



## **TESIS DOCTORAL**

**Beta-lactamasas de amplio espectro y resistencia a la colistina en enterobacterias aisladas de casos clínicos humanos en Extremadura**

**María Rosario Sánchez Benito**

Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal (R005)

**Conformidad del director y codirectores:**

**Dr. D. Alberto Quesada Molina,**

**Dr. D. Alejandro Gallardo Soler,**

**Dr. D. Eugenio Garduño Eseverri**

*"Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura."*

**2023**

*A mi padre, allá donde esté, porque de ti aprendí todo lo que soy ahora. A mi mamá, por su dedicación y su bello corazón. Y a mis hijos, Marta y Javier, el sol de mi vida, gracias por vuestro amor.*

## Agradecimientos

- A mi hermano, que aunque a veces sea un gruñón, siempre ha estado ahí cuando le he necesitado, sin quejas ni malas caras. ¡Muchas gracias hermano!
- Esta tesis la dedico, cómo no, a mis directores de tesis, por el trabajo y dedicación que han invertido en este proyecto, que también es su proyecto. Muchas gracias Alberto, muchas gracias Alex por la enorme paciencia que habéis tenido conmigo y por todo el apoyo recibido, tanto profesional como anímico sin lugar a dudas, sin ello este trabajo no hubiese llegado a término, pero todo vuestro ánimo me ha alentado a continuar. He tenido mucha suerte al trabajar con vosotros.
- Y por supuesto no olvidarme del personal de laboratorio, sobre todo la maravillosa Gloria Gutiérrez Montero, extraordinaria técnico y también persona, siempre con una sonrisa y ayudando a olvidar los problemas. Te estoy muy agradecida por todo lo que has ayudado en este trabajo, son muchas PCRs, a que sí. Te deseo lo mejor.
- A mis familiares y amigos, los que están y aquellos que partieron o siguieron otros caminos, pero todos y cada uno dejaron una huella.
- A mis compañero/as de trabajo del Servicio de Microbiología del Hospital San Pedro de Alcántara, algunas ya disfrutando su jubilación, porque cuando llegué me acogieron como una familia, hemos compartido tantas cosas ¿verdad? Cuántos recuerdos y estupendas historias, algunas no tanto, pero si compartimos la carga se hace menos pesada. He tenido el privilegio de conocer a gente maravillosa y grandes profesionales, y he intentado sacar todo lo bueno en mi afán de ser mejor profesional y persona. ¡Gracias a todos/as por estar ahí para mí!
- Y a todas aquellas personas que en algún momento de mi vida se cruzaron en mi camino y tuvimos la suerte de compartir tanto momentos buenos como otros no tanto.
- Mi agradecimiento a la Dirección de este hospital al proporcionarme el material y los datos necesarios para realizar esta tesis.
- Este trabajo se ha financiado gracias a los proyectos: “Un abordaje integral para valorar la eficacia de los antibióticos frente a las enterobacterias: monitorización de microorganismos centinela, búsqueda de alternativas en nutrición animal y estudio de nuevos mecanismos de resistencia” (Junta de Extremadura y FEDER, IB20181), “Reducción de la resistencia a los antimicrobianos en enterobacterias zoonóticas”. Ministerio de Ciencia e Innovación, AEI (PID2020-118405RB-I00), “Grupo de investigación Microbiología, Bioquímica y Química Orgánica: abordajes multidisciplinares” (Junta de Extremadura y FEDER, GR21115, CTS059).
- Por último, quiero agradecer la colaboración de los siguientes investigadores: D<sup>a</sup> María Gil Molino (Universidad de Extremadura), D<sup>a</sup> Marta Hernández Pérez (ITACYL) y D. Alfonso David Rodríguez Lázaro (Universidad de Burgos).

Según consta en el Registro de Actividades y Plan de Investigación del Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal (R005) de la Universidad de Extremadura, la Tesis que se presenta consta del siguiente Resumen y Objetivos.

## RESUMEN

La resistencia frente a los antimicrobianos supone una de las mayores amenazas para la salud pública mundial. La expresión de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), capaces de inactivar prácticamente todas las cefalosporinas, constituye uno de los mecanismos de resistencia más extendido y compromete severamente la efectividad de los tratamientos para detener las infecciones por bacterias Gram negativas. Además, en los últimos meses se ha descrito un gen plasmídico, *mcr-I*, que confiere resistencia a la colistina, conocida como la última barrera defensiva frente a los microorganismos multirresistentes. La situación podría hacerse crítica si se dispersan plásmidos conteniendo *mcr-I* y determinantes de resistencia como las BLEEs, elementos que ya han sido detectados en diferentes países. Este proyecto pretende evaluar la presencia de estos determinantes, incluyendo su posible asociación molecular y potencial de dispersión, entre los casos clínicos de enterobacteriosis diagnosticados durante el intervalo 2015-2018 en el Hospital S. Pedro de Alcántara, Cáceres (España).

## OBJETIVOS

El **objetivo general** de este proyecto es estudiar las características de las cepas productoras de BLEEs y la dispersión del gen *mcr-I* entre una colección de aislados clínicos de enterobacterias aisladas procedentes del Hospital S. Pedro de Alcántara (Cáceres, España). Los **objetivos específicos** de este estudio son los siguientes:

- a. Analizar los perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislados.
- b. Establecer la presencia de marcadores de resistencia para BLEEs entre las cepas seleccionadas.
- c. Caracterizar molecularmente las BLEEs identificadas entre las cepas de la colección.
- d. Analizar las características moleculares de los plásmidos en una selección de cepas productoras de BLEEs.
- e. Establecer la presencia del gen *mcr-I* entre las cepas seleccionadas.
- f. Analizar el genoma de cepas que expresen BLEEs y *mcr-I*.
- g. Analizar el potencial de movilización y de co-selección de las BLEEs y *mcr-I*.
- h. Evaluar las asociaciones existentes entre las características epidemiológicas de los casos clínicos dónde se aislen las cepas productoras de BLEEs y, en su caso, resistentes a la colistina y/o que presenten *mcr-I*.

# ÍNDICE

---

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>1.1 PANORAMA ACTUAL DE LAS RESISTENCIAS</b>	
<b>ANTIMICROBIANAS</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1 Impacto de las resistencias antimicrobianas</b>	<b>12</b>
<b>1.2 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1 <i>Escherichia coli</i></b>	<b>14</b>
<b>1.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>15</b>
<b>1.3 PARED CELULAR DE LAS ENTEROBACTERIAS</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1 Lipopolisacárido</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1.1 Estructura del lipopolisacárido</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1.2 Biosíntesis del lipopolisacárido</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1.3 Modificaciones del lipopolisacárido</b>	<b>18</b>
<b>1.4 ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1 Clasificación de los antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>19</b>
<b>1.4.2 Mecanismos de resistencia frente a los antibióticos</b>	
<b><math>\beta</math>-lactámicos: <math>\beta</math>-lactamasas</b>	<b>21</b>
<b>1.4.2.1 <math>\beta</math>-lactamasas de amplio espectro (ESBLs)</b>	<b>21</b>
<b>1.4.2.2 <math>\beta</math>-lactamasas AmpC o cefalosporinasas</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2.3 Carbapenemasas</b>	<b>24</b>
<b>1.5 COLISTINA</b>	<b>25</b>
<b>1.5.1. Estructura química de la colistina</b>	<b>25</b>
<b>1.5.2 Mecanismo de acción de las polimixinas</b>	<b>26</b>
<b>1.5.3 Mecanismos de resistencia a la colistina</b>	<b>27</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>2.1 EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>30</b>
<b>2.2 MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>30</b>
<b>2.3 CONSERVACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>30</b>

<b>2.3.1 Conservación en crioviales</b>	<b>30</b>
<b>2.3.2 Conservación en glicerol</b>	<b>31</b>
<b>2.4 DETECCIÓN Y ANÁLISIS INICIAL DE CEPAS RESISTENTES</b>	<b>31</b>
<b>2.4.1 Identificación y sensibilidad antimicrobiana</b>	<b>31</b>
2.4.1.1 <i>Cultivos de vigilancia</i>	31
2.4.1.2 <i>Sistema automático MicroScan</i>	32
2.4.1.3 <i>Espectrometría de masas MALDI-TOF</i>	32
2.4.1.4 <i>Tiras de gradiente de CMI</i>	33
2.4.1.5 <i>Dilución en agar</i>	34
2.4.1.6 <i>Determinación de la CMI a colistina mediante el método de microdilución en caldo</i>	34
<b>2.4.2 Caracterización de carbapenemasas mediante pruebas de detección rápida</b>	<b>35</b>
2.4.2.1 <i>Ensayo “NG-Test Carba 5”</i>	35
2.4.2.2 <i>PCR múltiple en tiempo real</i>	35
<b>2.5 CARACTERIZACIÓN PROFUNDA DE LAS CEPAS RESISTENTES: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>36</b>
<b>2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa.</b>	<b>36</b>
<b>2.5.2 Extracción y purificación de ácidos nucleicos</b>	<b>36</b>
2.5.2.1 <i>Aislamiento de DNA mediante el método de “boiling”</i>	36
2.5.2.2 <i>Aislamiento de DNA genómico</i>	37
2.5.2.3 <i>Extracción y purificación de RNA total</i>	37
2.5.2.3.1 <u>Tratamiento con DNasa I</u>	38
2.5.2.3.2 <u>Síntesis de cDNA</u>	38
<b>2.5.3 PCR (convencional)</b>	<b>38</b>
<b>2.5.4 PCR cuantitativa (qPCR)</b>	<b>40</b>
<b>2.5.5 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)</b>	<b>41</b>
2.5.5.1 <i>Preparación de los bloques de agarosa</i>	41
2.5.5.2 <i>Digestión del DNA</i>	42
2.5.5.3 <i>Electroforesis y tinción del PFGE</i>	42
<b>2.5.6 Transferencia horizontal de genes: Conjugación</b>	<b>43</b>
<b>2.5.7 Análisis de la modificación del lípido A mediante espectrometría de masas MALDI-TOF</b>	<b>44</b>

2.5.8 Secuenciación del genoma completo (WGS)	44
2.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	44
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>3.1 EPIDEMIOLOGÍA DE CEPAS RESISTENTES A <math>\beta</math>-LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO</b>	<b>47</b>
3.1.1 Incidencia de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> portadores de ESBLs, AmpC y carbapenemasas.	47
3.1.2 Relación entre la expresión de ESBLs y las características epidemiológicas de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> resistentes a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.	52
3.1.3 <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> resistente a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: resistencia a otros antimicrobianos.	55
<b>3.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE <i>E. coli</i> RESISTENTE A COLISTINA</b>	<b>57</b>
3.2.1 Cepas resistentes a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: origen de los aislados y fenotipos de sensibilidad frente a los antimicrobianos	57
3.2.2 Cepas sensibles a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: origen de los aislados	58
3.2.3 Identificación de los mecanismos de resistencia a la colistina	59
3.2.3.1 Detección de <i>mcr-1</i> y potencial de transmisión horizontal	59
3.2.3.2 Polimorfismo de <i>PmrAB</i>	61
3.2.3.3 Decoración del lípido A	63
3.2.4 Impacto de los determinantes de resistencia a la colistina sobre la expresión génica	64
3.2.5 Análisis genómico de los aislados resistentes a la colistina	64
3.2.5.1 Detección de genes de resistencia frente a los Antimicrobianos	65
3.2.5.2 Tipificación de las cepas: MLST e identificación de plásmidos	68
3.2.5.3 Agrupamiento filogenético de los aislados resistentes	

<i>a la colistina</i>	72
<b>3.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE</b>	
<b><i>K. pneumoniae</i> ESBL RESISTENTE A COLISTINA</b>	<b>74</b>
<b>3.3.1 Cepas resistentes a <math>\beta</math>-lactámicos de amplio espectro:</b>	
<b>origen de los aislados y fenotipos de sensibilidad frente</b>	
<b>a los antimicrobianos</b>	<b>74</b>
<b>3.3.2 Identificación de mecanismos de resistencia a colistina</b>	<b>76</b>
3.3.2.1 <i>Identificación de polimorfismos génicos potencialmente</i>	
<i>implicados en la resistencia a colistina</i>	<b>76</b>
3.3.2.2 <i>Impacto de los determinantes de resistencia a colistina</i>	
<i>sobre la expresión génica</i>	<b>78</b>
3.3.2.3 <i>Decoración del lipido A</i>	<b>79</b>
<b>3.3.3 Análisis genómico de los aislados resistentes a la colistina</b>	<b>85</b>
3.3.3.1 <i>Detección de genes de resistencia frente a los antimicrobianos</i>	<b>85</b>
3.3.3.2 <i>Tipificación de las cepas: MLST e identificación de plásmidos</i>	<b>86</b>
3.3.3.3 <i>Agrupamiento filogenético de los aislados resistentes a colistina</i>	<b>89</b>
<b>3.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UN BROTE</b>	
<b>DE <i>K. pneumoniae</i> ST307 <i>bla</i><sub>KPC-3</sub></b>	<b>92</b>
<b>3.4.1 Epidemiología y fenotipo de resistencia de <i>K. pneumoniae</i></b>	
<b>ST307 <i>bla</i><sub>KPC-3</sub></b>	<b>92</b>
<b>3.4.2 Susceptibilidad antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> ST307</b>	
<b><i>bla</i><sub>KPC-3</sub></b>	<b>95</b>
<b>3.4.3 Caracterización genotípica de <i>K. Pneumoniae</i></b>	
<b>ST307 <i>bla</i><sub>KPC-3</sub></b>	<b>95</b>
3.4.3.1 <i>MLST y relación clonal de las cepas analizadas</i>	<b>95</b>
3.4.3.2 <i>Análisis genómico del brote <i>K. pneumoniae</i> ST307 <i>bla</i><sub>KPC-3</sub></i>	<b>97</b>
3.4.3.3 <i>Resistoma del brote <i>K. pneumoniae</i> ST307 <i>bla</i><sub>KPC-3</sub></i>	<b>99</b>
3.4.3.4 <i>Plásmidos característicos del brote <i>K. Pneumoniae</i></i>	
<i>ST307 <i>bla</i><sub>KPC-3</sub></i>	<b>100</b>



<b>4 DISCUSION</b>	<b>104</b>
<b>4.1 EPIDEMIOLOGIA DE CEPAS RESISTENTES A β-LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO</b>	<b>105</b>
<b>4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE <i>E. coli</i> RESISTENTE A COLISTINA</b>	<b>108</b>
<b>4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE <i>K. pneumoniae</i> RESISTENTE A COLISTINA Y β-LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO</b>	<b>113</b>
<b>4.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UN BROTE DE <i>K. pneumoniae bla<sub>KPC-3</sub></i></b>	<b>117</b>
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>124</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1 PANORAMA ACTUAL DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

*“Existe el peligro de que un hombre ignorante pueda fácilmente aplicarse una dosis insuficiente de antibiótico, y, al exponer a los microbios a una cantidad no letal del medicamento, los haga resistentes”.*

En 1928, Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico, la penicilina, uno de los hallazgos más extraordinarios del siglo XX. Años después, en 1945, ya predijo la posibilidad de que pudieran producirse resistencias originadas por el mal uso de los antibióticos. Desde entonces, las bacterias han sabido adaptarse para sobrevivir a la era antibiótica. Esta capacidad de adaptación se produce mediante mutaciones o adquiriendo nuevos genes de resistencia por transferencia horizontal, ubicados en elementos genéticos móviles, fundamentalmente plásmidos (Rodríguez-Martínez et al., 2016). Existen varios factores que han provocado el aumento y diseminación de las bacterias multirresistentes, destacando un uso indiscriminado y excesivo de antimicrobianos en medicina humana y veterinaria e incluyendo la producción animal. Esto ha provocado una rápida propagación de bacterias multirresistentes, que suponen en la actualidad una creciente amenaza para la salud pública y una situación alarmante con un importante impacto en materia de sanidad y economía, constituyendo uno de los mayores problemas de salud pública (World Health Organization, 2014). Ante este panorama, sumado a circunstancias que han agravado y acelerado el proceso, incluido el aumento de la población mundial, el cambio climático y la intensificación de la producción agrícola, ha surgido la necesidad de adoptar un enfoque multisectorial en el manejo de la salud de los seres humanos, los animales y la naturaleza, naciendo el concepto “One Health” desde una perspectiva multidisciplinaria para intentar frenar este avance en el número de bacterias resistentes a los antimicrobianos. En España, una iniciativa gubernamental en este sentido ha sido la creación del Plan estratégico Nacional frente a la Resistencia a los ANtibióticos (PRAN), que engloba medicina humana y veterinaria y su relación con la naturaleza para reducir el riesgo de su selección y diseminación (<https://www.aemps.gob.es/j-plan-resistencias-antimicrobianas/>).

El rápido aumento de patógenos Gram negativos resistentes a carbapenemas, que compromete su utilidad como antibiótico de último recurso, unido al desarrollo estancado de nuevos antibióticos, ha llevado a reintroducir la colistina, un antibiótico que dejó de usarse en medicina humana por ser considerado tóxico, para tratar infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes. Entre ellas, la OMS incluyó en 2017 en el grupo de prioridad crítica a tres organismos resistentes a carbapenemas: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* que además sea productora de ESBLs (Taconelli et al., 2017).

La resistencia frente a los antibióticos (RAM) bacteriana puede dividirse en intrínseca y adquirida (Blair et al., 2015). Las bacterias han interactuado con los antimicrobianos de manera ancestral, desarrollando mecanismos para resistir su efecto y sobrevivir o incluso prosperar en estos ambientes de manera natural. De hecho, algunos géneros bacterianos como *Pseudomonas* son intrínsecamente resistentes a cefalosporinas de 1º y 2º generación, además de a macrólidos y tetraciclinas (Saiman, 2007). Sin embargo, la resistencia adquirida, producida bien mediante mutaciones o adquisición de determinantes de resistencia transferidos horizontalmente (Blair et al., 2015), es la que representa el gran problema al que hoy día nos enfrentamos.

La RAM está mediada por múltiples mecanismos, que pueden englobarse dentro de tres tipos principales: i) reducción de la concentración intracelular del fármaco, ya sea impidiendo la entrada o a través de la expulsión, mediante la expresión de bombas de expulsión activa; ii) protección de la diana mediante la adquisición de mutaciones en los genes que codifican para estos determinantes o mediante moléculas que interfieren con la unión del antimicrobiano; y iii) producción de enzimas que causan la modificación del fármaco mediante hidrólisis o la adición de grupos funcionales (Munita y Arias, 2016).

### **1.1.1 Impacto de las resistencias antimicrobianas**

El aumento de bacterias resistentes a los antimicrobianos conlleva un importante impacto sobre la morbimortalidad y cuantiosos costes a nivel económico y social. Las infecciones más comunes fueron urinarias, intraabdominales y neumonías (ECDC, 2022), causadas principalmente por Gram negativos (*E. coli* productor de ESBL, *P. aeruginosa* resistente a carbapenemas y *K. pneumoniae* productora de ESBL y/o resistente a carbapenemas), suponiendo entre el 15% y el 20% del total de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IRAS), y que se relacionan también con un aumento de entre tres y cinco veces su morbimortalidad (ECDC, 2009).

En 2018, la SEIMC informó que el número de pacientes fallecidos por bacterias con resistencia a antimicrobianos durante el primer mes de seguimiento fue 35.400 de un total de 180.600 infecciones, suponiendo un 19,6% de desenlace de muerte (SEIMC, 2018). Un año más tarde se estimó que unas 222.000 pacientes sufrirían infecciones por microorganismos con RAM, de los cuales más de 26.000 morirían en los 30 días siguientes al diagnóstico según el segundo registro de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), que fue presentado en el XXIII Congreso de la SEIMC en 2019. En 2020 España se

situó como el 5º país de la Unión Europea (UE) en consumo de antibióticos a nivel hospitalario, y aunque se ha apreciado un descenso en su consumo en los últimos años, tanto a nivel veterinario como hospitalario, todavía las tasas de consumo se mantienen superiores al promedio de la UE (ECDC, 2009; SEQ, 2021). En el ámbito veterinario los datos son alarmantes, situando a España en el primer lugar en consumo de antibióticos veterinarios críticos para la salud humana en 2013 y 2014 (AEMPS, 2015; ESVAC, 2016), siendo el segundo consumidor de fluoroquinolonas y el primero en consumo de colistina, superando siete veces el máximo recomendado por Europa según el proyecto ESVAC (AEMPS, 2013). En 2020 se detectó un descenso en el porcentaje de RAM durante el periodo 2016-2020, excepto en la resistencia a carbapenémicos en *E. coli* y *K. pneumoniae* y a la vancomicina en *Enterococcus faecium* donde se constató un preocupante incremento (ECDC, 2022). Según este estudio, más de la mitad de las cepas de *E. coli* y más de un tercio de las de *K. pneumoniae* eran resistentes al menos a un grupo de antimicrobianos. La resistencia a los carbapenémicos siguió siendo rara en *E. coli*, en comparación con *K. pneumoniae*, donde se notificaron porcentajes de resistencia a las carbapenemas superiores al 10 %. Los porcentajes de RAM informados para varias combinaciones de especies bacterianas y grupos de antimicrobianos presentaron una gran variabilidad entre países, siendo menos frecuente en los países del norte de Europa, y más altos en países del sur y este de Europa (ESVAC, 2013). Las principales bacterias implicadas fueron *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, siendo la neumonía, la sepsis, las infecciones intraabdominales y respiratorias sus patologías más frecuentes (Murray et al., 2022, Meštrović et al., 2022). Entre los implicados, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *S. pneumoniae* y *A. baumannii* fueron los causantes de algo menos de medio millón de muertes (European Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022), siendo *E. coli* responsable de 154.000 (entre ellas 6110 cepas productoras de ESBL y 1.820 de carbapenemasas) y *K. pneumoniae* de 69.000 (1.390 productoras de ESBL y 5.320 de carbapenemasas). Aunque las estrategias llevadas a cabo hasta el momento para reducir y mejorar el consumo de antibióticos se han traducido en una disminución de la RAM, sus niveles son todavía altos, como el consumo de antibióticos, que está en muchos casos descontrolado mostrando que es necesario reforzar la vigilancia y/o mejorar la estrategia para abordar la situación e intentar revertirla.

