La población de *Enterobacter hormaechei* presentó un índice de diversidad simple (SDI) del 55,55%. La distancia alélica de cgMLST entre los ST obtenidos, se representó mediante la construcción de un árbol filogenético (*minimum-spanning tree*):

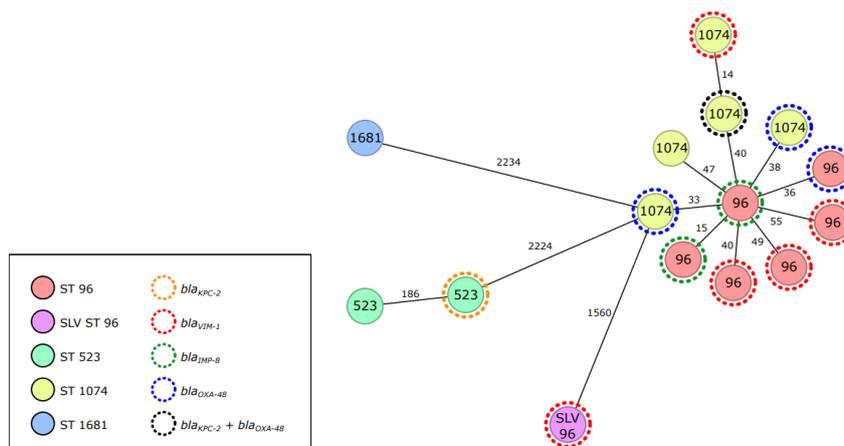


**Figura 6.** Estructura de la población de 54 aislados de *Enterobacter hormaechei* resistentes a carbapenémicos: *minimum-spanning tree*. Las distancias genéticas mostradas se basan en un cgMLST de 2.123 genes y no están a escala. Los colores de cada círculo indican el tipo de MLST y el color de la línea discontinua indica el tipo de carbapenemasa. Los óvalos grises representan agrupaciones, aplicando un umbral de 10 alelos.

Se detectaron dos agrupaciones considerando una diversidad genética  $\leq 10$  alelos. En ambos casos, las agrupaciones estaban conformadas por dos aislamientos únicamente:

- Agrupación 1. Aislados de *Enterobacter hormaechei* pertenecientes al ST114, productores de OXA-48 (+ CTX-M-15) recogidos en dos hospitales diferentes de la provincia de Ciudad Real en el año 2020 y 2021. Presentan una distancia alélica de 6 alelos, por lo que están genéticamente relacionados.
- Agrupación 2. Aislados de *Enterobacter hormaechei* pertenecientes al ST124, productores de VIM-1 recogidos en el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid en el año 2019 y 2020. Presentan una distancia alélica de 4 alelos, por lo que están genéticamente relacionados.

Los 15 aislados de *Enterobacter roggenkampii* se agruparon en 4 ST: ST96 (46,7%), ST1074 (33,3%), ST523 (13,3%), y ST1681 (6,7%). Uno de los aislados era una SLV (*single locus variant*) del ST96. La población de *Enterobacter roggenkampii* presentó un índice de diversidad simple (SDI) del 26,66%. La distancia alélica de cgMLST entre los ST obtenidos, se representó mediante la construcción de un árbol filogenético (*minimum-spanning tree*):



**Figura 7.** Estructura de la población de 15 aislados de *Enterobacter roggenkampii* resistentes a carbapenémicos: *minimum-spanning tree*. Las distancias genéticas mostradas se basan en un cgMLST de 2.446 genes y no están a escala. Los colores de cada círculo indican el tipo de MLST y el color de la línea discontinua indica el tipo de carbapenemasa.

En cuanto al resto de aislados, los dos pertenecientes a *Enterobacter asburiae* pertenecían a los ST672 y ST807, el aislado de *Enterobacter cloacae* pertenecía al ST1718 y el aislado de *Enterobacter ludwigii* era un DLV (*double locus variant*) del ST257. Respecto a los aislados de *Enterobacter kobei*, uno de ellos pertenecía al ST777, mientras que el otro presentó una combinación alélica desconocida y no fue posible asociarlo con ningún ST descrito hasta la fecha.

## DISCUSIÓN

Las especies del complejo *Enterobacter cloacae* son patógenos nosocomiales comunes que afectan principalmente a pacientes hospitalizados durante periodos prolongados de tiempo en unidades de cuidados intensivos (UCIs), por lo que la mayor parte de las infecciones que provocan son de origen intrahospitalario.<sup>45, 46, 47</sup> Sin embargo, en los últimos años, estos patógenos han tomado también gran relevancia fuera del entorno hospitalario, siendo responsables con frecuencia de infecciones adquiridas en la comunidad.<sup>48</sup>

Al igual que otros enterobacteriales, estas especies colonizan el intestino de individuos sanos, estableciendo un reservorio y una posible fuente de infección, por lo que es habitual contar con muestras clínicas procedentes de pacientes colonizados.<sup>49, 50</sup> En nuestro estudio, la proporción de pacientes colonizados/infectados (19/56) fue superior a la descrita en otros estudios.<sup>40, 51</sup>

En cuanto a los cuadros clínicos de los pacientes de nuestro estudio, la mayoría de ellos presentaron infección genitourinaria, bacteriemia o infección respiratoria, lo que coincide con estudios realizados previamente.<sup>52, 53</sup> Sin embargo, nuestro trabajo también muestra un gran número de pacientes con infecciones de úlceras/heridas y un bajo número de pacientes con infecciones intraabdominales, en contraposición con los estudios mencionados anteriormente.

