



Universidad
Zaragoza

Curso 2014 - 2015

**TRABAJO FIN DE MASTER INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE
CARBAPENEMASAS**

Jessica Bueno Sancho

Dirigido por:

Cristina Seral García

Francisco Javier Castillo García

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.2. Antibióticos β -lactámicos	6
1.2.1. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.....	6
1.2.2. Estructura y clasificación	7
1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	16
1.3.1. Mecanismo de resistencia a β -lactámicos.....	21
1.3.2. β -lactamasas	23
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAL Y MÉTODOS	36
3.1. Selección de las cepas.....	36
3.2. Identificación y determinación de la sensibilidad a los antibióticos.....	36
3.3. Detección fenotípica de los mecanismos de resistencia	37
3.3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas	38
3.3.2. Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE).....	43
3.3.3. Detección fenotípica de β -lactamasas tipo AmpC plasmídicas.....	43
3.4. Detección molecular de los genes de resistencia	44
3.4.1. Extracción del DNA	44
3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1. Selección de las cepas.....	56
4.2. Detección de los fenotipos de resistencia	58
4.3. Presencia de carbapenemasas	60

4.3.1. Confirmación de la producción de carbapenemasas mediante métodos moleculares	60
4.4. Presencia de otras β -lactamasas	62
4.4.1. Presencia de BLEE	62
4.4.2. Presencia de AmpC o cefamicinasas plasmídicas	64
4.5. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas.....	64
4.6. Caracterización de las cepas productoras de carbapenemasas.....	67
4.6.1. Distribución de las cepas portadoras de carbapenemasa	67
4.6.2. Presencia de otras β -lactamasas.....	68
4.6.3. Detección de integrones de clase 1, 2 y 3.....	68
4.6.4. Detección de otros genes de resistencia a antibióticos no β -lactámicos ..	69
5. DISCUSIÓN	73
5.1. Epidemiología de las carbapenemasas en <i>Enterobacteriaceae</i>	73
5.2. Evaluación de los métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas	79
5.3. Resistencia a otros antimicrobianos.....	81
5.4. Limitaciones del estudio	82
6. CONCLUSIONES	83
7. BIBLIOGRAFÍA.....	84

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un conjunto heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia clínica, con características estructurales semejantes y homología genética, pero heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patógena. Agrupa a un número creciente de bacterias englobadas en 76 géneros y diversos grupos no nominados que recoge a todo un conjunto de enterobacterias no clasificadas. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543>)

Género	Especie
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
	<i>koseri</i>
	<i>amalonaticus</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
	<i>cloacae</i>
	<i>sakazakii</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	<i>alberti</i>
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
	<i>oxytoca</i>
	<i>granulomatis</i>
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Pantoea (Enterobacter)</i>	<i>agglomerans</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>
<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i>
	<i>rettgeri</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i>
	<i>flexnerii</i>
	<i>sonnei</i>
	<i>boydii</i>
<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i>
	<i>enterocolitica</i>
	<i>pseudotuberculosis</i>

Tabla 1.-Principales género y especie de la familia *Enterobacteriaceae*

Los miembros de esta familia son aerobios/anaerobios facultativos, no forman esporas, y son móviles por flagelos peritricos, excepto los géneros *Klebsiella*, *Shigella* y *Yersinia* (a 37°C) que carecen de ellos. Tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa con o sin producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, son oxidasa negativa (a excepción del género *Plesiomonas*) y catalasa positiva. Una importante característica taxonómica que diferencia los diversos géneros de enterobacterias es el tipo y la proporción de productos de fermentación producidos por la fermentación de la glucosa. Se pueden distinguir dos amplios perfiles: la fermentación ácido mixta y la fermentación butanodiólica (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

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

Las enterobacterias forman parte de la microbiota comensal del tracto intestinal de humanos y animales, y también de otros nichos ecológicos del medio ambiente como el agua o el suelo. Con excepción de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, las enterobacterias son parte de la flora normal o son bacterias ambientales, pudiendo dar lugar a infecciones oportunistas cuando existen factores predisponentes. De esta forma podemos diferenciar especies de enterobacterias que poseen capacidad patógena primaria causando infecciones en personas sanas como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y algunos serogrupos de *Escherichia coli*, y patógenos secundarios que serán los causantes de las infecciones oportunistas: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*.

La pared celular de las enterobacterias está compuesta por una estructura multilaminar: la membrana interna o citoplasmática y la capa más exterior o membrana externa. Entre ellas se encuentra el espacio periplásmico, que contiene diversas enzimas hidrolíticas y proteínas implicadas en el transporte de sustratos (Figura 1). En las bacterias gramnegativas la mayor parte de la pared celular está representada por la membrana externa. Esta capa es una segunda bicapa lipídica, pero a diferencia de la membrana interna, no está compuesta sólo por fosfolípidos y proteínas, sino que contiene polisacáridos. Los lípidos y los polisacáridos están unidos en la membrana externa y se presentan formando un complejo: el lipopolisacárido (LPS). La porción lipídica del LPS es la región más interna y se conoce como lípido A, el cual es una endotoxina formada por ácidos grasos insaturados. La región de polisacáridos la forman el núcleo o core y la denominada polisacárido específico O, que es la región hidrofílica y, por tanto, la más externa. El polisacárido O está unido al núcleo y consta de una secuencia repetitiva de azúcares, cuyas variaciones son las responsables de la especificidad del antígeno somático O y condiciona la virulencia de estas bacterias.

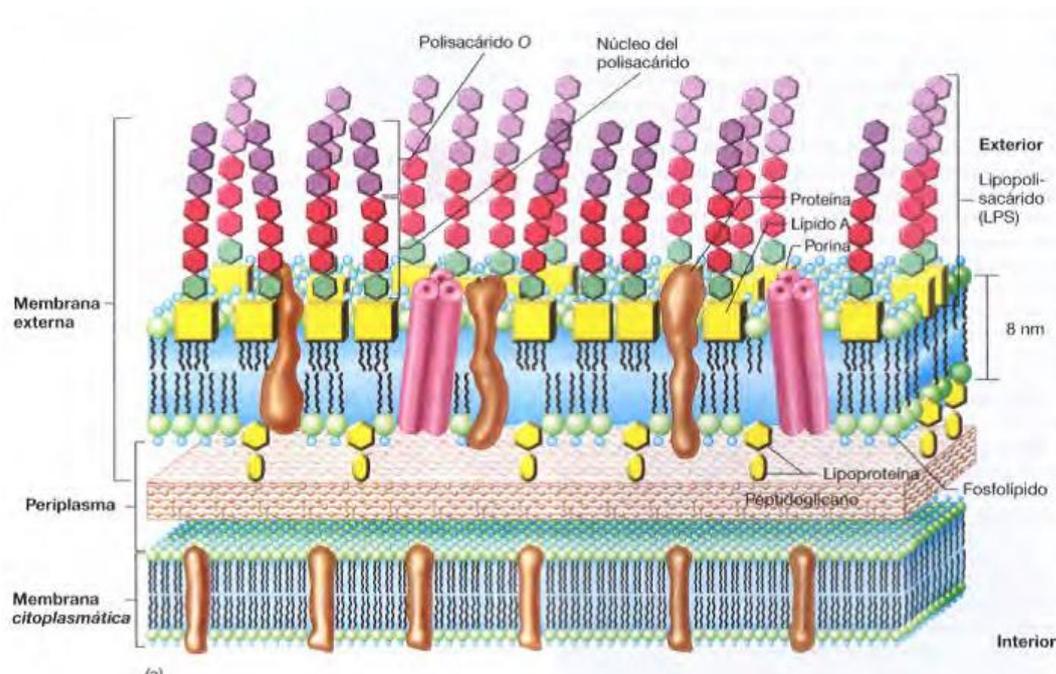


Figura 1.- La pared celular gramnegativa (Madigan et al., 2009)

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

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

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

La familia *Enterobacteriaceae* está asociada a una gran variedad de enfermedades como sepsis, infecciones intraabdominales, respiratorias, urinarias... El tratamiento de estas infecciones está basado fundamentalmente en la terapia con fármacos antimicrobianos. Existen diversos grupos de antimicrobianos con actividad frente a enterobacterias. Los antibióticos más utilizados en estas infecciones son los β -lactámicos asociados con otras familias de antimicrobianos como los aminoglucósidos o las quinolonas (Livermore & Woodford, 2006). Sin embargo, las bacterias han ido desarrollando unos mecanismos de defensa a los antibióticos. Estos son los mecanismos de resistencia, que pueden ser adquiridos (como nuevo material genético procedente de otra bacteria), o generarse por mutaciones cromosómicas en el DNA de la bacteria.

1.2. Antibióticos β -lactámicos

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

1.2.1. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos

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



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

1.2.2. Estructura y clasificación

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

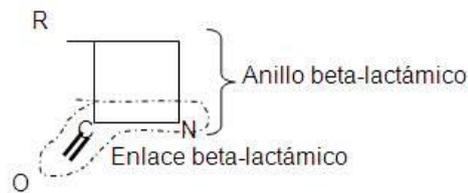


Figura 3.- Anillo β -lactámico

a) Penicilinas:

Su estructura deriva de dos porciones: una, la resultante de la fusión del anillo β -lactámico, responsable de la acción antimicrobiana, y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA); y una cadena lateral, unida al carbono 6 del anillo β -lactámico. A partir del anillo del 6-APA y a través de las modificaciones introducidas en la cadena lateral, se puede contar con penicilinas semi-sintéticas, factibles de administrar por vía oral, o resistentes a penicilinasas.

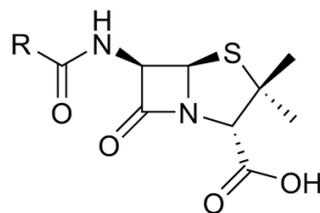


Figura 4.- Estructura química de las penicilinas

Según su espectro de acción, pueden clasificarse en:

- Penicilinas de primera generación (Bencilpenicilina o penicilina G y fenoxi-alquil-penicilina o penicilina V): su espectro de actividad abarca bacterias grampositivas y algunos cocos gramnegativos (como *Neisseria meningitidis*)
- Penicilinas anti-estafilocócicas (metecilina, cloxacilina): las penicilinasas son enzimas producidas por muchas bacterias, especialmente *Staphylococcus*, que rompen el anillo β -lactámico de la molécula de penicilina. Metecilina y cloxacilina son muy estables frente a las β -lactamasas estafilocócicas.
- Aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina): su espectro de acción es un poco más amplio, ya que además de tener el mismo espectro que la penicilina G, actúa también frente a enterococos, *Listeria*, algunas enterobacterias y *Haemophilus*. Sin embargo, son inestables frente a las β -lactamasas estafilocócicas y de muchos bacilos gramnegativos.
- Penicilinas anti-pseudomonas: las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) y las ureidopenicilinas (piperacilina) presentan buena actividad frente a bacilos gramnegativos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, sobre todo las ureidopenicilinas.

b) Cefalosporinas:

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

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

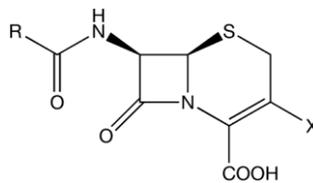


Figura 5.- Estructura química de las cefalosporinas

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

- Cefalosporinas de primera generación: actúan principalmente contra casi todos los cocos grampositivos (*Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*) y tienen una actividad moderada frente a las gramnegativas más sensibles. Dentro de esta generación, se encuentran la cefalotina, cefazolina, cefalexima, etc.
- Las cefalosporinas de segunda generación incluye un grupo heterogéneo caracterizado por un incremento del espectro de acción frente a gramnegativos, pero mucho menos que los compuestos de posteriores generaciones. Se caracterizan por ampliar su espectro frente a algunas enterobacterias oportunistas, *H. influenzae* y *Moraxella catharralis*. Sin

embargo, disminuye su actividad frente a grampositivos. Son, por ejemplo, cefuroxima y cefaclor.

Dentro de esta segunda generación cabe destacar un grupo, las cefamicinas o 7- α -metoxi-cefalosporinas. Son activas frente a algunas enterobacterias y, además, proporcionan estabilidad frente a la hidrólisis por β -lactamasas. Cefoxitina y cefotetán son cefamicinas.

- Las cefalosporinas de tercera generación, en general, son menos activas que las cefalosporinas de primera generación contra cocos grampositivos, pero son mucho más activas frente a gramnegativos y proporcionan un aumento de la resistencia a las β -lactamasas con respecto a las anteriores generaciones. Se caracterizan por una elevada actividad sobre las enterobacterias, y algunas, como ceftazidima, frente a *P. aeruginosa* y otros gramnegativos no fermentadores. Las más importantes son cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefixima.
- Las cefalosporinas de cuarta generación son moléculas que se caracterizan por presentar un amplio espectro, tanto frente a grampositivos como estreptococos y estafilococos, aunque con menor actividad que las cefalosporinas de primera generación; como a gramnegativos, incluida *P.aeruginosa*. Ésta se debe a que penetran mejor y tienen más afinidad por las PBP que por las β -lactamasas. Cefepime y cefpirome son las únicas cefalosporinas que pertenecen a este grupo.

c) Monobactams

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

La acción antimicrobiana del aztreonam difiere de la de otros antibióticos β -lactámicos y se asemeja íntimamente a la de un aminoglucósido (Goodman & Gilman,). Además, es resistente a muchas de las β -lactamasas bacterianas (especialmente de bacterias gramnegativas tipo *Pseudomonas*) debido a los diferentes radicales que se unen al anillo.

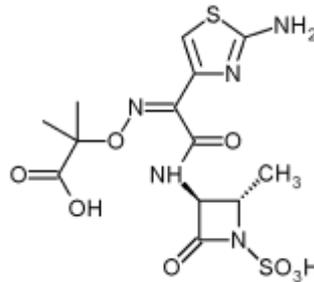


Figura 6.- Estructura química del Aztreonam

d) Carbapenems

Los carbapenems son antibióticos derivados de tienamicina, la cual se obtiene de un compuesto que produce *Streptomyces catleya*. Sus propiedades antibacterianas la convertían en un antibiótico ideal pero era químicamente inestable (Kahan et al., 1979). Su estructura contiene un anillo β -lactámico fusionado a un anillo insaturado de 5 átomos. (Goodman & Gilman,)(Goodman & Gilman,)(Goodman & Gilman,)(Goodman & Gilman,)(Goodman & Gilman,) Para ejercer su acción deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, lo que es fácil en grampositivos pero más complicado en gramnegativos. Sus características estructurales les permiten atravesar la pared mediante las porinas de la membrana externa.

Poseen un espectro de actividad muy amplio, determinado por la capacidad de penetrar a través de la pared de los gramnegativos, la alta afinidad por las PBP esenciales de muchas especies y la elevada resistencia a muchas β -

lactamasas. En general, el espectro es similar, aunque hay algunas diferencias en su actividad intrínseca. (Martinez, Garcia, Sanchez, & Sanchez, 2010). Constituyen el grupo de β lactámicos con mayor espectro de actividad, por lo que deberían utilizarse exclusivamente en infecciones producidas por microorganismos resistentes al resto de β -lactámicos, limitándose su uso al ámbito hospitalario (Rodrigo, 2010). Los principales carbapenems son: imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem.

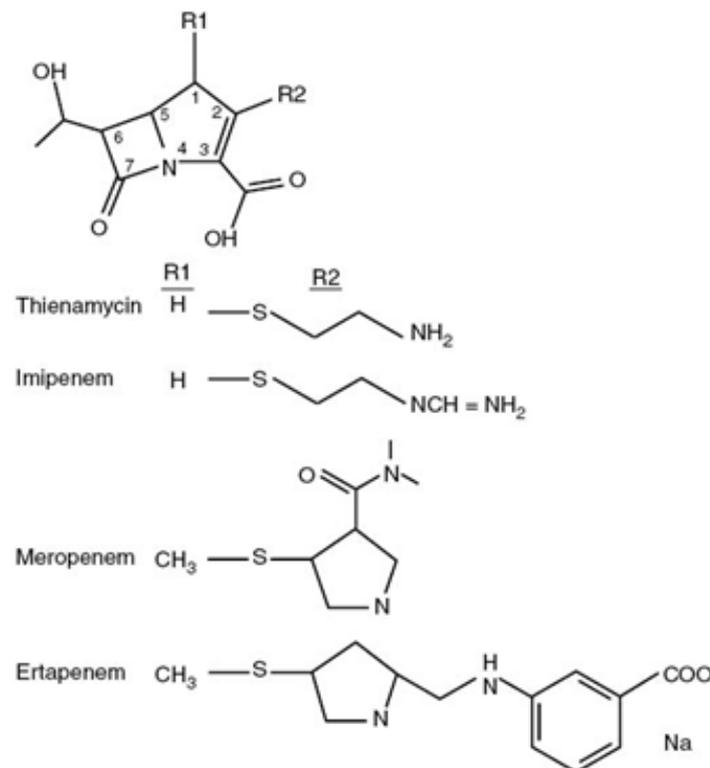


Figura 7.- Estructura química de carbapenems: imipenem, meropenem y ertapenem

- Imipenem: es un derivado N-formimidoil-tienamicina. Se administra combinado con cilastatina, fármaco que inhibe la degradación de dicho antibiótico por la acción de una dehidropeptidasa en los túbulos renales (DHP-1). Imipenem es menos bactericida que meropenem o doripenem en *P. aeruginosa*. Posee gran actividad contra cocos grampositivos,

excepto *Staphylococcus* resistentes a meticilina, y frente a más del 90% de bacterias gramnegativas.

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

El mecanismo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. Los carbapenémicos, para ejercer su acción, deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, esto ocurre a través de las porinas de la membrana externa en las bacterias gramnegativas (Martinez et al., 2010).

Frente a enterobacterias todos los carbapenems poseen una elevada actividad intrínseca, tanto en cepas sensibles como en resistentes a otros antimicrobianos, incluidos los β -lactámicos. Doripenem es similar o ligeramente superior a meropenem y ertapenem, y generalmente estos son más activos que imipenem. La excepción la constituyen *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. y *Salmonella* spp. frente a las que meropenem y ertapenem son más activos que doripenem.

Todos los carbapenem son estables frente a la mayoría de las β -lactamasas clínicamente significativas: β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y cefamicinasas plasmídicas tipo AmpC, pero hay diferencias entre ellos (Martinez et al., 2010).

e) Inhibidores de las β -lactamasas

El mecanismo más importante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción de enzimas inactivadoras por parte de las bacterias, las β -lactamasas, que hidrolizan el anillo β -lactámico haciendo perder la actividad antibacteriana.