## **1.2 FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE***

La familia *Enterobacteriaceae*, un grupo heterogéneo y extenso de bacterias Gram negativas del orden Enterobacterales, incluye 63 géneros entre los cuales 20 a 25 miembros son clínicamente importantes (National Library of Medicine's Internet Taxonomy; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543>). Estas bacterias forman parte de la microbiota intestinal, entre otros órganos y tejidos del ser humano y los animales, y son responsables de numerosas infecciones, destacando las enterobacterias patógenas primarias (*Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* y algunas cepas de *E. coli*) que producen principalmente cuadros gastrointestinales, y las enterobacterias oportunistas (Pérez-Guerrero et al., 2014), que causan infecciones en pacientes con factores de riesgo previos (Alós, 2005, Cisneros et al., 2005). En España y durante 2021 (SEMPSP, 2021), estas bacterias estuvieron implicadas en el 30,96 % de las infecciones comunitarias (74,71 % infecciones urinarias, 48,20 % bacteriemias, 12,29 % infección respiratoria) y en el 35,83 % de las infecciones hospitalarias (58,45 % infecciones urinarias, 36,90 % infecciones quirúrgicas, 30,63 % infección respiratoria, 24,33 % bacteriemias).

Las enterobacterias se clasifican según su estructura antigénica, existiendo el antígeno somático O, antígeno K y antígeno H. Las cepas móviles poseen flagelos y fimbrias o pillis, que intervienen en la adherencia. Entre los determinantes de patogenicidad destacan su cápsula, endotoxinas (LPS), enterotoxinas o exotoxinas, variación de fase antigénica, sistema de secreción de tipo III, secuestro de factores de crecimiento, resistencia al efecto bactericida del suero y RAM.

### **1.2.1 *Escherichia coli***

Descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, es la bacteria anaerobia facultativa comensal más abundante de la microbiota del tracto gastrointestinal, donde interviene en el correcto funcionamiento del proceso digestivo, contribuyendo al metabolismo de proteínas y carbohidratos, y participa en la síntesis de vitamina B y K (Burkholder y McVeigh, 1942). Tiene una gran capacidad de adaptación a condiciones adversas mediante la adquisición de elementos genéticos móviles o mutaciones, causando infecciones intestinales y extraintestinales. Se encuentra distribuida en el intestino de vertebrados de sangre caliente y ampliamente en la naturaleza. La globalización del comercio ha originado su diseminación mundial y su presencia en infecciones extraintestinales humanas sugieren por tanto que los

linajes pandémicos *E. coli* extraintestinales (ST10, ST69, ST73, ST95, ST127 y ST131, ST393) deben haber evolucionado para adaptarse a una amplia variedad de ambientes, siendo ST131 el genotipo más frecuente y responsable de cepas resistentes a fluoroquinolonas o productoras de ESBL (Mathers et al., 2015). En 2021 *E. coli* causó un 15,14% del total de las infecciones en España (SEMPSP, 2021), 13,36% fueron infecciones hospitalarias (29,84% infecciones urinarias, 15,17% infecciones quirúrgicas, 5,92% infecciones respiratorias y 7,75% bacteriemias) y 16,11% comunitarias (47,38% infecciones urinarias, 3,38% infecciones respiratorias, 30,80% bacteriemias).

### **1.2.2 *Klebsiella pneumoniae***

Es la especie más relevante del género *Klebsiella* y fue descrita por Karl Friedländer en 1882. Se considera un patógeno oportunista en pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos y se encuentra de manera ubicua en el medio ambiente. La mayoría de las infecciones son adquiridas en el hospital y/o en pacientes con alguna enfermedad que les predispone. Poseen una cápsula responsable de su aspecto mucoso y que les protege de la fagocitosis (Martin y Bachman, 2018), siendo K1 y K2 los serotipos más frecuentes de los más de 77 serotipos capsulares distintos descritos (Sanikhani et al., 2021).

Según datos de EPINE (Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España), *K. pneumoniae* causó un 5,89% del total de las infecciones en España, siendo un 7,83% infecciones hospitalarias (12,21% infecciones urinarias, 4,37% infecciones quirúrgicas, 9,01% infecciones respiratorias y 7,89% bacteriemias) y un 4,82% infecciones comunitarias (12,07% infecciones urinarias, 3,95% infecciones respiratorias, 5,66% bacteriemias). El 45,30% de los aislados en hospital eran resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y el 16,73% a carbapenemas (SEMPSP, 2021).

## **1.3 PARED CELULAR DE LAS ENTEROBACTERIAS.**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y la colistina ejercen su mecanismo de acción sobre la pared celular, y por este motivo se ha considerado oportuno dedicar un capítulo a esta estructura y poder así entender las modificaciones que se producen en la pared celular de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

La pared celular proporciona la integridad de la célula bacteriana y la protege del medio exterior. En las enterobacterias, al igual que en otras bacterias Gram negativas, la pared celular consta de tres estructuras: la membrana interna, el periplasma y la membrana externa. La

membrana interna o citoplásmica consiste en una doble capa de fosfolípidos y proteínas que regulan el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. El periplasma contiene una fina capa de peptidoglicano, responsable de la coloración característica en la tinción de Gram, y que proporciona rigidez a la pared celular bacteriana y determina la forma de la célula. Por último, la membrana externa es una bicapa asimétrica que contiene fosfolípidos en su capa interna y moléculas de lipopolisacárido (LPS) en la externa. Se encuentra unida al peptidoglucano y en contacto directo con la membrana plasmática facilitando el transporte de ciertas sustancias desde el exterior al interior celular. El LPS tiene una estructura química que es única para cada especie y/o cepa bacteriana y que es responsable de muchas de sus características antigénicas, además de conferir carga negativa a la superficie externa celular.

### **1.3.1 El lipopolisacárido**

Es una potente toxina termoestable que es liberada por las bacterias Gram negativas tras la lisis celular y es responsable del shock inducido, y su modificación favorece su adaptación y supervivencia al medio ambiente. y juega por tanto un papel importante en la estabilidad y protección de la bacteria contra el exterior (Romero Hurtado e Iregui, 2010; Raetz y Whitfield, 2002; Erridge et al., 2002). En las bacterias Gram negativas constituye el mayor componente de la membrana celular externa y consta de tres partes: el lípido A, el núcleo o core y el antígeno O.

#### *1.3.1.1 Estructura del lipopolisacárido*

El lípido A es la endotoxina bacteriana responsable del desencadenamiento de la respuesta inmunitaria y ancla las moléculas de LPS a la membrana externa a través de interacciones hidrofóbicas. Se trata de un disacárido de glucosamina, unido por un enlace beta-1,6 y esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos saturados (más dos ácidos grasos adicionales unidos a beta-hidroxilos de los primeros) y fosforilado en sus dos extremos, en el C4 del primer monosacárido y en el C1 del segundo. El lípido A tiene un papel estructural muy relevante, y entre otros efectos aumenta la resistencia frente a disolventes orgánicos. El núcleo o “core” del lípido A es una cadena corta de azúcares que se divide en una región interna compuesta de octulosas (KDO) unidas directamente al lípido A y un número variable de residuos de L-glicero-D-manoheptosa (Hep) que proporcionan el lugar de unión para el polisacárido de cadena larga o antígeno “O” con el lípido A (Heinrichs et al., 1998). Este



antígeno “O”, de carácter hidrofílico, es la región más externa del LPS y está formado por polímeros de oligosacáridos de longitud variable con una elevada capacidad antigénica. Su estructura es muy variable, identificándose sólo en *E. coli* unos 200 serogrupos diferentes. Así, la respuesta altamente específica del sistema inmune contra el antígeno O lo convierte en una herramienta para la tipificación de cepas y, al ser esencial en la interacción con el huésped, condiciona la virulencia de las bacterias Gram negativas patógenas. Es el receptor para muchos bacteriófagos, y en el hospedador evita el reconocimiento del lípido A por parte de los macrófagos. Además, protege a las bacterias de la acción de numerosos antibióticos y de otras moléculas hidrofóbicas (Caroff y Karibian, 2003).

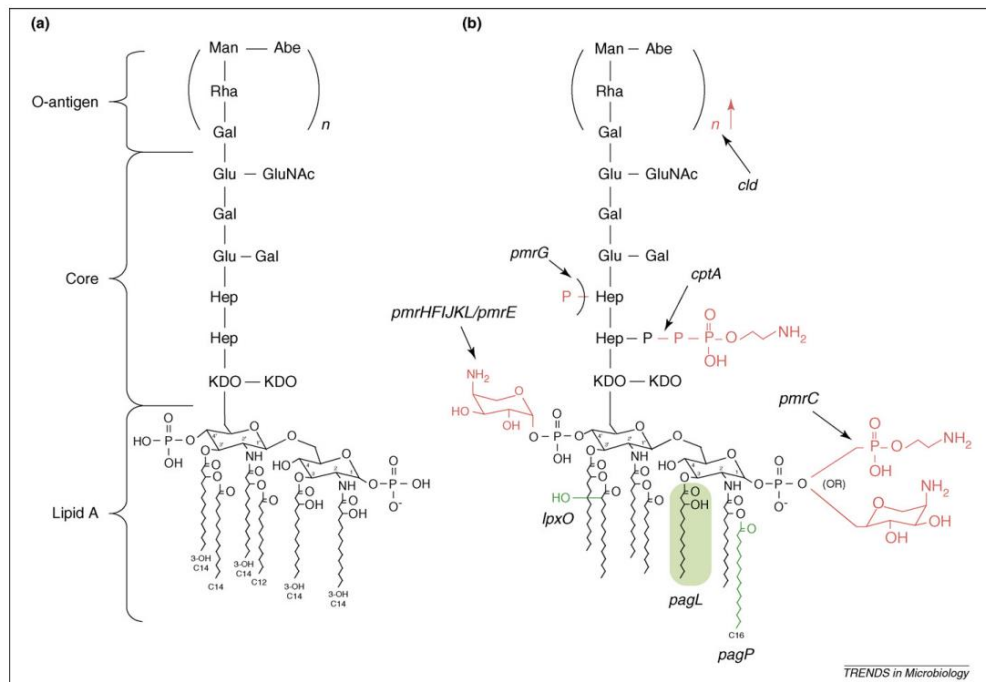
#### *1.3.1.2 Biosíntesis del lipopolisacárido*

Es un proceso complejo que sucede en varios compartimentos con la participación de un gran número de funciones celulares. El LPS es ensamblado como un polímero unido a un lípido de membrana, y transferido posteriormente a la glucosa terminal no reductora del núcleo completo. Las células sintetizan el lípido A junto con los restos Kdo del oligosacárido central utilizando una ruta biosintética denominada vía de Raetz. El primer paso para la biosíntesis del LPS consiste en la acilación de una molécula UDP-N-acetil glucosamina (UDP-GlcNAc) con una molécula de ácido  $\beta$ -hidroximirístico. Este paso es llevado a cabo por una aciltransferasa denominada LpxA, para producir UDP-3- O- (acil)-GlcNAc. Posteriormente se produce la acilación del monosacárido para generar 2,3-diacilglucosamina-1-fosfato, también conocido como lípido X. Esta acción es realizada por los productos de los genes lpxC, dependiente de  $Zn^{2+}$ , y lpxD. Posteriormente LpxB agrega el lípido X a una molécula de UDP-2,3-diacilglucosamina (producto de la reacción de LpxD) a través de un enlace  $\beta$  1'-6 que libera el transportador de nucleótidos UDP produciendo un precursor disacárido con cuatro grupos acilo, denominado lípido IVA al que se le añaden dos unidades de ácido 2-keto-3-deoxioctanato (Kdo) formando Kdo2- IVA, el cual es acilado completamente en las posiciones 2' y 3' del disacárido, formando así la endotoxina Re. La síntesis de Kdo se inicia con la condensación de arabinosa-5-fosfato con fosfoenolpiruvato, proceso en el cual está implicado el gen *kdsA*. Seguidamente el Kdo sintetizado es activado a Kdo-CMP para lo que son necesarias la participación de las enzimas la Kdo-8-fosfato sintasa, y la CMP-Kdo sintasa, que, tras la actuación de una fosfatasa específica para el Kdo, forma CMP-Kdo. El producto resultante es un disacárido de glucosamina tetraacilada que se inserta en la capa interna de la membrana plasmática y, a veces, se denomina disacárido de lípido A. Por otro lado, los genes del grupo

*rfa* codifican glicosiltransferasas que actúan de forma secuencial en la síntesis del núcleo, así como otras enzimas que añaden grupos funcionales a diversas regiones del núcleo (Schnaitman y Klena, 1993).

El antígeno O, sintetizado independientemente del resto de la molécula del LPS, es ensamblado como un polímero unido a un lípido de membrana y transferido posteriormente a la glucosa terminal reductora del núcleo completo. En su biosíntesis intervienen tres vías o rutas: ruta dependiente de Wzy, vía dependiente de ABC, y la vía dependiente de sintasa (Kalynych et al., 2014).

Como mecanismo de defensa, las bacterias Gramnegativas modifican el LPS para adaptarse al entorno, pudiendo distinguirse las modificaciones en el Lípido A, el núcleo y el antígeno O (figura 1.1).



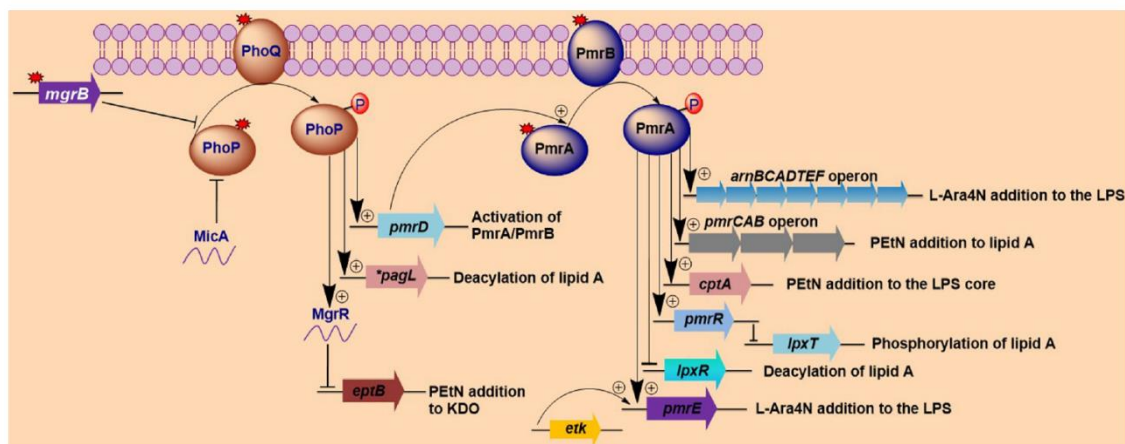
**Figura 1.1.** (a) LPS no modificado de *S. typhimurium*. (b) LPS de *S. typhimurium* modificado a través de los sistemas TCS PhoPQ (en verde) o PmrAB (en rojo). Tomado de John S. Gunn, 2008.

### 1.3.1.3 Modificaciones del lipopolisacárido

La mayoría de los cambios en la estructura del LPS ocurren a nivel del lípido A y en respuesta a estímulos ambientales, estando reguladas principalmente por los sistemas de dos componentes (TCS) *PmrAB* y *PhoPQ* (Needham y Trent, 2013; figura 1.2). Así, *PhoPQ* responde fundamentalmente a pH bajo (5,5) y baja concentración de cationes divalentes ( $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ). En estas circunstancias, *phoQ* se autofosforila y fosforila a *PhoP*, el cual activa la

transcripción del gen *pmrD* (Kato y Groisman, 2004). Además, *mgrB* mantiene inhibida la actividad de *PhoP*. El otro TCS, PmrAB, está regulado positivamente por *PhoPQ* a través de *PmrD*, inhibiendo la desfosforilación de *PmrA*. *PmrA* es el gen regulador que responde al sensor *PmrB* cuando detecta altas concentraciones de  $Fe^{3+}$  (Wösten et al., 2000) y/o pH ligeramente ácido (Pérez y Groisman, 2007) activando a *PmrA* tras fosforilarlo, produciendo la transferencia de 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) a la posición 4' fosfato, mediada por ArnT, y la transferencia de fosfoetanolamina (pEtN) desde la fosfatidiletalonamina, mediada por EptA, tanto a la posición 1'-P como 4'-P del lípido A (Lee et al., 2004). Los genes involucrados en la adición de L-Ara4N son *ugd* y el operón *arnBCADTEF* (también denominados *pmrE* y *pmrHFIJKLM*, respectivamente, en *Salmonella*). La activación del sistema PhoPQ y/o del sistema PmrAB, que puede deberse a la inactivación de *mgrB*, conduce a la sobreexpresión del operón *arnBCADTEF* y a la modificación del lípido A con L-Ara4N, responsable de la resistencia a la colistina (Lippa y Goulian, 2009; Poirel et al., 2015). En el apartado 1.5.3 de esta memoria, que trata sobre la resistencia a la colistina, se ampliará esta información.

Las modificaciones del núcleo o core del LPS ocurren mediante la adición de varios grupos de azúcar, así como otros restos, como la propia pEtN, mientras que las modificaciones del antígeno O permiten un extenso rango de posibles cambios estructurales, entre ellos la adición o eliminación de azúcares individuales, e incluso el propio antígeno O en su totalidad puede ser reemplazado por otro a través del intercambio genético mediante la transferencia horizontal de parte o la totalidad del locus biosintético (Iguchi et al., 2015).



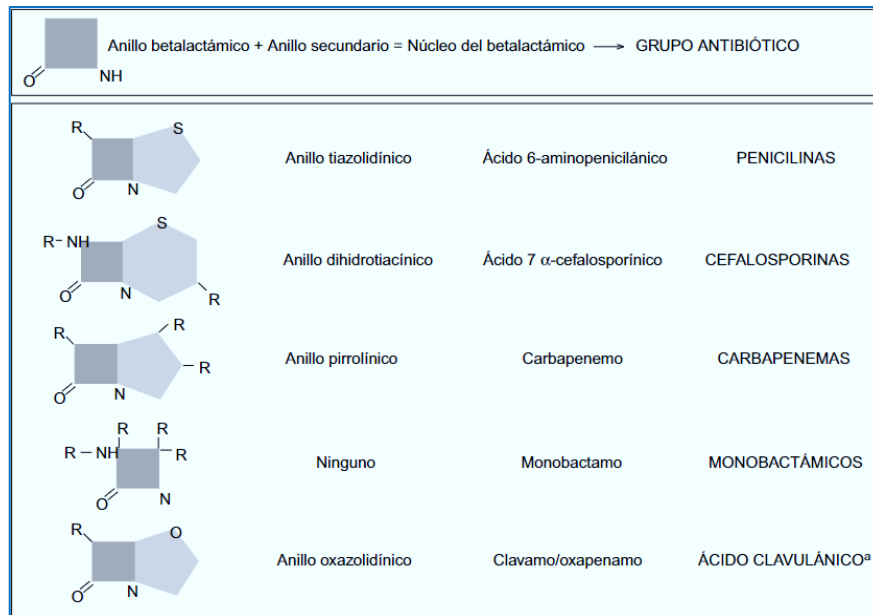
**Figura 1.2.** Cambios en la expresión génica producidos por la activación de los TCS PhoPQ y PmrAB (Tomado de Olaitan et al., 2014.)

## **1.4 ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS.**

Estas moléculas constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada para el tratamiento de las infecciones, en clínica humana y veterinaria, por su acción bactericida lenta y escasa toxicidad (Tang et al., 2014). Están formadas por el anillo  $\beta$ -lactámico, un anillo heterocíclico con tres átomos de carbono y uno de nitrógeno, unido a otros radicales, principalmente un anillo secundario que determina su pertenencia a un grupo u otro (figura 1.3). El anillo  $\beta$ -lactámico actúa como análogo del sustrato de las PBPs (por *Penicillin Binding Proteins*), enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano, y por tanto su mecanismo de acción radica en bloquear el metabolismo de la pared celular bacteriana. Además, provocan la activación de la autolisina bacteriana endógena, destruyendo el peptidoglicano y amplificando su efecto (Mohr, 2016).

### **1.4.1 Clasificación de los antibióticos $\beta$ -lactámicos.**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas (figura 1.3). Las penicilinas a su vez se agrupan en naturales, semisintéticas, resistentes a penicilinasas e inhibidores de betalactamasas. Por otra parte, las cefalosporinas constituyen el grupo de betalactámicos más amplio y, siendo similares a las penicilinas, son más estables y con un espectro de actividad más amplio, por lo que están siendo más utilizadas en el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por enterobacterias. Dependiendo del momento de su desarrollo, las cefalosporinas se agrupan en cinco generaciones sucesivas (Jordan et al., 2020). Los monobactámicos sólo poseen un anillo en su estructura, siendo el aztreonam el único disponible para uso clínico e indicado para pacientes con hipersensibilidad a penicilinas y cefalosporinas. Por último, las carbapenemas son antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y gran resistencia a las beta-lactamasas, tanto de Gram negativas como de Gram positivas.



**Figura 1.3.** Estructura de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Tomado de Cristina Suárez and Francesc Gudiol, 2009.

#### 1.4.2 Mecanismos de resistencia frente a los antibióticos $\beta$ -lactámicos: $\beta$ -lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, inactivándolo irreversiblemente. Se clasifican según los sustratos sobre los que actúan, las sustancias capaces de inhibirlas y la similitud en sus secuencias de aminoácidos (tabla 1.1). Así, algunas son específicas para penicilinas, como las penicilinasas, mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad siendo capaces de actuar sobre la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro o ESBL (*Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases*), activas sobre todos los  $\beta$ -lactámicos salvo carbapenemas, y las carbapenemasas, que hidrolizan prácticamente cualquier  $\beta$ -lactámico. Dependiendo del tipo de enzima, su síntesis puede ser constitutiva o inducida por la presencia del antibiótico, pudiendo estar codificadas por genes situados en el cromosoma principal bacteriano o por genes adquiridos mediante transferencia horizontal. Las ESBLs y las carbapenemasas suponen un importante riesgo para la salud ya que están codificadas en plásmidos y se transfieren entre microorganismos muy eficientemente (Pratt, 2016).

##### 1.4.2.1 $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBLs)

Estas enzimas hidrolizan eficientemente penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación. Están codificadas en plásmidos, a menudo asociadas a transposones o secuencias de inserción, lo que ha facilitado su propagación, y su evolución está directamente vinculada al uso y abuso de los  $\beta$ -lactámicos y a factores como la densidad de población y la

higiene. Las ESBLs han adquirido gran interés ya que su incidencia ha aumentado progresivamente, y se clasifican según la familia génica a la que pertenecen en: TEM, CTX-M, SHV y OXA.