En cuanto a la procedencia geográfica de los aislados incluidos en el estudio, se hallaron grandes diferencias entre comunidades. Se obtuvo representación de todas las comunidades autónomas españolas, a excepción de Extremadura, La Rioja, Islas Baleares y las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla. Estas diferencias territoriales se deben a la voluntariedad de envío de muestras por parte de los hospitales al PVRA-CNM y a la existencia de programas de vigilancia propios en algunas comunidades autónomas.

La mayoría de los aislados (72%) pertenecieron a *Enterobacter hormaechei*, siendo ésta la especie predominante en el ámbito clínico.<sup>48</sup> La segunda especie más representada fue *Enterobacter roggenkampii* (20%), a diferencia de investigaciones realizadas en Asia, donde *Enterobacter kobei* era la segunda especie más común.<sup>48, 54</sup> En España Mateos et al.<sup>37</sup>, obtuvieron resultados similares a los de nuestro estudio, siendo *Enterobacter hormaechei* la especie predominante en muestras clínicas, seguida de *Enterobacter roggenkampii*. El resto de especies identificadas (*Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* y *Enterobacter cloacae*) tuvieron muy poca representación (1% - 3%) y ninguna se identificó en más de dos aislados clínicos.

Las especies del complejo *Enterobacter cloacae* son intrínsecamente resistentes a penicilinas, cefalosporinas de primera generación y cefalosporinas de segunda generación debido a la presencia en su cromosoma de un gen *ampC* inducible ante la exposición a betalactámicos.<sup>55</sup> Además, tras esta exposición, pueden aparecer mutaciones asociadas al sistema represor que regula la producción de AmpC, provocando que pasen a expresar esta enzima de manera constitutiva. Estas cepas hiperproductoras de AmpC presentan resistencia a todos los betalactámicos, a excepción de las cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. Sin embargo, la presencia combinada de este fenotipo hiperproductor de AmpC junto con otros mecanismos de resistencia (tales como disminución en la expresión de porinas o adquisición de BLEE), también puede provocar la resistencia a carbapenémicos.<sup>56, 57</sup>

Los carbapenémicos constituyen la primera opción terapéutica para el tratamiento de infecciones provocadas por enterobacteriales productores de BLEE o AmpC, los cuales son resistentes al resto de betalactámicos. Sin embargo, el aumento cada vez mayor de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos, supone una gran amenaza mundial para el tratamiento de estas infecciones.<sup>58</sup>

En nuestro estudio, todos los aislados fueron resistentes al menos a un carbapenémico. Meropenem constituyó la mejor opción terapéutica *in vitro*, mientras que ertapenem fue el carbapenémico con una mayor tasa de resistencia (98,67%), seguido de imipenem (24%) y meropenem (17,33%). Este patrón de resistencia a carbapenémicos coincide con los descritos previamente en España<sup>59</sup> y en otros países<sup>58,60</sup>. Adelman et al.<sup>61</sup>, postulan que la resistencia a ertapenem se debe generalmente a la combinación de betalactamasas (BLEE o AmpC) y a la alteración en la expresión de porinas, aunque también se puede deber a la expresión de carbapenemasas, de manera que es más sencillo el desarrollo de resistencias frente a este antibiótico.

Respecto al resto de antibióticos estudiados, se observaron elevadas tasas de resistencia frente a penicilinas (100%), cefalosporinas (84,34%), cotrimoxazol (80%), fluoroquinolonas (76%) y monobactámicos (64%). Por el contrario, aminoglucosidos (43,11%), tetraciclinas (29,33%) y polimixinas (10,67%), presentaron tasas de resistencia más bajas, especialmente amikacina, que fue el antibiótico con la menor tasa de resistencia de todo el estudio (6,67%). Estos valores son similares a los descritos en España por Brañas et al.<sup>59</sup>, a excepción de los valores frente a cotrimoxazol y tigeciclina, donde se obtienen valores más elevados de resistencia; y a colistina, donde se obtienen valores más bajos de resistencia.

Es destacable el bajo porcentaje de resistencia que presenta el antibiótico ceftazidima-avibactam (53,33%) en comparación con el resto de cefalosporinas (94,67%). Esta diferencia se puede atribuir a la actividad inhibitoria que presenta el avibactam, capaz de inhibir las betalactamasas de clase A (BLEE) y clase C (AmpC), y carbapenemasas de clase A (KPC) y algunas de clase D (OXA-48).<sup>62</sup>

Colistina se considera uno de los antibióticos de elección frente a infecciones provocadas por enterobacteriales resistentes a carbapenémicos. Debido a ello, la resistencia a colistina, que podría estar originada debido a su uso excesivo en animales de granja, supone un gran problema a la hora de tratar estas infecciones, ya que reduce mucho las opciones terapéuticas.<sup>63, 64</sup> En nuestro estudio, colistina presentó una tasa de resistencia del 10,67%, en comparación con otros estudios que presentaban tasas de resistencia superiores.<sup>59</sup>

Se detectó la producción de carbapenemasas en el 69,33% de los aislados, de manera que el 30,67% de los aislados restantes no eran productores de carbapenemasas. El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos es la producción de carbapenemasas, sin embargo, la producción de BLEE y/o AmpC (cromosómica y/o plasmídica) junto con una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática por una disminución en la expresión de porinas, también puede conferir resistencia a carbapenémicos.<sup>65</sup> De esta manera, los aislados de nuestro estudio que no producen carbapenemasas, presentan resistencia a carbapenémicos por alguno de los mecanismos mencionados anteriormente. Para conocer exactamente el mecanismo de resistencia, sería necesario estudiar la expresión de porinas y los niveles de expresión de AmpC cromosómica en dichos aislados.