Existen una serie de moléculas con baja actividad antibacteriana que son capaces de unirse de forma irreversible a las β -lactamasas. Estos son inhibidores suicidas de estas enzimas, puesto que para ejercer su acción deben de ser previamente hidrolizados por una β -lactamasa antes de convertirse en inactivadores efectivos de la enzima. Debido a que el centro activo de la enzima está preparado para actuar específicamente en el anillo β -lactámico, las sustancias inhibidoras de las β -lactamasas deben parecerse estructuralmente al antibiótico. Por tanto, cuando la enzima bacteriana rompe e hidroliza el anillo, la enzima queda unida de forma permanente y no puede seguir actuando sobre otras moléculas. (Bush, 1988)

Estos agentes van asociados a un β -lactámico de forma que protege al agente terapéutico de la destrucción por β -lactamasas, aumentando así su espectro. Los empleados en clínica son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

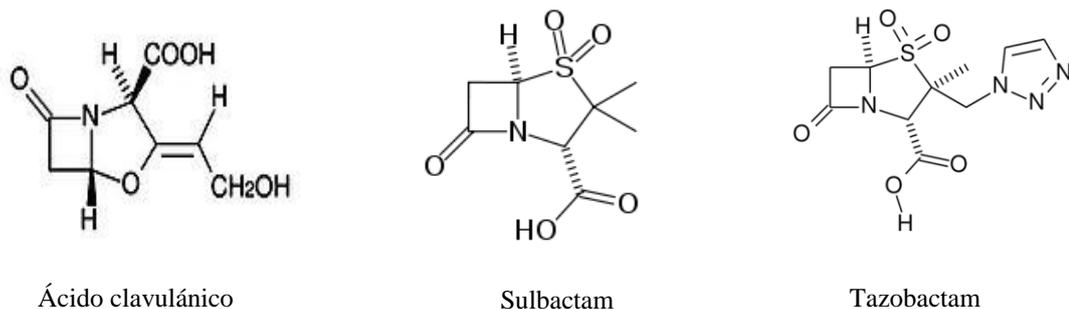


Figura 8.- Inhibidores de β -lactamasas

- **Ácido clavulánico.** El ácido clavulánico fue el primer inhibidor suicida descrito en la literatura por Brown y colaboradores (Brown et al., 1976). La combinación amoxicilina con ácido clavulánico amplía el espectro de ésta frente a una amplia variedad de β -lactamasas plasmídicas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Fusobacterium*) y también de β -lactamasas cromosómicas (*P. vulgaris*, *Klebsiella* y *Bacteroides*). Sin embargo, no inhibe las β -lactamasas cromosómicas producidas por especies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella* y *Pseudomonas*.
- **Sulbactam.** La ampicilina asociado a sulbactam tiene un espectro de acción similar.
- **Tazobactam.** Tiene poca acción contra las β -lactamasas cromosómicas inducibles de *Enterobacteriaceae*, pero tiene actividad satisfactoria contra otras muchas β -lactamasas plasmídicas, como las de espectro extendido. Se ha combinado con piperacilina, de forma que aumenta su espectro para bacterias productoras de penicilinasas. Además es útil para especies de *Pseudomonas* y anaerobios.

1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es un problema con implicaciones terapéuticas, epidemiológicas, microbiológicas y de salud pública. El problema de la resistencia se puede ver como una ecuación con dos componentes principales: el de los antibióticos que inhiben los organismos susceptibles y selecciona los resistentes; y la resistencia genética de un microorganismo seleccionada por el antimicrobiano (Levy & Marshall, 2004).

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

En las bacterias, los mecanismos de resistencia empleados son: alteración de la permeabilidad de la membrana, modificación enzimática del antimicrobiano, expulsión activa del agente terapéutico, alteración de la diana de acción, protección de la diana, hiperproducción de la diana o, de manera más infrecuente, desarrollo de nuevas vías metabólicas (Martinez-Martinez & Calvo, 2010) (Figura 9).

Con frecuencia, estos mecanismos no se desarrollan de forma aislada, sino que nos encontramos que las cepas resistentes a una familia de antibióticos también lo es a otras familias con mecanismos de acción o resistencia diferentes, proporcionando a la bacteria un nivel de resistencia mayor a los antibióticos. Esto produce que los tratamientos sean insuficientes, lo que conlleva un fracaso terapéutico (Falagas, Tansarli, Karageorgopoulos, & Vardakas, 2014; Martinez-Martinez & Calvo, 2010).

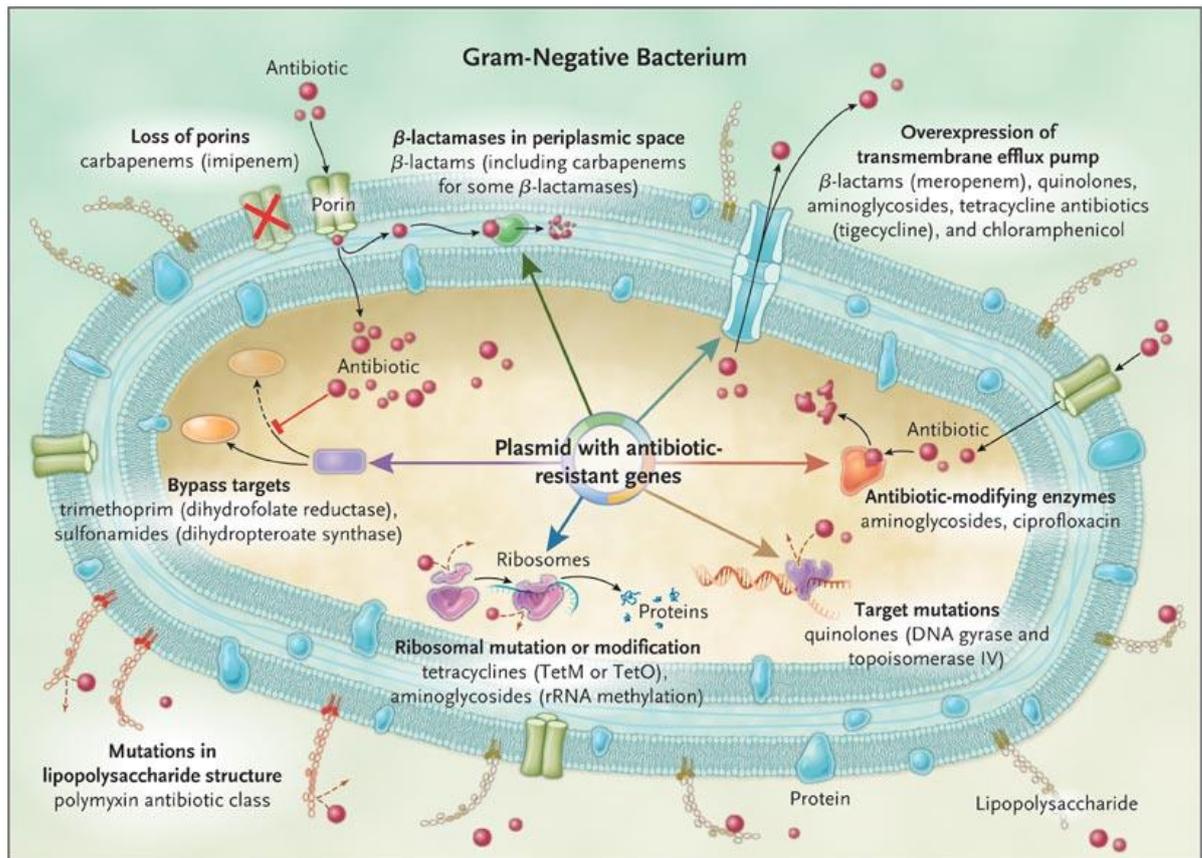


Figura 9.- Mecanismos de resistencias en bacterias gramnegativas (Peleg & Hooper, 2010)

Los mecanismos por los que las bacterias pueden intercambiar material genético y así adquirir los distintos genes de resistencia pueden ser:

- a) **Transformación.** Consiste en la adquisición de ADN por parte de la bacteria receptora a partir de ADN libre en el medio. Para que el fragmento de ADN pueda incorporarse al material genético de la bacteria receptora, es necesario que posea cierta homología con alguna región del cromosoma bacteriano, de forma que a través de un proceso de recombinación genética se incorpore.
- b) **Transducción.** En este caso, la transferencia del material genético se realiza de una bacteria a otra a través de un bacteriófago. Que actúa como un vector

intermediario entre ambas. Clínicamente, solo tiene importancia en la transmisión de genes de resistencia en cocos grampositivos, principalmente *Staphylococcus aureus* (Malachowa & DeLeo, 2010).

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

La transferencia horizontal de ADN mediante conjugación está mediada por plásmidos. Los **plásmidos** son moléculas de ADN extracromosómico, bicateriano, circular y autorreplicativas. No codifica funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria que lo contiene. Sin embargo, le aporta ventajas a la bacteria, ya que puede proporcionarle, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos. Algunos plásmidos son transferibles mediante conjugación (plásmidos conjugativos) y otros necesitan la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria (plásmidos no conjugativos móviles) (Carattoli, 2009).

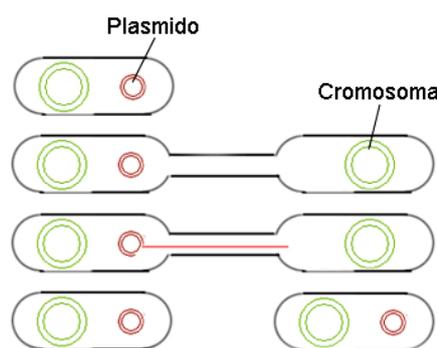


Figura 10.- Conjugación. (Herveg y Barcia-Macay, 2005)

Además de los mecanismos de transmisión horizontal de la resistencia, el ADN exógeno puede adquirirse mediante los elementos genéticos móviles o transponibles. Estos tienen la propiedad de cambiar de posición dentro del genoma, es decir, pueden trasladarse e insertarse desde un sitio dador a otro receptor. En este proceso, los elementos pueden movilizar junto a ellos genes de resistencia que estaban en su interior, o crear una delección o pérdida de bases, lo que se traducirá en una inactivación de los genes. Dentro de los elementos transponibles encontrados destacan dos: las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn).

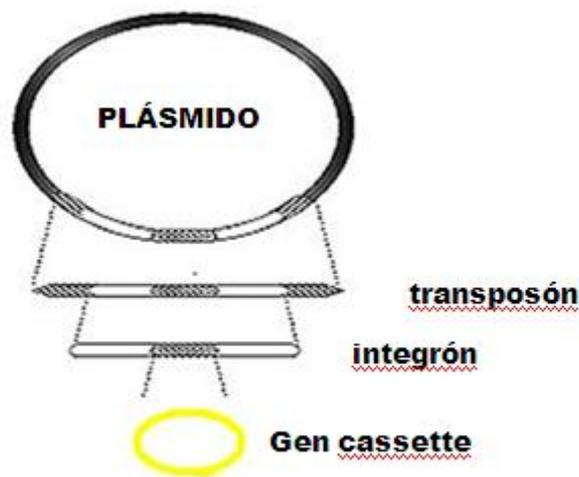


Figura 11.- Estructura simplificada de elementos móviles que permiten la transferencia horizontal de genes entre las bacterias

Los **integrones** son elementos genéticos que pertenecen a la familia de los transposones y se caracterizan por ser capaces de captar genes (genes casetes) que codifican determinantes de resistencia a antibióticos mediante un mecanismo de recombinación sitio-específica (Fluit & Schmitz, 2004). Están formados por tres elementos necesarios para la captura y expresión de genes externos (casetes): el gen *intI* que codifica una integrasa, un lugar de recombinación sitio-específico (*attI*) y un promotor (Pc) necesario para la expresión de los genes casetes integrados (Sabate & Prats, 2002). Los integrones no son móviles por sí mismos, pero los principalmente implicados en la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos se asocian a elementos genéticos móviles y en algunos casos se incluyen en cromosoma.

Se han descrito cinco clases de integrones, aunque los más frecuentemente implicados en la resistencia de antibióticos son los de clase 1, 2 y 3 (Fluit & Schmitz, 2004). Estos tres tipos de integrones se han detectado mayoritariamente en enterobacterias, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Rowe-Magnus & Mazel, 2002). Sin embargo, en las bacterias gramnegativas de interés clínico, los que se han encontrado con mayor frecuencia son los integrones de clase 1.

Dentro de los integrones, podemos encontrar gran variedad de genes de resistencia a antimicrobianos. Los genes de resistencia más frecuentemente encontrados en enterobacterias son una gran variedad de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y β -lactamasas tipo AmpC o cefamicinasas, así como genes de resistencia a quinolonas (*qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*), o a aminoglucósidos (*aac*, *aad*, *aph*). Hay un gran número de posibilidades de recombinación y de intercambio de genes que poseen los integrones, lo que proporciona a las bacterias una gran versatilidad para hacer frente a los antibióticos. Por tanto, su estudio es de gran importancia para estudiar la dispersión epidémica de clones, para una política de control de infección hospitalaria, o desde el punto de vista del tratamiento antibiótico.

El hecho de que muchos de estos genes de resistencia a β -lactámicos se localicen en elementos móviles permiten y favorecen su movilización entre diferentes bacterias, principalmente mediante mecanismos de transferencia horizontal (Carattoli, 2001; Nordmann & Poirel, 2002; Walsh, Toleman, Poirel, & Nordmann, 2005).

1.3.1. Mecanismo de resistencia a β -lactámicos

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

- **Reducción de la permeabilidad de la membrana:** los β -lactámicos son sustancias poco lipófilas, por lo que necesitan proteínas (poros) para facilitar la entrada al espacio periplásmico para unirse a su diana. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión, dando en consecuencia bacterias deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de los β -lactámicos. Esta barrera es una defensa que utilizan muchas bacterias. En el caso de los carbapenems, la pérdida de porinas no confiere una resistencia propiamente dicha, sino que eleva los valores de la concentración mínima inhibitoria (CIM) sin superar los puntos de corte de resistencia. En enterobacterias, intervienen diferentes porinas en el transporte de carbapenems, pero son las porinas de gran tamaño las más importantes en este proceso, siendo las que deben perderse para disminuir significativamente la permeabilidad de la membrana externa a los carbapenems (Suárez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006).
- **Expulsión del antibiótico mediante bombas de expulsión:** algunos microorganismos desarrollan unos sistemas de bombeo muy eficaces mediante los cuales expulsan al exterior de la célula bacteriana los antibióticos (ej: *Pseudomonas aeruginosa*). En enterobacterias no se ha descrito la participación de este tipo de bombas en el desarrollo de resistencia a carbapenems.
- **Modificación de la diana de acción,** las PBP (penicilin binding protein), mediante mutaciones o modificación de la afinidad, que dificulta la unión del β -lactámico a la proteína. Este mecanismo es muy frecuente en los microorganismos grampositivos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

- **Por hidrólisis enzimática del anillo β -lactámico**, que inactiva al antibiótico antes de su unión con las PBP.

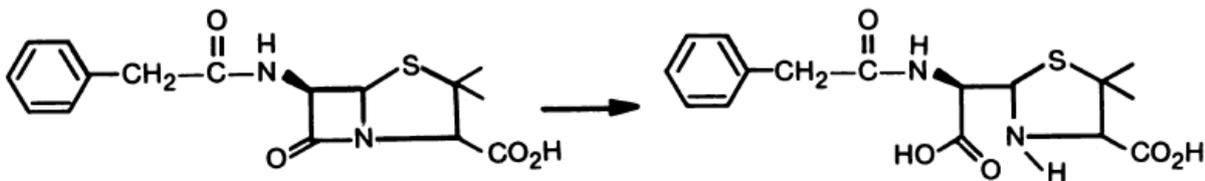


Figura 12.- Hidrólisis de la bencilpenicilina por una β -lactamasa (Bush & Jacoby, 2010)

Este último mecanismo de resistencia es el principal en bacterias gramnegativas (Suarez & Gudiol, 2009). Estas enzimas se denominan β -lactamasas, y dentro de ellas encontramos diferentes tipos en función del sustrato preferido frente al que actúan, y el perfil de inhibición. Su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada. En el primer caso, pueden ser transferibles y suelen ser inactivadas por los inhibidores de las β -lactamasas. Algunos microorganismos poseen β -lactamasas, concretamente cefalosporinasas, de origen cromosómico (ej: *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp. y *Serratia* spp.), las cuales muchas veces son inducibles, es decir, aumenta su producción tras la exposición a β -lactámicos, y no son sustrato de los inhibidores de las β -lactamasas.

1.3.2. β -lactamasas

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

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

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

Según la clasificación funcional de Bush-Medeiros-Jacoy diferenciamos:

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

- β -lactamasas cromosómicas inducibles (AmpC) de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. y *Morganella* spp.

- β -lactamasas cromosómicas constitutivas (AmpC) de *E. coli*.
- β -lactamasas plasmídicas, que son el resultado de la incorporación de genes cromosómicos AmpC en plásmidos.

Las bacterias que poseen el gen AmpC en el cromosoma presentan un sistema molecular que regula la expresión del gen, de tal modo que sintetizan la enzima cuando es necesaria. El mecanismo de inducción de la β -lactamasa AmpC es complejo. El proceso depende de la actuación de los genes *ampC*, *ampE* y *ampD* que codifican proteínas de membrana (AmpC y AmpE) y una proteína soluble (AmpD). La expresión del gen es inducida por el gen *ampR*, la cual en condiciones normales actúa como represor, y adquiere funcionalidad cuando los productos de degradación de la pared bacteriana están presentes como consecuencia de la actuación del β -lactámico, los cuales entran gracias a una permeasa (AmpG). Si hay una alta degradación de la pared, se induce la producción de β -lactamasas tipo AmpC.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La resistencia a los carbapenems en bacterias gramnegativas ocurre principalmente por la combinación de dos o más de los mecanismos de resistencia antes mencionados. Sin embargo, lo más frecuente es encontrar como agente causal una β -lactamasa tipo carbapenemasa o una del grupo AmpC.

Las β -lactamasas tipo AmpC o cefalosporinasas presentan baja afinidad a los carbapenem. Sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y, a su vez, se

produce un mecanismo de pérdida de porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplásmico permite que la enzima lo hidrolice, produciendo una resistencia a los carbapenem. ACT-1, CMY-4 y ACC-1 son algunas de las β -lactamasas tipo AmpC presentes en plásmidos que se han identificado en enterobacterias resistentes a los carbapenem (Suárez et al., 2006).

La resistencia a betalactámicos en enterobacterias y otros gramnegativos está mediada principalmente por β -lactamasas. Muchos tipos de estas enzimas son de gran relevancia clínica, y su producción origina microorganismos multirresistentes. En enterobacterias las más importantes son las de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas tipo AmpC cromosómicas o plasmídicas, y las carbapenemasas. Con la circunstancia agravante que estos microorganismos productores de β -lactamasas presentan también resistencia a aminoglucósidos y quinolonas por otros mecanismos. (Philippon, Arlet, & Jacoby, 2002)

1.3.2.1. Carbapenemasas

El mecanismo más importante de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias es la producción de carbapenemasas, aunque dicha resistencia también puede ser debida a la combinación de β -lactamasas tipo AmpC o, en menor medida, β -lactamasas de espectro extendido, combinadas con la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, ya que por sí solas su capacidad hidrolítica frente a carbapenems es muy pobre (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, & Bonomo, 2011). Algunos estudios han identificado la alteración de las PBP como otro posible mecanismo causante de la resistencia a carbapenems en enterobacterias (Yamachika, Sugihara, Kamai, & Yamashita, 2013).

Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan carbapenems pero también actúan frente a otros β -lactámicos, aunque su espectro depende de la especificidad de cada enzima. Además, son resistentes a la acción de los inhibidores de β -lactamasas (como el ácido clavulánico o el tazobactam). Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles. Podemos diferenciar dos grupos principales: las serín-carbapenemasas, que pertenecen a la clase molecular A o D de

Ambler, y las metalo- β -lactamasas (MBLs), llamadas así por su dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento, que corresponden a la clase B de Ambler (Ambler, 1980)(Ambler, 1980)(Ambler, 1980)(Ambler, 1980)(Ambler, 1980)(Ambler, 1980).