Las ESBLs de tipo TEM a menudo están mediadas por plásmidos, y derivan de TEM-1 y TEM-2 por sustitución de uno o varios aminoácidos alrededor del sitio activo. De hecho, hasta un 30% de los residuos de aminoácidos tienen posibilidad de mutar, afectando principalmente a la especificidad del sustrato y la actividad enzimática (Pimienta et al., 2014; Stec et al., 2005). La primera enzima descrita de este grupo provino de una cepa de *E. coli* aislada en Atenas (Grecia) de un paciente llamado Temoneira, de ahí el nombre de TEM (Paterson y Bonomo, 2005). Las isoformas o alelos TEM-1 y TEM-2 solo confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de 1ª generación, mientras que la adquisición de mutaciones y evolución de nuevos alelos ha aumentado su espectro de acción sobre cefalosporinas de generaciones superiores. Son las  $\beta$ -lactamasas más abundantes en enterobacterias y se localizan principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* aunque también pueden estar presentes en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Las ESBLs tipo TEM pueden ser movilizadas mediante plásmidos y/o transposones (Partridge y Hall, 2005).

Las ESBLs de tipo SHV se originaron a partir de SHV-1, una enzima codificada cromosómicamente en *K. pneumoniae*, y comparte un 68% de identidad aminoacídica con TEM-1 (Jacoby y Munoz-Price, 2005). En España, las primeras bacterias con ESBL se detectaron casi simultáneamente en *E. coli* y *K. pneumoniae* y fueron aisladas en dos hospitales de Madrid (Hospital Universitario Ramón y Cajal y Hospital Clínico) en 1988, y correspondían a cepas de que producían SHV-2. Al igual que las TEM, SHV-1 y SHV-2 confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de 1ª generación, mientras que la evolución de nuevos alelos ha aumentado su espectro de acción. Las ESBL tipo SHV se pueden encontrar codificadas en plásmidos o en el cromosoma, estando sus genes flanqueados por la secuencia IS26, que moviliza y promueve su expresión (Lee et al., 1990).

Las ESBLs de tipo CTX-M son enzimas que se caracterizan por hidrolizar muy eficientemente la cefotaxima, una cefalosporina de 3ª generación. Se conocen 239 ESBLs isoformas del tipo CTX-M, agrupadas en torno a cinco grupos diferentes según su secuencia de aminoácidos con una identidad superior al 94% dentro de cada grupo (Bonnet, 2004). En su movilización parecen haber participado las secuencias de inserción ISCR1 e ISEcp1, bacteriófagos y plásmidos del grupo de incompatibilidad IncF, también llamados “plásmidos

de resistencia epidémicos” debido a su elevada capacidad para adquirir genes de resistencia y diseminarse rápidamente entre los miembros de las *Enterobacteriaceae*.

Las ESBLs del tipo OXA deben su nomenclatura a su capacidad de hidrolizar oxacilina, aunque son un grupo amplio que muestra amplia variabilidad de secuencias de aminoácidos y de especificidad de sustrato. Así, existen variantes OXA que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos. Hay descritas 27 oxacilinasas, muchas de ellas detectadas en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *E.coli*, y se diseminan mediante plásmidos y/o integrones (Barlow and Hall, 2002; Antunes y Fisher, 2014)

#### 1.4.2.2 $\beta$ -lactamasas AmpC o cefalosporinasas

Las enzimas de la clase AmpC son serín- $\beta$ -lactamasas pertenecientes al grupo 1 de  $\beta$ -lactamasas y se encuentran codificadas en cromosoma o en plásmidos por *ampC*, pudiendo expresar ambos genes si presentan genes codificadores en plásmidos conjugativos o movilizables (Kohlmann et al, 2018; Tekele et al., 2020; Ibrahim et al., 2019). Esta situación se agrava ya que los genes en principio cromosómicos pueden ser transportados, tras integrarse en elementos genéticos transferibles, aumentando su propagación (figura 1.7). Tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación, cefamicinas, monobactámicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, pero no cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación ni carbapenemas. En la mayoría de las enterobacterias que poseen el gen *ampC*, éste se codifica en el cromosoma y su expresión es baja, aunque pueden ser inducidos como respuesta a la exposición a ciertos  $\beta$ -lactámicos y por mutaciones de genes reguladores (Meini et al., 2019; Jacoby, 2009). Así, han sido descritas tres categorías: AmpCc con expresión inducible, AmpCc no inducible y AmpCp en plásmidos de transferencia (Tamma et al., 2019). Respecto a su repercusión, se encuentran presentes a nivel mundial, principalmente asociadas a infecciones del tracto urinario (Mata et al., 2007), existiendo un aumento progresivo y global de la categoría AmpCp mediante transferencia horizontal. Su detección es prioritaria para dictaminar un tratamiento adecuado y evitar su propagación y para ello se recomiendan distintos métodos de cribado, entre los que destacan la microdilución en caldo, la dilución en agar, difusión en disco o el gradiente de concentración, existiendo también medios de cultivo cromogénicos diferenciales (EUCAST, 2017; Girlich et al., 2019). Habitualmente se usa como primer indicador la resistencia a oximino-cefalosporinas, definida como un valor de CMI  $\geq$  1mg/L según las recomendaciones de CLSI y EUCAST, y posteriormente estas cepas se confirman mediante pruebas fenotípicas y/o genotípicas, como la detección de cefalosporinasas AmpC

plasmídicas mediante su resistencia fenotípica a cefalosporinas de amplio espectro combinada con la resistencia a cefoxitina (CMI>8mg/L o zona de inhibición <19mm)

#### 1.4.2.3 Carbapenemasas

Al igual que sucede con AmpC, las carbapenemasas han generado una gran preocupación desde el punto de vista clínico debido a que las carbapenemas constituían una alternativa muy eficaz a la infección por bacterias multirresistentes (MDR), incluidas las causadas por ESBLs (Thomson, 2010). En su espectro de acción son capaces de hidrolizar carbapenemas, cefalosporinas de 3ª generación y monobactams aunque realmente son capaces de conferir resistencia a prácticamente todos los β-lactámicos. Se codifican tanto en el cromosoma como en plásmidos (Al-Marzooq et al., 2015), y a menudo se asocian a otros genes de resistencia antimicrobiana haciendo difícil su tratamiento (Souli et al., 2010)

Las carbapenemasas se clasifican en (Sawa et al., 2020): clase A (penicilinasas), B (metalo-β-lactamasas o MBL), C y D (oxacilinasas). Las enzimas de la clase A son las más prevalentes globalmente entre gramnegativas multirresistentes, y a su vez se subdividen en GES, SME, SHV, KPC, IMI/NMC-A y SFC (Poirel et al., 2000; Naas et al., 1994; Barthélémy et al., 1986; Yigit et al., 2001; Nordmann et al., 1993; Henriques et al., 2004) Dentro de ellas, la KPC es la más representativa y la que más preocupa desde el punto de vista epidemiológica ya que posee una alta propagación al viajar codificada en plásmidos. En España, su prevalencia ha aumentado considerablemente desde el año 2010, donde representaba < del 1% (0.04% en 2009), siendo entonces las más frecuentes VIM-1 (76.9%), principalmente en *Klebsiella spp.* (69.7%) y en *Enterobacter spp.* (25.6%), pero también se detectaron IMP-22 e IMP-28 (Miró et al., 2013). Sin embargo, el estudio multicéntrico CARB-ES-19 llevado a cabo en 2019 en hospitales españoles informa como más comunes las carbapenemasas OXA-48, KPC-3, VIM-1 y NDM-1 por orden de frecuencia (Cañada-García et al., 2022).

Para la detección de carbapenemasas se dispone de medios cromogénicos con suplementos que impiden el crecimiento de bacterias sensibles, y se utilizan los valores ECOFF definidos por EUCAST, siendo el meropenem el antibiótico con mejor relación sensibilidad-especificidad.

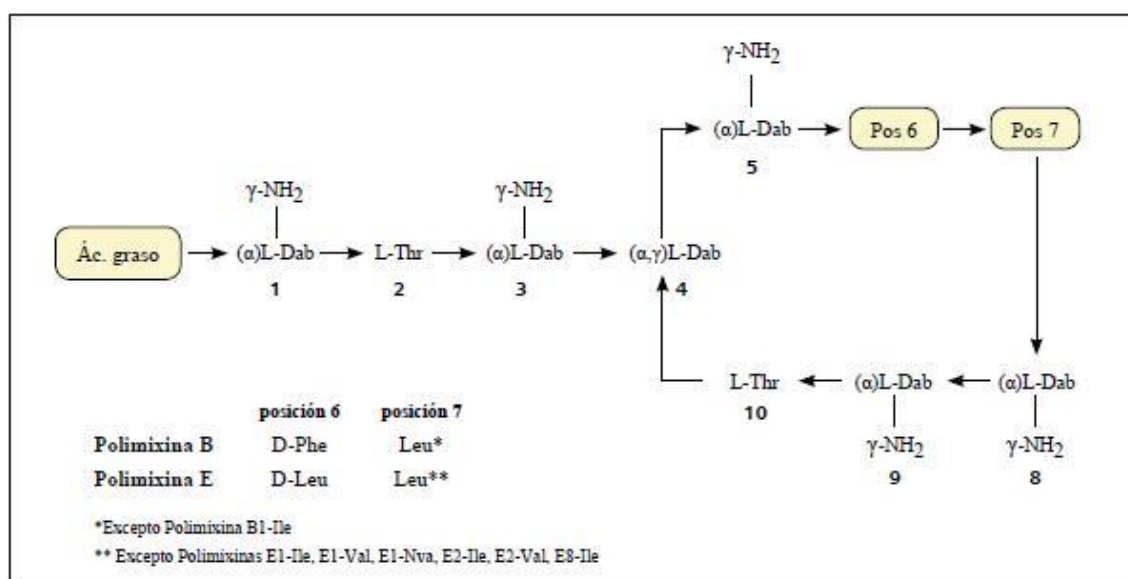


## 1.5 COLISTINA

La colistina o polimixina E fue descubierta en 1947 tras extracción de la bacteria *Paenibacillus polymyxa var. colistinus* (Ainsworth et al., 1947; Benedict and Langlykke 1947; Stansly y Schlosser, 1947). Tanto la colistina como la otra polimixina disponible (polimixina B) son metabolitos secundarios peptídicos no ribosomales producidos por dicha bacteria. Cayeron en desuso en la década de los 80 debido a sus potenciales efectos adversos nefro y neurotóxicos, así como alergias e incluso parálisis respiratorias (Falagas y Kasiakou, 2005) pero en los últimos años la colistina ha resurgido como antibiótico de último recurso frente a patógenos multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii complex* y enterobacterias productoras de carbapenemasas, produciéndose un incremento en su consumo dentro del ámbito hospitalario (Falagas y Kasiakou, 2005, Li et al., 2005).

### 1.5.1 Estructura química de la colistina

La polimixina B y la colistina son péptidos policatiónicos cíclicos compuestos por un anillo decapeptídico unido a través de un enlace amida a una cadena de ácidos grasos (Li et al., 2006). La presencia de esta cadena lateral de ácidos grasos explica la hidrofobicidad de la molécula (Velkov et al., 2013), necesaria para su actividad antimicrobiana (Brink et al., 2014), aunque la característica diferencial del antibiótico es la presencia de L-diaminobutírico (L-Dab), aminoácido con carga positiva en su cadena lateral (pH 7,0), en 6 de las 10 posiciones del péptido (figura 1.4).



**Figura 1.4.** Estructura de las polimixinas. Los residuos en las posición 6 y 7 determinan las distintas polimixinas. Por último, el ácido graso determina el subtipo (Li et al., 2006).

Las polimixinas se clasifican de acuerdo con los aminoácidos presentes en su secuencia, especialmente en las posiciones 6 y 7, asignando a cada grupo una letra, desde A hasta E. A su vez, cada uno de estos grupos han sido subclasificados según el ácido graso presente en el grupo amino terminal (Velkov et al., 2013). De entre todas las polimixinas identificadas, sólo las polimixinas B y E (colistina) tienen uso clínico (Velkov et al., 2013), difiriendo en solo en un aminoácido del anillo peptídico, fenilalanina en la polimixina B y leucina en la colistina (Nation et al., 2014).

En el espectro de acción de las polimixinas se incluye a la mayoría de las bacterias Gram negativas aerobias como *Enterobacterales* (excepto *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Edwardsiella* y *Serratia*) y bacilos Gram negativos no fermentadores como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* También presenta actividad contra *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, y más del 50% de *Stenotrophomonas maltophilia*. Además, es potencialmente activo frente a varias especies de micobacterias (Falagas y Kasiakou, 2005). Sin embargo, al no incluir especies con gran importancia (*Proteus*, *Providencia*, *Burkholderia* y *Serratia*) se le considera un antimicrobiano de reducido espectro (Aguayo et al., 2016).

### **1.5.2. Mecanismo de acción de las polimixinas**

Como se comentó anteriormente, una de las principales funciones de la membrana externa es ser una barrera de permeabilidad frente a los antimicrobianos, función que ejerce a través del LPS impidiendo la entrada de antibióticos hidrófobos y/o antibióticos de gran tamaño (Velkov et al., 2013; Bialvaei y Samadi Kafil, 2015). Las cadenas de ácidos grasos saturados del lípido A se encuentran inmersas en la capa externa de la membrana externa, firmemente empaquetados mediante interacciones hidrofóbicas y, debido al íntimo contacto, por fuerzas de Van der Waals, mientras que tanto el  $Mg^{+2}$  como el  $Ca^{+2}$  se asocian a los fosfoésteres del lípido A y funcionan como puente entre moléculas vecinas del LPS, estabilizando así su estructura (Nikaido, 2003; Hancock, 1997). La membrana externa se configura como una barrera no sólo mecánica, sino también electrostática, con una elevada carga aniónica repulsiva, conferida por las fracciones fosfoéster del lípido A, además del fosfato y grupos carboxilato dentro del núcleo y azúcares del antígeno O (Velkov et al., 2013). Aunque existe discrepancias y su mecanismo de acción no está completamente elucidado, se cree que las polimixinas interactúan con las membranas a través de su larga cadena hidrofóbica, mientras que su región policationica se asociaría electrostáticamente de modo que los grupos amino cargados positivamente del L-Dab

interaccionarían con los grupos fosfato esterificados al disacárido de N-acetil-glucosamina del lípido A, justo en la superficie de la membrana extrínseca, desplazando los cationes divalentes de calcio y magnesio que estabilizan esa parte de la estructura (1055). Este hecho produciría un incremento en la permeabilidad de la membrana y la posterior muerte celular al provocar la desestructuración del LPS bacteriano (Landman et al., 2008), actuando de modo similar a un detergente. Además, otro papel propuesto de las polimixinas es su efecto antitoxina al neutralizar el lípido A (Li et al., 2005).

### 1.5.3 Mecanismos de resistencia a la colistina

En los últimos años ha aumentado el número de bacterias resistentes a colistina debido al uso excesivo y descontrolado sobre todo en medicina veterinaria, donde se ha usado para el tratamiento y prevención de patologías infecciosas gastrointestinales y como promotor del crecimiento (Catry et al., 2015, Poirel et al., 2017).

Al igual que el mecanismo de acción de la colistina, las bases moleculares de la resistencia frente a estos antibióticos aún continúan desconocidos en ciertos aspectos (Sherry y Howden, 2018). El principal mecanismo de resistencia a la colistina se produce mediante modificaciones en el lípido A, añadiéndole distintas moléculas como cadenas de ácidos grasos, L-Ara4N y pEtN, que bloquean la carga negativa de los grupos fosfato del LPS impidiendo así la unión de la colistina y su acción antimicrobiana (Anaya-López et al., 2013). Otros mecanismos propuestos son la actividad de bombas de eflujo, la pérdida del lípido A, la remodelación de la membrana externa y la formación de cápsulas, aunque su importancia o relevancia podría considerarse secundaria.

En general se pueden distinguir dos mecanismos de resistencia a la colistina: i) la adquisición de mutaciones en los propios genes bacterianos que regulan la decoración del LPS (*phoP*, *phoQ*, *mgrB*, *pmrA*, *pmrB* y *pmrD*), dando lugar a la sobreexpresión de las enzimas implicadas en la adición de L-Ara4N y/o de pEtN; y ii) la adquisición de genes de la súperfamilia *mcr* (mobile colistin resistance), que codifican pEtN-transferasas de diferentes orígenes (Mora et al., 2022). Además, existen bacterias intrínsecamente resistentes a colistina como son *P. mirabilis*, *S. marcescens* y *Burkholderia spp*, debiendo su mecanismo de resistencia a la expresión constitutiva del operón *arnBCADTEF* y del gen *eptA*, que adicionan respectivamente L-Ara4N y pEtN al LPS (Jiang et al., 2010; Lin et al., 2014).

En 2015 se identificó el primer gen plasmídico de resistencia a colistina (*mcr-1*), en aislados de *E. coli* procedentes de China (Liu et al., 2016). Desde entonces, han sido descritos genes *mcr* en los cinco continentes, encontrados en muestras humanas y animales y en el medio ambiente. Hasta la fecha, se han identificado diez variantes de los genes *mcr* denominados *mcr-1* a *mcr-10*, que se han identificado en diferentes especies de *Enterobacteriaceae*, como *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Klebsiella spp.* (Zeng et al., 2016; Zhang et al., 2022; Phetburom et al., 2021) y en una amplia gama de plásmidos conjugativos, como IncI2, IncHI2, IncX4, IncP, IncF e IncY (Elbediwi et al., 2019) o de tipo ColE (Carattoli et al., 2017), siendo IncX4 e IncHI2 los más prevalentes (Liu et al., 2020). Los genes *mcr*, son genes movilizables codificados por plásmidos conjugativos y responsables de la transferencia horizontal de resistencia a colistina, aunque en algunos casos están ubicados cromosómicamente (Mora et al., 2022). Además, *mcr-1* en algunas ocasiones también se encuentra integrado en el cromosoma y la movilización del plásmido que contiene *mcr-4* necesita la presencia de un plásmido colaborador que promueva su conjugación. Los genes *mcr* codifican una proteína transmembrana citoplásmica que actúa como una fosfoetanolamina transferasa, añadiendo un resto PEtN en el fosfato 1' o 4' del lípido A, resultando un LPS con una menor carga negativa y en consecuencia disminuye la unión de colistina, al igual que sucede con las mutaciones cromosómicas que promueven la sobreexpresión de *eptA*, otro gen que pertenece a la misma superfamilia que los genes *mcr* (Kim et al., 2019). Los genes *mcr* tienen la capacidad de diseminarse rápidamente bajo presión selectiva (Kieffer et al., 2019) y suelen tener una CMI menor que la resistencia a colistina con un origen cromosómico en *K. pneumoniae*, pero no en *E. coli* ni en *S. enterica* (Janssen et al., 2020). La resistencia a la colistina mediada por mutación o por la expresión de genes *mcr* origina cambios en la morfología celular bacteriana, afectando a su supervivencia al disminuir la tasa de crecimiento celular. Debido a ello, la expresión de los genes *mcr* está finamente regulada y sólo se encuentran en plásmidos de bajo número de copias (Xavier et al., 2016; Bontron et al., 2016).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 2.1 EPIDEMIOLOGÍA

Los datos epidemiológicos que se muestran en esta tesis proceden de la base de datos microbiológicos del Área de Salud de Cáceres. La gestión de estos datos se realizó mediante las plataformas SGLAB (DB Soft y Gestlab, Indra), sistemas de gestión integral de laboratorios clínicos, de acuerdo con la Norma UNE EN ISO/IEC 17025 que garantiza la competencia técnica y la fiabilidad de los resultados analíticos.

## 2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Todas las cepas utilizadas en este estudio son aislados clínicos de muestras de pacientes del Área de Salud de Cáceres. Para la denominación de las cepas cuyo análisis a nivel individual se muestra en este trabajo se ha utilizado una nomenclatura que comienza por la abreviatura **HSP**, indicativa de su procedencia, el Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres. A continuación sigue una letra que refiere la especie, **E** si se trata de *E. coli* o **K** si es *K. pneumoniae*. Luego se especifica **B** o **C**, que en el caso de las cepas de *E. coli* (todas ellas resistentes a la colistina) refiere si son productoras de  $\beta$  lactamasa de amplio espectro o no, respectivamente. En el caso de las cepas de *K. pneumoniae*, **B** significa que la cepa es productora de  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro (y resistente a la colistina), mientras que **C** se reserva para las productoras de la carbapenemasa KPC-3. Por último, el nombre de cada cepa finaliza en un número, asignado en función de la temporalidad de su identificación, y que la diferencia del resto.

## 2.3 CONSERVACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas bacterianas procedentes de cultivos de 18-24 h en placas de agar selectivas (LB con 2 mg/L de colistina) fueron conservadas bien en crioviales o bien en suspensión celular conteniendo 20 % de glicerol.

### 2.3.1 Conservación en crioviales

Los crioviales son tubos fabricados en polipropileno autoclavable, esterilizados mediante radiación y diseñados para almacenar material biológico a temperaturas hasta  $-196$  °C, y están libres de DNAsa, RNAsa y pirógenos. Contienen perlas de vidrio recubiertas de una solución crioconservadora. Las cepas se sembraron en medio LB agar y se incubaron en aerobiosis, a 37 °C durante 18-24 h. Tras esta primera incubación se realizó el pase de una de las colonias a un medio selectivo, LB agar suplementado con 2 mg/L de colistina, que fue incubado en las mismas condiciones que el cultivo previo. A partir de este cultivo, y utilizando

un asa de siembra estéril, se transfirieron las colonias resultantes a los crioviales, dejándolos reposar durante 2-3 min; a continuación, se procedió a extraer el medio contenido en los tubos mediante una pipeta estéril tras lo que se procedió a su almacenamiento a -80 °C.

### **2.3.2 Conservación en glicerol**

Partiendo de un cultivo bacteriano puro se toma una colonia y se inoculó en medio selectivo, LB líquido suplementado con 2 mg/L de colistina y se incubó en aerobiosis y agitación (150 rpm), a 37 °C durante 18-24 h. Se transfirieron 300 µL de este cultivo a tubos de 1,5 mL y se añadió a cada tubo 200 µL de glicerol estéril diluido al 50 % en H<sub>2</sub>O, tras cuya homogenización se procedió a su almacenamiento a -80 °C. Las cepas bacterianas objeto de estudio en esta tesis doctoral se conservan por duplicado en congelación a -80°C, manteniendo así dos colecciones (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Veterinaria de la UEX y en el laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres).