Según estudios realizados recientemente en España, la carbapenemasa más común en enterobacteriales es OXA-48<sup>66</sup>, sin embargo, en especies del complejo *Enterobacter cloacae* es VIM-1.<sup>37</sup> Esta información concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde la carbapenemasa más representada fue VIM-1 (53,84%), seguida de OXA-48 (28,85%). Aparte de estas dos carbapenemasas, también se detectó la presencia en menor medida de NDM-1 (7,69%), IMP-8 (3,85%), KPC-2 (3,85%), OXA-181 (1,92%), GES-6 (1,92%) y NDM-5 (1,92%).

El 38,67% de los aislados eran productores de BLEE, siendo CTX-M (82,76%) y SHV (13,79%) los grupos predominantes. La BLEE mayoritaria en el estudio fue CTX-M-15 (62,07%), seguida de CTX-M-9 (13,79%) y SHV-12 (13,79%). Estos resultados coinciden con el reciente estudio realizado por Hu et al.<sup>67</sup>, con la diferencia de que en dicho estudio la BLEE CTX-M-9 no era tan predominante como en el nuestro. Nuestros resultados, a su vez, difieren de los obtenidos en España por Mateos et al.<sup>37</sup>, ya que en su estudio la BLEE más frecuente fue SHV-12, esta

diferencia puede quedar justificada debido a que este trabajo muestra la epidemiología de un único hospital de Madrid.

En lo que respecta a los genes *ampC* cromosómicos, existen al menos tres familias de genes diferentes dentro de las especies del complejo *Enterobacter cloacae*. De manera que en la colección de estudio en *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei* y *Enterobacter ludwigii* encontramos genes *bla<sub>ACT</sub>*; en *Enterobacter roggenkampii* genes *bla<sub>MIR</sub>*; y en *Enterobacter cloacae* genes *bla<sub>CMH</sub>*; tal y como ha sido descrito previamente.<sup>41</sup>

Los genes *ampC* plasmídicos se originaron a partir de genes *ampC* cromosómicos de diferentes bacterias Gram-negativas y se han expandido globalmente como consecuencia de la transferencia horizontal de los plásmidos que cargan estos genes.<sup>68</sup> Se detectó la presencia de cinco aislados de *Enterobacter hormaechei* portadores de genes *ampC* plasmídicos: 2 portaban *bla<sub>ACC-1</sub>*, 2 portaban *bla<sub>DHA-1</sub>* y 1 portaba *bla<sub>FOX-9</sub>*. No se detectaron genes *bla<sub>CMY</sub>*, pese a que, según la bibliografía, las AmpC plasmídicas más comúnmente descritas en el género *Enterobacter* son las pertenecientes a las familias CIT y DHA.<sup>69</sup>

La aparición y propagación mediada por plásmidos de genes *mcr* que confieren resistencia a colistina en bacterias Gram-negativas, constituye una grave amenaza emergente para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias productoras de carbapenemasas, frente a las cuales colistina es una de las últimas opciones terapéuticas.<sup>70</sup>

Se detectó la presencia del gen *mcr-9* en 2 aislados de *Enterobacter hormaechei* productores de VIM-1 sensibles a colistina. Pese a que el gen *mcr-9* se asocia con resistencia a colistina, pocos aislados clínicos con este gen muestran un fenotipo resistente a la misma.<sup>71</sup> Este gen se ubica en grandes plásmidos del grupo de incompatibilidad IncH12 y a menudo está acompañado de genes que codifican betalactamasas y carbapenemasas.<sup>72, 73</sup> En numerosos estudios europeos se ha notificado la aparición de cepas del complejo *Enterobacter cloacae* que presentan un plásmido que portaba *bla<sub>VIM-1</sub>* y *mcr-9*, por lo que es probable que nuestros aislados también porten este plásmido.<sup>73, 74, 75</sup>

También se detectó la presencia del gen *mcr-10.1* en un aislado de *Enterobacter kobei* resistente a colistina. El gen *mcr-10.1* se asocia con resistencia o susceptibilidad reducida a colistina y su presencia en *Enterobacter kobei* ha sido descrita en China previamente por Liao et al.<sup>76</sup>. Tras la realización de una búsqueda bibliográfica, no se ha encontrado ningún estudio que describa la presencia de este gen en España. Únicamente en el estudio de Wang et al.<sup>77</sup>, se notifica la presencia en GenBank de un aislado clínico de *Enterobacter asburiae* portador del gen *mcr-10* en 2014.