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

Cefalosp. : cefalosporinas

CLAV/EDTA: inhibidas por ácido clavulánico y EDTA

V: variable

^a Cefamicinas no suelen ser sustrato de las carbapenemasas de clase A

^b Algunas enzimas tipo GES no hidrolizan aztreonam

Tabla 3.-Perfiles hidrolíticos de carbapenemasas descritas en Enterobacterias (Martínez-Martínez & González-López, 2014)

En un principio, la resistencia a carbapenems sólo fue descrita en algunas especies de bacilos gramnegativos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*, pero cada vez se encuentra en la literatura más casos de enterobacterias portadoras de estas enzimas, aunque de manera casual (Rossolini, Mantengoli, Docquier, Musmanno, & Coratza, 2007; Suárez et al., 2006). Sin embargo, a pesar de esta infrecuencia, la situación es preocupante, dado que estas enzimas están generalmente codificadas por genes localizados en integrones y asociados a plásmidos que pueden diseminarse entre diferentes especies. Además, otros genes de resistencia suelen estar albergados en las mismas estructuras (como enzimas modificantes de aminoglucósidos y quinolonas), pudiendo transferirse de forma conjunta y provocar el fenómeno de bacteria multirresistente (Poole, 2011). Diferentes estudios alertan de la

creciente incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Asthana, Mathur, & Tak, 2014; Robilotti & Deresinski, 2014).

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

- **La clase A de Ambler** corresponde con el grupo 2f de Bush y Jacoby. Son enzimas que hidrolizan carbapenems, oximino- β -lactámicos y cefamicinas; y son resistentes a aztreonam. Su actividad es inhibida por ácido borónico, pero parcialmente por ácido clavulánico y tazobactam. Esta propiedad es útil en su detección, ya que se emplean métodos fenotípicos basados en el efecto de inhibición producido por el ácido borónico, en formato de test de sinergia de doble disco. Ejemplos de estas carbapenemasas son KPC, IMI, GES, NMC-A y SME.
 - **SME, IMI, NMC-A:** estos tres grupos enzimáticos están codificados por genes cromosómicos. Hidrolizan a diferentes sustratos como penicilinas, algunas cefalosporinas, aztreonam y carbapenems. SME-1 fue la primera enzima descubierta en dos cepas de *Serratia marcescens* en Inglaterra en 1982. Las enzimas IMI (imipenem-hydrolyzing β -lactamasas) fueron descubiertas en 1996 en Norte América en *Enterobacter cloacae*. Solo se han descritos 6 variantes hasta hoy (<http://www.lahey.org/Studies/>), principalmente en *Enterobacter* spp. y alguna cepa de *Escherichia coli*.
 - **GES:** Las Guiana Extended-Spectrum β -lactamasas (GES) fueron descubiertas en el año 2000, pero al principio fueron consideradas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los genes *bla_{GES}* suelen estar codificados en integrones de clase 1 localizados en plásmidos, pero se han descrito genes codificados cromosómicamente en algunas enterobacterias.
 - **KPC:** Dentro de las carbapenemasas de clase A, son las enzimas con mayor importancia epidemiológica. Desde la primera descripción en 1996 en Carolina del Norte, Norte América en *Klebsiella pneumoniae*,

las bacterias productoras de KPC se han propagado por todo el mundo y hay 23 variantes identificadas (<http://www.lahey.org/Studies/>). Los genes *bla_{KPC}* suelen estar codificados en transposones, lo que facilita su transmisión.

- **La clase B de Ambler** (grupos 3a y 3b) comprende las carbapenemasas que actúan frente a todos los β -lactámicos excepto monobactámicos. Son las llamadas metalo- β -lactamasas (MBLs), ya que son inhibidas por quelantes de cationes divalentes como el EDTA o el ácido dipicolínico debido a que su mecanismo de hidrólisis depende de la interacción con un ión Zn^{2+} en su sitio activo, pero no se ven afectados por los inhibidores clásicos (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam). En este caso, para su identificación se emplean los test de sinergia con EDTA. Entre ellas, encontramos diferentes enzimas como VIM, IMP, NDM, SPM, SIM y GIM, siendo las más importantes las tres primeras (Meini, Llarrull, & Vila, 2014), las cuales se han descrito en cepas de enterobacterias en Grecia, Francia y España.
 - **VIM:** las primeras Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamasas (VIM) fueron aisladas de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenems en 1997, Verona (Italia). Desde entonces, se han registrado 46 variantes de estas enzimas, principalmente en cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Suelen estar codificadas en integrones de clase 1, dentro de transposones, junto con otros genes de resistencia como a aminoglucósidos, cloranfenicol y sulfonamidas dando lugar a cepas multirresistentes.
 - **NDM:** Las enterobacterias New Delhi Metallo- β -lactamasas (NDM) positivas, fueron descubiertas en 2008 en Suecia en un paciente indio, quien primero había estado hospitalizado en Nueva Delhi (Yong et al., 2009). Estas enzimas se han propagado rápidamente y ahora las encontramos en diferentes países, sobre todo en enterobacterias (Nordmann, Poirel, Toleman, & Walsh, 2011). En comparación con otras carbapenemasas, NDM-1 tiene unas características que son muy

desconcertantes para la salud pública mundial: 1) el gen *bla_{NDM-1}* no está solo en una especie, sino que se encuentra en diferentes especies no relacionadas, 2) una frecuente adquisición por patógenos nosocomiales como *K. pneumoniae* y *E. coli*, 3) el gran tamaño del reservorio, ya que está presente en todo el subcontinente Indio (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011).

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

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

Hay descritas más de 400 tipos de β -lactamasas tipo OXA (<http://www.lahey.org/Studies/>), de las cuales solo se consideran carbapenemasas 127 (grupo 2df de Bush), como por ejemplo OXA-23, 27, 40, 48, 50, 51, 55 y 58, que se han identificado en el género *Acinetobacter* (Martinez et al., 2010). El primer productor de OXA-48 fue identificado en una cepa de *K. pneumoniae* en Turquía en 2003, y desde entonces su

distribución ha sido tal que incluye países de Europa y África. En los últimos años se está observando un aumento de la diseminación de OXA-48 entre enterobacterias, sobre todo en *K. pneumoniae* y, en menor medida, OXA-23 en *Proteus mirabilis*.

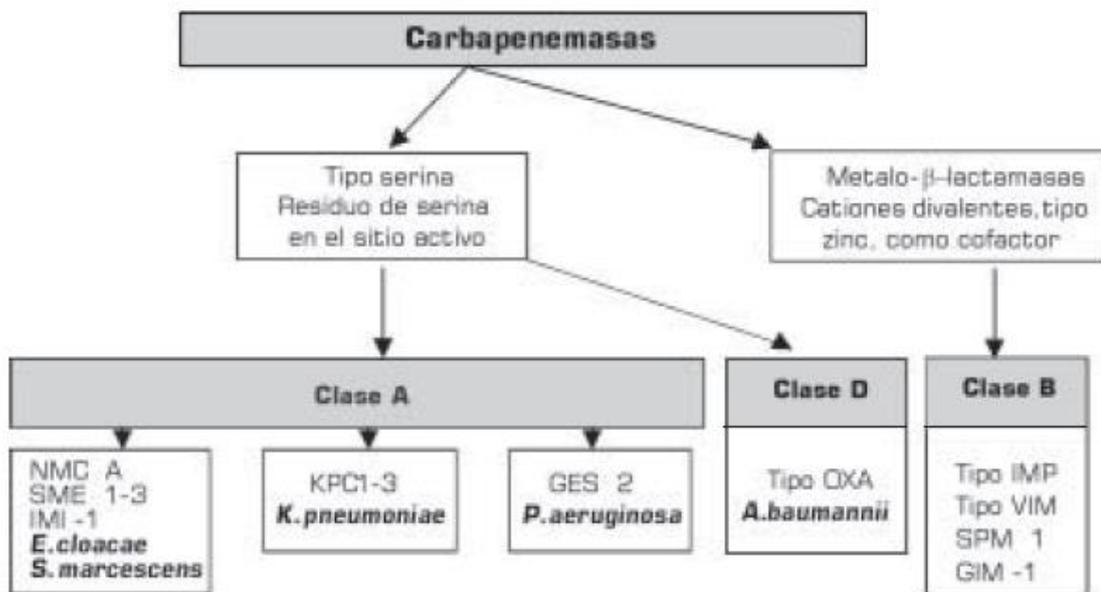


Figura 13.- Clasificación de β-lactamasas basada en la propuesta por Ambler (Suarez et al., 2006)

2. OBJETIVOS

Desde hace varias décadas se está observando un incremento de bacterias multirresistentes gramnegativas portadoras de genes codificantes de carbapenemasas. La aparición de enterobacterias productoras de carbapenemasas como causa de infecciones es un asunto de gran preocupación, y la evolución futura indica un aumento de estas infecciones, tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad (Oteo, Miro, Perez-Vazquez, & Navarro, 2014).

Además, la inclusión de estos genes en elementos genéticos móviles (integrones, transposones, plásmidos) puede estar favoreciendo su diseminación entre las bacterias. Asimismo, la presencia y co-existencia de genes de resistencia a antibióticos no- β -lactámicos en la misma estructura genética, favorecería los procesos de co-selección de bacterias multirresistentes portadoras de carbapenemasas.

Conocer la prevalencia de los pacientes que han adquirido una cepa portadora de carbapenemasa y los mecanismos por los que ha adquirido esta resistencia podría ayudar a la prevención de esta infección, y a adoptar medidas para un control epidemiológico para evitar la diseminación de estas bacterias multirresistentes (Suárez et al., 2006).

El objetivo principal de este estudio es conocer cuál es la situación en el Sector Sanitario de Zaragoza III en cuanto a los mecanismos de resistencia a β -lactámicos, producción de carbapenemasas, y su posible asociación con mecanismos de resistencia a otras familias de antimicrobianos como aminoglucósidos y quinolonas.

Los objetivos que se persiguen son:

1. Detección de carbapenemasas en enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenems durante dos años (2012-2014) en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.
2. Determinación de la prevalencia de cepas de enterobacterias resistentes a carbapenems aisladas durante ese periodo de tiempo.

3. Estudio de la sensibilidad antibiótica de todas las cepas bacterianas seleccionadas.
4. Estudio de los fenotipos de resistencia a diversos antimicrobianos, principalmente fenotipos BLEEs, AmpC y carbapenemasas en los aislados clínicos.
5. Caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia a distintos antimicrobianos, principalmente los asociados con el fenotipo BLEE, AmpC y la presencia de carbapenemasas.
6. Evaluar la eficacia de cuatro métodos fenotípicos utilizados para la detección de carbapenemasas en enterobacterias para comparar su aplicabilidad respecto a los resultados obtenidos por métodos moleculares.
7. Conocer las frecuencias relativas de los integrones tipo 1, 2 y 3 en las cepas portadoras de carbapenemasas. Caracterizar genéticamente estos integrones estudiando los genes casetes que incluyen.
8. Determinar las resistencias asociadas en las cepas productoras de carbapenemasas a antibióticos no β -lactámicos (quinolonas y aminoglucósidos).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de las cepas

Se ha estudiado la sensibilidad de un total de 20093 aislados de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos de muestras clínicas durante el periodo comprendido entre Abril de 2012 y Agosto de 2014 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Se seleccionaron las cepas con un perfil compatible de portar una carbapenemasa, siguiendo el criterio de selección compatible con una sensibilidad disminuida a carbapenems según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): CIM de ertapenem >0,5 µg/ml y/o imipenem >2 µg/ml.

3.2. Identificación y determinación de la sensibilidad a los antibióticos

La identificación bacteriana y los estudios de sensibilidad se realizaron mediante el sistema semiautomático de microdilución en caldo (MicroScan Walkaway[®], Siemens Healthcare, España). Este sistema incluye la determinación de sensibilidad a diferentes antibióticos y permite un cribado de diferentes mecanismos de resistencia. Los antibióticos estudiados con sus diferentes concentraciones se recogen en la Tabla 4. Los criterios de sensibilidad del sistema MicroScan Walkaway[®] están adaptados a las recomendaciones del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), de forma que se clasifican las cepas en diferentes categorías de sensibilidad: cepas sensibles, intermedias o resistentes.

Este sistema, además de los criterios de sensibilidad, permite identificar las bacterias mediante un conjunto de pruebas bioquímicas. Posteriormente, la identificación bacteriana se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina	8 - 16
Amoxicilina / Ác. clavulánico	8/4 - 16/8
Cefalotina	8 - 16
Cefazolina	8 - 16
Cefuroxima	4 - 16
Cefoxitina	8 - 16
Cefotaxima	1 - 32
Cefotaxima / Ác. clavulánico	0,5/4 - 4/4
Ceftazidima	1 - 16
Ceftazidima / Ác. clavulánico	0,25/4 - 2/4
Cefepime	1 - 16
Piperacilina / Tazobactam	8 - 64
Aztreonam	1 - 16
Imipenem	1 - 8
Ertapenem	0,5 - 4
Gentamicina	2 - 8
Tobramicina	2 - 8
Amikacina	8 - 32
Ác. Nalidíxico	16
Ciprofloxacino	0,5 - 2
Tigecilina	1 - 2
Trimetoprim / Sulfametoxazol	2/32
Colistina	4

Tabla 4.- Listado de antibióticos que recoge el sistema MicroScan Walkaway®

3.3. Detección fenotípica de los mecanismos de resistencia

A continuación, se describen varios métodos de detección fenotípica de diferentes tipos de mecanismos de resistencia a β -lactámicos que se realizaron a todas las cepas susceptibles de portar una carbapenemasa. En estas cepas se estudió la presencia de carbapenemasas, así como de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y cefamicinasas o AmpC plasmídicas.

En las enterobacterias con AmpC cromosómica (*Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*) se realizaron todos los test fenotípicos por duplicado: en agar Mueller-Hinton (bioMérieux) y en agar Mueller-Hinton (bioMérieux) suplementado con una concentración de 50 mg/ml de cloxacilina, de forma que inhibiremos su AmpC para evitar unos resultados falseados.

Para la detección fenotípica de las β -lactamasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico de cada una de las clases de enzimas y su posible inhibición por diferentes inhibidores de β -lactamasas.

3.3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas

3.3.1.1. Antibiógramas por difusión en agar

Permite determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas que queremos estudiar mediante el empleo de discos de papel impregnados con los antibióticos a una determinada concentración.

Para ello, se prepara una suspensión bacteriana de la cepa a estudio con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland en solución salina estéril. Se siembra en una placa de agar Mueller-Hinton (bioMérieux) en forma de césped con ayuda de un hisopo estéril. A continuación se colocan los discos de los antibióticos a estudio cargados con una concentración conocida con una distancia de centro a centro de 1 cm. El antibiótico difundirá en un gradiente radial alrededor del disco. La placa se incuba a 37 °C durante 18-24 horas.

El microorganismo que estamos estudiando crecerá en la placa, formando unos halos de inhibición (sin crecimiento) alrededor del disco, con diferente diámetro en función de si es sensible o resistente al antibiótico. Esa distancia se mide en milímetros (mm), que se corresponde con una concentración denominada concentración mínima inhibitoria (CIM).

Para la confirmación de la presencia de carbapenemasas en las cepas seleccionadas se emplean los siguientes discos, para confirmar la sensibilidad a los antibióticos:

- Imipenem 10 μ g
- Ertapenem 10 μ g

3.3.1.2. Test de sinergia de doble disco

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

Para la detección de metallo- β -lactamasas (MBL) se realizó un antibiograma con una distribución concreta de los discos: imipenem (10 μ g) + disco blanco con 6 μ l de ácido etilendiaminotetraacético 0,5M pH=8,0 (EDTA) + ertapenem (10 μ g) a una distancia de 1 cm. Se observa el fenotipo MBL cuando se produce una deformación del halo de inhibición de los carbapenems en las proximidades del disco de EDTA (Figura 17-2). Este estudio nos da una idea previa de la presencia de algún tipo de carbapenemasas de tipo B en la cepa correspondiente, aunque deberá ser confirmado por técnicas moleculares.

En el caso de las carbapenemasas de clase A, se emplea ácido 3-aminofenilborónico (APB) en vez de EDTA. La disposición de los discos es similar al caso anterior, pero colocando en el disco en blanco 6 μ l de ácido 3-aminofenilborónico a una concentración de 50 mg/ml (Figura 14-1).

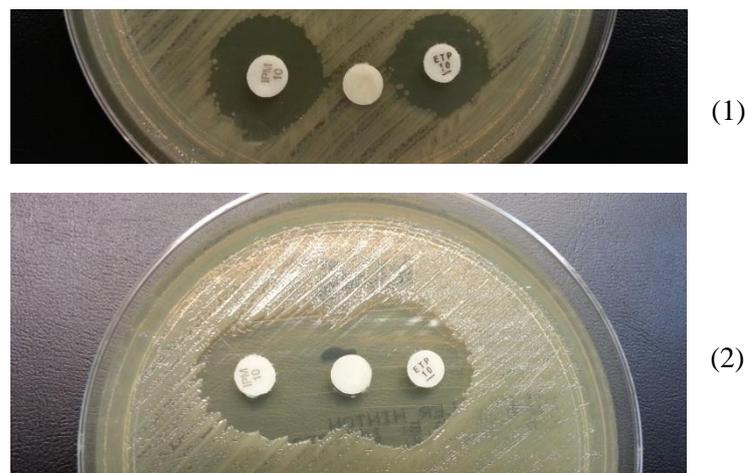


Figura 14.- Test de sinergia de doble disco para la detección de carbapenemasas de clase A (1) y clase B (2).

3.3.1.3. Epsilon-test (ϵ -test[®])

Otro test complementario para la detección de carbapenemasas fue el método de Epsilon-test (ϵ -test[®], bioMérieux). Este procedimiento es una técnica cuantitativa que nos permite determinar la actividad antimicrobiana ya que nos proporciona la concentración mínima inhibitoria (CMI, expresada en $\mu\text{g/ml}$).

El fundamento es similar a la difusión con disco, pero empleando en este caso tiras de plástico no poroso, de 6 cm de largo por 5 mm de ancho, la cual incorpora un gradiente definido del antibiótico equivalente a 15 diluciones dobles seriadas.

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

Para la detección de carbapenemasas de clase B se empleó tiras de E-test en las que en un lado lleva un carbapenem y en el otro lado lleva el carbapenem junto a un inhibidor. En este caso se emplearon unas tiras con imipenem. IP, (4-256 $\mu\text{g/ml}$) y imipenem-EDTA, IPI, (1-64 $\mu\text{g/ml}$) (bioMérieux).



Figura 15.- E-test imipenem / imipenem-EDTA de una cepa portadora de carbapenemasa de clase B

El resultado debe interpretarse como positivo cuando se produce una reducción de más de 3 diluciones en la CMI del carbapenem (imipenem) al estar presente el inhibidor (EDTA).

Si se observan colonias en los halos de inhibición, deberá tomarse como valor de la CMI la concentración a la que todos los mutantes han sido inhibidas.