## **2.4 DETECCIÓN Y ANÁLISIS INICIAL DE CEPAS RESISTENTES**

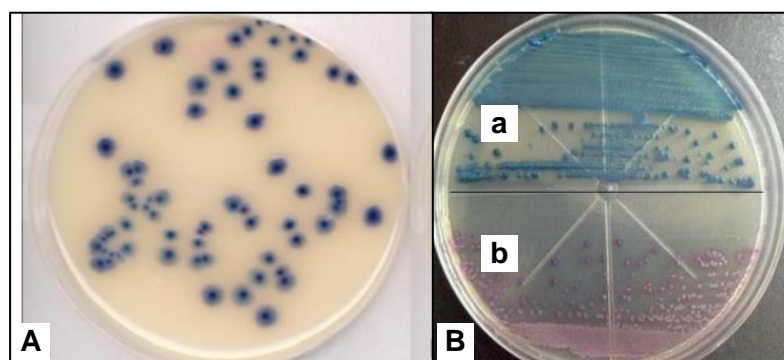
### **2.4.1 Identificación y sensibilidad antimicrobiana**

Se realizó la detección de cepas productoras de ESBLs, carbapenemasas y resistentes a colistina de la siguiente forma: las muestras provenientes de pacientes infectados o colonizados se procesaron para cultivo bacteriológico, y los aislados resultantes fueron identificados y realizadas pruebas de sensibilidad antimicrobiana por microdilución utilizando el sistema automático MicroScan (Beckman Coulter, CA, EE.UU.). La identificación bacteriana se confirmó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y la producción de ESBLs utilizando tiras de gradiente. Para la identificación de carbapenemasas se utilizaron inicialmente pruebas de detección rápida, confirmada posteriormente mediante una PCR a tiempo real (GeneXpert; Cepheid). Las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a colistina se procesaron en placas de agar Müeller Hinton II con colistina (2 mg/L) para confirmar su resistencia. Todas las cepas que cumplían los criterios establecidos pasaron a formar parte de nuestro estudio.

#### *2.4.1.1 Cultivos de vigilancia*

Para la identificación de pacientes hospitalarios colonizados por microorganismos multirresistentes se procedió a sembrar las muestras de exudados rectales en medios cromogénicos y selectivos: Brilliance ESBL™ (Thermo Fisher Scientific), que lleva añadido

cefepodoxima como marcador de ESBLs, y CHROMagar™ *Acinetobacter* (CHROMagar, France), que lleva un suplemento de inhibidores y carbapenemas, y aunque habitualmente su uso es el aislamiento de *Acinetobacter spp.*, también permite aislar enterobacterias productoras de carbapenemasas (Gozde O. et al., 2014). Estas cepas se identificaron mediante espectrometría de masas y se realizó antibiograma con paneles MicroScan (Beckman Coulter).



**Figura 2.1.** A, *E. coli* productor de ESBL en medio Brilliance ESBL™ . B, enterobacterias productoras de KPC en medio CHROMagar (a, *Acinetobacter*; b, *E. coli*).

#### 2.4.1.2 Sistema automático MicroScan

Este sistema (MicroScan; Beckman Coulter, CA, USA) ofrece resultados fiables tanto en identificación como sensibilidad bacteriana, utilizando distintos paneles que constan de 96 pocillos con sustratos cromogénicos deshidratados que permiten la identificación bacteriana y concentraciones seriadas de antibióticos, igualmente deshidratadas, que nos aportan información sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los microorganismos analizados.

Se utilizaron diferentes paneles, que según el caso fueron: ID/AST (identificación y antibiograma) B1016-159 y B1016-191 (muestras urinarias), y B1016-142 y B1016-192 (resto de las muestras, enterobacterias); o bien AST (antibiograma bacilos Gram negativos) B1016-175 y C32368. En la preparación del inóculo se toman con el inoculador (Sistema inoculador Prompt) 2-3 colonias aisladas, se destapa el diluyente del inóculo introduciendo el inoculador con las colonias dentro del mismo, mezclando por inversión suave varias veces, y dejando reposar durante 1 min. A continuación, se vierte el contenido del frasco diluyente en la bandeja y se tapa. Utilizando el inoculador rehidratante RENOK se dispensa el contenido de la bandeja en el panel correspondiente, tapándolo e incubando durante 18-24 h a 37 °C. Los resultados son interpretados mediante LabPro, un programa que posee una amplia base de datos actualizada,



mientras que la categorización clínica de los valores de CMI obtenidos se realizó siguiendo los puntos de corte establecidos por EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*).

#### 2.4.1.3 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*MALDI-TOF MS*, por “matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry”) es un método rápido, necesitándose solo unos pocos min para la identificación y clasificación de microorganismos mediante su espectro  $m/z$  (característico de género y, normalmente, especie), comparándolo con los existentes en su base de datos. Esta técnica permite determinar la “huella dactilar molecular” (patrón de las proteínas más abundantes, principalmente ribosomales, presentes en el microorganismo), única y característica de la mayoría de las bacterias, permitiendo así una identificación fiable a nivel de género y, normalmente, especie.

Las colonias que crecieron en placas de agar sangre fueron identificadas mediante MALDI-TOF MS, que se realizó a partir de una única colonia colocada sobre una placa de titanio punteada que se cubrió con 1  $\mu$ l de matriz (ácido-ciano-4-hidroxicinamínico). Se empleó el equipo MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Alemania) y el espectro resultante de cada cepa se analizó con el software FlexControl 3.0 comparándolo con la base de datos. Los resultados vienen expresados con una puntuación de 0 a 3, que expresa el grado de confianza en el resultado, siendo no fiables valores  $\leq 1,7$ ; valores entre 1,7-2 corresponden a una identificación fiable de género; y valores  $\geq 2$  una identificación fiable a nivel de especie.

#### 2.4.1.4 Tiras de gradiente de CMI

Este método, también conocido como “Epsilon test” o “Etest”, está basado en la difusión de un antibiótico conocido desde un soporte sólido, y nos permite conocer la CMI o concentración mínima inhibitoria. Aprobado por la FDA en 1991, es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana, siendo sencillo y que se correlaciona bien con la dilución en medio. Usa tiras de plástico de 6 cm de largo x 5 mm de ancho impregnadas en un gradiente predefinido del antibiótico, el cual difundirá al medio, creando un gradiente bidimensional continuo de las concentraciones del antibiótico en el medio. Partiendo de colonias crecidas en placas de agar, tras incubación durante 18-24 h, se realiza una suspensión bacteriana en suero fisiológico para obtener una turbidez del 0,5 de McFarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/mL). Mediante una torunda de algodón estéril se inocula el medio de cultivo, en este caso agar Müeller Hilton (MH), en toda su superficie de forma homogénea,

sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando la torunda por el agar tres veces, rotando la placa unos 60 °C cada vez, y finalmente pasándola por la periferia. Se colocan las tiras sobre el agar, que se separan entre ellas unos 2 cm, evitando la formación de burbujas de aire debajo de las mismas. Se incubarán a 37 °C durante 18-24 h. Tras la incubación podremos saber qué valor de CMI tiene el microorganismo, cuyo valor será el punto en el que el extremo de inhibición elipsoidal intersecciona con la tira. Para confirmar que el fenotipo del antibiograma de una cepa corresponde realmente a un microorganismo productor de betalactamasa, ESBL o AmpC, se utilizaron tiras de Etest (bioMérieux): cefotaxima +/- clavulánico (CT/CTL), ceftazidima +/- clavulánico (TZ/TZL), cefepime +/- clavulánico (PM/PML) y cefotetán +/- cloxacilina (CN/CNI), siguiéndose los criterios recomendados por EUCAST (EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0).

#### *2.4.1.5 Dilución en agar*

Se utilizó este procedimiento para confirmar la resistencia a colistina de los aislados identificados con fenotipo resistente mediante el sistema automático MicroScan (Beckman Coulter). Para ello se realizó una suspensión bacteriana con NaCl al 0,9 % para obtener una turbidez de 0,5 McFarland y se sembraron en placas de (MH-II) suplementadas con colistina (2 mg/L). Mediante una torunda de algodón estéril se inoculan 10µl en toda su superficie de forma homogénea. Estas placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h.

#### *2.4.1.6 Determinación de la CMI a colistina mediante el método de microdilución en caldo*

La determinación de la sensibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de referencia de microdilución en medio, un protocolo adaptado de CLSI M7-A10 y basado en la norma ISO 20766-1 siguiendo las recomendaciones de EUCAST publicadas en 2016 (Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. [www.eucast.org](http://www.eucast.org) 22 March 2016.) en las que se establece el uso de medio ajustado en cationes MH-II, sin aditivos y, utilizando sulfato de colistina en placas de poliestireno de fondo redondo, no tratadas previamente. La solución de antibiótico se debe preparar a una concentración tal que duplique la deseada, de manera que esta se alcance al agregar el inóculo bacteriano. Para preparar las placas de microdilución se realizaron diluciones seriadas de colistina (concentraciones desde 2 a 128 µg/mL), y se dispensaron 50 µl de estas diluciones en cada uno de los pocillos. En todas las determinaciones,

se incluyó un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico) y un control negativo (medio sin inocular). Se ajustó el inóculo bacteriano a una turbidez de 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml), realizando una dilución 1/100 de esta suspensión en MH II ( $1,5 \times 10^6$  UFC/ml). Se inocularon 50  $\mu$ l del inóculo diluido en cada pocillo de la placa, de esta manera el volumen final en cada pocillo será de 100  $\mu$ l: 50  $\mu$ l de antibiótico + 50  $\mu$ l de inóculo bacteriano (inóculo final  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL). Se selló la placa con una película plástica autoadhesiva y se incubó a 37° C durante 18-24 h. Finalmente, para interpretar los resultados se aplicaron los puntos de corte propuestos por EUCAST: sensible  $\leq 2$   $\mu$ g/ml y resistente  $\geq 4$   $\mu$ g/ml, usándose como control la cepa ATCC 25922 de *E. coli*.

## **2.4.2 Caracterización de carbapenemasas mediante pruebas de detección rápida.**

### *2.4.2.1. Ensayo “NG-Test Carba 5”*

Se utilizó un inmunoensayo cualitativo de flujo lateral (NG-Test Carba 5, NG- Biotech) para la detección y diferenciación de las cinco familias de carbapenemasas más prevalentes (NDM, IMP, VIM, OXA-48 y KPC). Estos métodos están basados en la captura inmunológica de epítomos de las diferentes carbapenemasas, utilizando nanopartículas de oro coloidales unidas a una membrana de nitrocelulosa dentro de un dispositivo de flujo lateral (EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11)). Son test rápidos, tardan 15 min, y además pueden realizarse directamente en muestras clínicas. Un estudio reciente realizado (Fauconnier et al. 2019) ha mostrado una alta especificidad (100 %) para la detección de NDM, OXA-48 y KPC, con una sensibilidad del 96 % para la detección de portadores fecales de carbapenemasas.

### *2.4.2.2 PCR múltiple en tiempo real*

Otra forma de detectar las carbapenemasas en el laboratorio es utilizando una PCR múltiple en tiempo real mediante el sistema GeneXpert (Cepheid). Se trata de una prueba de amplificación de ácido nucleico basada en cartucho (CBNAAT) que permite detectar las cinco familias más prevalentes de carbapenemasas (NDM, IMP, VIM, OXA-48 y KPC). Con ayuda de un hisopo se toma una colonia y se inserta en el interior del vial de elución, quedando allí durante 30 s. Después, se agita la muestra en el vórtex durante 30 s, y seguidamente se transfiere el contenido al cartucho. Tras insertar el cartucho en la plataforma GeneXpert para que

comience el ensayo y esperar aproximadamente 50 min se procederá al análisis de datos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.5 CARACTERIZACIÓN PROFUNDA DE LAS CEPAS RESISTENTES: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa.**

Para visualizar el tamaño y/o cantidad de los ácidos nucleicos (DNA o RNA) se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa (agarosa D-1, “low EEO”, ThermoFisher). El porcentaje de agarosa utilizado varió en función del tamaño de los fragmentos y/o la separación deseada. Así, la concentración de agarosa osciló entre 0,8-1,2 % en tampón Tris-borato-EDTA 1x (10x TBE Buffer, ThermoFisher) usando cubetas horizontales (LABOLAN) a 70 V y durante 30-60 min. Para visualizar los ácidos nucleicos se usó SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) a una dilución 1:20000. Como marcador de peso molecular se usaron escaleras de DNA de 1kb y 100 bp (gTP bio). Para la visualización de los productos de PCR en el gel de agarosa se empleó un transiluminador UV junto con un sistema de documentación de imágenes (Chemidoc, Bio-Rad).

### **2.5.2 Extracción y purificación de ácidos nucleicos**

#### *2.5.2.1 Aislamiento de DNA mediante el método de “boiling”*

Es una técnica sencilla y rápida que permite obtener un DNA que, aunque de calidad inferior al obtenido usando sistemas comerciales, permite realizar un cribado preliminar mediante PCR de los aislados clínicos. Así, de un cultivo líquido crecido en 1 mL de LB durante toda la noche a 37 °C en agitación (150 rpm), se transfieren 100 µL a un Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugan durante 1 minuto a 16000 x g. Posteriormente se retira el sobrenadante y se añade 1 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8) o H<sub>2</sub>O, se agita en vórtex para disgregar el pellet y se hierve en un termobloque a 100 °C durante 5 min. Por último, se centrifuga a 16000 x g durante 5 min y se recupera el sobrenadante, que se almacena a -20 °C. La obtención de DNA mediante este método puede hacerse también a partir de colonias obtenidas en placas de LB agar. Se toma una colonia y se introduce en un tubo Eppendorf de 1,5 mL donde previamente se han añadido 500 µL de TE o H<sub>2</sub>O y se agita en vórtex. Después se centrifuga durante 2 min a 16000 x g y se elimina el sobrenadante, añadiendo posteriormente 1 mL de TE o H<sub>2</sub>O y se continua del mismo modo que en el caso anterior.

### 2.5.2.2 Aislamiento de DNA genómico

Se usó el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) para aislar un DNA genómico de la mayor calidad. Brevemente, se transfirió 1 mL de cultivo, tras una noche de incubación a 37 °C con agitación, a un tubo Eppendorf de 1,5 mL libre de nucleasas y se centrifugó durante 5 min a 7500 rpm, eliminando posteriormente el sobrenadante. Sobre las células se añadió un volumen de Buffer ATL hasta completar 180 µL y se agitó vigorosamente. Posteriormente se añadieron 20 µL de proteinasa K, se agitó en vórtex, y se incubó en un termobloque a 56 °C durante 30 min, agitando 2 o 3 veces para favorecer la lisis. Para garantizar que el DNA estuviera libre de RNA se añadieron 4 µL de RNasa A (100 mg/mL), se agitó durante 15 s y se incubó 2 min a temperatura ambiente (15-25 °C). Posteriormente se añadieron 200 µL de Buffer AL a la muestra, y se agitó en vórtex durante 15 s, incubando a 70°C durante 10 min. A continuación, se añadieron 200 µL de etanol absoluto, agitando en vórtex durante 15 s. Se transfirió todo el contenido a la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Se desechó el filtrado y se añadieron 500 µL de Buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, descartando el filtrado. Se añadieron 500 µL de Buffer AW2 al tubo y se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min, desechando el filtrado y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Se pasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 200 µL de Buffer AE ó H<sub>2</sub>O, incubando durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugando a 8000 rpm durante 1 min. Por último, desechamos la columna y almacenamos el DNA a -20 °C.

### 2.5.2.3 Extracción y purificación de RNA total.

Para la extracción de RNA se usó el sistema (kit) “Aurum Total RNA Mini Kit” (Bio-Rad). Siguiendo las indicaciones del fabricante, se inoculó 1 colonia de placas LB agar suplementadas con 2 mg/L de colistina para cepas resistentes o LB agar para cepas sensibles en 2 mL de MH-II y se incubó a 37 °C en agitación suave (150 rpm) durante 18-24 h. Al día siguiente se diluyó el cultivo 1:100 en medio MH-II fresco y se incubó de nuevo a 37 °C, con alta agitación (200 rpm) hasta alcanzar una absorbancia (DO<sub>600nm</sub>) entre 0,3 y 0,5. Posteriormente se centrifugó un volumen equivalente de células de 2-3 unidades totales de absorbancia a 10000 rpm durante 1 min y a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de 500 mg/L de lisozima en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH7,5), disgregando las células mediante pipeteo y 350 µL de la solución de lisis. A continuación, se añadieron 250 µL de isopropanol al 70 %, se mezcló bien y transfirió la mezcla a la columna; se centrifugó durante 30 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Posteriormente se añadieron a la columna 700 µL de solución de lavado “low-stringency” y se centrifugó durante 30 s a 13000 rpm,

descartando de nuevo el filtrado. Se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de DNasa I del kit sobre la columna y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de solución de lavado “high-stringency” sobre la columna y se centrifugó durante 30 s a 13000 rpm, descartando el filtrado. Se añadió de nuevo 700  $\mu\text{L}$  de solución de lavado “low-stringency” y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm descartando el filtrado, centrifugando de nuevo durante 2 min en vacío para eliminar la solución de lavado residual. Por último, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 60  $\mu\text{L}$  de la solución de elución, dejando durante 1 minuto que la solución sature la membrana, centrifugando posteriormente durante 2 min a 13000 rpm y almacenando el eluido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.5.2.3.1 Tratamiento con DNasa I

Para garantizar que el RNA total purificado estuviera libre de DNA genómico contaminante, las muestras se sometieron a un segundo tratamiento utilizando la enzima DNasa I (“Turbo DNA-free kit”, Ambion). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se preparó una mezcla con 13  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$  de 10x buffer, 1  $\mu\text{L}$  de DNasa I y 4  $\mu\text{L}$  del RNA total purificado para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se incubó en un termobloque a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 25-30 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 2  $\mu\text{L}$  del reactivo de inactivación y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min, mezclando 3-4 veces para favorecer la inactivación. Finalmente se centrifugó a 10000 g durante 1.5 min y se recuperaron 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La integridad del RNA aislado y tratado con DNasas se verificó en electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % durante 60 min a un voltaje constante de 60 V.

#### 2.5.2.3.2 Síntesis de cDNA.

La síntesis de DNA complementario, DNA copia o cDNA, se realizó mediante el sistema (kit) “PrimeScript™ RT” (Takara) en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Siguiendo las instrucciones del fabricante, las condiciones de síntesis consistieron en un ciclo de 15 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para transcriptasa inversa y un ciclo de 5 s a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su inactivación. Al final de la síntesis, el cDNA fue diluido 1:10 en  $\text{H}_2\text{O}$  y conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5.3 PCR (convencional)**

La presencia de genes *ESBLs* y *mcr* se determinó mediante PCR convencional usando cebadores específicos o degenerados. Además, las secuencias codificantes de los genes *pmrA* y *pmrB* se amplificaron, y los fragmentos fueron purificados y secuenciados para localizar

polimorfismos asociados a la resistencia a la colistina. En todas las reacciones se usaron controles positivo y negativo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Techne Prime, conteniendo 20  $\mu$ L de una mezcla que incluye un tampón de reacción optimizado para MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, y Taq DNA polimerasa (dependiendo de cada secuencia diana), 1  $\mu$ L de muestra de DNA obtenida mediante hervido, los cebadores indicados (tabla 1) y completando con H<sub>2</sub>O hasta 20  $\mu$ L de volumen final. Las condiciones de PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguido de 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una hibridación durante 30 s a la temperatura indicada para cada pareja de cebadores y una extensión a 72 °C durante 1-2 min (dependiendo del tamaño esperado para cada amplicón), seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. La identificación de genes de resistencia *mcr* y *bla* se llevó a cabo empleando “Dream Taq DNA polymerase” (Thermo Fisher), una enzima que carece de actividad correctora de errores, mientras que la amplificación de los genes *pmrA* y *pmrB* para analizar sus posibles polimorfismos se realizó con la enzima de alta fidelidad “Phusion Green DNA polymerase” (Thermo Fisher).

**Tabla 1.** Cebadores empleados en la PCR (convencional) para la detección de genes de resistencia frente a la colistina y a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.

Genes	Secuencia 5'-3'	C <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	S <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-6</i>	F-TGYGGCACATCGACGGCGTA R-ATACCGACATCRGRCATTTCGTT	0,125		266 bp	
<i>mcr-3</i> , <i>mcr-7</i>	F-GTSCCCTGCATGTTCTCCAA R-AACGCSGTGTTGTACTTATCTTC	0,5	60 °C	494 bp	Campos y col., 2023
<i>mcr-4</i> , <i>mcr-8</i>	F-ACGGCYACSGRRTRTCWCTAC R-ATGRTCAGARAGATAYAKCATWGCA	0,5		534 bp	
<i>mcr-5</i>	F-GCGGTTGTCCTGCATTATCACT R-CTTGTTTCCAGCCCGTTCGT	0,125		464 bp	
<i>mcr-1</i>	F-CGGTCAGTCCGTTTGTTC R-CTTGTCGGTCTGTAGGG	0,5	68 °C	309 bp	Liu y col., 2016
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F-ATGCGTTATATTCGCCTGTG R-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	0,4		747 bp	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	0,4	60 °C	445 bp	Monstein y col., 2007
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	F-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	0,4		593 bp	
<i>pmrA</i>	F-AGTTTTCTCATTTCGCGACCA R-TACCAGGC TGCGGATGATATTCT	0,5	65 °C	714 bp	Quesada y col., 2015
<i>pmrB</i>	F-GGATGGCCTGATGTGACGCTGTC R-GCGCGGCTTTGGCTATA TGCTG	0,5		1312 bp	

Características de la PCR: <sup>1</sup>concentración de cada cebador ( $\mu$ M), <sup>2</sup>temperatura de alineamiento, <sup>3</sup>tamaño esperado del amplicón, <sup>4</sup>referencias.

Para la detección de genes *mcr* se usaron controles positivos de las variantes: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*, así como controles negativos conteniendo H<sub>2</sub>O en vez de DNA. Se usaron dos estrategias a la hora de identificar estas secuencias en las cepas del estudio: En un primer momento, se realizó una PCR con cebadores específicos para detectar *mcr-1* (tabla

1), ya que este fue el primer gen *mcr* detectado y sigue siendo el más prevalente entre los que se consideran auténticos determinantes de resistencia a la colistina (Liu et al., 2016; Gallardo et al., 2020). Una posterior PCR múltiple con cebadores degenerados (tabla 1), que detectan al mismo tiempo distintas variantes dentro de la familia *mcr* (Campos et al., 2023), se empleó para descartar la presencia de otros genes *mcr*.