El 78,66% de los aislados presentaron, al menos, un gen de resistencia a aminoglucósidos, siendo la adeniltransferasa *aadA1* (42,67%) y las N-acetiltransferasas *aac(6')-Ib-cr* (28%) y *aac(6')-Ib4* (25,33%), las enzimas modificadoras de aminoglucosidos predominantes. También se detectó la presencia del gen *rmtC* en dos aislados de *Enterobacter hormaechei* productores de NDM-1. Este gen codifica una ARNr metil-transferasa que le confiere una elevada resistencia a todos los aminoglucósidos. Varios estudios realizados en Asia han informado de la presencia de un plásmido que alberga *bla<sub>NDM-1</sub>* y *rmtC* en cepas del complejo *Enterobacter cloacae*, por lo que puede que nuestras cepas también lo porten.<sup>78, 79</sup>

En cuanto a la resistencia a quinolonas, destacó la presencia de *qnrB1* (24%), *qnrA1* (21,33%) y *qnrS1* (17,33%), así como la presencia de la N-acetiltransferasa *aac(6')-Ib-cr* (28%), que confiere también resistencia a estos antibióticos.<sup>80</sup> Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos.<sup>81</sup>

Los ST más representados fueron ST114 (16%), ST78 (13,33%), ST96 (8%) y ST1074 (6,67%). El ST114 y el ST78 pertenecen a *Enterobacter hormaechei* y se consideran clones internacionales de alto riesgo, responsables de la diseminación de carbapenemasas y BLEE en entornos hospitalarios.<sup>47</sup> La presencia de estos clones de alto riesgo ha sido documentada previamente en España.<sup>47, 82</sup>

Dentro de los aislados pertenecientes al ST114, el 33,33% eran productores de VIM-1, el 33,33% de OXA-48 y el otro 33,33% no eran productores de carbapenemasas. Además, el 91,67% de los aislados eran productores de CTX-M-15. Dentro de los aislados pertenecientes al ST78, el 50% eran productores de VIM-1, el 20% de OXA-48, el 10% de GES-1 y el otro 20% no eran productores de carbapenemasas. En este caso, se detectó la presencia de BLEE en el 30% de los aislados, pero ninguno era productor de CTX-M-15.

Por el contrario, el ST96 y el ST1074 pertenecen a *Enterobacter roggkampii*, y la presencia de ambos clones ha sido documentada previamente en España.<sup>83, 84</sup> Dentro de los aislados pertenecientes al ST96, el 50% eran productores de VIM-1, el 33,33% de IMP-8 y el 16,67% de OXA-48. También se detectó la presencia de GES-1 (BLEE) en un aislado. Dentro de los aislados pertenecientes al ST1074, el 40% eran productores de OXA-48, el 20% de VIM-1, el 20% de KPC-2 + OXA-48 y el otro 20% no eran productores de carbapenemasas. Además, se detectó la producción de CTX-M-15 en 2 aislados (40%) y de SHV-12 en 1 aislado (20%).

El análisis filogenético mediante cgMLST de los aislados de *Enterobacter hormaechei* mostró dos agrupaciones conformadas por dos aislados con una diversidad genética  $\leq 10$  alelos.

La primera agrupación muestra dos aislados genéticamente relacionados pertenecientes al ST114, productores de OXA-48 y CTX-M-15, que fueron recogidos en dos hospitales de la provincia de Ciudad Real (Hospital Santa Barbara y Hospital General Universitario de Ciudad Real) en el año 2020 y 2021. Dado que los aislados se encuentran espaciados en tiempo (años diferentes) y espacio (hospitales diferentes), podríamos pensar que se produjo un brote o circulación endémica del clon ST114 por estos hospitales de Ciudad Real. Pese a que al realizar una búsqueda bibliográfica no se ha encontrado información sobre dicha situación en Ciudad Real, en el año 2019 se informó de un brote de ocho años de duración en un hospital francés provocado por un clon ST114 de *Enterobacter hormaechei* productor de OXA-48 y CTX-M-15.<sup>85</sup>

La segunda agrupación muestra dos aislados genéticamente relacionados pertenecientes al ST124, productores de VIM-1, que fueron recogidos en el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid en el año 2019 y 2020. Dado que los aislados se encuentran espaciados en tiempo (años diferentes), podríamos pensar que se produjo un brote o circulación endémica del clon ST124 por en el Hospital Universitario Río Hortega. Sin embargo, tras realizar una búsqueda bibliográfica no se ha encontrado ninguna información relacionada con la descripción de brotes producidos por este clon de *Enterobacter hormaechei*.

## CONCLUSIONES

- Las especies del complejo *Enterobacter cloacae* son patógenos nosocomiales comunes en entornos hospitalarios. Además, en los últimos años están ganando relevancia como patógenos responsables de infecciones adquiridas en la comunidad.
- Estas especies son capaces de colonizar el intestino de individuos sanos y establecer así un reservorio y posible fuente de infección. Las infecciones genitourinarias y bacteriemias son las infecciones mayoritarias causadas por estos microorganismos.
- En España las especies del complejo *Enterobacter cloacae* predominantes en el ámbito clínico son *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter roggenkampii*. El resto de especies presentan una representación mucho menor.
- Las especies del complejo *Enterobacter cloacae* son intrínsecamente resistentes a una gran cantidad de betalactámicos por la presencia cromosómica de un gen *ampC*. Además, pueden aumentar su espectro de resistencia a estos antibióticos mediante la adquisición mediada por plásmidos de genes que codifican AmpC plasmídicas y/o BLEE.
- La resistencia a carbapenémicos es un problema creciente y supone una amenaza frente al tratamiento efectivo de las infecciones causadas por estas especies. El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos es la producción de carbapenemasas; aunque la producción de BLEE y/o AmpC junto con una disminución en la expresión de porinas, también puede conferir resistencia frente a estos antibióticos.
- En lo referente a las betalactamasas del complejo *Enterobacter cloacae*, la carbapenemasa más común en España es VIM-1, seguida de OXA-48. La BLEE predominante en el estudio fue CTX-M-15, seguida de CTX-M-9 y SHV-12. Por otro lado, la presencia de genes *ampC* plasmídicos no fue muy común en estas especies, siendo ACC-1, DHA-1 y FOX-9 las únicas AmpC plasmídicas detectadas.
- En los aislados estudiados, la presencia de genes plasmídicos que confieren resistencia frente a otros antibióticos, tales como colistina, aminoglicosidos o quinolonas, también es preocupante. Especialmente grave es la presencia de genes *mcr*, que confieren mayoritariamente resistencia a colistina; y genes *rmtC*, que confieren elevada resistencia frente a todos los aminoglicosidos.
- En la población de estudio, los ST más frecuentes fueron el ST114 y el ST78 de *Enterobacter hormaechei*; y el ST96 y el ST1074 de *Enterobacter roggenkampii*. Cabe destacar que el ST114 y el ST78 son considerados clones internacionales de alto riesgo, responsables de la diseminación de carbapenemasas y BLEE en entornos hospitalarios.