3.3.1.4. Test modificado de Hodge

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

Se prepara una suspensión bacteriana a 0,5 McFarland de la cepa control *E. coli* ATCC 25922. Esta cepa se emplea como siembra base de la placa (en césped) de agar Mueller-Hinton por su característica de ser sensible a los carbapenems. Colocamos en el centro de la placa un disco de ertapenem 10 µg. Con un asa estéril sembrar en línea desde el disco de antibiótico hacia el borde de la placa la cepa en estudio y unas cepas control positivo (que posea una carbapenemasa) y control negativo (sensible a carbapenems). Incubar durante 18-24 horas a 35-37 °C.

En el caso de un resultado positivo se observará formación de una punta de flecha por el crecimiento de la cepa ATCC 25922 en la intersección entre el halo de inhibición (generado por la difusión del antibiótico) y la estría de siembra de la cepa de estudio productora de carbapenemasa. Lo que ha sucedido es que la carbapenemasa de la cepa a estudio es liberada al medio, degradando el carbapenem y permitiendo el desarrollo de la cepa *E. coli* control. (Figura 16)

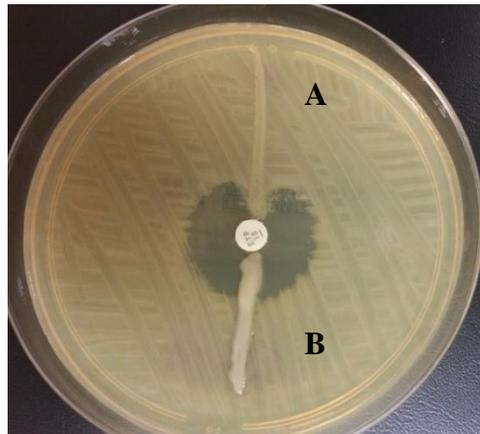


Figura 16.- Test modificado de Hode. A: resultado positivo (presencia de carbapenemasa). B: resultado negativo

3.3.1.5. Siembra en Medio Brilliance CRE Agar (Oxoid®)

Consiste en la siembra de las cepas en estudio en un medio de cultivo cromogénico, medio Brilliance CRE Agar (Oxoid®), el cual posee en su composición una pequeña concentración de carbapenems de acuerdo a los criterios del EUCAST y del CLSI para permitir el cribado de la presencia de enterobacterias productoras carbapenemasas en función del crecimiento o ausencia de crecimiento en este medio.

Al ser un medio cromogénico, nos permitirá diferenciar en función de la especie bacteriana, ya que las colonias se verán de un color diferente:

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

Este medio posee una alta sensibilidad para detectar cualquier tipo de carbapenemasa.

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

3.3.2.1. E-test

Para descartar la presencia de β -lactamasas de espectro ampliado asociada, se recurrió al método de E-test descrito anteriormente. Se emplearon los siguientes antibióticos:

- Cefepime, PM (0,25-16 μ g/ml) y cefepime-ácido clavulánico, PML, (0,064-4 μ g/ml) (bioMérieux) (Figura 17-A).

3.3.3. Detección fenotípica de β -lactamasas tipo AmpC plasmídicas

3.3.3.1. E-test

Se realizó solo en las cepas que no poseen AmpC o cefamicinasa cromosómica. En este caso, las tiras de antibióticos empleadas fueron:

- Cefotetán, CN, (0,5-32 μ g/ml) y cefotetán-cloxacilina, CNI, (0,5-32 μ g/ml) (bioMérieux).

En un resultado positivo, se observará la disminución de 4 diluciones de la CMI en presencia del inhibidor de la pAmpC (cloxacilina) (Figura 17-B).

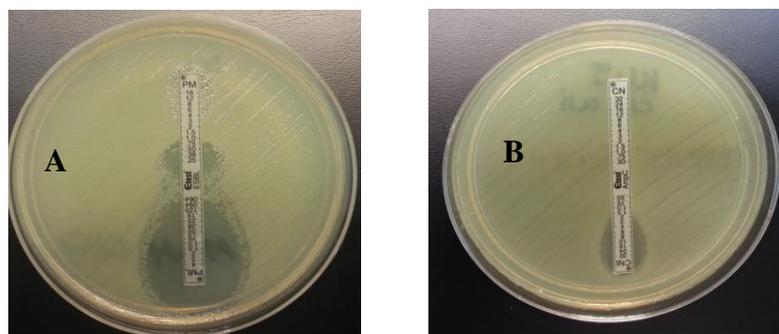


Figura 17.- E-test cefempice / cefepime-ácido clavulánico de una cepa productora de BLEE (A) y E-test cefotetán / cefotetán-cloxacilina de una cepa productora de AmpC plasmídica (B)

3.4. Detección molecular de los genes de resistencia

Para confirmar e identificar la presencia de los genes de resistencia que codifican las diferentes enzimas β -lactamasas, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.4.1. Extracción del DNA

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

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

3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

- **Desnaturalización:** las dos hebras del DNA se separan. Se lleva a cabo a una elevada temperatura.

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

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

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

- DNA de la muestra: es el DNA molde que queremos amplificar. Debe estar exento de compuestos inhibidores como quelantes (EDTA) que recuden la concentración de iones Magnesio necesarios para llevar a cabo la reacción.
- Primers o cebadores: son moléculas cortas, de entre 10 y 30 pares de bases, que son complementarios a la región que se quiere amplificar.
- DNA polimerasa: es la enzima que cataliza la síntesis de DNA.
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): se incorporarán durante el proceso de elongación al extremo 3' libre del cebador creando una cadena complementaria por acción de la DNA polimerasa.
- Tampón de la reacción: proporciona el pH y la fuerza iónica necesaria para que se produzca la reacción.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$): es el cofactor de la enzima.

Al añadir el conjunto de todos estos elementos formaremos la Master-Mix. Hay que calcular un volumen final de Master-Mix en función del número total de muestras a estudio, añadiendo siempre un control positivo y un control negativo. El volumen final para cada tubo de reacción, incluyendo el DNA, será de 50 μ l. Los componentes y cantidades empleadas se indican en la Tabla 6.

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

Tabla 5 .- Reactivos y cantidades empleadas en la realización de la PCR

Detección de genes codificantes de MBL:

Se empleó una PCR múltiple para la detección de genes que codifican carbapenemasas de clase B. Las condiciones específicas de esta PCR se siguieron según (Ellington, Kistler, Livermore, & Woodford, 2007), las cuales se especifican en la Tabla 7.

Primers (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Tamaño de amplicón (pb)
SIM: F: TAZAAGGGATTTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 s 52°C 40 s 36 ciclos 72°C 50 s 72°C 5 min 1 ciclo	570 pb
GIM: F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTTCCAACCTTGCCATGC		477 pb
VIM: F: GATGGTGTTTGGTTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG		390 pb
SPM: F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG		271 pb
IMP: F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R: CCAAACYACTAS GTTATCT		188 pb

Tabla 6.- Primers y condiciones de amplificación para la detección de MBL

En los resultados positivos, se repitió la PCR específica del gen codificante empleando únicamente su pareja de primers.

Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A:

Se utilizó una PCR múltiple en la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A. (Hong et al., 2012). En este caso, el volumen final en cada tubo de reacción fue de 25 µl, y se empleó otro tipo de polimerasa (“KAPA Taq HotStart DNA Polymerase”, KAPABIOSYSTEMS).

En la tabla 8 se reflejan los reactivos y cantidades empleadas para la realización de esta PCR.

Componentes	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
KPC-F, KPC-R	25 µM	0,5 µl	0,5 µM
SME-F, SME-R	25 µM	0,5 µl	0,5 µM
IMI-F, IMI-R	25 µM	0,5 µl	0,5 µM
GES-F, GES-R	25 µM	0,5 µl	0,5 µM
Tampón de reacción (KAPABIOSYSTEMS)	5X	2,5 µl	0,5X
dNTPs (Sigma)	10 mM	0,5 µl	0,2 mM
MgCl ₂ (KAPABIOSYSTEMS)	25 mM	1,5 µl	1,5 mM
BioTaq DNA polimerasa (KAPABIOSYSTEMS)	5 U/µl	0,1 µl	0,5 U
DNA	-	5 µl	-
Agua	-	Hasta 25 µl	-

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

Primers (secuencia 5' → 3')	Carbapenemasas amplificadas	Condiciones de amplificación	Tamaño de amplicón (pb)
KPC: F: GTATCGCCGTCTAGTTCTGC R: GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC	KPC-2 a KPC-10	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 50°C 30s 25 ciclos 72°C 1min 72°C 7min 1 ciclo	638 pb
SME: F: ACTTTGATGGGAGGATTGGC R: ACGAATTCGAGCATCACCAG	SME-1 a SME-3		551 pb
IMI: F: TCGGGTCGATTGGAGATAAA R: CGATTCTTGAAGCTTCTGCG	IMI-1, IMI-2, NMC-A		399 pb
GES: F: GCTTCATTCACGCACTATT R: CGATGCTAGAAACCGCTC	GES-1 a GES-9, GES-11 a GES-15		323 pb

Tabla 8.- Primers y condiciones de amplificación para la detección de carbapenemasas de clase A

Detección de genes codificantes de OXA-48:

Para el análisis del gen portador de carbapenemasas tipo OXA-48 se realizó una PCR específica según las condiciones de la tabla 6. Los primers y condiciones de amplificación se reflejan en la Tabla 10.

Primers (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Tamaño de amplicón (pb)
OXA-48: F: TTGGTGGCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTGTGATGGC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 57°C 1 min 35 ciclos 72°C 1min 72°C 5min 1 ciclo	743 pb

Tabla 9.- Primers y condiciones de amplificación para la detección de carbapenemasas OXA-48

Detección de genes codificantes de β -lactamasas tipo AmpC:

Se utilizó una PCR multiplex para detectar la presencia de β -lactamasas tipo AmpC, siguiendo las condiciones según Pérez-Pérez y Hanson, 2002.

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

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

Primers (secuencia 5' → 3')	B-lactamasas amplificadas	Condiciones de amplificación	Tamaño de amplicón (pb)
MOXM F: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT R: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 30 s 64°C 30 s 25 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	520 pb
CITM F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	LAT-1 a LAT-4, CMY-1 a CMY-7, BIL-1		462 pb
DHAM F: AACTTTTACAGGTGTGCTGGGT R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	DHA-1, DHA-2		405 pb
AACM F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R: CCGCCGCAATCATCCCTACG	AAC		346 pb
EBCM F: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG R: CTTCCACTGCGGCTGCCACTT	MIR-1T, ACT-1		302 pb
FOXM F: ACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	FOX-1 a FOX-5b		190 pb
CMY-2 F: AACACACTGATTGCGTCTGAC R: CTGGGCCTCATCGTCAGTTA	CMY-2		1126 pb
DHA-1 F: GAGCTGAATGTCACCCATGC R: TGAACATACATACCGGTGC	DHA-1		500 pb

Tabla 11.- Primers y condiciones de amplificación para la detección de β-lactamasas tipo AmpC (Perez-Perez & Hanson, 2002)

Posteriormente, en las cepas que amplifica mediante la PCR multiplex alguna de las familias, se caracterizó la cefamicinasa plasmídica mediante la detección de CMY-2 o DHA-1.

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

La identificación de BLEEs se realizó mediante PCR con primers para TEM, SHV y CTX-M universal. Posteriormente se caracterizó el grupo CTX-M mediante PCR: grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-9 o grupo CTX-M-10 (Tabla 13).

Primers (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia (tamaño amplificación)
CTX-M-UNIVERSAL F: CGATGTGCAGTACCAGTAA R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 seg 52°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(Batchelor et al., 2005) (585 pb)
CTX-M-9 F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 45 seg 62°C 45 seg 30 ciclos 72°C 45 seg 72°C 10 min 1 ciclo	(Coque, Oliver, Perez-Diaz, Baquero, & Canton, 2002) (857 pb)
CTX-M-3G F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94°C 7 min 1 ciclo 94°C 50 seg 50°C 40 seg 35 ciclos 68°C 1 min 72°C 10 min 1 ciclo	(Pagani et al., 2003) (1017 pb)
CTX-M-10 F: CCGCGCTACACTTTGTGGC R: TTACAAACCGTTGGTGACG	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 45 seg 56°C 45 seg 30 ciclos 72°C 45 seg 72°C 10 min 1 ciclo	(Coque et al., 2002) (944 pb)
SHV F: CACTCAAGGATGTATTGTG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C 15 seg 1 ciclo 96°C 15 seg 52°C 15 seg 30 ciclos 72°C 2 min 72°C 3 min 1 ciclo	(Pitout et al., 1998) (885 pb)
TEM F: ATAAAATTCTTGAAGAC R: TTACCAATGCTTAATCA	94°C 10 min 1 ciclo 94°C 30 seg 50°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min 1 ciclo	(Weill et al., 2004) (1080 pb)

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

Detección de integrones de clase 1, 2 y 3

En la tabla 13 se reflejan las condiciones empleadas para la detección de la presencia integrones de clase 1, 2 y 3 mediante amplificación de su integrasa. Estas PCR se realizaron solo en las cepas portadoras de carbapenemasas

Primers (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia (tamaño amplificación)
Int - 1 F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG R: ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 seg 62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 8 min 1 ciclo	(Mazel, Dychinco, Webb, & Davies, 2000) (483 pb)
Int-2 F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 seg 62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 8 min 1 ciclo	(Mazel et al., 2000) (788 pb)
Int-3 F: GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 seg 62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 8 min 1 ciclo	(Mazel et al., 2000) (979 pb)
QacEA1-Sul1 Qac - F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG Sul1 - R: GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 seg 62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 8 min 1 ciclo	(Mazel et al., 2000) (1125 pb)
RV-Int1 F: CGAAATCCAGATCCTTGACCC R: AAGCAGACTTGACCTGA	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 30 seg 62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 8 min 1 ciclo	(Lévesque, C. & Roy, P.H, 1993) (tamaño variable)

Tabla 13.-Primers y condiciones de amplificación para la detección de integrones de clase 1, 2 y 3

Detección de resistencias asociadas a la producción de carbapenemasas

En las cepas productoras de carbapenemasas, se analizó mediante PCR la asociación de genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos y quinolonas. En el caso de resistencia a aminoglucósidos se analizaron los genes codificantes de acetilasa (*aac(6')Ib*), que confiere resistencia a tobramicina, kanamicina y amikacina, y de adenilasa (*aadA1* y *aadA5*), que proporcionan resistencia a estreptomicina. (Tabla 15). En el caso de resistencia a quinolonas, se estudió la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* y *qepA* (Tabla 16).

Primers (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia (tamaño amplificación)
aac(6')Ib F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 45 s 55°C 45 s 34 ciclos 72°C 45 s 72°C 8 min 1 ciclo	(Park, Robicsek, Jacoby, Sahm, & Hooper, 2006) (482 pb)
aadA1 F: GCAGCGCAATGACATTCTTG R: ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 1 min 60°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 8 min 1 ciclo	(Madsen, Aarestrup, & Olsen, 2000) (282 pb)
aadA5 F: CTCAGTTCGGTGAGTGGC R: CAATCGTTGCTTTGGCATAT	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 1 min. 54°C 1 min. 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min. 1 ciclo	(Wei et al., 2009) (453 pb)

Tabla 14.- y condiciones para la detección de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos

Primers (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia (tamaño amplificación)
qnrA F: GGGTATGGATATTATTGATAAA R: CTAATCCGGCAGCACTATTA	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 1 min 55°C 1 min 40 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	(Cattoir et al., 2007) (650 pb)
qnrB F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 45 seg 53°C 45 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	(Wang et al., 2008) (469 pb)
qnrC F: GGGTTGTACATTTATTGAATCG R: CACCTACCCATTTATTTCA	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 1 min 55°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	(Kim et al., 2009) 307 pb
qnrD F: CGAGATCAATTTACGGGGAATA R: AACAAAGCTGAAGCGCCTG	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 1 min 55°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min ciclo	(Cavaco, Hasman, Xia, & Aarestrup, 2009) (581 pb)
qnrS F: AGTGATCTCACCTTCACCGC R: CAGGCTGCAATTTTGATACC	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 1 min 55°C 1 min 35 ciclos 72°C 2 min 72°C 7 min 1 ciclo	(Cattoir et al., 2007) (550 pb)
qepA F: GGACATCTACGGCTTCTTCG R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG	96°C 1 min 1 ciclo 96°C 1 min 60°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	(Yamane, Wachino, Suzuki, & Arakawa, 2008) (500 pb)

Tabla 15.- Primers y condiciones para la detección de genes relacionados con la resistencia a quinolonas

3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

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

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

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

4. RESULTADOS

4.1. Selección de las cepas

Durante el periodo de estudio, se procesaron un total de 20.093 cepas de enterobacterias procedentes de muestras clínicas aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Todos los aislamientos fueron procesados para el estudio de su sensibilidad “*in vitro*” a los antimicrobianos con la misma metodología, consistente en la determinación de las CIM mediante un sistema semiautomático de microdilución en caldo (MicroScan Walkaway[®], Siemens Healthcare, España).

A partir de los resultados obtenidos en el Servicio de Microbiología, se han analizado las resistencias de la totalidad de las especies de *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* recogidas durante este periodo. Podemos observar que el mayor porcentaje de resistencia se encuentran en antibióticos β -lactámicos, principalmente en *C. freundii*, *E. aerogenes* y *E. cloacae*, debido a los patrones de sensibilidad característicos producidos por su β -lactamasa cromosómica, en los que se observa una elevada resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, incluyendo cefamicinas (cefotitina) (Figura 18).

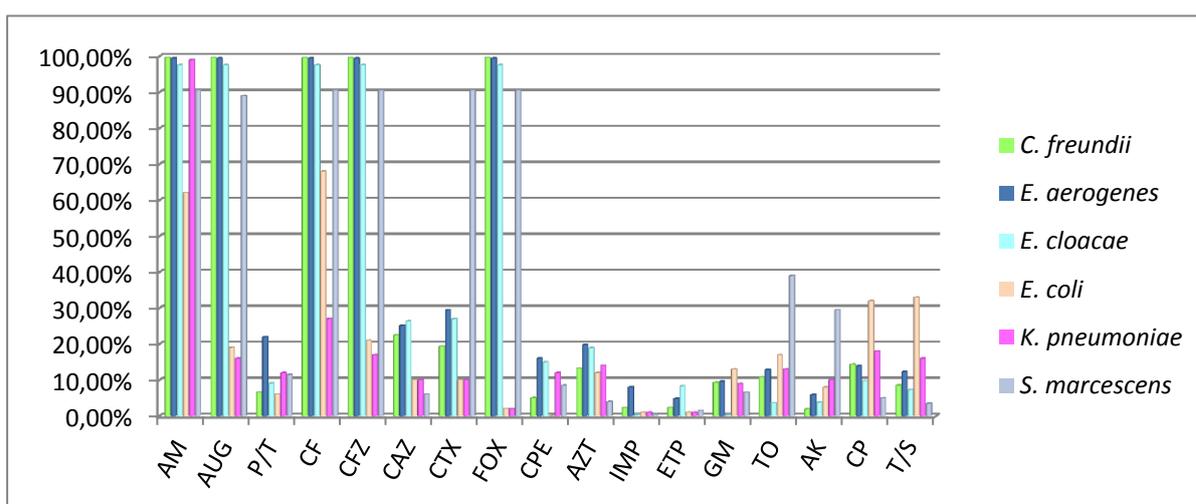


Figura 18.- Patrón de sensibilidad de las enterobacterias totales

De las 20.093 enterobacterias, se seleccionaron un total de 47 aislados (0,23%) con una sensibilidad disminuida a los antibióticos carbapenémicos (CIM de ertapenem $>0,5 \mu\text{g/ml}$ y/o imipenem $>2 \mu\text{g/ml}$).