En aquellos casos donde los productos debían ser secuenciados, finalizada la reacción de PCR se visualizó 1  $\mu$ L de su producto tras electroforesis en gel de agarosa como prueba diagnóstica, para posteriormente purificar el total directamente de la mezcla de PCR o bien, para PCR menos robustas y donde aparecen bandas inespecíficas, a partir del trozo de gel con la separación tras fundirlo en un paso previo a 55 °C durante 10 min, usando el sistema comercial “MEGAquick spin Plus Total Fragment DNA Purification kit” (iNtRON Biotechnology) y siguiendo las indicaciones del fabricante, para un volumen final de elución de 30  $\mu$ L. Finalmente, el fragmento se cuantificó en gel de agarosa usando 1  $\mu$ L del eluido y usando como referencia los valores de concentración de la escalera de DNA 1kb (gTPbio). Una vez purificados y cuantificados, los productos fueron secuenciados (StabVida, Portugal) y analizados mediante el programa Chromas Lite (Technelysium, Pty. Ltd.). Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los mismos que se emplearon en las diferentes reacciones de PCR convencional.

#### **2.5.4 PCR cuantitativa (qPCR)**

Se realizó la optimización de los cebadores mediante rectas estándar para cada pareja usada, comprobándose que su eficiencia ( $E=10[-1/\text{pendiente}]$ ) fue similar y cercana al 100 % entre las distintas parejas usadas en cada muestra. Se utilizó un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 (ThermoFisher, Madrid, España) en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min, 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 25 s. Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L conteniendo 10  $\mu$ L de TB Green Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.), 0,5  $\mu$ L de cada cebador (250 nM cada uno; tabla 2; sintetizados por StabVida, Portugal), 0,4  $\mu$ L de fluoróforo de referencia ROX y 3,6  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, que se completaron con 5  $\mu$ L de cDNA obtenido según se explicó previamente (apartado 5.2.3.1). Tras cada qPCR se realizó una curva de disociación de 65°C a 95°C con un incremento de temperatura de 1°C cada 10 s, para confirmar la especificidad de las amplificaciones detectadas por SyBrGreen. La estrategia de cuantificación utilizada para el análisis de la expresión génica por RTqPCR fue una cuantificación relativa utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen; 2001). Este método consiste en comparar



directamente los valores de  $C_i$  de un gen diana respecto de un gen calibrador ( $\Delta C_i$ ), que no varía con el tratamiento en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta C_t$  de las muestras problemas con respecto a la muestra control o normalizadora: siendo el resultado expresado como expresión relativa, igual a  $2^{-[\Delta C_t \text{ muestra} - \Delta C_t \text{ control}]}$  (expresión relativa =  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ ). Se utilizaron como muestras normalizadoras del nivel de expresión el mRNA (y su cDNA) aislado en las mismas condiciones de dos cepas sensibles a colistina, *E. coli* ATCC25922 y la cepa HSPKC08 (*K. pneumoniae* ST307 y *bla<sub>KPC-3</sub>*), mientras que los niveles de expresión de *recA* para *E. coli* y *rpsL* para *K. pneumoniae* se usaron para calibrar la concentración de las muestras de partida. Para cada determinación se utilizaron dos réplicas biológicas, incluyendo en cada placa dos réplicas técnicas de cada una de ellas. Además, cada placa contenía controles positivos y controles negativos, que incluyen todos los componentes de la reacción excepto la muestra que se sustituye por H<sub>2</sub>O.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en qPCR para medidas de expresión génica en *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Diana	Secuencia 5'-3'	T <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	Especie	Referencia
<i>arnB</i>	F-ATTGGCAAGGGCGATGAA R-AGGCGTGACCATCAGCGTAT	60 °C	126	<i>E. coli</i>	Gallardo A, et al 2021
<i>pmrC</i>	F-ACGGCAACGGCAGTTT R-CCGCTCGCTGAATGATATCCA	60 °C	112	<i>E. coli</i>	Gallardo A, et al 2021
<i>recA</i>	F-GTATGATGAGCCAGGCGATGC R-GCGCGTTACCACCGGTAGTG	60 °C	138	<i>E. coli</i>	Gallardo A, et al 2021
<i>arnT</i>	F-GGTGTATGCGATTGGCACCTA R-AGCAGCACGTAGCCCAGTAT	59 °C	132	<i>Klebsiella</i>	Haeili M, et al 2017
<i>pmrC</i>	F-CTCTCGCCTCGTTCCTGAA R-CGGAGTGGTGTCGAGGATA	59 °C	140	<i>Klebsiella</i>	Haeili M, et al 2017
<i>rpsL</i>	F- CCGTGGCGGTCGTGTTAAAGA R- GCCGTACTIONGGAGCGAGCCTG	59 °C	109	<i>Klebsiella</i>	Cannatelli et al., 2013

Características de la PCR: <sup>1</sup>temperatura de alineamiento, <sup>2</sup>tamaño esperado del amplicón.

## 2.5.5 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Se utilizó el equipo Chef-DR II System (BioRad), y los reactivos necesarios fueron proporcionados por la misma empresa. Brevemente, esta técnica consta de tres pasos: preparación de bloques de agarosa, digestión de los bloques con enzimas de restricción y electroforesis en campo pulsado del producto digerido.

### 2.5.5.1 Preparación de los bloques de agarosa.

A partir de un cultivo crecido el día anterior en medio selectivo (LB agar con o sin colistina, 2 mg/L, dependiendo de cada cepa), se prepara una suspensión bacteriana disgregando parte del cultivo en 1 ml de tampón CSB (Tris-HCl 100 mM y EDTA 100 mM, pH8). Se realizó una dilución 1:10 de la suspensión anterior en H<sub>2</sub>O y se midió la absorbancia a 600nm de

longitud de onda. Las suspensiones deben tener una densidad óptica entre 0,5 y 1. Una vez medida su absorbancia, y dependiendo de la misma, se preparan las soluciones de manera que: si tienen alrededor de 0,5 de absorbancia, se mezclan 75  $\mu$ L de la suspensión inicial con 75  $\mu$ L de CSB; si tienen alrededor de 0,8 de absorbancia, se mezclan 50  $\mu$ L de la suspensión inicial con 100  $\mu$ L de CSB; y si tienen alrededor de 1 de absorbancia, se mezclan 37,5  $\mu$ L de la suspensión inicial con 112,5  $\mu$ L de CSB. En un tubo Eppendorf, a estos 150  $\mu$ L de cada suspensión celular estandarizada se le adicionaron 7,5  $\mu$ L de proteinasa K 20 mg/mL, para conseguir una concentración final en los bloques de agarosa de 0,5 mg/mL. A continuación, se preparó una mezcla de agarosa al 2 % en tampón TE (Tris-HCl 1mM, EDTA 10 mM, pH 8), disuelta mediante calentamiento en microondas y posteriormente enfriada hasta 55 °C, momento en que se suplementa con SDS. Aún atemperados a 55 °C, 150  $\mu$ L de esta disolución de agarosa, TE y SDS se añadieron a cada tubo conteniendo 150  $\mu$ L células previamente diluidas, y la mezcla resultante se repartió en moldes hasta que solidificaron los bloques. Cada bloque de agarosa se traspasa a un tubo Eppendorf al que se añaden 500  $\mu$ L de tampón de lisis (lauril sarcosina 1 %, Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,05 M, pH 8) suplementado con proteinasa K 0,1 mg/mL, incubándose durante 3 h o toda la noche en la disolución de lisis a 50 °C. Una vez transcurrida la incubación, se eliminó el tampón de lisis y se pasaron los bloques a un tubo Falcon de 15 mL para lavarlos, eliminando los restos de disolución que puedan quedar. Se realizaron dos lavados de 30 min cada uno con H<sub>2</sub>O, seguidos de dos lavados más de 30 min cada uno en TE. Finalmente, los bloques se guardaron en TE a 4 °C hasta su uso.

#### 2.5.5.2 *Digestión del DNA*

Los bloques de agarosa se escindieron en 3 secciones, cada una de ellas del tamaño aproximado de un pocillo para la PFGE. La digestión con la enzima XbaI se realizó preincubando los bloques con 200  $\mu$ L del tampón recomendado para la enzima durante 15 min a temperatura ambiente, para posteriormente incubarlos con 0.4 U/ $\mu$ l de XbaI a 37 °C durante 3-4 h o toda la noche. Finalmente, cada bloque se lavó dos veces con 1 mL de CSB frío, para finalmente añadirle 1 mL de TE y conservarlo a 4 °C.

#### 2.5.5.3 *Electroforesis y tinción del PFGE*

En la preparación del gel se utilizó agarosa ultrapura especial para PFGE (BioRad) al 1% y TBE al 0,5X, sellándose los pocillos conteniendo los bloques con una disolución atemperada a 55 °C y con la misma composición del gel. A continuación, se separaron los fragmentos de DNA mediante electroforesis en campo pulsado en el sistema CheF-DR II

System (BioRad), empleando como tampón de electroforesis 2 L de TBE al 0,5X. Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: 6 V/cm, con pulsos de 2,2 a 63,8 s y 21 h. La temperatura a la que se realizó el campo pulsante fue de 14 °C y la bomba se mantuvo al 80 % de su velocidad máxima. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (20 mg/mL en TBE 0.5X) durante 30 min en agitación muy suave. Seguidamente se realizan dos lavados de 30 min cada uno con H<sub>2</sub>O, y se capturó una imagen de las bandas durante su exposición a una fuente de radiación UV, colocando al lado del gel una regla como referencia.

### **2.5.6 Transferencia horizontal de genes: Conjugación**

Para caracterizar los plásmidos con determinantes de resistencia a colistina se realizaron ensayos de conjugación, determinándose la frecuencia de conjugación de cada cepa. Para ello se utilizó como cepa receptora *E. coli* J53, una cepa derivada de *E. coli* K12, resistente a azida sódica, mientras que las cepas donadoras eran portadoras del *gen mcr-1* y, por tanto, resistentes a colistina. Tanto la cepa receptora como las donadoras se cultivaron en medio de agar selectivo, suplementado con azida 100 mg/L o colistina 2 mg/L, respectivamente, incubándose a 37°C durante 18-24 h. Mediante un asa estéril se transfirió el crecimiento bacteriano a 1 mL de medio LB, agitando para obtener una suspensión homogénea. A continuación, se centrifugó durante 3 min a 5000g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se disgregó en 50-150 µL de LB, dependiendo del crecimiento celular y del número de conjugaciones a realizar. Posteriormente se realizaron mezclas 1:1 de células donadores y receptoras, depositándose gotas de 10-50 µL sobre la superficie de placas de medio LB, incluyéndose controles (células donadoras o receptoras sin mezclar entre sí), y esperándose unos minutos hasta su completa absorción y secado antes de invertir las placas e incubarlas a 37°C durante 18-24 h. A continuación, se recogieron las células mediante un asa estéril y se disgregaron en 1 mL de medio LB, del que se realizaron diluciones seriadas que se sembraron por triplicado en los distintos medios selectivos necesarios para el recuento de viables resistentes a colistina (donadoras+conjugantes), resistentes a azida (receptoras más conjugantes), y resistentes a la doble selección (conjugantes). La frecuencia de conjugación se calculó como dos índices: conjugantes por cada célula receptora y conjugantes por cada célula donadora.

### **2.5.7 Análisis de la modificación del lípido A mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.**

El lípido A se extrajo a partir de un inóculo de 5 ml de medio LB usando una sola colonia que se creció durante la noche a 37 °C. Al día siguiente se midió la DO<sub>600nm</sub> y se inocularon 200 ml de cultivo con una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0,05, creciendo las células hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0,8-1. Las células se recogieron mediante centrifugación a 10000 g durante 10 min y se aisló el lípido A siguiendo el protocolo estándar (Hankins y col., 2013). Una vez purificado, las muestras se enviaron en CHCl<sub>3</sub> a 4 °C al “*Servicio de Química Sostenible i Energies Renovables de la Universidad Rovira i Virgili*” (Universidad de Tarragona), que se encargó de evaporar el solvente bajo corriente de N<sub>2</sub> y de la determinación de especies moleculares mediante espectrometría de masas en un equipo UHPLC-HRMS (Thermo Orbitrap ID-X).

### **2.5.8 Secuenciación del genoma completo (WGS)**

El DNA genómico de las cepas se aisló mediante el sistema “QIAamp DNA Mini Kit” (ver apartado 5.2.2) a partir de 1 mL de cultivo crecido durante toda la noche en medio MH-II. Previo a su envío, el DNA fue cuantificado y su integridad se verificó visualizándolo mediante electroforesis en 0.8% de agarosa (ver apartado 5.1) durante 1 h a 70 V. Los genomas se secuenciaron utilizando la metodología HiSeq X10 (Illumina; San Diego, USA) en la empresa StabVida (Portugal). Las lecturas generadas se ensamblaron de novo en contigs con SPAdes v3.13.0 aplicando los modos *scareful* y *autocut-off*, recibiendo en nuestro laboratorio los archivos en formato *fasta* con los que se realizaron todos los análisis efectuados en este trabajo. En un único caso en este trabajo se llevó a cabo la secuenciación masiva mediante tecnología de molécula única, utilizando la metodología Minion (Oxford Nanopore Technologies plc., Oxford, UK) en la empresa Longseq Applications SL (Empresa de base tecnológica, Universidad de Murcia), que también nos proveyó con el archivo *fasta* del genoma secuenciado.

## **2.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

Los genes de resistencia a los antimicrobianos se identificaron a partir de las secuencias genómicas utilizando la base de datos ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) y ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation), de modo que una cobertura y/o identidad por debajo del 90% fue eliminado, mientras que los plásmidos presentes se identificaron mediante PlasmidFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) y las bacterias se tipificaron mediante MLST (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) mientras que los árboles filogenéticos se construyeron mediante NDtree (Leekitcharoenphon et al., 2014).

Por otra parte, la reconstrucción de plásmidos se llevó a cabo mediante el programa Prokka v1.14 (Seemann, 2014) combinado con búsquedas mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los plásmidos se representaron gráficamente mediante el programa Proksee (Grant et al., 2023)

## **2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La comparación de variables cualitativas se realizó mediante el análisis de tablas de contingencia utilizando el estadístico Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, y se describieron mediante distribución de frecuencias. En todos los casos se aplicó la prueba de dos colas. Las variables continuas se representaron mediante el promedio  $\pm$  la desviación estándar (SD). Todos los análisis se hicieron mediante los softwares, JASP Team, 2023, Version 0.17.2, software del sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 (ThermoFisher, Madrid, España), y Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO).

El análisis de los patrones de restricción procedentes del análisis PFGE-XbaI (sección 5.5) y la elaboración de los dendrogramas de cada especie bacteriana se llevó a cabo mediante el software Bionumerics (versión 3.0 Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) utilizando el método de agrupamiento UPGMA (“unweighted pair group method using arithmetic averages”). Para calcular la similitud entre las cepas se aplicó el coeficiente de Dice, expresado entre los valores 0 y 1, siendo 1 el valor de mayor homogeneidad genética entre dos aislados. Los patrones de restricción obtenidos se interpretaron de acuerdo a los criterios de Tenover et al. (1995). Así, en función del número de diferencias (bandas) entre el patrón generado para cada muestra, se clasificó a los aislados como idénticos (mismo número de bandas y mismo tamaño), genéticamente relacionados (número de diferencias  $\leq 3$ ), posiblemente relacionados (número de diferencias entre 4 y 6) y no relacionados (número de diferencias  $> 6$ ).

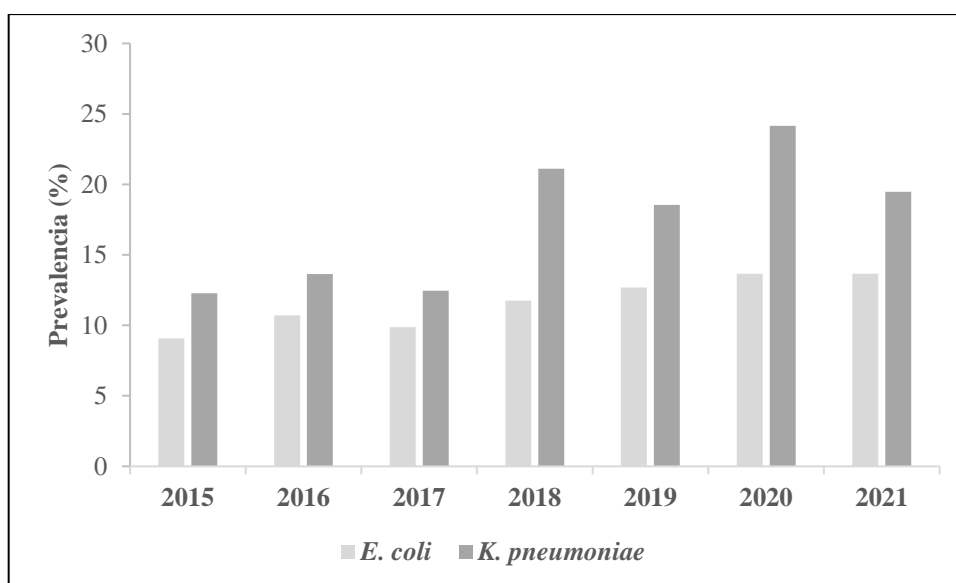
### **3. RESULTADOS**

---

### 3.1 EPIDEMIOLOGÍA DE CEPAS RESISTENTES A $\beta$ -LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO

#### 3.1.1 Incidencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadores de ESBLs, AmpC y carbapenemasas.

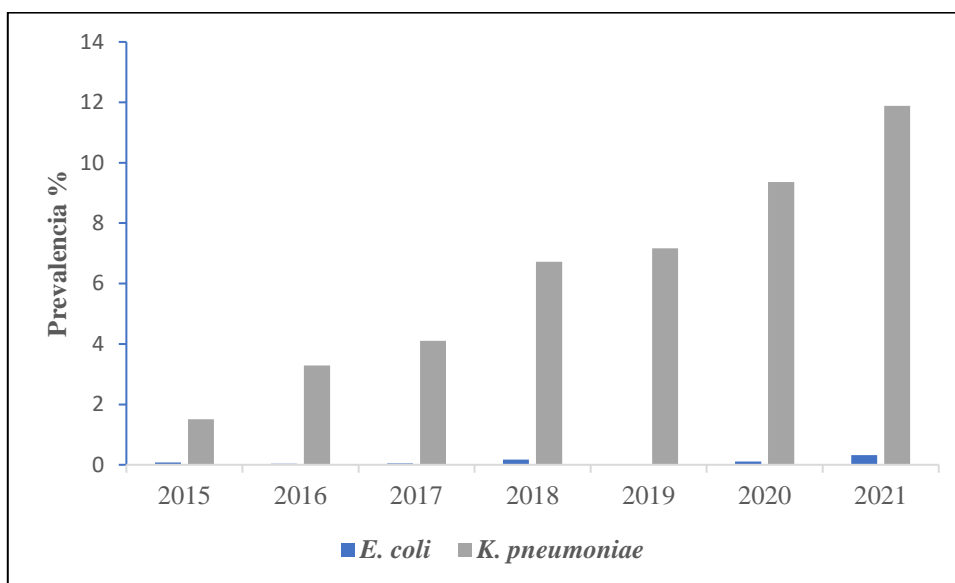
Durante el periodo 2015-2021, la prevalencia en el Área de Salud de Cáceres de *E. coli* y *K. pneumoniae* que expresan resistencia a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro ha ido aumentando progresivamente (figura 3.1).



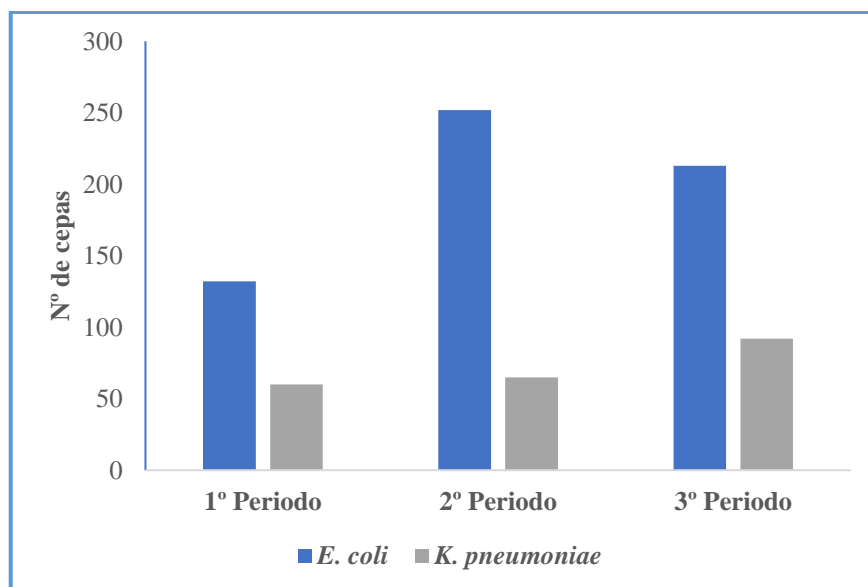
**Figura 3.1.** Prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro en el Área de Salud de Cáceres. La imagen se obtuvo directamente del equipo MicroScan (Beckman Coulter). Se muestra el % de cepas que expresan ESBL considerando el total de cada especie.

En lo referente a cepas portadoras de genes que codifican carbapenemasas es de destacar el importante protagonismo que ha adquirido *K. pneumoniae*, microorganismo cada vez más prevalente en el Área de Salud analizada (figura 3.2).

El aislamiento y caracterización de cepas de enterobacterias productoras de ESBLs, AmpC o carbapenemasa realizado en este trabajo se centró en el periodo comprendido entre octubre de 2015 hasta mayo de 2018, detectándose un total de 811 aislamientos (no duplicados) procedentes de pacientes, tanto hospitalarios como extrahospitalarios, colonizados o infectados, de los cuales 597 (73,61 %) correspondieron a *E. coli* y 214 (26,39%) a *K. pneumoniae* (figura 3.3).



**Figura 3.2.** Prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas en el Área de Salud de Cáceres. La imagen se obtuvo directamente del equipo MicroScan (Beckman Coulter). Se muestra el % de cepas que expresan carbapenemasa considerando el total de cada especie.



**Figura 3.3.** Distribución de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* correspondientes a los tres periodos de estudio.