- Las herramientas de secuenciación masiva y tipificación genotípica son imprescindibles a la hora de realizar vigilancia epidemiológica. Además, la detección en el estudio de dos agrupaciones de aislados de *Enterobacter hormaechei* genéticamente relacionados, que no habían sido detectadas previamente, resalta la importancia de emplear estas herramientas en estudios epidemiológicos para detectar brotes de manera precoz y poder aplicar medidas de prevención y control.
- Es fundamental mantener una estrecha vigilancia epidemiológica sobre los genes de resistencia a antibióticos, así como los clones circulantes, con el objetivo de conocer su frecuencia y distribución en las diferentes regiones de España. Con el fin de generar datos que permitan optimizar el uso de antibióticos y así evitar la aparición de nuevas resistencias o disminuir la circulación de bacterias multirresistentes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Adedeji WA. THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. Ann Ib Postgrad Med. 2016 Dec;14(2):56–7.
2. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol. 2019 Oct;51:72–80.
3. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev. 2018 Oct;31(4).
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection. 2012 Mar;18(3):268–81.
5. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. EMBO Rep. 2020 Dec 3;21(12):e51034.
6. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009 Feb;27(2):116–29.
7. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Aug;6(8):a025247.
8. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Lab Med. 2017 Jun;37(2):303–15.
9. Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:823684.
10. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 2019 Nov 13;69(Suppl 7):S565–75.
11. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Nov;55(11):4943–60.
12. Bush K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Oct;62(10).
13. Astocondor-Salazar L. Betalactamasas: la evolución del problema. Revista Peruana de Investigación en Salud. 2018 Dec 31;2(2):42–9.
14. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences. 1980 May 16;289(1036):321–31.

15. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1211–33.
16. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657–86.
17. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist.* 2021 Sep;3(3):dlab092.
18. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 2013 Feb;39(1):79–101.
19. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161–82, Table of Contents.
20. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ, Tamma PD, et al. A Primer on AmpC  $\beta$ -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical Infectious Diseases.* 2019 Sep 27;69(8):1446–55.
21. Liu X, Liu Y. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli*. *Biomed Rep.* 2016 Jun;4(6):687–90.
22. Akata K, Muratani T, Yatera K, Naito K, Noguchi S, Yamasaki K, et al. Induction of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase DHA-1 by piperacillin/tazobactam and other  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae*. *PLoS One.* 2019 Jul 8;14(7):e0218589.
23. Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergence of plasmid mediated AmpC  $\beta$ -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options. *Rev Esp Quimioter.* 2012 Jun;25(2):89–99.
24. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017 Feb 15;215(suppl\_1):S28–36.
25. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2018 Apr 3;66(8):1290–7.
26. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014 Dec;32:4–9.
27. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440–58, table of contents.
28. Palzkill T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Jan;1277:91–104.
29. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Jan;28:19–28.

30. Wei WJ, Yang HF, Ye Y, Li JB. New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Jul 20;128(14):1969–76.
31. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-Gonzalez A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017 Jun 30;34(2):261.
32. Lowe CF, Matic N, Champagne S, Romney MG, Leung V, Ritchie G. The Brief Case: IMP, the Uncommonly Common Carbapenemase. *J Clin Microbiol*. 2020 Mar 25;58(4).
33. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]*. 2011;29(7):524-34.
34. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Dec 18;33(1).
35. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2012 Jul;7(7):887–902.
36. Godmer A, Benzerara Y, Normand AC, Veziris N, Gallah S, Eckert C, et al. Revisiting Species Identification within the *Enterobacter cloacae* Complex by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Microbiol Spectr*. 2021 Sep 3;9(1).
37. Mateos M, Hernández-García M, del Campo R, Martínez-García L, Gijón D, Morosini MI, et al. Emergence and Persistence over Time of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* Isolates in a Spanish University Hospital in Madrid, Spain (2005–2018). *Microbial Drug Resistance*. 2021 Jul 1;27(7):895–903.
38. Díaz G, Alberto J, Rojas M, Padilla V, Eduardo D, Díaz M, et al. Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. Vol. 41, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2021.
39. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Jun 17;33(3).
40. Chen J, Tian S, Nian H, Wang R, Li F, Jiang N, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex in a tertiary Hospital in Northeast China, 2010-2019. *BMC Infect Dis*. 2021 Jun 26;21(1):611.
41. Feng Y, Hu Y, Zong Z. Reexamining the Association of AmpC Variants with *Enterobacter* Species in the Context of Updated Taxonomy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 Nov 17;65(12):e0159621.
42. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Sep 18;32(4).

43. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, et al. La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Dec;32(10):666–70.
44. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol*. 2016 Dec 20;17(1):132.
45. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol*. 2019 Jan 31;10.
46. Girlich D, Ouzani S, Emeraud C, Gauthier L, Bonnin RA, Le Sache N, et al. Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns: a cohort study. *Lancet Microbe*. 2021 Oct;2(10):e536–44.
47. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJM, Carmeli Y, et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*\*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015 Jan 1;70(1):48–56.
48. Zhou K, Yu W, Cao X, Shen P, Lu H, Luo Q, et al. Characterization of the population structure, drug resistance mechanisms and plasmids of the community-associated *Enterobacter cloacae* complex in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Jan 1;73(1):66–76.
49. Wendel AF, Peter D, Mattner F, Weiss M, Hoppenz M, Wolf S, et al. Surveillance of *Enterobacter cloacae* complex colonization and comparative analysis of different typing methods on a neonatal intensive care unit in Germany. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022 Dec 1;11(1):54.
50. Ferry A, Plaisant F, Ginevra C, Dumont Y, Grando J, Claris O, et al. *Enterobacter cloacae* colonisation and infection in a neonatal intensive care unit: retrospective investigation of preventive measures implemented after a multiclonal outbreak. *BMC Infect Dis*. 2020 Dec 17;20(1):682.
51. Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Barbosa de Castro CMM, Lopes ACS. Clonal spread and accumulation of  $\beta$ -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *J Med Microbiol*. 2017 Jan 1;66(1):70–7.
52. Tato-Rodríguez R, Oteo-Iglesias J, Álvarez-García P, Zamora-López MJ, Martínez-López J, Pallarés-González Á, et al. Brote de *Enterobacter cloacae* complex multirresistente productor de CTX-M-9 en una unidad de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016 Apr;34(4):237–42

53. Silva F, Martínez O. TMP. Complejo *Enterobacter cloacae*. Revista chilena de infectología. 2018;35(3):297–8.
54. Ganbold M, Seo J, Wi YM, Kwon KT, Ko KS. Species identification, antibiotic resistance, and virulence in *Enterobacter cloacae* complex clinical isolates from South Korea. Front Microbiol. 2023 Mar 23;14.
55. Yang X, Wang Z, Liu M, Yu X, Zhong Y, Wang F, et al. Cefazolin and imipenem enhance AmpC expression and resistance in NagZ-dependent manner in *Enterobacter cloacae* complex. BMC Microbiol. 2022 Nov 29;22(1):284.
56. Martínez Rojas D. D, Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]. 2009;29(2):78-83.
57. Pot M, Reynaud Y, Couvin D, Ducat C, Ferdinand S, Gravey F, et al. Wide Distribution and Specific Resistance Pattern to Third-Generation Cephalosporins of *Enterobacter cloacae* Complex Members in Humans and in the Environment in Guadeloupe (French West Indies). Front Microbiol. 2021 Jun 25;12.
58. Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. Characterization of Ertapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese University Hospital. J Clin Microbiol. 2012 Feb;50(2):223–6.
59. 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.
60. Wang Q, Wang X, Wang J, Ouyang P, Jin C, Wang R, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Data From a Longitudinal Large-scale CRE Study in China (2012–2016). Clinical Infectious Diseases. 2018 Nov 13;67(suppl\_2):S196–205.
61. Adelman MW, Bower CW, Grass JE, Ansari UA, Soda EA, See I, et al. Distinctive Features of Ertapenem-Mono-Resistant Carbapenem-Resistant Enterobacterales in the United States: A Cohort Study. Open Forum Infect Dis. 2022 Jan 1;9(1).
62. Tuon FF, Rocha JL, Formigoni-Pinto MR. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime–avibactam: a systematic review. Infection. 2018 Apr 7;46(2):165–81.
63. El-Mahallawy HA, El Swify M, Abdul Hak A, Zafer MM. Increasing trends of colistin resistance in patients at high-risk of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Ann Med. 2022 Dec 31;54(1):2748–56.
64. Hameed MF, Chen Y, Wang Y, Shafiq M, Bilal H, Liu L, et al. Epidemiological Characterization of Colistin and Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* in a Tertiary: A Hospital from Anhui Province. Infect Drug Resist. 2021 Apr;Volume 14:1325–33.