Las 47 enterobacterias seleccionadas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales, y posteriormente fueron confirmadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Las especies de las enterobacterias seleccionadas fueron: 20 *Enterobacter cloacae*, 5 *Escherichia coli*, 11 *Enterobacter aerogenes*, 5 *Klebsiella pneumoniae*, 5 *Citrobacter freundii* y 1 *Serratia marcescens* (Figura 19). El 78,72% de las cepas, pertenecen a los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Serratia*, por lo que poseen una β -lactamasa cromosómica inducible del tipo AmpC, lo que les confiere una resistencia natural característica que incluye cefalosporinas de primera y segunda generación. Este espectro de hidrólisis puede ampliarse y afectar a otras generaciones de cefalosporinas, así como ligeramente a carbapenems en caso de una desrepresión del gen (hiperproducción de AmpC) o mediante una adquisición de otras β -lactamasas plasmídicas. El 21,28% restante no son cepas portadoras de β -lactamasa cromosómica inducible (*E.coli* y *K. pneumoniae*).

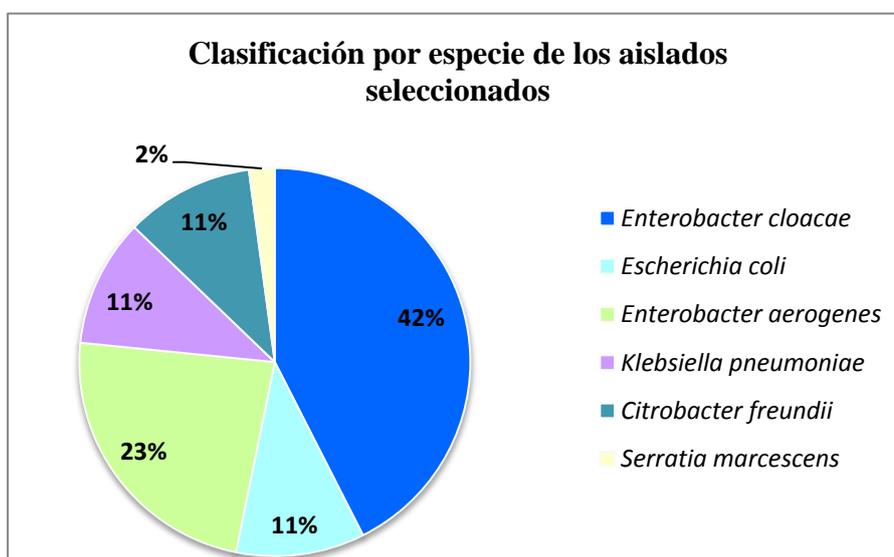


Figura 19.- Clasificación por especie de los aislados seleccionados

Se estudió la sensibilidad de estos 47 aislados, observándose una alta resistencia a β -lactámicos, debido a los perfiles de sensibilidad característicos de las AmpC cromosómicas, seguidos de aminoglucósidos y quinolonas (Figura 20). La sensibilidad

disminuida a carbapenems se mostró más relevante en el estudio frente a ertapenem (80,85% de las cepas seleccionadas) que a imipenem (46,81% de las cepas seleccionadas). Todos los aislados fueron resistentes a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, cefalotina, cefazolina, cefuroxima y cefoxitina.

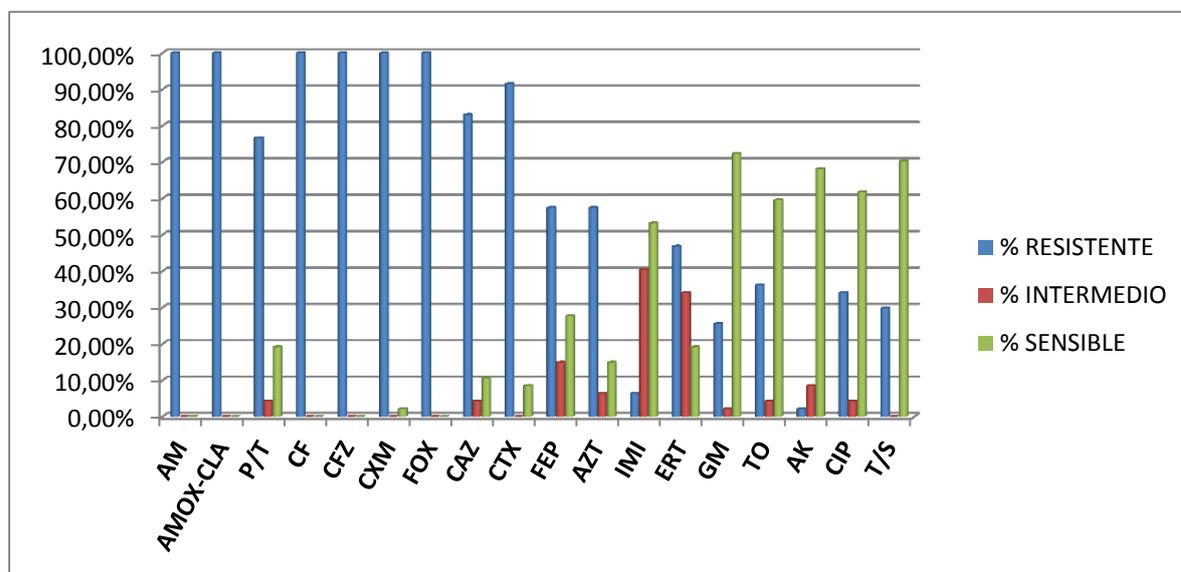


Figura 20.- Patrón de sensibilidad de las cepas seleccionadas

4.2. Detección de los fenotipos de resistencia

Las 47 enterobacterias seleccionadas fueron estudiadas fenotípicamente para asociar su patrón de sensibilidad a un mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos y así clasificarlas como enterobacterias productoras de carbapenemasas, cefamicinasas y/o BLEE.

El 55,32% de los aislados seleccionados no presentaron ninguna característica fenotípica relevante. Estas cepas fueron 19 *E. cloacae*, 5 *E. aerogenes*, 1 *K. pneumoniae* y 1 *S. marcescens*, por lo que se asoció su sensibilidad disminuida a carbapenems a una hiperproducción de su AmpC cromosómica, posiblemente combinada con una pérdida de porinas, excepto en el caso de la cepa de *K. pneumoniae*, en la cual no se ha encontrado el mecanismo responsable y sigue pendiente de caracterizar. En el resto de las cepas se obtuvieron resultados positivos en uno o varios test fenotípicos.

El 21,28% de las cepas seleccionadas (n=10) presentaron un fenotipo asociado a enterobacterias productoras de carbapenemasas (test modificado de Hodge realizado con cloxacilina positivo), de las cuales 9 (19,15%) confirmaron un fenotipo compatible con una carbapenemasa de clase B (test de sinergia con EDTA y/o E-test IP/IPI positivo). La otra cepa con el test de Hodge positivo con cloxacilina no dio ningún test de sinergia positivo para detección de carbapenemasas, por lo que se consideró un falso positivo. Esta cepa, a su vez, dio positivos los test fenotípicos de BLEE y AmpC. Ninguna enterobacteria presentó un fenotipo compatible con carbapenemasas de clase A o de clase D.

El fenotipo compatible con enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se encontró en 13 enterobacterias (27,66%). De estas cepas, 5 presentaban a su vez un fenotipo AmpC, de las cuales una presentó el test de Hodge con cloxacilina falsamente positivo (7,69%) y las otras 4 BLEE y AmpC (30,77%). Además, 2 de las enterobacterias con fenotipo BLEE también tuvieron un fenotipo MBL positivo (15,38%). Las 6 cepas restantes (46,15% de las cepas con fenotipo BLEE) quedaron como productoras exclusivas de BLEE (Figura 21).

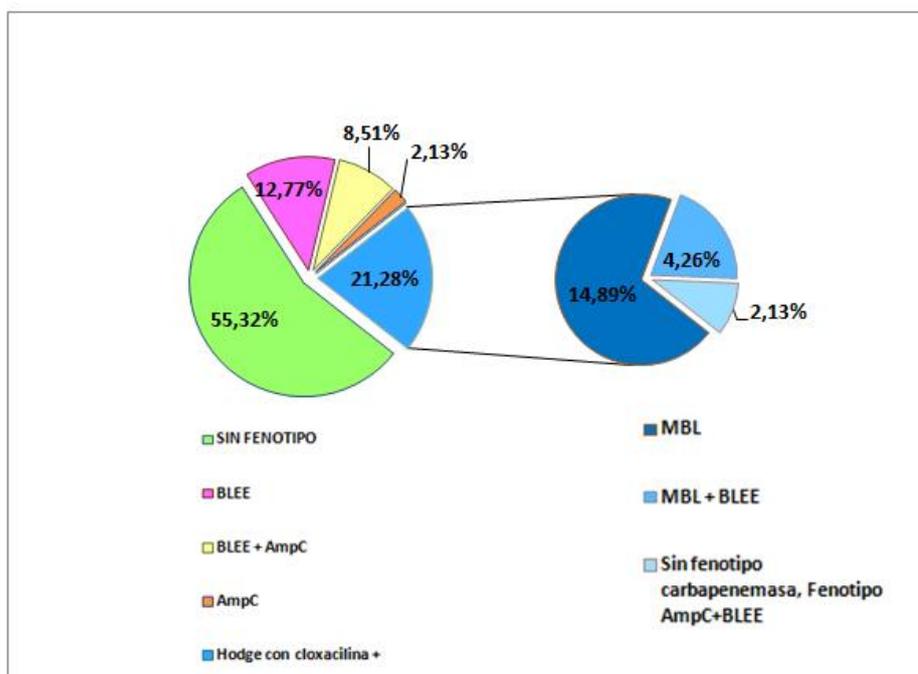


Figura 21.- Representación de los fenotipos de las enterobacterias seleccionadas

En cuanto al fenotipo AmpC, de las 10 enterobacterias no portadoras de β -lactamasas cromosómicas inducibles (*E. coli* y *K. pneumoniae*), 6 presentaban un fenotipo compatible con una producción de cefamicinasa plasmídica (test CN/CNI positivo) (Figura 22). Entre estas cepas, 5 tenían otros fenotipos asociados (ver párrafo anterior), quedando solo una de ellas con un fenotipo AmpC (2,13% de los aislados seleccionados).

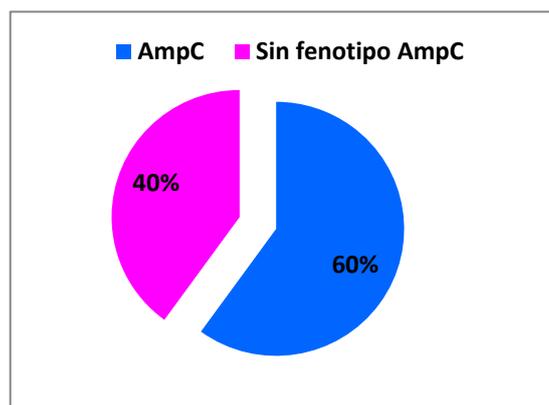


Figura 22.- Aislamientos con fenotipos compatibles con cefamicinasa plasmídica en enterobacterias sin β -lactamasa cromosómica

4.3. Presencia de carbapenemasas

Se investigó la presencia de carbapenemasas mediante métodos moleculares en los 47 aislamientos debido a la posibilidad de ser portador del gen sin expresión fenotípica por un posible falso negativo o error de interpretación.

4.3.1. Confirmación de la producción de carbapenemasas mediante métodos moleculares

Tras la realización de las distintas PCR para la detección de carbapenemasas de clase A (KPC, SME, IMI, GES), B (SIM, GIM, VIM, SPM, IMP) y D (OXA-48), se obtuvo un resultado positivo en 9 de los casos (19,15% del total de cepas

seleccionadas) como productores de metallo- β -lactamasas (MBL). Estas cepas pertenecen a 5 pacientes, lo que representa una prevalencia del 0,024%.

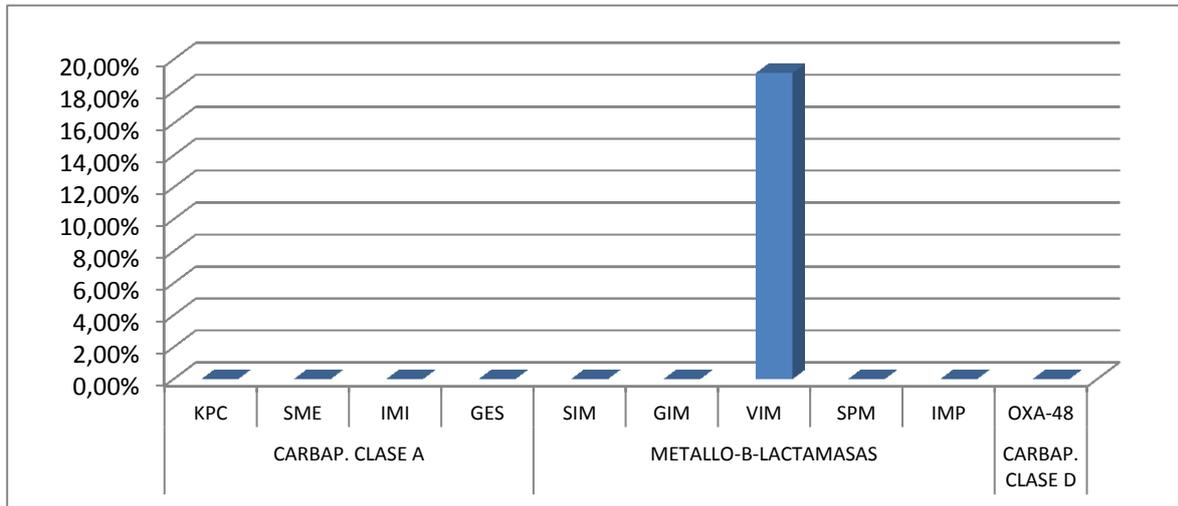


Figura 23.- Representación de las cepas productoras de carbapenemasas

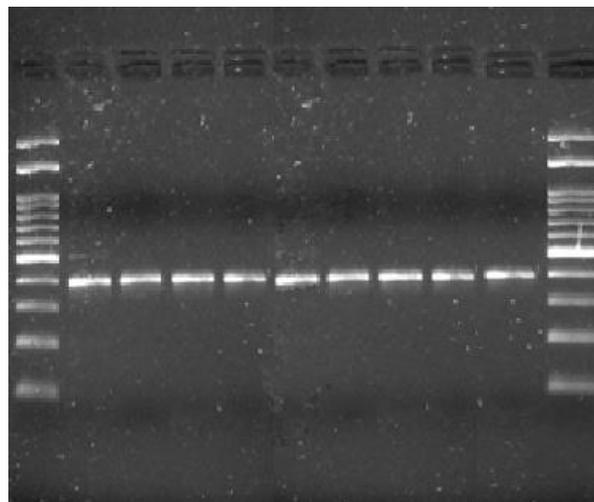


Figura 24.- PCR positiva VIM. La banda se encuentra en el gel a 390 pb

Los 9 resultados positivos se caracterizaron como portadores del gen *bla_{VIM}* (Figuras 23 y 24). Estas cepas eran 5 *Enterobacter aerogenes* (55,56%) y 4 *Citrobacter freundii* (44,44%).

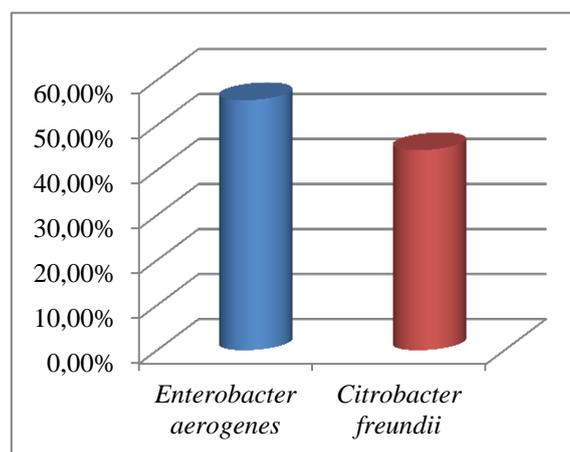


Figura 25.- Especies de enterobacterias portadoras del gen *bla_{VIM}*

4.4. Presencia de otras β -lactamasas

4.4.1. Presencia de BLEE

Se realizaron distintas PCR para la detección de las β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M (universal, 3G, 9 y 10), TEM y SHV. Se obtuvo un resultado positivo en 19 de los casos, pertenecientes a 13 cepas (27,66% del total de enterobacterias analizadas). Todos los casos también fueron detectados mediante los métodos fenotípicos.

Los resultados de las PCR fueron TEM (36,84%, n=7), SHV (26,32%, n=5), y CTX-M-9 (26,32 %, n=5), seguidos del grupo CTX-M-3G (10,53%, n=2). No se encontró ninguna BLEE del grupo CTX-M-10.

Las especies portadoras de estos genes fueron *Klebsiella pneumoniae* (5,26% CTX-M-9, 10,53% CTX-M-3G, 21,05% SHV, 10,53% TEM), *Citrobacter freundii*

(5,26% CTX-M-9, 5,26% TEM), *Enterobacter aerogenes* (15,79% CTX-M-9), *Enterobacter cloacae* (5,26% SHV) y *Escherichia coli* (21,05% TEM).

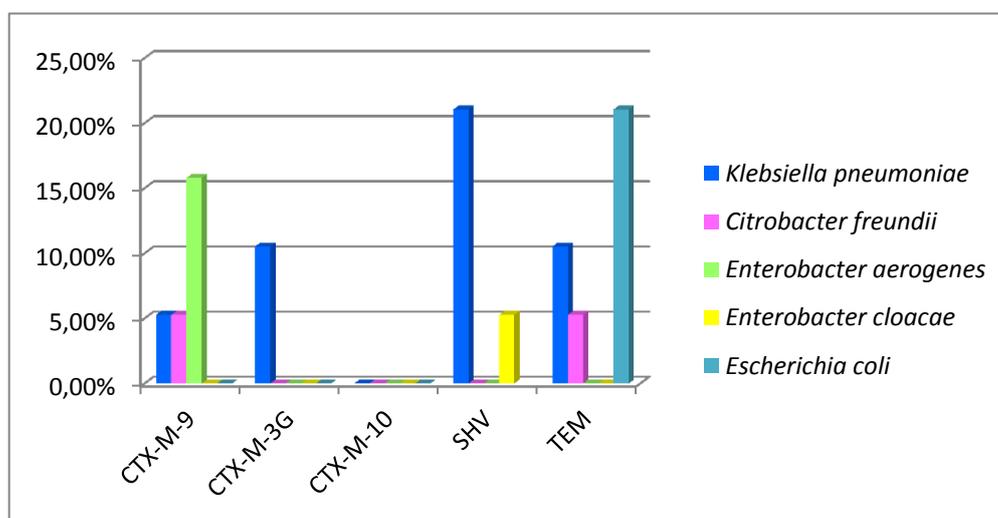


Figura 26.- Comparación gráfica de los resultados obtenidos en la caracterización molecular de BLEEs

Es importante señalar que las dos *K. pneumoniae* portadoras de los genes *bla*_{CTX-M-3G} detectados, también poseían los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, es decir, fueron positivas a tres enzimas. Además, dos de las cepas productoras de CTX-M-9, portaban otro gen codificante de β -lactamasa (*bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} respectivamente). El resto de las cepas solo eran portadoras de un gen codificante de β -lactamasa (Figura 27).