En cuanto a la edad de los pacientes de los que proceden los aislamientos analizados en este trabajo, fue de 0 a 98 años, siendo la mediana igual a 81 años. Por intervalos, la mayor prevalencia se observó en pacientes con más de 60 años, grupo del que proceden más del 70% de los aislados de ambas especies bacterianas, si bien los aislamientos de *E. coli*, a diferencia



de *K. pneumoniae*, predominan entre los pacientes mayores de 80 años, de donde proceden más del 55% de sus cepas (tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Clasificación de los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro según especie bacteriana y edad de los pacientes.<sup>§</sup>

Rango de edad (años)	Especie (n; %) <sup>&amp;</sup>	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<21	9; 1,51	3; 1,40
21-40	31; 5,19	10; 4,67
41-60	63; 10,55	38; 17,76
61-80	161; 26,97	85; 39,72
>80	333; 55,78	78; 36,45
<b>Total</b>	597	214

<sup>§</sup>Para el conjunto de datos:  $\chi^2=26,72$ ; gl=4; p<0,001.

<sup>&</sup>Referido (%) al total de cada especie.

Según el género de los pacientes de donde proceden los aislados, el 41,06% eran hombres y el 58,94 % mujeres (tabla 3.2). Del total de aislamientos, un 92,60% correspondía a pacientes que estaban infectados y un 7,39% a pacientes colonizados, siendo las infecciones más frecuentes las del tracto urinario (77,68%), seguidas por las de piel y partes blandas (IPPB, 6,91%) y bacteriemias (4,19%). Distinguiendo el género de los pacientes, destacan más los aislamientos en muestras urinarias procedentes de mujeres, mientras que en el género masculino son relativamente más prevalentes las colonizaciones y las muestras de origen respiratorio.

**Tabla 3.2.** Clasificación de los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro según género y origen del muestreo.<sup>§</sup>

Origen	Género (n; %) <sup>&amp;</sup>	
	M	F
<b>Respiratorio</b>	12; 3,6	1; 0,21
<b>IPPB</b>	26; 7,8	30; 6,28
<b>Orina</b>	233; 69,97	397; 83,05
<b>Colonización</b>	37; 11,11	23; 4,81
<b>Sangre</b>	15; 4,5	19; 3,97
<b>Otros</b>	10; 3,0	8; 1,67
<b>Total</b>	333	478

M, masculino; F, femenino. <sup>§</sup>Para el conjunto de datos:  $\chi^2=31,32$ ; gl=5; p<0,001. <sup>&</sup>Referido (%) al total de aislados en cada género.

Considerando los dos microorganismos aislados en este trabajo, el orden de prevalencia por origen de la muestra fue similar para ambas especies (tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Clasificación de los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro según especie y origen del muestreo.<sup>§</sup>

Origen	Especie (n; %) <sup>&amp;</sup>	
	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Respiratorio	7; 1,17	6; 2,80
IPPB	39; 6,53	17; 7,94
Orina	481; 80,57	149; 69,63
Colonización	35; 5,86	25; 11,68
Sangre	24; 4,02	10; 4,67
Otros	11; 1,84	7; 3,27
Total	597	214

<sup>§</sup>Para el conjunto de datos:  $\chi^2=14,32$ ; gl=5; p<0,14.

<sup>&</sup>Referido (%) al total de cepas de cada especie.

La prevalencia de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro ha aumentado considerablemente en el segundo periodo analizado, manteniéndose estable en el tercer periodo de nuestro estudio, aunque puede observarse una tendencia ascendente con respecto a las colonizaciones por estos microorganismos, probablemente debido a la intensa vigilancia de microorganismos multirresistentes que se viene realizando en los últimos años para la prevención de infecciones por estos gérmenes. En cuanto a las infecciones que estos microorganismos ocasionan, entre el segundo y el tercer periodo se aprecia un ligero descenso en bacteriemias así como un pequeño incremento de las IPPB (tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Clasificación de los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro según período y origen del muestreo.<sup>§</sup>

Origen	Periodo (n; %) <sup>&amp;</sup>		
	1	2	3
Respiratorio	9; 4,69	1; 0,32	3; 0,99
IPPB	15; 7,81	18; 5,71	23; 7,57
Orina	138; 71,88	255; 80,95	237; 77,96
Colonización	11; 5,73	23; 7,30	26; 8,55
Sangre	11; 5,73	15; 4,76	8; 2,63
Otros	8; 4,17	3; 0,95	7; 2,30
Total	192	315	304

Período 1, octubre de 2015 a mayo de 2016; Período 2, octubre de 2016 a mayo de 2017; Período 3, octubre de 2017 a mayo de 2018. <sup>§</sup>Para el conjunto de datos:  $\chi^2=27,64$ ; gl=10; p<0,002.

<sup>&</sup>Referido (%) al total de cepas en cada período.

La procedencia de los aislamientos según su origen entre diferentes servicios sanitarios (tabla 3.5) refleja que la mayoría de las cepas de *E. coli* fueron de origen extrahospitalario, mientras que *K. pneumoniae* apareció sobre todo a nivel hospitalario. Además, para *E. coli* de origen hospitalario destaca Urgencias, no habiendo diferencia entre aislamientos de los

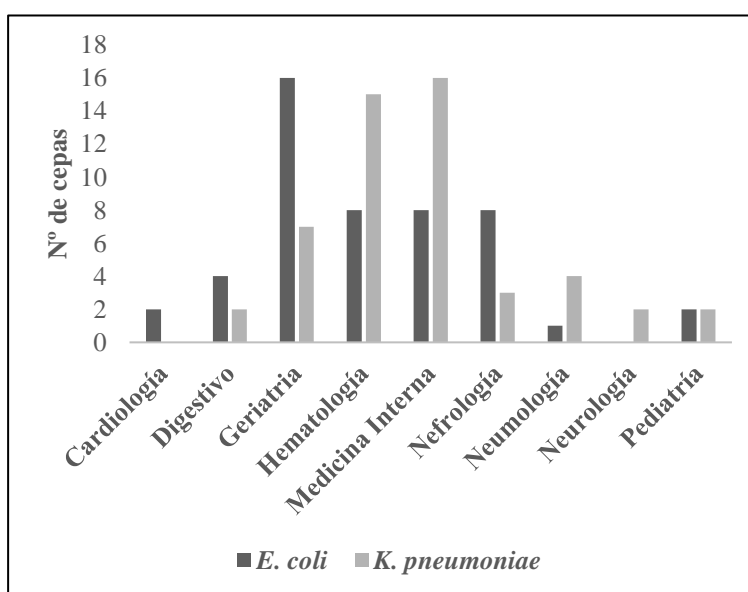
servicios médicos y quirúrgicos hospitalarios, y la prevalencia en UCI fue relativamente baja, procediendo fundamentalmente de cultivos de vigilancia epidemiológica (n=12). En el entorno hospitalario, *K. pneumoniae* fue aislada con mayor frecuencia entre los servicios médicos, seguido de Urgencias y servicios quirúrgicos.

**Tabla 3.5.** Clasificación de los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro según especie y servicio sanitario de procedencia.<sup>§</sup>

Servicio	Especie (n; %) <sup>§</sup>	
	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<b>Extrahospitalarios</b>	349; 58,29	92; 42,99
Atención Primaria	308; 51,59	83; 38,78
Residencias Geriátricas	41; 6,87	9; 4,2
<b>Hospitalarios</b>	248; 41,54	122; 57
Quirúrgicos	47; 7,87	27; 12,62
Médicos	49; 8,21	51; 23,83
UCI	18; 3,01	12; 5,61
Urgencias	134; 22,44	32; 14,95
<b>Total</b>	<b>597</b>	<b>214</b>

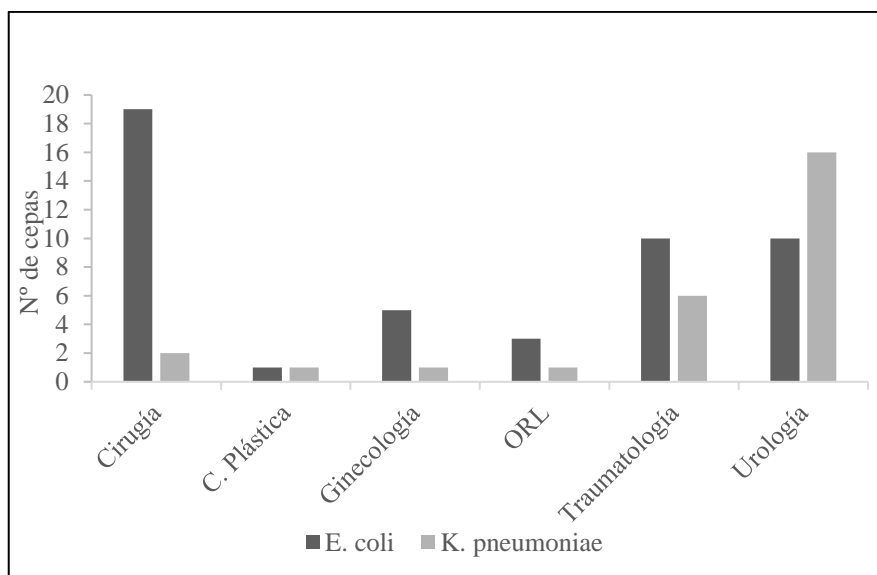
<sup>§</sup>Para el conjunto de datos:  $\chi^2=50,31$ ; gl=5; p<0,001. <sup>&</sup>Referido (%) al total de cepas de cada especie.

En las figuras 3.4 y 3.5 se desglosan los aislados bacterianos según servicios de procedencia. Así, entre los servicios médicos (figura 3.4), *K. pneumoniae* fue más prevalente en Medicina Interna y Hematología, mientras que en los servicios quirúrgicos (figura 3.5) la



**Figura 3.4** (página anterior). Distribución de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$  lactámicos de espectro ampliado según servicios médicos de procedencia.

mayor prevalencia para este microorganismo fue en Urología, seguido de Traumatología. Los aislamientos hospitalarios de *E. coli* manifestaron su predilección por el servicio de Geriatria, comprensible por las características de estos pacientes. Entre los servicios quirúrgicos mostró una mayor prevalencia en Cirugía General.



**Figura 3.5.** Distribución de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$  lactámicos de espectro ampliado según servicios quirúrgicos de procedencia.

### 3.1.2 Relación entre la expresión de ESBLs y las características epidemiológicas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a $\beta$ lactámicos de amplio espectro.

Para comprender con mayor detalle la naturaleza de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, se procedió a identificar los genes que codifican las  $\beta$ -lactamasas potencialmente implicadas. Los 811 aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* recopilados durante este estudio, que mostraban un perfil fenotípico de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro incluyendo cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, fueron también caracterizados para detectar la expresión de enzimas de la familia AmpC y/o de enzimas con actividad carbapenemasa, así como mediante una PCR múltiple para determinar qué  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro codificaban dichas cepas, considerando sus 3 genes más prevalentes (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> (Monstein et al., 2007), técnicas que se describen en el capítulo de (Materiales y Métodos) de este trabajo. Una vez identificada la presencia de estas funciones enzimáticas, se pudo también valorar la posible relación existente entre genotipo y origen de las cepas. Así, tras comprobar que CTX-M fue la  $\beta$ - lactamasa de amplio espectro mayoritaria en este estudio, se observó también un incremento de su prevalencia entre el primer y segundo periodo, y un ligero ascenso en el tercero (tabla 3.6). SHV y TEM fueron más

predominante en *K. pneumoniae*, mientras que la  $\beta$  lactamasa AmpC lo fue en *E. coli* (tabla 3.7), y SHV se detectó con mayor frecuencia en los aislamientos procedentes de personas del género masculino (tabla 3.8).

**Tabla 3.6.** Evolución temporal de la prevalencia de las distintas  $\beta$ -lactamasas identificadas en los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.

$\beta$ -lactamasas	Período (%) <sup>§</sup>		
	1	2	3
<b>CTX-M**</b>	78,12	87,62	88,49
<b>SHV</b>	28,64	26,67	30,92
<b>TEM</b>	52,60	48,57	49,01
<b>AmpC</b>	10,42	6,03	5,92

<sup>§</sup>Referido (%) al total de cepas en cada período. \*, \*\*, \*\*\*: se indica que la característica en cuestión se distribuye no aleatoriamente, con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.

**Tabla 3.7.** Prevalencia de las distintas  $\beta$ -lactamasas entre las dos especies bacterianas con aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.

$\beta$ -lactamasas	Especie (%) <sup>§</sup>	
	<i>E. coli</i> %	<i>K. pneumoniae</i> %
<b>CTX-M</b>	85,76	85,51
<b>SHV***</b>	10,55	79,44
<b>TEM***</b>	46,06	59,81
<b>AmpC***</b>	8,88	1,87

<sup>§</sup>Referido (%) al total de cepas de cada especie. \*, \*\*, \*\*\*: se indica que la característica en cuestión se distribuye no aleatoriamente, con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.

**Tabla 3.8.** Prevalencia de las distintas  $\beta$ -lactamasas según el género de los pacientes y entre las dos especies bacterianas con aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.

$\beta$ -lactamasas	Género (%) <sup>§</sup>	
	M	F
<b>CTX-M</b>	84,08	86,82
<b>SHV***</b>	36,94	23,01
<b>TEM</b>	49,85	49,58
<b>AmpC</b>	6,0	7,74

M, masculino; F, femenino. <sup>§</sup>Referido (%) al total de cepas procedentes de cada género. \*, \*\*, \*\*\*: se indica que la característica en cuestión se distribuye no aleatoriamente, con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.

Aunque una cantidad significativa de las cepas analizadas sólo presentaban una  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro (261; el 32,18% del total), lo más frecuente es que en un mismo

aislamiento coexistan varios determinantes de resistencia antimicrobiana de esta naturaleza (tabla 3.9), como puede deducirse de los resultados que muestran la distribución de las cuatro  $\beta$ -lactamasas detectadas según el origen de las cepas analizadas en este estudio (tablas 6, 7 y 8). Así, el genotipo CTX-M resultó ser más prevalente que CTX-M+TEM, seguidos aunque a cierta distancia, por el genotipo (triple  $\beta$ -lactamasa) CTX-M+SHV+TEM (tabla 3.9), lo que también explica el orden de prevalencia relativa de las asociaciones mutuas, encabezado por CTX-M+TEM y seguido por CTX-M+SHV y TEM+SHV, ocupando las combinaciones con AmpC los últimos lugares (tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Relación de los distintos tipos de  $\beta$ -lactamasas asociadas a las cepas analizadas.

$\beta$ -lactamasas/cepa	Tipo de $\beta$ -lactamasa	n <sup>§</sup>
<b>1 (n= 354)</b>	CTX-M	277
	SHV	42
	AmpC	35
<b>2 (n=334)</b>	CTX-M+SHV	50
	CTX-M+TEM	245
	CTX-+AmpC	2
	SHV+TEM	20
	SHV+AmpC	1
	TEM+AmpC	16
<b>3 (n=123)</b>	CTX-M+SHV+TEM	120
	CTX-M+TEM+AmpC	2
	SHV+TEM+AmpC	1

<sup>§</sup>Número de cepas que presentan el genotipo.

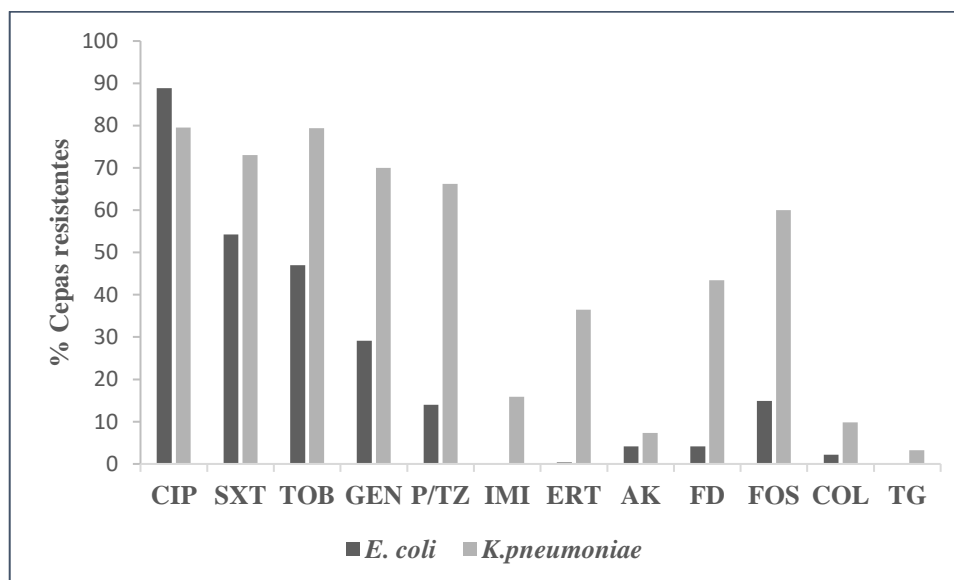
**Tabla 3.10.** Coexistencia<sup>§</sup> de los genes para  $\beta$ -lactamasas en las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.

$\beta$ -lactamasas	SHV	TEM	AmpC
<b>CTX-M</b>	20.84%	45,0%	0.49%
<b>SHV</b>		17.14%	0.25%
<b>TEM</b>			2.47%

<sup>§</sup>Referido (%) al total de cepas de este estudio.

### 3.1.3 *E. coli* y *K. pneumoniae* resistente a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: resistencia a otros antimicrobianos.

Siendo frecuente la asociación de varios determinantes de resistencia en una misma cepa, se analizaron los fenotipos de las cepas del estudio para conocer su sensibilidad frente a antibióticos de las familias más relevantes por su interés biomédico (figura 3.6).



**Figura 3.6.** Prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a diferentes antibióticos. La imagen se obtuvo directamente del Sistema de Información del Laboratorio (SIL), utilizando el soporte informático SGLAB de DB Soft. Se muestra el % de cepas que expresan cada resistencia respecto al total de cada especie. EC, *E. coli*; KP, *K. pneumoniae*. CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; TOB, tobramicina; GEN, gentamicina; P/TZ, piperacilina/tazobactam; IMI, imipenem; ERT, ertapenem; AK, amikacina; FD, nitrofurantoína; FOS, fosfomicina; COL, colistina; TG, tigeciclina.

Podemos destacar que las cepas de *E. coli* portadoras de ESBLs presentan un alto nivel de resistencia (figura 3.6) a quinolonas, algo menor a trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos como tobramicina o gentamicina, y muy bajo a tigeciclina (n=1; 0,17%), carbapenemas (n=2; 0,34% frente a ertapenem) y colistina (n=13; 2,18%). Sin embargo, *K. pneumoniae* muestra elevada resistencia a quinolonas, a la combinación trimetoprim-sulfametoxazol, a los aminoglicósidos tobramicina y gentamicina, a fosfomicina y, además, a un antibiótico de amplio espectro como piperacilina/tazobactam, siendo algo menor la resistencia frente a nitrofurantoína, a la tigeciclina (n=7; 3,27%), a las carbapenemas imipenem y ertapenem (n=34; 15,89%; y n=48; 36,45%; respectivamente) y a la colistina (n=21; 9,81%). Estas características dan lugar a una alta incidencia (77,53%) de cepas multirresistentes (MDR, definida como la resistencia adquirida a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos y col., 2012), lo que tiene una drástica repercusión en el

pronóstico de los pacientes infectados por estos microorganismos, ya que tienen considerablemente reducidas las opciones terapéuticas.

Merece la pena destacar los datos de resistencia a la colistina detectados en *E. coli* y *K. pneumoniae* de este estudio (figura 3.6). En el segundo caso (*K. pneumoniae*), esto podría deberse al uso de este antibiótico para tratar a los pacientes infectados con estas cepas, lo que habría provocado la selección de fenotipos resistentes, mientras que las cepas de *E. coli* con este fenotipo podrían presentar diversos orígenes. El análisis molecular de estas cepas se desarrolla en los capítulos 2 y 3 de este trabajo.

Otro capítulo aparte merece también la resistencia a carbapenemas detectada entre las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro (figura 3.6). Del total de cepas analizadas, 61 expresaron carbapenemasas, de las cuales 29 eran OXA-48-like, 30 KPC, una cepa VIM y otra cepa expresaba KPC+OXA-48 (los genotipos de estas carbapenemasas se obtuvieron empleando un sistema de PCR cuantitativa comercial, ver en Materiales y Métodos; tabla 3.11). En casi todos los casos, las cepas productoras de carbapenemasas correspondían a la especie *K. pneumoniae*, excepto una cepa de *E. coli* productora de KPC. La clasificación de las cepas productoras de carbapenemasas según origen, tipo de muestra y género de los pacientes se ve dificultada por su baja incidencia, que impide distinguir posibles diferencias significativas, siendo la única asociación evidente el incremento en la evolución temporal de la prevalencia de KPC en el intervalo del estudio (tabla 3.11). El análisis molecular de estas cepas se desarrolla en el capítulo 4 de este trabajo.

**Tabla 3.11.** Evolución temporal de la prevalencia de las distintas carbapenemasas identificadas en los aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro.

Carbapenemasa	Periodo (n, %) <sup>s</sup>		
	1	2	3
<b>KPC***</b>	0	2	28
<b>OXA-48</b>	6	11	12
<b>VIM</b>	1	0	0
<b>OXA-48+KPC</b>	0	0	1
<b>Total***</b>	7 (3.65)	13 (4.13)	41 (13.49)

\*Referido (%) al total de cepas correspondientes a cada periodo. \*, \*\*, \*\*\*: se indica que la característica en cuestión se distribuye no aleatoriamente, con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.



## 3.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *E. coli* RESISTENTE A COLISTINA

### 3.2.1 Cepas resistentes a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: origen de los aislados y fenotipos de sensibilidad frente a los antimicrobianos.

Del total de 811 aislamientos clínicos de enterobacterias resistentes a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro cuyo análisis epidemiológico se describe en el capítulo 1 de este trabajo, 597 corresponden a *E. coli*, de las que 19 cepas fueron identificadas como presumiblemente resistentes a polimixinas ya que inicialmente crecieron en placas de Müller Hinton conteniendo 2 mg/L de colistina (CMI > 2 mg/L). Sin embargo, el crecimiento de 6 de estas cepas no fue suficientemente robusto ni reproducible, por lo que tras varios intentos se descartaron. Las restantes 13 cepas, que representan un 2,18% de las *E. coli* productoras de ESBLs, correspondían a 3 pacientes colonizados y 10 pacientes infectados, 9 del tracto urinario y uno con infección respiratoria (tabla 3.12).