65. Liu S, Huang N, Zhou C, Lin Y, Zhang Y, Wang L, et al. Molecular Mechanisms and Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Isolated from Chinese Patients During 2004–2018. *Infect Drug Resist.* 2021 Sep;Volume 14:3647–58.
66. Rivera-Izquierdo M, Láinez-Ramos-Bossini AJ, Rivera-Izquierdo C, López-Gómez J, Fernández-Martínez NF, Redruello-Guerrero P, et al. OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Spanish Hospitals: An Updated Comprehensive Review on a Rising Antimicrobial Resistance. *Antibiotics.* 2021 Jan 18;10(1):89.
67. Hu J, Li J, Liu C, Zhang Y, Xie H, Li C, et al. Molecular characteristics of global  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* by genomic analysis. *BMC Microbiol.* 2022 Oct 21;22(1):255.
68. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection.* 2019 Jun 6;47(3):363–75.
69. Dimitrova DI, Markovska RD, Stoeva TJ, Stankova PB, Georgieva LB, Mihova KI, et al. First Report of DHA-1 Producing *Enterobacter cloacae* Complex Isolate in Bulgaria. *Folia Med (Plovdiv).* 2019 Sep 30;61(3):458–61.
70. Nang SC, Li J, Velkov T. The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol.* 2019 Mar 4;45(2):131–61.
71. Chen C, Xu H, Liu R, Hu X, Han J, Wu L, et al. Emergence of Neonatal Sepsis Caused by MCR-9- and NDM-1-Co-Producing *Enterobacter hormaechei* in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 May 6;12.
72. Lumbreras-Iglesias P, de Toro M, Vázquez X, García-Carús E, Rodicio MR, Fernández J. High-risk international clones ST66, ST171 and ST78 of *Enterobacter cloacae* complex causing blood stream infections in Spain and carrying *blaOXA-48* with or without *mcr-9*. *J Infect Public Health.* 2023 Feb;16(2):272–9.
73. Hendrickx APA, Debast S, Pérez-Vázquez M, Schoffelen AF, Notermans DW, Landman F, et al. A genetic cluster of MDR *Enterobacter cloacae* complex ST78 harbouring a plasmid containing *blaVIM-1* and *mcr-9* in the Netherlands. *JAC Antimicrob Resist.* 2021 Apr 8;3(2).
74. Bitar I, Papagiannitsis CC, Kraftova L, Chudejova K, Mattioni Marchetti V, Hrabak J. Detection of Five *mcr-9*-Carrying Enterobacterales Isolates in Four Czech Hospitals. *mSphere.* 2020 Dec 23;5(6).
75. Marchetti VM, Bitar I, Sarti M, Fogato E, Scaltriti E, Bracchi C, et al. Genomic Characterization of VIM and MCR Co-Producers: The First Two Clinical Cases, in Italy. *Diagnostics.* 2021 Jan 6;11(1):79.
76. Liao W, Cui Y, Quan J, Zhao D, Han X, Shi Q, et al. High prevalence of colistin resistance and *mcr-9/10* genes in *Enterobacter* spp. in a tertiary hospital over a decade. *Int J Antimicrob Agents.* 2022 May;59(5):106573.

77. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 1;9(1):508–16.
78. Oshiro S, Tada T, Watanabe S, Tohya M, Hishinuma T, Uchida H, et al. Emergence and Spread of Carbapenem-Resistant and Aminoglycoside-Panresistant *Enterobacter cloacae* Complex Isolates Coproducing NDM-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase and 16S rRNA Methylase in Myanmar. *mSphere.* 2020 Apr 29;5(2).
79. Zeng H, Tan Y, Su J, Gao F, Lei T, Liang B. Co-occurrence of *blaNDM-1*, *rmtC*, and *mcr-9* in multidrug-resistant *Enterobacter kobei* strain isolated from an infant with urinary tract infection. *J Glob Antimicrob Resist.* 2023 Jun;33:221–6.
80. Kim ES, Jeong JY, Jun JB, Choi SH, Lee SO, Kim MN, et al. Prevalence of *aac(6′)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme among *Enterobacteriaceae* Blood Isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2643–5.
81. Peymani A, Farivar TN, Najafipour R, Mansouri S. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacter cloacae* isolated from hospitals of the Qazvin, Alborz, and Tehran provinces, Iran. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016 Jun;49(3):286–91.
82. Villa J, Carretero O, Viedma E, Lora-Tamayo J, Mingorance J, Chaves F. Emergence of NDM-7-producing multi-drug-resistant *Enterobacter hormaechei* sequence type ST-78 in Spain: a high-risk international clone. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Apr;53(4):533–4
83. Cañada-García JE, Grippo N, de Arellano ER, Bautista V, Lara N, Navarro AM, et al. Phenotypic and molecular characterization of IMP-producing Enterobacterales in Spain: Predominance of IMP-8 in *Klebsiella pneumoniae* and IMP-22 in *Enterobacter roggenkampii*. *Front Microbiol.* 2022 Sep 28;13.
84. Perez-Vazquez MD, Oteo-Iglesias J. Vigilancia molecular de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex y *Escherichia coli* productores de carbapenemasas en España. 2023.
85. Siebor E, de Curraize C, Neuwirth C. Identification of AGI1-A, a variant of *Acinetobacter* genomic island 1 (AGI1), in a French clinical isolate belonging to the *Enterobacter cloacae* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2019 Feb 1;74(2):311–4.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo no habría sido posible sin el apoyo de muchas personas, a las que me gustaría mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis dos tutoras, María Belén Aracil García y María Dolores Pérez Vázquez, por su tiempo, dedicación, compromiso y empatía. Su experiencia y consejos han sido de gran ayuda, y considero que han tenido un gran impacto positivo en mi desarrollo personal, académico y profesional.