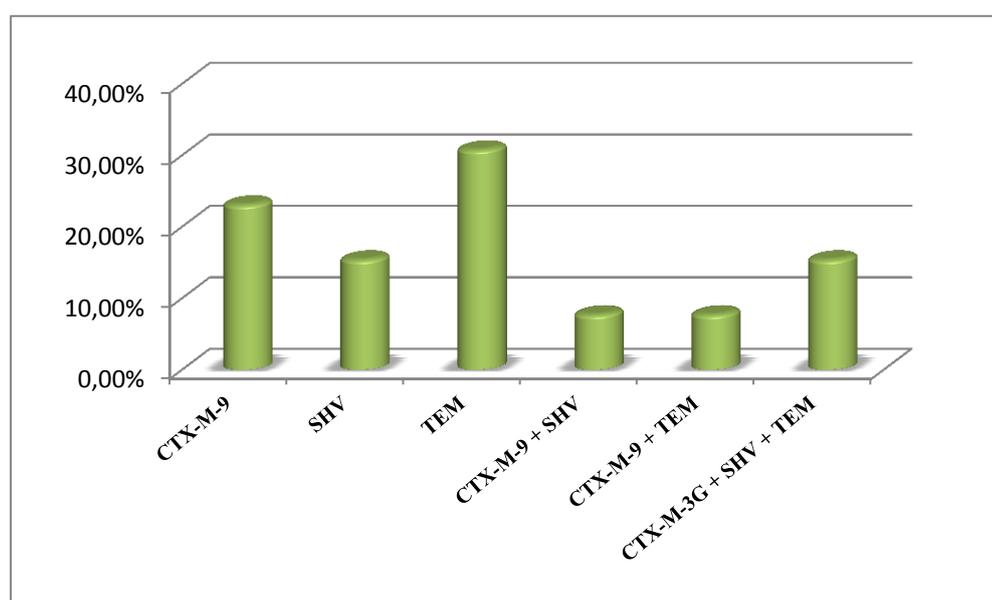


Figura 27.- Representación de las cepas portadoras de β -lactamasa

4.4.2. Presencia de AmpC o cefamicinasas plasmídicas

Del total de las cepas recogidas se seleccionaron 6 aislamientos con fenotipos AmpC, las cuales no poseen una cefamicinasa cromosómica inducible. Para analizar qué genes, en concreto, codifican las enzimas que proporcionan el fenotipo AmpC se estudiaron mediante PCR 5 familias de cefamicinasas (CIT, EBC, FOX, DHA, MOX). Así, de los 6 aislados inicialmente seleccionados por su fenotipo, fueron confirmados 5 (83,33%) como portadores de enzimas de la familia CIT.

Posteriormente se caracterizó las cefamicinasas plasmídicas mediante PCR, siendo en las 5 enterobacterias CMY-2 la cefamicinasa encontrada (10,64% del total de las cepas). Además, 4 de los aislados con CMY-2 (80%) poseían a su vez una β -lactamasa tipo TEM.

Cabe destacar que todos los aislados productores de AmpC plasmídica fueron identificados como *Escherichia coli*.

4.5. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas

Para evaluar diferentes métodos de screening de enterobacterias productoras de carbapenemasas se realizaron cuatro test fenotípicos: test modificado de Hodge, test de sinergia con EDTA, test de sinergia con ácido borónico y crecimiento en un medio de cultivo cromogénico Brilliance CRE Agar (Oxoid®). En las cepas con cefamicinasa cromosómica, los test se realizaron, además, en un medio de cultivo suplementado con cloxacilina para inhibir su AmpC. Estos métodos se compararon con los resultados obtenidos mediante métodos moleculares. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 17.

	Test Hodge	Test Hodge con cloxacilina	Test sinergia EDTA	Test sinergia EDTA con cloxacilina	Test sinergia ác. borónico	Test sinergia ác. borónico con cloxacilina	Brilliance CRE Agar	PCR positiva MBL
<i>E. cloacae</i> (n=20)	17	0	1	0	5	2	4	0
<i>E. aerogenes</i> (n=11)	10	5	5	5	1	1	6	5
<i>E. coli</i> (n=20)	2	1	0	0	3	1	3	0
<i>K. pneumoniae</i> (n=6)	0	0	0	0	1	0	2	0
<i>C. freundii</i> (n=5)	5	4	4	4	0	0	5	4
<i>S. marcescens</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	35	10	10	9	10	4	20	9

Tabla 16.- Resultados de la comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas

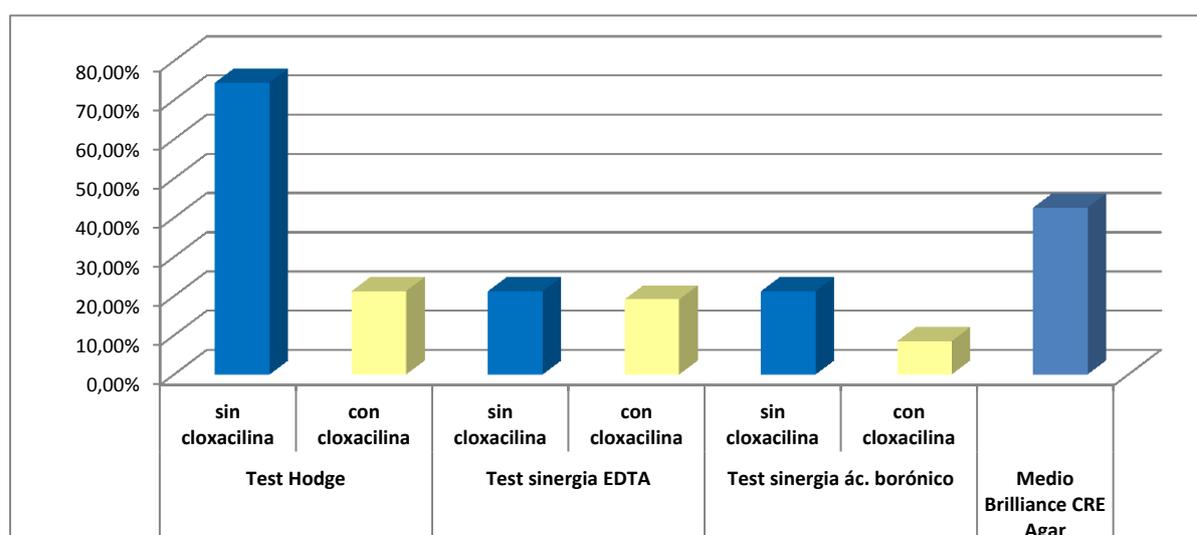


Figura 28.- Representación gráfica comparativa de los cuatro métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas

De las 47 cepas estudiadas, el test de Hodge fue positivo en 35 de ellas (74,47%), pero al realizarlo con cloxacilina se observó que solo 10 de ellos (21,28%) realmente eran positivos. Al realizar el test de Hodge con cloxacilina se consiguió inhibir la AmpC cromosómica de 24 enterobacterias (17 *E. cloacae*, 5 *E. aerogenes*, 1 *C. freundii* y 1 *S. marcescens*), y 1 *E. coli* productor de AmpC plasmídica. De las 10 cepas con el test de Hodge positivo, 9 de ellas (90%) presentaron una carbapenemasa mediante PCR.

Las 9 cepas productoras de MBL fueron identificadas fenotípicamente por los cuatro test, sin embargo muchas otras enterobacterias dieron uno, dos, o tres test positivos sin llegar a confirmarse la presencia de una carbapenemasa mediante métodos moleculares (Tabla 17). Mediante PCR no se detectó ninguna carbapenemasa de clase A, por lo que podemos afirmar que el test de sinergia con ácido borónico da resultados falsos positivos, realizándolo tanto sin cloxacilina (10/47, 21,27%) como con cloxacilina (4/47, 8.5%). El test de sinergia con EDTA con cloxacilina fue el método más sensible (100%) y específico (100%) para la detección de carbapenemasas de clase B.

La especificidad de los test fenotípicos al realizarlos en un medio de cultivo con cloxacilina aumenta debido a la inhibición de la cefamicinasa cromosómica de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*, lo que nos permite evitar posibles falsos positivos.

A su vez, el medio de cultivo cromogénico Brilliance CRE Agar (Oxoid®) tiene una buena sensibilidad (100%) pero una baja especificidad (71,79%), dando falsos positivos en las cepas con cefamicinasa cromosómica (6/15, 40%), cefamicinasa plasmídica (3/5, 60%) y productores de SHV/TEM/CTX-M (5/20, 25%) (Tabla 18). Todas las enterobacterias productoras de la enzima VIM fueron detectadas por el medio cromogénico (45% de las cepas crecidas en este medio). De los tres *E. aerogenes* productores de BLEE, dos de ellos eran también productores de VIM, por lo que no han sido considerados falsos positivos.

	Nº TOTAL	Nº Brilliance CRE Agar	% crecido Brilliance CRE Agar	Brilliance CRE Agar crecido			
				AmpC cromosómica	AmpC plasmídica	SHV / TEM/ CTX-M	VIM
<i>E. aerogenes</i>	11	7	63,64%	100,00%	-	42,86%	71,43%
<i>E. cloacae</i>	20	3	15,00%	100,00%	-	0,00%	0,00%
<i>C. freundii</i>	5	5	100,00%	100,00%	-	20,00%	80,00%
<i>E. coli</i>	5	3	60,00%	-	100,00%	100,00%	0,00%
<i>K. pneumoniae</i>	5	2	40,00%	-	0,00%	100,00%	0,00%
<i>S. marcescens</i>	1	0	0,00%	-	-	-	0,00%
TOTAL	47	20	42,55%	75,00%	15,00%	45,00%	45,00%

Tabla 17.- Resultados obtenidos del medio cromogénico Brilliance CRE Agar

4.6. Caracterización de las cepas productoras de carbapenemasas

Una vez estudiados los diferentes tipos de genes codificantes de β -lactamasas mediante métodos moleculares, se procedió al estudio en profundidad de los aislamientos identificados como enterobacterias productoras de carbapenemasas.

4.6.1. Distribución de las cepas portadoras de carbapenemasa

Durante el periodo de estudio se vigiló la epidemiología de las enterobacterias portadoras de carbapenemasas y su distribución durante este tiempo. De las 9 cepas detectadas, el 33,33% (3/9) fueron recogidas en 2012, el 33,33% (3/9) fueron recogidas en 2013 y el 33,33% restante (3/9) fueron recogidas en 2014.

Según su procedencia, en 2 de los casos los pacientes eran de origen ambulatorio (22,22%) y 7 de origen hospitalario (77,78%), ingresados en servicios médicos (42,86%) y UCI (57,14%).

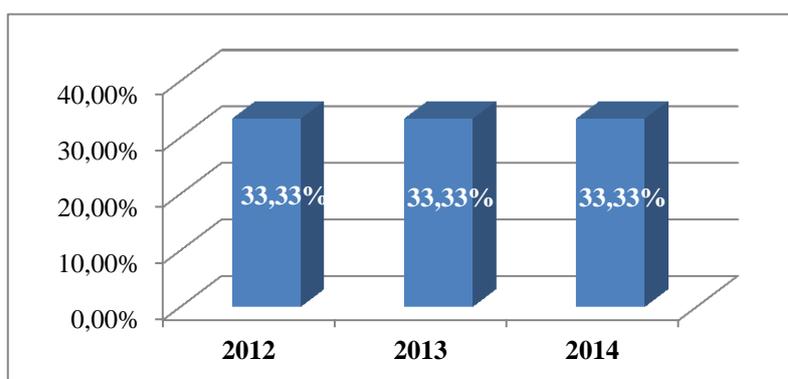


Figura 29.- Distribución por años de las enterobacterias productoras de MBL

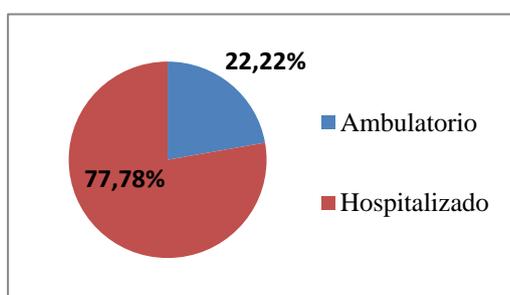


Figura 30.- Distribución según el origen de los aislados portadores de MBL

En cuanto a las muestras clínicas, las cepas portadoras de carbapenemasas se aíslan mayoritariamente de orinas (44,44%), seguidamente de hemocultivos (22,22%), frotis vaginal (11,11%), lesión de piel (11,11%) y catéter central (11,11%). Todas las enterobacterias productoras de carbapenemasas de origen ambulatorio se aislaron de muestra de orina.

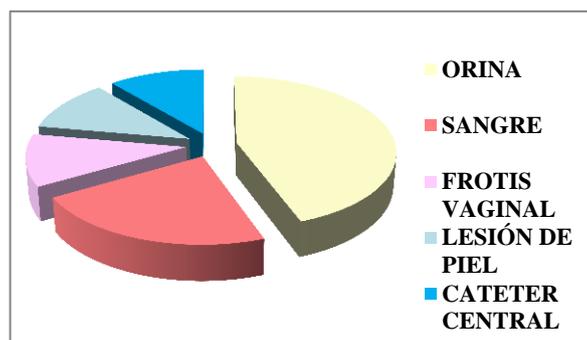


Figura 31.- Tipos de muestras clínicas de donde se obtuvieron las enterobacterias productoras de MBL

4.6.2. Presencia de otras β -lactamasas

Para analizar las β -lactamasas plasmídicas de los aislamientos productores de MBL se evaluó la presencia de BLEE. No se realizó la determinación de enzimas AmpC ya que las cepas en las que se ha detectado una carbapenemasa poseen cefamicinasa cromosómica.

De los 9 aislados con VIM, 2 (22,22%) resultaron ser positivas en la detección de BLEEs del grupo CTX-M-9. El resto de las cepas fueron negativas a todas las determinaciones.

4.6.3. Detección de integrones de clase 1, 2 y 3

Se estudiaron la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3 en las cepas productoras de carbapenemasas, detectando integrones de clase 1 en los 9 casos. Ninguna de ellas presentaba integrones de clase 2 o clase 3.

Mediante el análisis de la región variable del integrón de clase 1 se analizó la presencia del gen casete codificante de carbapenemasas. Todas las cepas productoras de metallo- β -lactamasas contenían el gen *bla_{VIM}* dentro de estos integrones.

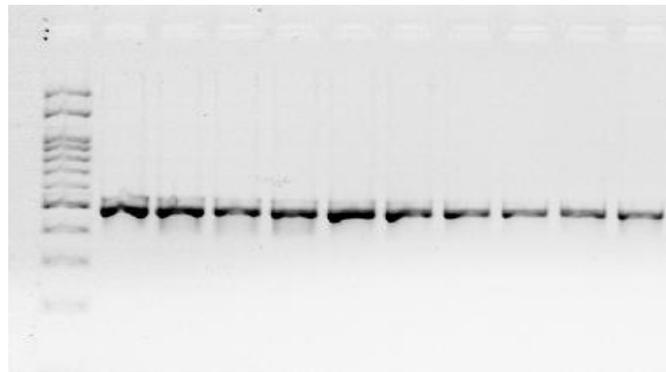


Figura 32.- PCR positiva para integrón de clase 1 (9 cepas y un control positivo). La banda aparece a 483 pb.

4.6.4. Detección de otros genes de resistencia a antibióticos no β -lactámicos

Una característica de las enterobacterias productoras de carbapenemasas es que los genes causantes de esta resistencia, al estar codificados en elementos genéticos móviles, suelen estar asociados con otros genes responsables de la resistencia a otras familias de antibióticos.

Debido a los patrones de sensibilidad de las diferentes enterobacterias productoras de carbapenemasas y a que los genes codificantes *bla_{VIM}* se encontraban dentro de integrones, se decidió estudiar los mecanismos de resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos, prestando especial atención a aminoglucósidos y quinolonas.

La resistencia de estas cepas productoras de MBL tipo VIM a antibióticos no β -lactámicos es elevada. Los aislados mostraron resistencia a ciprofloxacino (66,67%), gentamicina (77,78%), tobramicina (77,78%), amikacina (44,44%) y cotrimoxazol (55,56%).

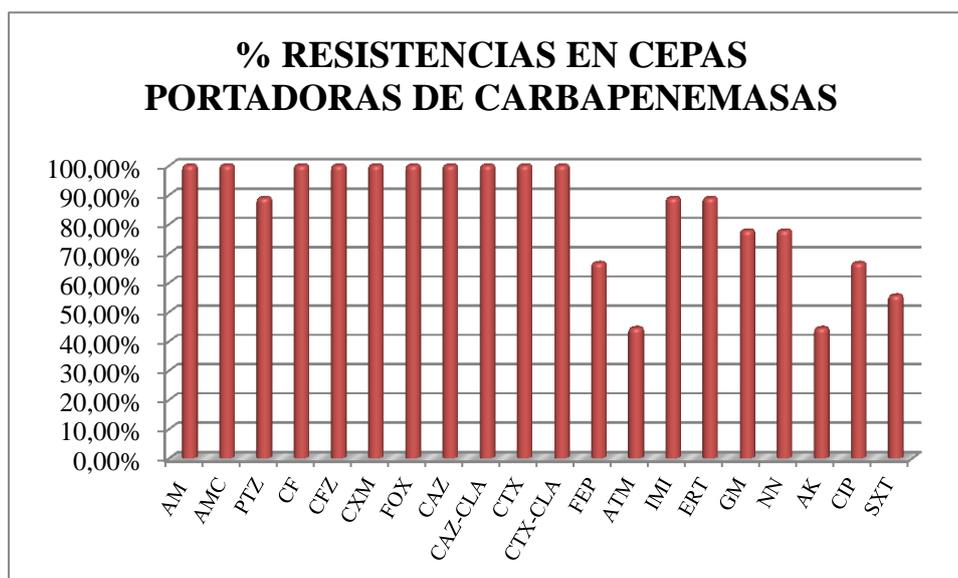


Figura 33.- Representación gráfica del porcentaje de resistencias a diferentes antibióticos en las enterobacterias productoras de carbapenemasas

Si analizamos la resistencia a no β -lactámicos del resto de enterobacterias de las mismas especies aisladas en el mismo período, podemos observar que los porcentajes de resistencia a estos antibióticos es mayor en el caso de las cepas portadoras de enzimas VIM que en el resto de las enterobacterias (Tabla 19). Es importante destacar que no se encontró ningún *Citrobacter freundii* productor de carbapenemasa resistente a amikacina ni a cotrimoxazol, a pesar que en las cepas no portadoras de carbapenemasa se encuentran unos bajos porcentajes de resistencia.