**Tabla 3.12.** Cronología y procedencia de *E. coli* resistente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y colistina

Cepa	Año	$\beta$ -lactamasa*	Muestra	Tipología
<b>HSPEB01</b>	2015	SHV+TEM	Rectal/heces	Colonización
<b>HSPEB02</b>	2015	CTX-M+TEM	Orina	Infección
<b>HSPEB03</b>	2016	SHV+TEM	Rectal/heces	Colonización
<b>HSPEB04</b>	2016	SHV,+TEM	Rectal/heces	Colonización
<b>HSPEB05</b>	2016	CTX-M+TEM	Orina	Infección
<b>HSPEB06<sup>&amp;</sup></b>	2016	CTX-M	Respiratoria	Infección
<b>HSPEB07</b>	2016	CTX-M+TEM	Orina	Infección
<b>HSPEB08</b>	2017	CTX-M	Orina	Infección
<b>HSPEB09</b>	2017	CTX-M	Orina	Infección
<b>HSPEB10</b>	2017	CTX-M	Orina	Infección
<b>HSPEB11</b>	2018	CTX-M+TEM	Orina	Infección
<b>HSPEB12</b>	2018	CTX-M	Orina	Infección
<b>HSPEB13</b>	2018	CTX-M	Orina	Infección

\*Identificado mediante PCR múltiple (Monstein et al., 2007; ver capítulo 1 de Resultados); <sup>&</sup>Cepa denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017).

En cuanto al fenotipo de sensibilidad frente a los antimicrobianos de las 13 cepas seleccionadas, todas ellas resultaron resistentes a cefotaxima, mientras que 12 lo fueron a ceftazidima y a cefoperazona (tabla 3.13). La mayoría de las cepas (9/13) también fueron resistentes a amoxicilina/clavulánico, pero sólo dos lo eran a piperacilina/tazobactam.

**Tabla 3.13.** Fenotipos de susceptibilidad frente a los antibióticos de *E. coli* resistente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y a colistina.\*

Cepas	Antibióticos**														
	AMX	A/C	CFM	CFT	CTZ	CFP	P/TZ	GEN	TOB	CIP	SXT	FOS	FD	ERT	IMI
HSPEB01	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPEB02	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
HSPEB03	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPEB04	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPEB05	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPEB06 <sup>&amp;</sup>	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S
HSPEB07	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPEB08	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
HSPEB09	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
HSPEB10	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
HSPEB11	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S
HSPEB12	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
HSPEB13	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\*Se representa la resistencia medida mediante el sistema MicroScan (Beckman Coulter), en base a microdilución en caldo y teniendo en cuenta los puntos de corte definidos por Eucast. \*\*AMX, amoxicilina; A/C, amoxicilina/ác.clavulánico; CFM, cefixima; CFT, cefotaxima; CTZ, ceftazidima; CFP, cefoperazona; P/TZ, piperacilina/tazobactam; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; FOS, fosfomicina; FD, nitrofurantoína; ERT, ertapenem IMI, imipenem. <sup>&</sup>Cepa denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017).

Con respecto a los antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos testados, algunas cepas presentaron resistencia a ciprofloxacina (10/13), cotrimoxazol (10/13), gentamicina (6/13) y tobramicina (5/15), y solamente una fue resistente a fosfomicina. Finalmente, ninguna de las cepas presentó resistencia a los carbapenemas (ertapenem e imipenem) ni a nitrofurantoína.

### 3.2.2 Cepas sensibles a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: origen de los aislados.

Con el propósito de contrastar la posible asociación entre los fenotipos de resistencia a la colistina y a  $\beta$ -lactámicos, se seleccionó para este análisis un segundo grupo de cepas de *E. coli* aisladas en muestras clínicas desde el inicio de nuestro estudio que, siendo susceptibles a  $\beta$ -lactámicos, expresaron resistencia a la colistina, Un total de 26 cepas fueron caracterizadas, incluyendo aislados clínicos detectados desde el año 2016 al 2021, mayoritariamente entre los

años 2018 (n=12) y 2019 (n=9), y prácticamente la totalidad de ellos proceden de muestras de orina, excepto una muestra de un paciente con IPPB (tabla 3.14). La sensibilidad de estas cepas a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y su resistencia a la colistina se obtuvo de los antibiogramas rutinarios realizados utilizando el sistema MicroScan WalkAway (Beckman Coulter). Posteriormente todas estas cepas crecieron en medio semisólido Müller Hinton suplementado con 2 mg/L de colistina.

**Tabla 3.14.** Cronología y procedencia de *E. coli* sensible a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y resistente a la colistina

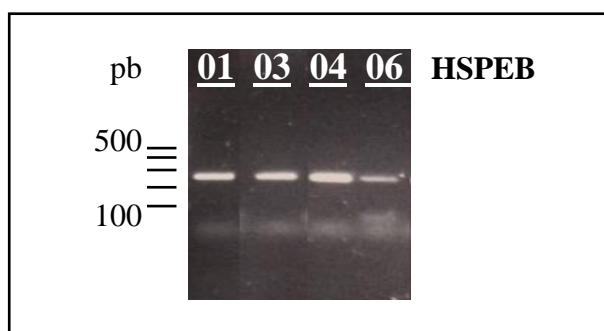
<b>CEPAS</b>	<b>AÑO</b>	<b>MUESTRA</b>
<b>HSPEC01</b>	2018	Orina
<b>HSPEC03</b>	2018	Orina
<b>HSPEC04</b>	2018	Orina
<b>HSPEC05</b>	2018	Orina
<b>HSPEC07</b>	2019	Orina
<b>HSPEC08</b>	2018	Orina
<b>HSPEC09</b>	2018	Orina
<b>HSPEC10</b>	2018	Orina
<b>HSPEC13</b>	2018	Orina
<b>HSPEC14</b>	2020	IPPB
<b>HSPEC15</b>	2019	Orina
<b>HSPEC16</b>	2019	Orina
<b>HSPEC17</b>	2019	Orina
<b>HSPEC19</b>	2019	Orina
<b>HSPEC20</b>	2016	Orina
<b>HSPEC22</b>	2021	Orina
<b>HSPEC23</b>	2019	Orina
<b>HSPEC24</b>	2019	Orina
<b>HSPEC25</b>	2019	Orina
<b>HSPEC26</b>	2019	Orina
<b>HSPEC29</b>	2021	Orina
<b>HSPEC30</b>	2021	Orina
<b>HSPEC31</b>	2018	Orina
<b>HSPEC32</b>	2018	Orina
<b>HSPEC33</b>	2018	Orina
<b>HSPEC34</b>	2018	Orina

### **3.2.3. Identificación de los mecanismos de resistencia a la colistina**

#### *3.2.3.1. Detección de mcr-1 y potencial de transmisión horizontal*

Habida cuenta de que *mcr-1* es el determinante de resistencia a la colistina más prevalente en la actualidad (Mora et al., 2022), se realizó una PCR con cebadores específicos para detectar

la posible presencia de este gen en todas las cepas resistentes a colistina analizadas en este trabajo, 13 aislados de *E. coli* seleccionados a partir de cepas productoras de ESBL, así como 26 aislados sensibles a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, siendo determinados como positivos para *mcr-1* 8 aislados, 4 de cada grupo de cepas: HSPEB1, HSPEB3, HSPEB4, HSPEB6, HSPEC5, HSPEC14, HSPEC15 y HSPEC30 (figura 3.7, se muestran únicamente las amplificaciones producidas entre las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, siendo similar en el resto), lo que se confirmó posteriormente mediante secuenciación de los fragmentos amplificados (resultados no mostrados). Además, se realizó también otra PCR utilizando cebadores degenerados que cubren las diferentes familias de genes *mcr* con un papel claramente definido en la resistencia a la colistina (desde *mcr-1* hasta *mcr-8*; Campos et al., 2023), descartándose la existencia de determinantes movilizables adicionales (resultados no mostrados).



**Figura 3.7.** Detección del gen *mcr-1*. Se realizó la PCR específica para *mcr-1* (Liu et al., 2016) y se resolvieron los productos mediante electroforesis en 1% de agarosa y 0,5xTBE. Solo se muestran los 4 positivos detectados entre las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos.

Se han descrito distintos elementos plasmídicos portando el gen *mcr-1*, lo que más adelante se evidenciará mediante análisis genómico de las 8 cepas positivas a este gen identificadas en este trabajo (apartado 2.4), siendo los plásmidos más prevalentes IncX4 e IncH12, y presentando ambos un elevado potencial de transferencia (Gallardo et al., 2021). Para comprobar la transmisibilidad de *mcr-1*, y si el genotipo u origen de las cepas de *E. coli* afecta al potencial con el que se transfiere el elemento portador, se realizaron conjugaciones con la cepa receptora *E. coli* J53, calculándose eficiencias de las conjugaciones referidas a células donadoras con HSPEC05 y HSPEB06 de  $3,1 \cdot 10^{-2}$  y  $6,8 \cdot 10^{-2}$ , respectivamente, y referidas a células receptoras, de  $2,1 \cdot 10^{-2}$  y  $2,6 \cdot 10^{-2}$ , respectivamente.

### 3.2.3.2. Polimorfismo de PmrAB

En las enterobacterias, determinadas mutaciones en los genes que codifican el sistema de doble componente PmrAB causan su activación constitutiva, desencadenando señales que originan la resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos, incluidas las polimixinas (Mora et al., 2022). Por lo tanto, una vez identificada la presencia del gen *mcr-1* se procedió a determinar la posible existencia de mutaciones en los genes *pmrA* y *pmrB* de los aislados resistentes a la colistina, para lo que se amplificaron las secuencias codificantes de ambos genes y se secuenciaron (ver detalles en Materiales y Métodos). Tras comparar (TBLASTN) las secuencias obtenidas con las de dos cepas de *E. coli* sensibles a colistina y utilizadas como referencia (K12 y ATCC25922), descartándose las variantes alélicas presentes en las cepas sensibles (Quesada et al., 2015), se seleccionaron los polimorfismos que pudieran constituir determinantes de resistencia en todas las cepas resistentes a colistina que carecen del gen *mcr-1* (tabla 3.15). Así, se detectaron mutaciones tanto en PmrA (n=5) como en PmrB (n=25), identificándose los siguientes polimorfismos (y su ubicación en los correspondientes dominios de las proteínas; Olaitan et al., 2014): G15R, G53D, R81C, R81L y D82N en el dominio REC (“CheY-like receiver”) de PmrA; L10R, G19E (4x), G19R (3x), V30D y  $\Delta^{18-24}$  (delección del péptido 18-24) en el dominio TM1 (Transmembrana 1) de PmrB; R93P (2x) y P94L en el dominio HAMP (“Histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-binding proteins and phosphatases) de PmrB; D149A, D149N, P157Q, G160E, V161G (2x), V161A, L167P, y L194P (2x) en el dominio HisKA (“Histidine kinase A phosphoacceptor”) de PmrB; y G206E, en la inmediata vecindad de HisKA. Entre los polimorfismos encontrados, sólo P157Q y V30D ocurren en posiciones que no han sido descritas con anterioridad como posibles determinantes de resistencia a la colistina, aunque se encuentran en la inmediata vecindad de variantes para las que, como para el resto de mutaciones detectadas, sí se dispone de descripciones previas sobre su efecto (Dos Santos et al., 2021; Huang et al., 2020; Miltgen et al., 2021; Olaitan et al., 2014; Sato et al., 2018; Sun et al., 2009; Wang et al., 2021). Además, una delección próxima a la mutación  $\Delta^{18-24}$  en el dominio TM1 de PmrB origina su activación constitutiva (Sato et al., 2018). Finalmente, la mutación S138N tiene un papel incierto, ya que aparece con frecuencia en cepas resistentes a la colistina que contienen también el gen *mcr-1* (Delannoy et al., 2017). Por último, una única cepa (HSPEC24) no presentó mutaciones en PmrA ni PmrB, como tampoco genes *mcr*, no disponiéndose de ningún determinante potencial para explicar su resistencia.

Además de identificar los determinantes de resistencia, la tabla 3.15 muestra la CMI para la colistina de todas las cepas de este estudio, observándose que estuvo comprendida entre 4 y 128 mg/L y que, siendo todas las cepas resistentes al antibiótico (CMI > 2 mg/L), no existe asociación entre el valor de su CMI y los genotipos detectados.

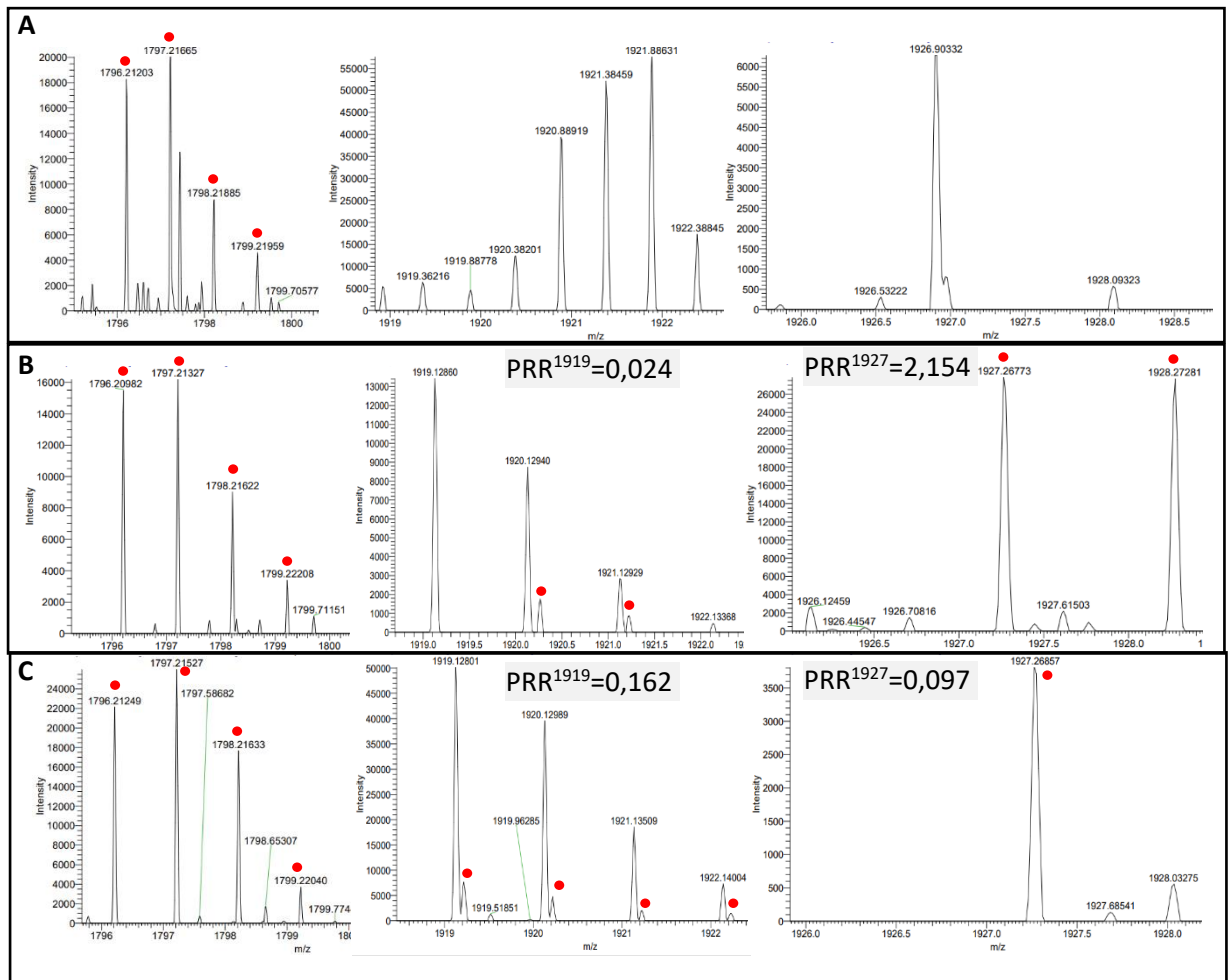
**Tabla 3.15.** Fenotipo y genotipos (*mcr-1* y polimorfismos de PmrA y PmrB) de *E. coli* resistente a la colistina.

Cepa	CMI <sup>#</sup>	<i>mcr-1</i> <sup>@</sup>	PmrA <sup>&amp;</sup>	PmrB <sup>&amp;</sup>
HSPEB01	8	+	-	-
HSPEB02	4	-	-	P157Q
HSPEB03	8	+	-	-
HSPEB04	8	+	-	-
HSPEB05	8	-	-	D149A
HSPEB06*	4	+	-	-
HSPEB07	16	-	G15R	-
HSPEB08	16	-	-	G19E
HSPEB09	8	-	-	R93P
HSPEB10	8	-	-	R93P
HSPEB11	128	-	-	V161G
HSPEB12	8	-	R81L	-
HSPEB13	8	-	-	V30D
HSPEC01	16	-	-	S138N
HSPEC03	8	-	-	G206E
HSPEC04	32	-	-	G19R
HSPEC05	4	+	-	-
HSPEC07	4	-	G53D	-
HSPEC08	4	-	R81C	-
HSPEC09	4	-	-	L167P
HSPEC10	8	-	-	G19E
HSPEC13	8	-	-	V161G
HSPEC14	8	+	-	-
HSPEC15	4	+	-	-
HSPEC16	4	-	D82N	-
HSPEC17	8	-	-	Δ <sup>18-24</sup>
HSPEC19	8	-	-	G19R
HSPEC20	8	-	-	G160E
HSPEC22	8	-	-	G19E
HSPEC23	8	-	-	L194P
HSPEC24	4	-	-	-
HSPEC25	8	-	-	L194P
HSPEC26	8	-	-	G19R
HSPEC29	4	-	-	P94L
HSPEC30	8	+	-	-
HSPEC31	8	-	-	L10R
HSPEC32	8	-	-	D149N
HSPEC33	64	-	-	V161A
HSPEC34	8	-	-	G19E

<sup>#</sup>mg/L, determinado mediante microdilución en medio líquido; <sup>@</sup>determinado mediante PCR (figura 7); <sup>&</sup>polimorfismos detectados. \*Cepa denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017).

### 3.2.3.3. Decoración del lípido A

La resistencia a la colistina mediada por la activación constitutiva del sistema PmrAB se produce por la modificación covalente del lípido A con fosfoetanolamina y/o con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, lo que reduce la carga negativa del LPS y su interacción con las polimixinas y otros antimicrobianos peptídicos cargados positivamente (Mora et al., 2022). La posible presencia de estas modificaciones, que alteran el valor m/z del lípido A, se analizaron mediante espectrometría de masas de extracciones lipídicas de dos de las cepas de *E. coli* que, siendo resistentes a colistina, presentan las mayores incógnitas sobre su determinante de resistencia: HSPEC01, cuyo único posible determinante de resistencia es PmrB<sup>S183N</sup>; y HSPEC24, para la que se carece de determinantes potenciales, y además, se utilizó la cepa K12 de *E. coli* para visualizar el resultado de analizar un lípido A no modificado (figura 3.8).



**Figura 3.8** (Página anterior). Espectros UHPLC-HRMS de preparaciones de lípido A de cepas de *E. coli*. A, cepa K12; B, cepa HSPEC01; C, cepa HSPEC24. Los extractos lipídicos se obtuvieron mediante el método “blight & dyer” (Materiales y Métodos). Las áreas de los picos señaladas con puntos rojos se integraron para calcular la PRR correspondiente ( $PRR^{1919} = 1919/1796$ ;  $PRR^{1927} = 1927/1796$ ), considerando un máximo de 4 isotopólogos (+1Da respecto al valor mínimo esperado) y únicamente los valores m/z esperados con  $\pm 0,01$ Da de precisión (1796,21 / 1797,21 / 1798,21 / 1799,21; 1919,21 / 1920,21 / 1921,21 / 1922,21; 1927,27 / 1928,27 / 1929,27 / 1930,27).

Las dos cepas resistentes a la colistina cuyo lípido A se analizó mediante UHPLC-HRMS revelaron la existencia de ambas modificaciones, aunque con distinta intensidad. Con un PRR (“Polymyxin Resistance Ratio”) de más de 2, la cepa HSPEC01 presenta una fuerte modificación con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, mientras que su modificación con fosfoetanolamina fue mínima, prácticamente en el límite de detección. Por otra parte, en la cepa HSPEC24 también se presentaron los picos específicos correspondientes a ambas modificaciones, aunque con valores de PRR intermedios a los observados para HSPEC01.

### 3.2.4 Impacto de los determinantes de resistencia a la colistina sobre la expresión génica

Se analizó la posible implicación de algunos de los polimorfismos identificados en PmrAB en la resistencia a colistina mediante la observación del nivel de expresión de los operones *pmrCAB* y *arnBCADTEF*. Se utilizaron 13 cepas de *E. coli* resistentes a colistina, tanto sensibles (n=2) como resistentes (n=11) a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, entre las cuales 3 eran positivas para *mcr-1* (HSPEB01, HSPEB04 y HSPEB06) y las restantes presentaban polimorfismos en PmrA (R81L) ó PmrB (L10R, G19E, V30D, R93P, D149A, D149N, P157Q, G160E, V161G), observándose la sobreexpresión del gen *arnB* en las 10 cepas con polimorfismos, aunque sólo 6 sobreexpresaron *pmrC* (figura 3.9). Por el contrario, las cepas de *E. coli* positivas a *mcr-1* presentaron reprimida la expresión génica, una señalización que ya ha sido previamente observada (Gallardo et al., 2021).