También me gustaría dar las gracias al resto de compañeros y compañeras que componen el Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos, quienes me hicieron sentir uno más desde el primer momento. Me siento profundamente afortunado de haber podido formar parte de un equipo compuesto por grandes personas y profesionales.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a las personas que siempre están conmigo y me hacen ser quien soy: mis padres, mi hermana, mi pareja y mis amigos. Sin vuestro apoyo incondicional, vuestro tiempo y vuestros consejos nada de esto habría sido posible.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1**

*Tabla Suplementaria 1. Procedencia de los aislados del complejo *Enterobacter cloacae* resistentes a carbapenémicos seleccionados para el estudio*

<b>Provincia</b>	<b>Hospital</b>	<b>Año 2018</b>	<b>Año 2019</b>	<b>Año 2020</b>	<b>Año 2021</b>	<b>Año 2022</b>
<b>A Coruña</b>	Área Sanitaria De Ferrol	-	-	Exudado herida	-	-
<b>Alicante</b>	Hospital Virgen De Los Lirios	-	-	Orina	-	-
	Hospital Universitario Sant Joan D'Alacant	Exudado rectal	-	-	-	-
	Hospital General Universitario de Elda Virgen de la Salud	Herida quirúrgica	-	-	-	-
<b>Asturias</b>	Hospital Universitario de Cabueñes	Sangre completa	-	-	Líquido ascítico	-
	Hospital Vital Álvarez-Buylla	-	-	Orina	-	-
<b>Barcelona</b>	Hospital Universitario Vall D'Hebron	-	-	-	-	Sangre completa
	Laboratorio Dr. F. Echevarne	-	-	Líquido sinovial	-	-
	Laboratorio de Referencia de Catalunya	Exudado rectal	-	-	-	-
<b>Burgos</b>	Complejo Asistencial De Burgos	-	-	-	Líquido ascítico	-
	Hospital Santos Reyes	Orina	-	-	-	-
<b>Cantabria</b>	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla	-	-	-	-	Exudado herida
<b>Castellón</b>	Hospital Universitario De La Plana	-	Orina	-	Orina	-
<b>Ciudad Real</b>	Hospital Santa Barbara	-	-	-	-	Sangre completa
	Hospital General La Mancha Centro	-	-	-	Orina	-
	Hospital General Universitario de Ciudad Real	Sangre completa	Exudado rectal	Exudado rectal	-	-

Provincia	Hospital	Año 2018	Año 2019	Año 2020	Año 2021	Año 2022
<b>Huelva</b>	Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez	Orina	-	-	-	-
<b>Madrid</b>	Hospital Central de la Cruz Roja San José y Santa Adela	-	Exudado rectal	-	-	Orina
	Hospital de El Escorial	Orina	Exudado rectal	Exudado perianal	Orina	Orina
	UR Salud UTE	-	-	-	Herida quirúrgica	Sangre completa
	Hospital Universitario de Fuenlabrada	-	-	-	Sangre completa	Aspirado bronquial
	Hospital Clínico San Carlos	-	-	-	Exudado rectal	-
	Hospital Universitario Severo Ochoa	-	-	-	Líquido biliar	-
	Hospital Universitario HM Madrid	Sangre completa	Sangre completa	Sangre completa	Sangre completa	-
	Hospital Universitario Infantil Niño Jesús	Sangre completa	-	-	-	-
	Hospital Universitario de Móstoles	-	Exudado rectal	Sangre completa	-	-
	Megalab, S.A.	-	-	Orina	-	-
	Hospital Universitario Puerta de Hierro	Sangre completa	Orina	-	-	-
	Hospital Universitario Fundación Alcorcón	Orina	-	-	-	-
	Hospital Universitario Príncipe de Asturias	Orina	-	-	-	-
<b>Murcia</b>	Hospital Clínico Universitario Virgen De La Arrixaca	-	-	-	-	Orina
	Hospital General Universitario J.M. Morales Meseguer	Orina	-	-	-	-
<b>Navarra</b>	Clínica Universitaria de Navarra	Espujo	Heces	-	-	-

Provincia	Hospital	Año 2018	Año 2019	Año 2020	Año 2021	Año 2022
<b>Palencia</b>	Hospital General Rio Carrión	Orina	-	-	-	-
<b>Pontevedra</b>	Hospital Montecelo	-	-	-	-	Exudado rectal
	Hospital Povisa	-	-	Exudado herida	-	-
	Xerencia De Xestión Integrada de Pontevedra e o Salnés	Exudado herida	Exudado herida	-	-	-
<b>Santa Cruz de Tenerife</b>	C.H.U. Nuestra Señora de Candelaria	-	-	-	-	Sangre completa
<b>Tarragona</b>	Hospital Verge de la Cinta de Tortosa	-	-	-	Orina	Orina
<b>Toledo</b>	Hospital Virgen de la Salud	Exudado cutáneo	-	-	-	-
<b>Valencia</b>	Hospital Clínico Universitario de Valencia	-	-	-	Exudado herida	-
	Hospital Universitario y Politécnico La Fe	-	Exudado orofaríngeo	-	-	Sangre completa
	Consortio Hospital General Universitario de Valencia	Exudado perianal	-	-	-	Exudado orofaríngeo
<b>Valladolid</b>	Hospital Universitario Rio Hortega	Espujo	Aspirado traqueal	Exudado rectal	Exudado rectal	Exudado rectal
	Hospital Comarcal de Medina del Campo	Sangre completa	-	-	-	-
<b>Vizcaya</b>	Hospital Universitario de Basurto	Sangre completa	-	-	Aspirado bronquial	Exudado herida
<b>Zaragoza</b>	Hospital Universitario Miguel Servet	-	Herida quirúrgica	-	-	Exudado herida