	Ciprofloxacino	Gentamicina	Tobramicina	Amikacina	Cotrimoxazol
<i>E. aerogenes</i> VIM	60 %	80 %	80 %	80 %	100%
<i>E. aerogenes</i>	12,30%	7,49%	10,70%	3,74%	9,63%
<i>C. freundii</i> VIM	75%	75%	75%	0 %	0%
<i>C. freundii</i>	13,18%	8,14%	9,69%	1,94%	8,53%

Tabla 18.- Comparación de porcentaje de no sensibilidad en cepas portadoras y cepas no portadoras de VIM

Para estudiar la resistencia a quinolonas, se determinó la presencia de diferentes genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *qepA*). Se obtuvo un resultado positivo en el 44,44% de los aislamientos (4/9) en la detección del gen *qnrA*, y en un 33,33% (3/9) en el gen *qnrB*. Ninguna cepa mostró un resultado positivo frente a los genes *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *qepA*.

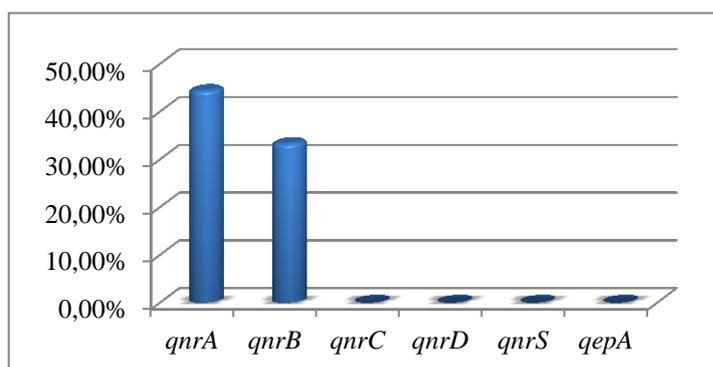


Figura 34.- Representación gráfica de la detección molecular de genes de resistencia a quinolonas

En el caso de la resistencia a aminoglucósidos, se analizaron empleando métodos moleculares los genes codificantes de acetilasa *aac(6')Ib* y de adenilasa *aadA1* y *aadA5*. Todos los aislamientos productores de metallo- β -lactamasa fueron positivos en la determinación del gen *aac(6')Ib*, y un 88,89% (8/9) en el caso de *aadA1*. No se encontró ningún aislado con el gen *aadA5*.

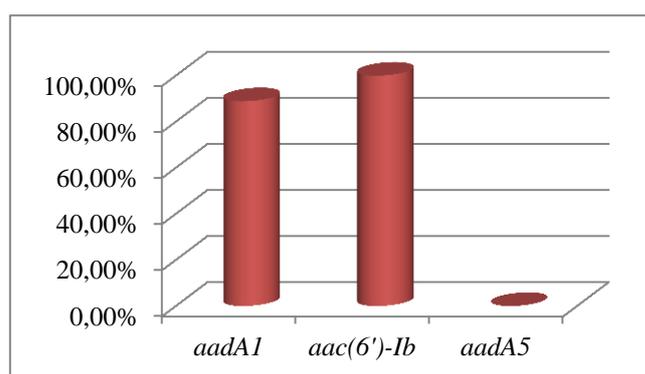


Figura 35.- Representación gráfica de la detección molecular de genes de resistencia a aminoglucósidos

En el 100% de los aislamientos se observa una asociación de la resistencia a carbapenems (cepas portadoras de MBL tipo VIM) con genes de resistencia a aminoglucósidos, y en el 77,78% (7/9) hay asociación con genes de resistencia a quinolonas y, por tanto, el 77,78% de las cepas son portadoras de genes de resistencia a carbapenems, aminoglucósidos y quinolonas.

CEPA	Especie	Carbapenemasa	CTX-M-9	acc(6')-Ib'	aadA1	qnrA	qnrB
1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+	+		
2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+	+		+
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+	+		+
4	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+			
5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>bla_{VIM}</i>	+	+	+	+	
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>bla_{VIM}</i>	+	+	+	+	
7	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+	+	+	
8	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+	+	+	
9	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla_{VIM}</i>		+	+		+

Tabla 19.- Cepas productoras de MBL con los genes asociados de resistencia a antibióticos no β -lactámicos

5. DISCUSIÓN

5.1. Epidemiología de las carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*

Desde el año 2000, se ha observado una propagación mundial de diferentes aislados de enterobacterias productoras de β -lactamasas de amplio espectro (BLEE), las cuales hidrolizan todas las cefalosporinas, pero no carbapenems (Pitout & Laupland, 2008). Hoy en día, las bacterias productoras de BLEE se han expandido globalmente a través de elementos genéticos móviles y asociadas a otros genes de resistencia a antibióticos, haciendo que la erradicación de estas enzimas sea difícil.

Los carbapenémicos son antimicrobianos que se suelen usar como última línea de tratamiento en infecciones multirresistentes en bacilos gramnegativos. Por tanto, en las infecciones producidas por las enterobacterias productoras de BLEE se convirtieron en el tratamiento de elección, originando un importante aumento en el uso de carbapenems. Sin embargo, esto ha desencadenado una reciente aparición en los últimos años de bacilos no fermentadores (*Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) y fermentadores (enterobacterias) resistentes a carbapenems. Este hecho ha reflejado una creciente preocupación en todo el mundo sobre el cuidado de la salud, debido a la asociación de la resistencia a β -lactámicos y otras clases de antibióticos (aminoglucósidos, quinolonas, cotrimoxazol...), lo que reduce la posibilidad de tratamiento de las cepas multirresistentes.

Las principales carbapenemasas descritas a nivel mundial en enterobacterias pertenecen a los tipos KPC, VIM, NDM, IMP y OXA-48 (Oteo et al., 2014). La situación en Europa varía desde países como Grecia, Turquía e Italia, donde encontramos una alta prevalencia, a los países nórdicos donde es más baja. En países como Islandia, Montenegro y la República Yugoslava de Macedonia no se ha registrado ningún caso de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Glasner et al., 2013) (Figura 36).

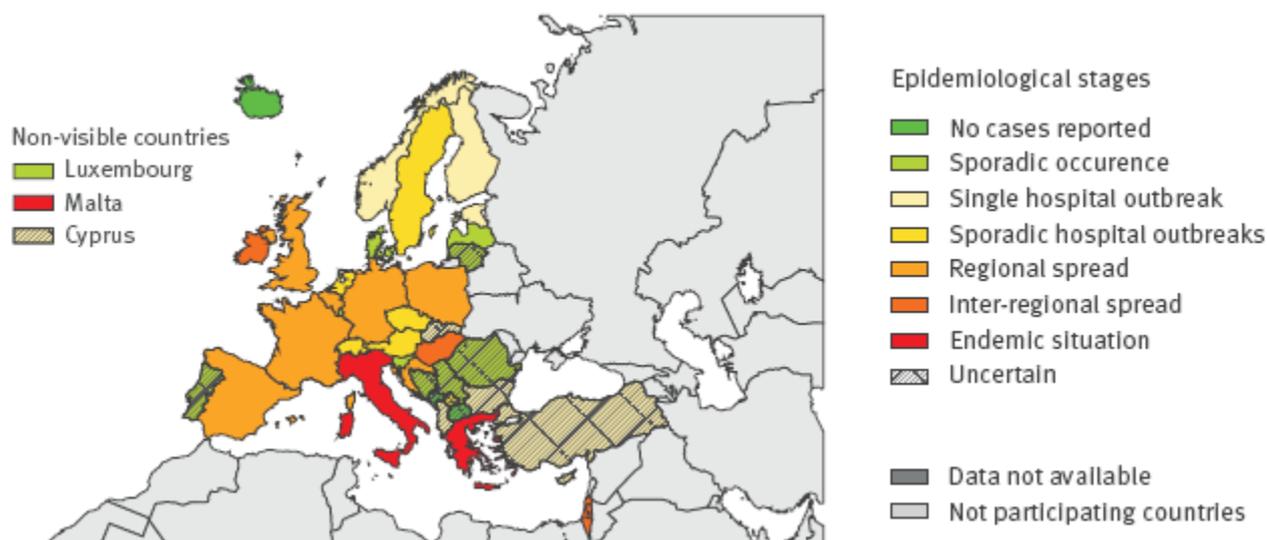


Figura 36.- Situación europea de enterobacterias productoras de carbapenemasas, tomada de Glasner et al., 2013

En un estudio realizado a nivel europeo en 2013 sobre la epidemiología de carbapenemasas en enterobacterias se observó que en la mayoría de los hospitales de Italia, Grecia y Malta se aislaban repetidamente casos autóctonos, considerándose así estos países como una situación endémica (Glasner et al., 2013). En la mayor parte de los países europeos, *Klebsiella pneumoniae* es la enterobacteria más frecuentemente aislada como productora de carbapenemasas.

A pesar de los diferentes tipos de carbapenemasas de clase A que existen (KPC, GES, NMC-A, IMI, SME, SFC y BIC), solo dos de ellas, KPC y GES, se han convertido en un importante problema epidemiológico. Estas enzimas se han descrito en varios plásmidos, clones y especies de enterobacterias. Se han encontrado 22 subtipos de carbapenemasas KPC, siendo KPC-2 y KPC-3 las más frecuentemente aisladas en enterobacterias, principalmente en *K. pneumoniae*. En Europa, el primer caso de una cepa productora de KPC fue en 2008 en Grecia (Tsakris et al., 2008), donde desde entonces se ha convertido en un problema endémico.

Las carbapenemasas de clase B o MBL más extendidas son IMP, VIM y, últimamente, NDM. Los productores de enzimas tipo VIM se han encontrado prácticamente en todo el mundo, sobre todo en el área mediterránea. Las más descritas son VIM-1 en enterobacterias y VIM-2 en *Pseudomonas aeruginosa* (Oteo et al., 2014).

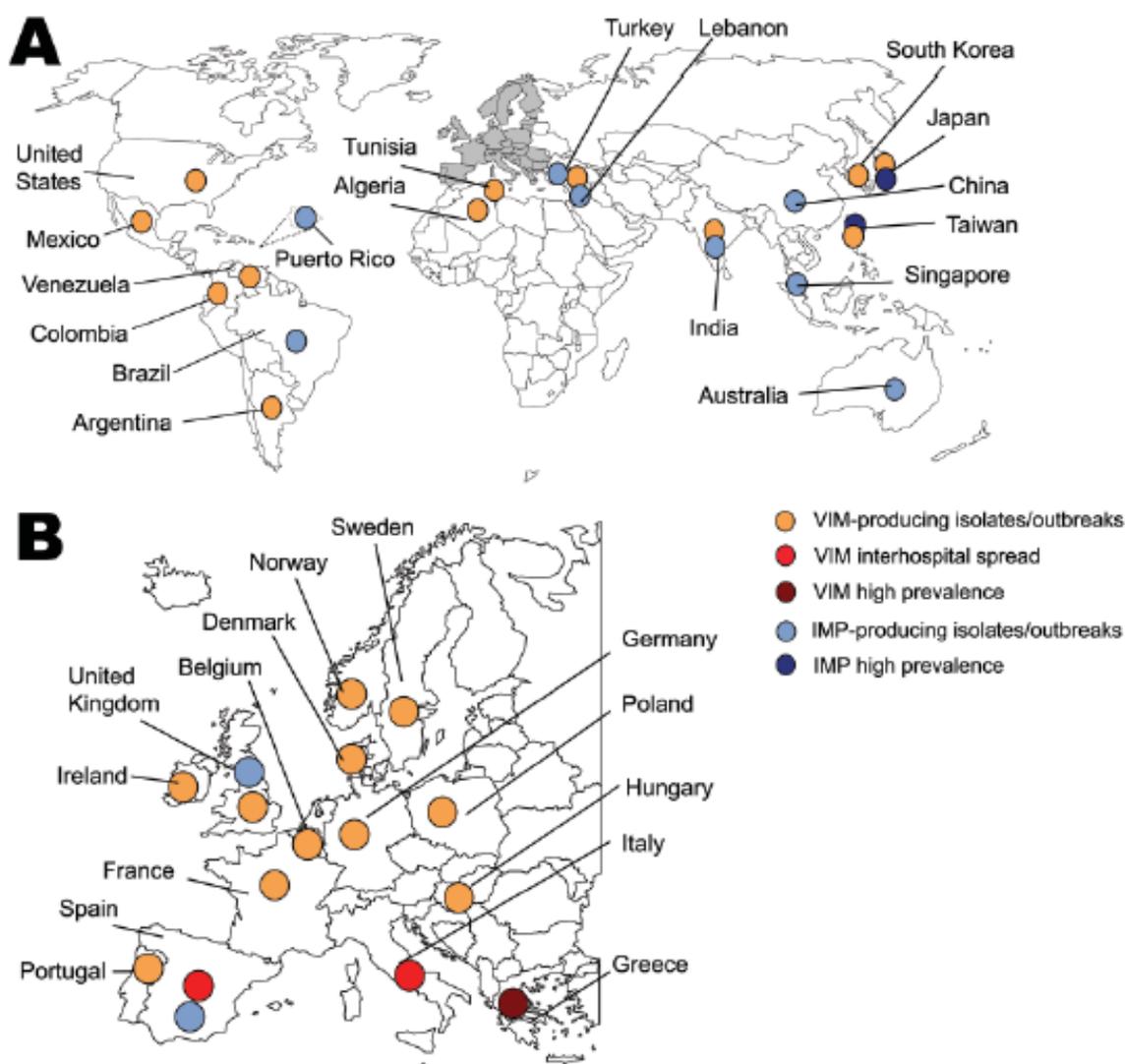


Figura 37.- Distribución geográfica a nivel mundial (A) y en Europa (B) de las enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo IMP y VIM, tomado de Nordmann et al., 2011

Los tipos de carbapenemasas varían en función de los países, aunque generalmente las encontramos en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Canton et al., 2012). En la Figura 37 se puede observar la distribución geográfica a nivel mundial (A) y en Europa (B) de enterobacterias productoras de IMP y VIM.

En cuanto a las carbapenemasas de clase D, la distribución en enterobacterias prácticamente se reduce a OXA-48.

En España, los primeros casos detectados fueron correspondientes a unas cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* portadoras de VIM-1 obtenidas en un estudio realizado en Barcelona en 2003. Desde este primer descubrimiento, se han ido registrando casos esporádicos, hasta que en los últimos años se ha producido un importante cambio epidemiológico caracterizado por un aumento de las enterobacterias productoras de carbapenemasas.

La aparición de carbapenemasas tipo KPC en España fue detectada entre septiembre de 2009 y febrero de 2010. Se aislaron dos clones de *K. pneumoniae* en un hospital de Madrid con el gen *bla_{KPC-3}* (Curiao et al., 2010) y, al poco tiempo, en otro hospital, el gen *bla_{KPC-2}* en tres clones de *C. freundii*. (Gomez-Gil et al., 2010).

Sin embargo, el gran impacto epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas en España ha sido llevado a cabo por las cepas productoras de OXA-48. El primer brote fue debido a una cepa de *K. pneumoniae* productora de OXA-48 y CTX-M-15 en Barcelona (Pitart et al., 2011). Desde entonces se han descrito varios brotes en diferentes hospitales del país. En un estudio multicéntrico realizado en los hospitales de Cataluña se estimó que la prevalencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 era del 2,2%.

En 2009 se realizó un estudio multicéntrico llevado a cabo en 35 hospitales españoles, donde se detectaron 43 enterobacterias productoras de carbapenemasas (0.04%), siendo las más frecuentes VIM-1 y IMP-22 (Miro et al., 2013). Sin embargo, actualmente las cifras son más elevadas (Figura 38), y el mayor impacto es debido a cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 o VIM-1, siguiéndoles otras especies como *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*.

Geográficamente, las zonas de España donde se ha encontrado la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas son: Madrid, Barcelona, Guadalajara, Málaga, Alicante, Almería, Asturias, Ávila y Ciudad Real (Oteo et al., 2013). Ni en nuestro área sanitaria ni en nuestra Comunidad Autónoma (Aragón) hay descripciones en la literatura sobre enterobacterias productoras de carbapenemasas hasta 2012.

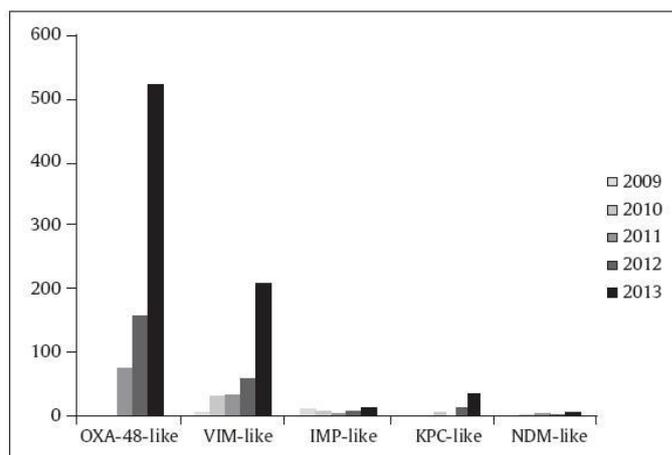


Figura 38.- Evolución de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España (Oteo et al., 2014)

En nuestro sector sanitario y durante el periodo de estudio, la prevalencia detectada de enterobacterias productoras de carbapenemasas ha sido del 0,024%, lo que es menor que en otras regiones españolas, siendo por especie del 2,67% (5/187) en *E. aerogenes* y del 1,55% (4/258) en *C. freundii*. No hemos encontrado ninguna otra enterobacteria productora de carbapenemasa, a pesar que en el resto de Europa la principal especie que se encuentra en pacientes es *K. pneumoniae* (Canton et al., 2012).

Mientras que en el resto de España ha habido un alarmante incremento de carbapenemasas principalmente debido a diferentes clones de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48, en nuestra región no ha sido detectada ninguna enterobacteria productora de este tipo de enzima. Sin embargo, en un estudio multicéntrico realizado en 2013 se ha descrito una mayor distribución geográfica de aislados productores de VIM, siendo esta enzima detectada en 16 de las provincias participantes en el estudio frente a 10 provincias en el caso de OXA-48 (Oteo et al., 2015). Por tanto, aunque el número de enterobacterias productoras de OXA-48 sea mayor que el de VIM, éstas se encuentran localizadas en

menos regiones españolas (principalmente en la Comunidad de Madrid, Guadalajara y Málaga), lo que está acorde con los resultados de nuestro estudio ya que solo hemos detectado cepas productoras de VIM.

Estos genes de resistencia suelen estar presentes dentro de integrones de clase 1, 2 y 3. Algunos autores describen la localización de β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas en integrones, a su vez localizados en plásmidos o transposones, asociados también a otros genes de resistencia en el género *Pseudomonas*. La mayoría de carbapenemasas descritas en *Pseudomonas* han sido detectadas siempre en el seno de integrones, principalmente de clase 1, aunque también de clase 3 (Juan Nicolau & Oliver, 2010). Walsh et al. señalan que en el caso de genes codificantes de carbapenemasas de clase B como VIM, IMP y GIM-1 se encuentran incluidos en forma de casetes dentro de integrones de clase 1 (Walsh et al., 2005). Otros autores inciden en la presencia de los genes codificantes de MBL dentro de integrones de clase 1, tanto en enterobacterias como en gramnegativos no fermentadores, cuya adquisición favorece la transferencia horizontal entre bacterias, ya que estos integrones se encuentran dentro de elementos móviles como plásmidos o transposones (Zhao & Hu, 2015). En todos los aislamientos con carbapenemasas estudiados en este trabajo se detectaron integrones de clase 1. La presencia de las carbapenemasas VIM detectadas dentro de estos integrones sugiere la necesidad de poner en marcha medidas de vigilancia para evitar la propagación de estas cepas ya que la presencia de estos genes de resistencia en elementos genéticos móviles favorece su diseminación.

Sin embargo, la resistencia de enterobacterias a carbapenems no siempre es debida a la acción de una enzima carbapenemasa. En diferentes artículos encontramos descrita que la pérdida de la sensibilidad a estos antibióticos puede ser debida a una disminución de la permeabilidad de la membrana, por pérdida de porinas o bombas de expulsión, junto a la acción de otras β -lactamasas, tanto tipo AmpC como BLEE (Livermore & Woodford, 2006; Suárez et al., 2006).

En nuestro estudio, en el 80,85% de las cepas seleccionadas no encontramos ninguna carbapenemasa, y en el 55,32% de los aislados ningún fenotipo característico de un mecanismo de resistencia adicional. Esto nos lleva a pensar que en nuestro entorno, la sensibilidad disminuida a carbapenems no está debida a carbapenemasas si no a una

asociación de β -lactamasas (tanto cromosómica como adquirida) junto a otra característica bacteriana que disminuya su permeabilidad.

5.2. Evaluación de los métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas

La detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas a través de métodos fenotípicos no es fácil, ya que muchas veces encontramos los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) a carbapenems dentro de los rangos de sensibilidad (Tzouvelekis, Markogiannakis, Psychogiou, Tassios, & Daikos, 2012). En este estudio, se han encontrado dos cepas productoras de carbapenemasas (22,22%) con CIM a imipenem correspondientes al rango de sensibilidad y 4 (44,44%) al rango intermedio. Las CIM a ertapenem estaban dentro del rango de resistencia excepto en un caso que era intermedio (11,11%).

Se han descrito varios test fenotípicos para identificar una actividad carbapenemasa. El test modificado de Hodge es el único método recomendado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009), a pesar de que carece de especificidad (en cepas productoras de AmpC de alto nivel) y sensibilidad (baja detección en productores de NDM) (Castanheira et al., 2011) (Miriagou et al., 2010). En nuestro estudio se han encontrado unos resultados similares, ya que 26 enterobacterias resultaron tener un falso positivo en el test modificado de Hodge, siendo todas productoras de AmpC sin carbapenemasa (24 con AmpC cromosómica y 2 AmpC plasmídica). Al realizar el test con cloxacilina para inhibir la AmpC, una cepa no productora de carbapenemasa siguió dando un resultado positivo a este test. Posteriormente, se vio que esta cepa era productora de una cefamicinasa plasmídica CMY-2 y una β -lactamasa tipo TEM.

En cuanto a los test de sinergia de doble disco, la inhibición por ácido borónico para la detección de carbapenemasas de clase A tiene unos resultados con una alta sensibilidad, pero baja especificidad en los aislados con una alta expresión de AmpC (Bou, Vila, Seral, & Javier Castillo, 2014). Si observamos los resultados obtenidos en

este estudio, el test de sinergia con ácido borónico dio falsos positivos en 10 cepas: 6 con AmpC cromosómica (5 *E. cloacae* y 1 *E. aerogenes*), 3 AmpC plasmídica (3 *E. coli*) y 1 productora de 3 tipos de β -lactamasas (*K. pneumoniae* portadora de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M-9}*). Al realizar este test con cloxacilina se obtuvieron resultados positivos en 4 cepas (3 con AmpC cromosómica (2 *E. cloacae* y 1 *E. aerogenes*) y 1 AmpC plasmídica (*E. coli*)), por lo que en estos casos la concentración de 50 mg/ml no fue suficiente para inhibir la expresión de AmpC.

Las infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas son un problema emergente a nivel mundial y produce serias consecuencias, sobre todo en pacientes de UCI (Nordmann et al., 2011). Para evaluar la colonización de los pacientes por estas enterobacterias es importante el empleo de un medio de cultivo que nos detecte este tipo de cepas directamente desde la muestra clínica. Por eso, los medios cromogénicos empleados para su detección son de gran importancia ya que nos permite obtener resultados en 24 horas. Hoy en día existen diferentes medios cromogénicos en el mercado, pero los medios SUPERCARBA o Brilliance CRE Agar, en combinación con ChromID CARBA/chromID OXA-48, y el medio chromID CARBA SMART son los que ofrecen una mayor sensibilidad para detectar todos los tipos de carbapenemasas (Girlich, Poirel, & Nordmann, 2013).

El medio cromogénico Brilliance CRE Agar ofrece unos buenos resultados en la detección de carbapenemasas en enterobacterias y gramnegativos no fermentadores resistentes a carbapenems (Bracco et al., 2013), pero su principal problema es que no detecta productores de OXA-48 (d'Humieres et al., 2012). Además, en otra evaluación del medio realizada en 2013 estiman una sensibilidad del 94%, pero una baja especificidad (71%) dando falsos positivos en productores de AmpC y β -lactamasas de espectro extendido (Cohen Stuart et al., 2013). Nosotros hemos obtenido unos resultados muy similares en este estudio, ya que el medio nos ha ofrecido una sensibilidad del 100% pero una especificidad del 71,79%, debido que el 20% (4/20) de las cepas crecidas sin carbapenemasa producían AmpC cromosómica, el 15% (3/20) AmpC plasmídica y β -lactamasas tipo TEM, el 10% (2/20) otras β -lactamasas (una cepa tipo SHV y CTX-M-9 y la otra tipos TEM, SHV y CTX-M-3G) y el 10% restante (2/20) AmpC cromosómica y β -lactamasas tipo CTX-M-9.

El test de Hodge con cloxacilina demostró ser el método fenotípico más sensible (100%) y específico (97,4%) para la detección de carbapenemasas. En el caso de la detección de carbapenemasas de clase B mediante métodos fenotípicos, los mejores resultados se obtuvieron con el test de sinergia con EDTA, en el cual se logró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97,4% (solo se encontró un falso positivo). Al realizar este test con cloxacilina, se consiguió inhibir el efecto de la AmpC cromosómica correspondiente al aislado de *E. cloacae* con resultado falso positivo en el test de sinergia con EDTA, por lo que su especificidad aumentó al 100%.

5.3. Resistencia a otros antimicrobianos

Las cepas productoras de carbapenemasas suelen presentar corresistencias a otros antimicrobianos no β -lactámicos, debido a la inclusión de estos genes de resistencia en plataformas genéticas móviles como integrones y plásmidos, lo que favorece su diseminación. Es habitual la existencia de casos de extensa resistencia o panresistencia (Magiorakos et al., 2012), lo que limita enormemente las opciones terapéuticas, siendo los fármacos de elección colistina, aztreonam, aminoglucósidos (principalmente amikacina), tigeciclina y, de manera menos frecuente, quinolonas (sobre todo ciprofloxacino) y cotrimoxazol (Rodríguez-Bano, Cisneros, Gudiol, & Martínez, 2014).

En nuestro estudio, la resistencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas a antibióticos no β -lactámicos es elevada. Se observaron resistencias a diferentes antimicrobianos de la familia de aminoglucósidos (gentamicina 77,78%, tobramicina 77,78% y amikacina 44,44%) y quinolonas (ciprofloxacino 66,67%), así como de cotrimoxazol (55,56%). Cuatro de los aislamientos fueron resistentes a toda la familia de aminoglucósidos.

Además, el 22,22 % de estas cepas eran co-productoras de β -lactamasas de amplio espectro (BLEE). No se encontró ningún aislamiento resistente a tigeciclina ni colistina.

En un estudio llevado a cabo por Oteo *et al.* durante 2013 en España, se detectó la asociación de enterobacterias productoras de carbapenemasas y BLEE en el 70,4% de los

aislados, siendo más frecuente en las cepas productoras de OXA-48. A su vez, los porcentajes de resistencia a gentamicina (66,8%) y amikacina (18,7%) fueron inferiores a los resultados obtenidos en nuestro estudio, frente a los de tobramicina (83,6%), ciprofloxacino (87,3%) y cotrimoxazol (83,9%) que fueron superiores ((Oteo et al., 2015).

Al comparar la resistencia a no β -lactámicos en las cepas portadoras y no portadoras de VIM de las especies *E. aerogenes* y *C. freundii* en nuestro sector sanitario durante el periodo de estudio, observamos que los porcentajes de resistencia en el caso de las cepas portadoras de MBL es superior que en el resto de los aislados, aunque el número de aislados es pequeño para poder indicar si las diferencias son significativas estadísticamente.

5.4. Limitaciones del estudio

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

6. CONCLUSIONES

1. Con los datos obtenidos, podemos observar que el porcentaje de enterobacterias productoras de carbapenemasas en nuestro sector (0,024%) es menor que en otras regiones, tanto españolas como europeas. Aunque esta resistencia es poco frecuente en nuestro entorno, es necesario adoptar medidas de vigilancia activa para evitar su propagación debido al problema emergente de estas cepas en el resto de comunidades autónomas.
2. Se han encontrado solo genes codificantes de carbapenemasas tipo VIM y en las especies: *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*.
3. La sensibilidad disminuida a carbapenems en enterobacterias no siempre es debido a una producción de carbapenemasas. Seguramente, la causa mayoritaria en nuestro entorno para desarrollar resistencia sea la combinación de distintos mecanismos, como la producción de β -lactamasas y una pérdida de porinas.
4. Tras la comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas, podemos afirmar que el test de Hodge realizado con cloxacilina es el método más sensible y específico. La realización del test de sinergia con EDTA con cloxacilina aporta una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de carbapenemasas de clase B.
5. La localización del gen *bla_{VIM}* en integrones de clase 1 y la vinculación a genes de resistencia a otras familias de antibióticos (aminoglucósidos y quinolonas) favorece la selección y diseminación de estas cepas multirresistentes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
- Asthana, S., Mathur, P., & Tak, V. (2014). Detection of carbapenemase production in gram-negative bacteria. *Journal of Laboratory Physicians*, 6(2), 69-75.
- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E. J., Clifton-Hadley, F. A., Stallwood, A. D., Davies, R. H., & Liebana, E. (2005). Bla(CTX-M) genes in clinical salmonella isolates recovered from humans in england and wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1319-1322.
- Bou, G., Vila, J., Seral, C., & Javier Castillo, F. (2014). Detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32 Suppl 4, 24-32.
- Bracco, S., Migliavacca, R., Pini, B., Corbo, N., Nucleo, E., Brigante, G., . . . Luzzaro, F. (2013). Evaluation of brilliance CRE agar for the detection of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *The New Microbiologica*, 36(2), 181-186.
- Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C., & Rolinson, G. N. (1976). Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*, 29(6), 668-669.
- Bush, K. (1988). Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 109-123.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Canton, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., . . . European Network on Carbapenemases. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among enterobacteriaceae in europe. *Clinical Microbiology and*

Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18(5), 413-431.

Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4), 243-259.

Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227-2238.

Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mathai, D., Bell, J. M., Jones, R. N., & Mendes, R. E. (2011). Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing enterobacteriaceae in indian hospitals: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006-2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 1274-1278.

Cattoir, V., Weill, F. X., Poirel, L., Fabre, L., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Prevalence of qnr genes in salmonella in france. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 751-754.

Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in salmonella enterica serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 603-608.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. nineteen informational supplement CLSI document M 100-S19.

Cohen Stuart, J., Voets, G., Rottier, W., Voskuil, S., Scharringa, J., Van Dijk, K., . . . Leverstein-Van Hall, M. (2013). Evaluation of the oxoid brilliance CRE agar for the detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(11), 1445-1449.

Coque, T. M., Oliver, A., Perez-Diaz, J. C., Baquero, F., & Canton, R. (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are

- carried by multiple klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 500-510.
- Curiao, T., Morosini, M. I., Ruiz-Garbajosa, P., Robustillo, A., Baquero, F., Coque, T. M., & Canton, R. (2010). Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 klebsiella pneumoniae clones in spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1608-1614.
- d'Humieres, C., Birgy, A., Doit, C., Bidet, P., Arlet, G., & Bingen, E. (2012). Use of a new screening medium to detect carbapenem-non-susceptible members of the enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 6), 878-880.
- Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 321-322.
- Falagas, M. E., Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., & Vardakas, K. Z. (2014). Deaths attributable to carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1170-1175.
- Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(4), 272-288.
- Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. (2013). Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and brilliance CRE screening media for detection of enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2), 214-217.
- Glasner, C., Albiger, B., Buist, G., Tambic Andrasevic, A., Canton, R., Carmeli, Y., . . . European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. (2013). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in europe: A survey among national experts from 39 countries, february 2013. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 18(28), 20525.

- Gomez-Gil, M. R., Pano-Pardo, J. R., Romero-Gomez, M. P., Gasior, M., Lorenzo, M., Quiles, I., & Mingorance, J. (2010). Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2695-2697.
- Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (11th ed.) McGraw-Hill Interamericana.
- Hong, S. S., Kim, K., Huh, J. Y., Jung, B., Kang, M. S., & Hong, S. G. (2012). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Annals of Laboratory Medicine*, 32(5), 359-361.
- Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N., & Ohta, M. (1995). Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(4), 824-829.
- Juan Nicolau, C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. [Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 Suppl 1, 19-28.
- Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., . . . Birnbaum, J. (1979). Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of Antibiotics*, 32(1), 1-12.
- Kim, H. B., Park, C. H., Kim, C. J., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 639-645.
- Lévesque, C. & Roy, P.H. (1993). PCR analysis of integrons. In D.H. Persing et al (Ed.), *Diagnostic molecular microbiology* (1^a ed., pp. 590-594). Washington, American Society for Microbiology

- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, *10*(12 Suppl), S122-9.
- Livermore, D. M., & Woodford, N. (2006). The beta-lactamase threat in enterobacteriaceae, pseudomonas and acinetobacter. *Trends in Microbiology*, *14*(9), 413-420.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock biología de los microorganismos* (12th ed.). Madrid (España): Pearson.
- Madsen, L., Aarestrup, F. M., & Olsen, J. E. (2000). Characterisation of streptomycin resistance determinants in danish isolates of salmonella typhimurium. *Veterinary Microbiology*, *75*(1), 73-82.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *18*(3), 268-281.
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of staphylococcus aureus. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *67*(18), 3057-3071.
- Martinez, M. J., Garcia, M. I., Sanchez, E. G., & Sanchez, J. E. (2010). Available carbapenems: Properties and differences. [Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28 Suppl 2*, 53-64.
- Martinez-Martinez, L., & Calvo, J. (2010). Development of resistances to antibiotic drugs: Causes, consequences and importance to the public health system. [Desarrollo de las resistencias a los antibioticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud publica] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28 Suppl 4*, 4-9.
- Martinez-Martinez, L., & Gonzalez-Lopez, J. J. (2014). Carbapenemases in enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32 Suppl 4*, 4-9.

- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., & Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1568-1574.
- Meini, M. R., Llarrull, L. I., & Vila, A. J. (2014). Evolution of metallo-beta-lactamases: Trends revealed by natural diversity and evolution. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 3(3), 285-316.
- Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. G., Gniadkowski, M., . . . Canton, R. (2010). Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: Detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 112-122.
- Miro, E., Agüero, J., Larrosa, M. N., Fernández, A., Conejo, M. C., Bou, G., . . . Navarro, F. (2013). Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(2), 253-259.
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791-1798.
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(6), 321-331.
- Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by gram-negative bacteria? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 689-692.

- Oteo, J., Miro, E., Perez-Vazquez, M., & Navarro, F. (2014). Evolution of carbapenemase-producing enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32 Suppl 4*, 17-23.
- Oteo, J., Ortega, A., Bartolome, R., Bou, G., Conejo, C., Fernandez-Martinez, M., . . . Campos, J. (2015). Prospective multicenter study of carbapenemase-producing enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(6), 3406-3412.
- Oteo, J., Saez, D., Bautista, V., Fernandez-Romero, S., Hernandez-Molina, J. M., Perez-Vazquez, M., . . . Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Program. (2013). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(12), 6344-6347.
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M. M., Giacobone, E., Amicosante, G., . . . Rossolini, G. M. (2003). Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(9), 4264-4269.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(11), 4943-4960.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(11), 3953-3955.
- Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*, *362*(19), 1804-1813.
- Perez-Perez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(6), 2153-2162.

- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 1-11.
- Pitart, C., Sole, M., Roca, I., Fabrega, A., Vila, J., & Marco, F. (2011). First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in klebsiella pneumoniae in spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), 4398-4401.
- Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: An emerging public-health concern. *The Lancet.Infectious Diseases*, 8(3), 159-166.
- Pitout, J. D., Thomson, K. S., Hanson, N. D., Ehrhardt, A. F., Moland, E. S., & Sanders, C. C. (1998). Beta-lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in klebsiella pneumoniae, escherichia coli, and proteus mirabilis isolates recovered in south africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), 1350-1354.
- Poole, K. (2011). Pseudomonas aeruginosa: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2, 65.
- Robilotti, E., & Deresinski, S. (2014). Carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae. *F1000prime Reports*, 6, 80-80. eCollection 2014.
- Rodrigo, C. (2010). Use of antibiotics in the paediatric population. [Uso de los antimicrobianos en la poblacion pediátrica] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(5), 310-320.
- Rodriguez-Bano, J., Cisneros, J. M., Gudiol, C., & Martinez, J. A. (2014). Treatment of infections caused by carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32 Suppl 4, 49-55.
- Rossolini, G. M., Mantengoli, E., Docquier, J. D., Musmanno, R. A., & Coratza, G. (2007). Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *The New Microbiologica*, 30(3), 332-339.

- Rowe-Magnus, D. A., & Mazel, D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 292(2), 115-125.
- Sabate, M., & Prats, G. (2002). Structure and function of integrons. [Estructura y función de los integrones] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7), 341-345.
- Suárez, C., Kattán, J., Guzmán, A., & Villegas, M. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *acinetobacter* y *enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2), 85-93.
- Suarez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. [Antibióticos betalactámicos] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129.
- Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., Markou, F., Ikonomidis, A., & Pournaras, S. (2008). First occurrence of KPC-2-possessing klebsiella pneumoniae in a greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1257-1260.
- Tzouveleki, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in klebsiella pneumoniae and other enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682-707.
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 306-325.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., . . . Shen, X. (2008). Presence of qnr gene in escherichia coli and klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in china. *BMC Infectious Diseases*, 8, 68-2334-8-68.
- Wei, Q., Jiang, X., Yang, Z., Chen, N., Chen, X., Li, G., & Lu, Y. (2009). dfrA27, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from escherichia coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 405-406.

- Weill, F. X., Lailier, R., Praud, K., Kerouanton, A., Fabre, L., Brisabois, A., . . . Cloeckaert, A. (2004). Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of salmonella enterica serotype virchow in poultry and humans in france. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5767-5773.
- Yamachika, S., Sugihara, C., Kamai, Y., & Yamashita, M. (2013). Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in escherichia coli. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt 3), 429-436.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., & Arakawa, Y. (2008). Plasmid-mediated qepA gene among escherichia coli clinical isolates from japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1564-1566.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in klebsiella pneumoniae sequence type 14 from india. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046-5054.
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2015). Acquired metallo-beta-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in gram-negative bacteria. *Future Microbiology*, 10, 873-887.