### 3.2.5 Análisis genómico de los aislados resistentes a la colistina

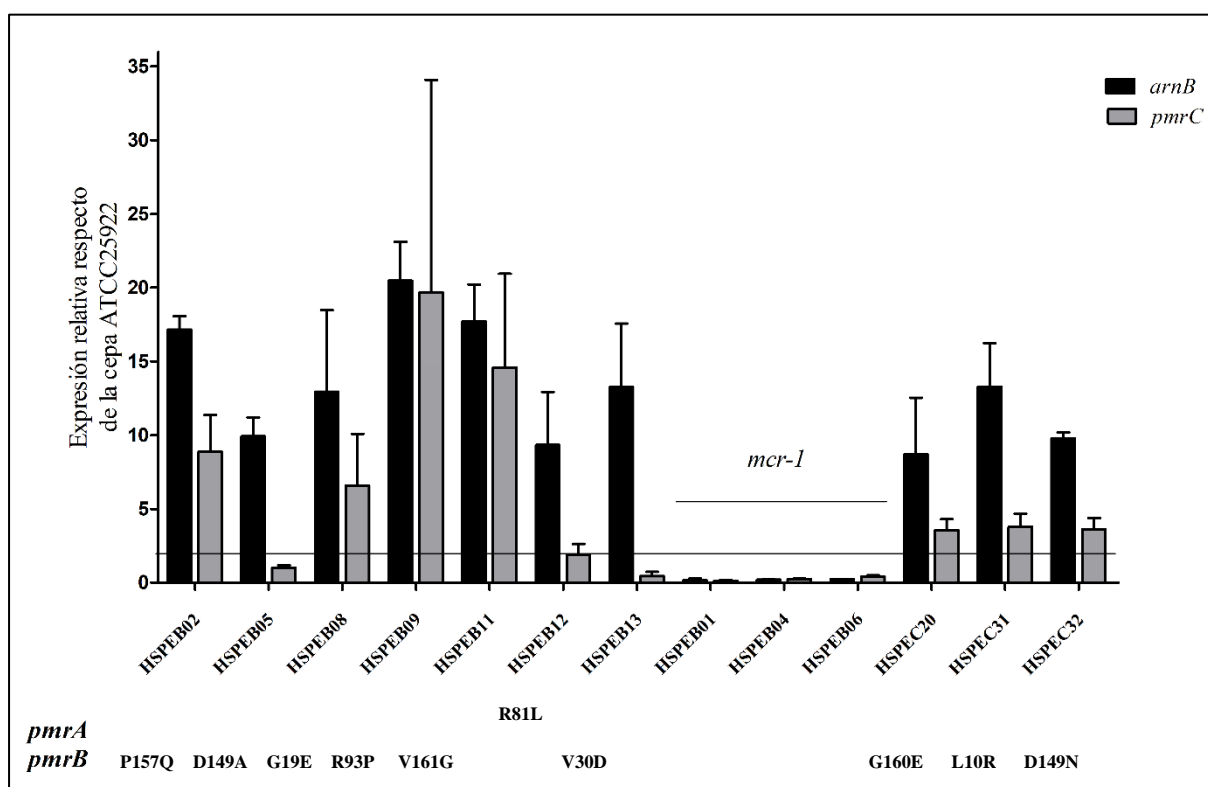
Entre las 39 cepas de *E. coli* resistentes a la colistina caracterizadas en este trabajo, 16 se han sometido a análisis genómico, incluyendo 9 de las 13 cepas que expresan resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y 7 de las 24 cepas seleccionadas por su sensibilidad frente a la mayoría de los antimicrobianos. Las técnicas utilizadas para la determinación de los genomas de estas cepas incluyeron su secuenciación mediante: Ion Torrent (cepa HSPEB06;



Sanchez-Benito et al., 2017), Illumina (las 16 cepas secuenciadas) y Nanopore (cepa HSPEB06).

### 3.2.5.1 Detección de genes de resistencia frente a los antimicrobianos

Se rastreó la presencia de los determinantes de resistencia existentes en los genomas bacterianos secuenciados, utilizando para ello el programa ResFinder, disponible en la plataforma web del CGE/DTU (“Center for Genomic Epidemiology, Technical University of Denmark”, <https://www.genomicepidemiology.org/>), incluyendo tanto la búsqueda de genes adquiridos (movilizables) como de mutaciones cromosómicas en *E. coli*, y utilizando los umbrales de sensibilidad ofrecidos por defecto (90% de identidad y 60% de cobertura). Además, los casos dudosos se analizaron en detalle tras descarga de su secuencia y análisis mediante BLAST frente a secuencias disponibles en las bases de datos del NCBI.



**Figura 3.9.** Control de la expresión de los genes *arnB* y *pmrC* de *E. coli* por determinantes de resistencia a la colistina, determinado mediante PCR cuantitativa (qPCR). Como expresión génica relativa se muestra el valor de  $\Delta\Delta C_t$  para cada mRNA y cepa analizada, utilizándose la cepa *E. coli* ATCC25922 como control y el mRNA de *recA* como calibrador interno de cada preparación de mRNA. La qPCR se llevó a cabo con las cepas indicadas según se describe en Materiales y Métodos, utilizándose dos experimentos independientes (incluyendo cultivo celular, extracción de RNA y síntesis de cDNA) para el cálculo de las medias y del error de cada determinación. En la parte inferior se muestran los polimorfismos que presentan PmrA ó PmrB en las cepas utilizadas (tabla 15).

La prevalencia de genes de resistencia a antimicrobianos detectados en los genomas de las cepas de *E. coli* resistentes a colistina se muestra en la tabla 16. Los genes productores de ESBLs se detectaron de manera exclusiva entre las cepas que presentaron este fenotipo, estando siempre presentes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (3/9 cepas presentan este alelo del grupo 1 de CTX-M), *bla*<sub>SHV-12</sub> (3/9), *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (2/9, otro alelo del grupo 1 de CTX-M), o *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (1/9, una sola cepa presenta este alelo del grupo 9 de CTX-M). Además, destacó también la presencia del alelo *bla*<sub>TEM-1B</sub> tanto entre cepas productoras como no productoras de ESBLs (8/16), mientras que *bla*<sub>TEM-1A</sub> y *bla*<sub>TEM-1C</sub> se detectaron exclusivamente en una cepa en cada caso, entre las cepas productoras y no productoras de ESBLs, respectivamente. Por último, *bla*<sub>OXA-1</sub> se detectó en dos cepas productoras de ESBLs, las únicas resistentes a la combinación P/Tz (tabla 3.13) como corresponde a la menor capacidad inhibidora del tazobactam sobre este tipo de enzimas. En la mayoría de las cepas analizadas se detectaron determinantes que reducen la susceptibilidad frente a quinolonas (Strahilevitz et al., 2009; tabla 3.16), lo que explica la ocurrencia mayoritaria del fenotipo entre estas cepas (tabla 3.13). Así, las mutaciones S83L y D87N de *gyrA*, que confieren elevada resistencia a quinolonas por modificación de la subunidad A de la ADN girasa, se observaron en 8/9 y 7/9 de las cepas productoras de ESBLs, respectivamente, así como en 4/7 y 3/7 cepas no productoras de ESBLs, mientras que también se observaron *los determinantes plasmídicos aac(6')-Ib-cr* (n=4) y *qnrB* (n=1), que sólo reducen la susceptibilidad frente a fluoroquinolonas en ausencia de mutaciones en *gyrA*, la denominada resistencia no clásica. Entre las 16 cepas secuenciadas, tanto productoras como no productoras de ESBLs, se detectaron diversos genes (tabla 3.16) que confieren resistencia a: aminoglucósidos, codificando acetil transferasas (*aac*), adenil transferasas (*aad* ó *ant*) o fosfatidil transferasas (*aph*) que modifican estos antibióticos (Shaw et al., 1993); sulfamidas (*sul*) o trimetoprim (*dhfr*), o la sinergia entre ambos antibióticos que bloquea la síntesis bacteriana de ácido fólico (Huovinen, 2001); tetraciclinas (*tet*; Grossman, 2016); y también fenicoles (*cat*, *floR* y *cmlA*; Shwarz et al., 2004). La presencia de estos determinantes entre las cepas productoras de ESBLs (tabla 3.16) explica la mayoría de los fenotipos de resistencia observados (tabla 3.13). También se detectan genes de resistencia entre las cepas no productoras de ESBLs, aunque en este grupo (previsiblemente) predominen los fenotipos de susceptibilidad, incluyendo dos cepas sensibles a todos los antibióticos salvo a colistina. No se aprecia ninguna asociación absoluta, ni inclusiva ni excluyente, entre determinantes de resistencia concretos, aunque la mayor abundancia relativa de determinantes de resistencia entre las cepas productoras de ESBLs podría indicar su ligamiento genético en ciertos casos.

**Tabla 3.16.** Detección de determinantes de resistencia\* a los antibióticos mediante análisis genómico de las cepas de *E. coli* resistentes a la colistina.

Cepa	$\beta$ -lactámicos	Quinolonas	Aminoglucósidos	Sulfamidasa+ Trimetoprim	Tetraciclina	Cloranfenicol	Colistina
<b>HSPEB01</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aac(3)-IV</i> , <i>aac(6')-Ib-cr-like</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2-like</i> , <i>aadA5</i> , <i>aph(4)-Ia</i> ,	<i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1-like</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet(B)</i>	<i>catA1-like</i> , <i>catB3</i> , <i>cmlA1-like</i>	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEB02</b>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1A</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aadA5</i>	<i>sul1</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet(A)</i>	<i>catB3</i>	<i>pmrB-P157Q</i>
<b>HSPEB03</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aac(3)-IV</i> , <i>aac(6')-Ib-cr-like</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA3</i> , <i>aadA5</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1-like</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet(B)</i> , <i>tet(M)-like</i>	<i>catA1-like</i> , <i>catB3</i> , <i>cmlA1-like</i> , <i>floR-like</i>	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEB04</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aac(3)-IV</i> , <i>aac(6')-Ib-cr-like</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2b-like</i> , <i>aadA5</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1-like</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet(B)</i> , <i>tet(M)</i>	<i>catA1-like</i> , <i>catB3</i> , <i>cmlA1-like</i> , <i>floR-like</i>	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEB05</b>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1'</sub></i> -like, <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L), <i>qnrB1</i>	<i>aac(3)-IIId-like</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aadA5</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2-like</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet(A)</i>	<i>catB3</i>	<i>pmrB-D149A</i>
<b>HSPEB06<sup>&amp;</sup></b>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA5</i> , <i>aadA13-like</i> , <i>aph(3')-Ia-like</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id-like</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA17</i>	<i>tet(B)</i>	<i>cmlA1-like</i>	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEB07</b>	<i>bla<sub>CTX-M-55</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib-like</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	<i>tet(A)-like</i>	<i>catA2-like</i>	<i>pmrA-G15R</i>
<b>HSPEB08</b>	<i>bla<sub>CTX-M-27</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	-	-	-	-	<i>pmrB-G19E</i>
<b>HSPEB13</b>	<i>bla<sub>CTX-M-55</sub></i>	-	-	-	-	-	<i>pmrB-V30D</i>
<b>HSPEC05</b>	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	<i>tet(B)</i>	-	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEC14</b>	<i>bla<sub>TEM-1C</sub></i>	-	-	-	<i>tet(A)</i>	-	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEC15</b>	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	<i>tet(A)-like</i>	<i>cmlA1-like</i> , <i>floR-like</i>	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEC24</b>	-	<i>gyrA</i> (S83L)	-	-	-	-	-
<b>HSPEC30</b>	-	-	-	-	-	-	<i>mcr-1.1</i>
<b>HSPEC33</b>	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	<i>gyrA</i> (S83L, D87N)	-	-	-	-	<i>pmrB-V161A</i>
<b>HSPEC34</b>	-	-	-	-	-	-	<i>pmrB-G19E</i>

\*Se muestran los determinantes detectados que presentan un 100% de identidad con las secuencias disponibles en la base de datos de ResFinder (CGE/DTU), reservándose el apelativo “-like” para los casos con identidad inferior, aunque siempre resultó ser > 98%. <sup>&</sup>Cepa denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017).

### 3.2.5.2. Tipificación de las cepas: MLST e identificación de plásmidos

El ST (“Sequence Type”) de las cepas de *E. coli* se determinó mediante MLST (“Multi Locus Sequence Typing”) de acuerdo con las secuencias disponibles en PubMLST.org, que se basa en siete genes conservados (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) y el esquema de clasificación previamente descrito para *E. coli* (Wirth et al., 2006), utilizando el programa MLST 2.0 (CGE/DTU). Los 16 aislamientos fueron asignados a 10 STs diferentes: ST131 fue el más prevalente (n=5), seguido por ST156 (n=2), mientras que el resto de las cepas pertenecían a MLST únicos, incluyendo ST38, ST59, ST69, ST73, ST127, ST167, ST410 y ST4204, y en una de las cepas no pudo determinarse (tabla 3.17). Aunque a nivel global ST131 es también muy prevalente, y se encuentra frecuentemente asociado al gen que codifica CTX-M-15, lo que puede explicar su transmisión nosocomial (Palkovicova et al., 2022), esta clonalidad solo se observa en dos cepas de este estudio (HSPEB02 y HSPEB05). De las 8 cepas resistentes a colistina que presentan el gen *mcr-1*, 2 tienen ST156 y además SHV-12, mientras que el resto, productoras o no de ESBLs, corresponden a distintos MLSTs, lo que podría sugerir un cierto predominio de la diseminación horizontal del determinante de resistencia a la colistina entre distintas cepas.

La búsqueda de plásmidos en las cepas resistentes a la colistina se realizó mediante el programa PlasmidFinder, disponible en la plataforma web del CGE/DTU (“Center for Genomic Epidemiology, Technical University of Denmark”, <https://www.genomicepidemiology.org/>), incluyendo la búsqueda de replicones catalogados de enterobacterias y utilizando los umbrales de sensibilidad ofrecidos por defecto (95% de identidad y 60% de cobertura), salvo en los casos en los que se indiquen otros valores. Las secuencias típicas de replicones más frecuentemente detectadas fueron de los tipos correspondientes a IncF (n=14), seguido de IncX4 (n=8), aunque otras secuencias también detectadas fueron IncHI2, IncX1, Col(MG828), Col156, Col(BS512), IncN, IncI2, IncI1 e IncQ1 (tabla 3.17). En general, la diversidad de secuencias típicas de replicones fue mayor entre las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, detectándose incluso una cepa sin plásmidos detectables (HSPEC34) entre las sensibles. También se observó una elevada correlación entre la presencia de plásmidos IncX4 y *mcr-1* entre las cepas cuyo genoma se ha analizado. Así, 7 de las 8 cepas que portan el determinante de resistencia lo tienen localizado en plásmidos de esta familia, con un tamaño de alrededor 30 Kb y que se han reconstruido utilizando como referencia pMUB-MIN6-MCR, un elemento previamente descrito de la familia (figura 3.10A).

**Tabla 3.17.** Plásmidos identificados en las cepas de *E. coli* resistentes a la colistina.

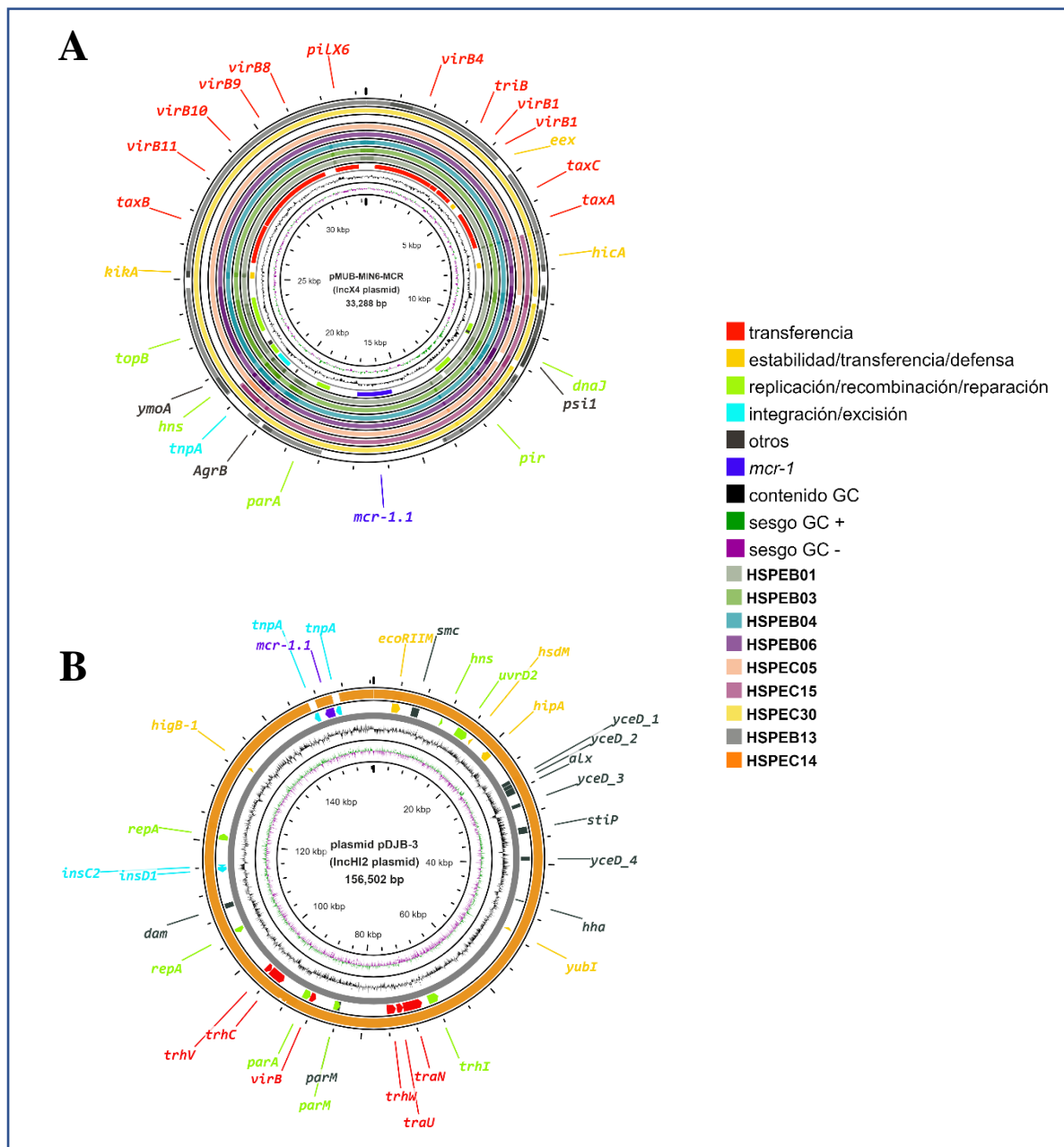
Cepas	ST	Plásmidos*	<i>mcr-1</i>
<b>HSPEB01</b>	156	<b>IncFII, IncHI2, IncX4</b> , Col(MG828), IncH12A, IncI1-I(Alpha), IncX1	+
<b>HSPEB02</b>	131	<b>IncFII</b> , IncFIA IncFII(pRSB107)	-
<b>HSPEB03</b>	156	<b>IncFII, IncHI2, IncX4</b> , Col(MG828), IncH12A, IncI1-I(Alpha), IncX1	+
<b>HSPEB04</b>	NT	<b>IncFII, IncHI2, IncX4</b> , IncH12A IncI1-I(Alpha) IncX1	+
<b>HSPEB05</b>	131	IncFIB(AP001918), IncFIB(K), IncFII(29), IncFII(K), IncN3	-
<b>HSPEB06<sup>&amp;</sup></b>	167	<b>IncN, IncX4</b> , IncFIA, IncFIA(HI1), IncFIB(AP001918), IncFII, IncFII(29), IncX1	+
<b>HSPEB07</b>	4204	IncFIB(AP001918), IncFIC(FII), IncFII(pEH01), IncI2(Delta)	-
<b>HSPEB08</b>	131	<b>IncFIA, IncFII(pRSB107)</b> , IncFIB(AP001918), Col156	-
<b>HSPEB13</b>	59	<b>IncI1-I(Alpha), IncX4, Col(BS512)</b> , IncFIB(AP001918), IncFII(pEH01), IncFII(pRSB107)	-
<b>HSPEC05</b>	410	<b>IncQ1, IncX4</b> , IncFIA, IncFIB(AP001918),	+
<b>HSPEC14</b>	131	<b>IncHI2</b> , IncHI2A, IncFIB(AP001918), IncX1	+
<b>HSPEC15</b>	38	<b>IncQ1, IncX4</b> , Col156, ColpVC, IncFIB(AP001918)	+
<b>HSPEC24</b>	73	IncFIB(AP001918), IncFII, Col156	-
<b>HSPEC30</b>	69	<b>IncX4</b> , Col156	+
<b>HSPEC33</b>	131	<b>IncFIA, IncFII(pRSB107)</b> , IncFIB(AP001918)	-
<b>HSPEC34</b>	127	-	-

\*En negrita se indican solo los plásmidos cuya secuencia tipo se detecta con un 100% de identidad. <sup>&</sup>Cepa denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017).

La elevada identidad existente entre las secuencias de estos 7 elementos de la familia IncX4, cercana al 100% en todos los casos, evidencia la importancia de su potencial de transferencia en la dispersión horizontal del plásmido (ver apartado 2.3.1). La cepa HSPEC15 merece una mención especial, ya que la cobertura del plásmido IncX4 sobre su genoma está en torno al 42%, a diferencia de las 6 cepas restantes que lo cubren prácticamente en su totalidad. Por otro lado, una de las cepas secuenciadas que no presenta *mcr-1* también contiene IncX4 (HSPEB13), siendo su cobertura del 85% y su identidad inferior al 98% (figura 3.10A). Por último, la única cepa que no presenta *mcr-1* en IncX4 lo presenta en un plásmido IncHI2 (HSPEC14), cuya estructura se ha reconstruido con elevada identidad y cobertura sobre el genoma de la cepa empleando pDJB-3, un plásmido estrechamente relacionado (figura 3.10B).

El contexto genómico del gen *mcr-1* es diferente entre los plásmidos IncX4 e IncHI2 identificados. Así, mientras que IncX4 codifica un sistema de secreción de tipo

IV (T4SS), y un elemento IS26 aguas arriba de la casete génica compuesta por *mcr-1* y *pap2* (Olaitan et al., 2014; Sun et al., 2017), perfectamente conservado entre pMUB-MIN6-MCR y los 7 plásmidos IncX4-*mcr-1* identificados en este trabajo (figura 3.10A), en el caso de IncHI2 se observa una notable diferencia entre el plásmido utilizado como referencia, pDJB-3, donde la casete *mcr-1-pap2* está flanqueada por secuencias de inserción ISAp11 que se encuentran ausentes en el plásmido identificado en la cepa HSPEC14 (figura 3.10B).



**Figura 3.10.** Estructura de los plásmidos conteniendo *mcr-1* identificados en *E. coli*. Los plásmidos IncX4 e IncHI2 se reconstruyeron utilizando PROKSEE y una secuencia de referencia de cada tipo. **A**, plásmido pMUB-MIN6-MCR (IncX4, SAMN17831481) procedente de una cepa extraintestinal de *E. coli* aislada en

Polonia (Majewski et al., 2021). **B**, plásmido pDJB-3 (IncHI2, MK574666) procedente de una cepa de *E. coli* aislada en China que contiene el cassette 'ISAp11-mcr1-pap2-ISAp11'.

Los genes para  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro identificados en este trabajo son también determinantes de resistencia a los antibióticos de gran relevancia, especialmente *bla<sub>CTX-M</sub>*, que suele presentar localización plasmídica (Sánchez-Benito et al., 2017). De hecho, no se observa la asociación exclusiva de los alelos de *bla<sub>CTX-M</sub>* detectados en este estudio con el fondo genético, encontrándose *bla<sub>CTX-M-15</sub>* en ST131 y ST167, *bla<sub>CTX-M-55</sub>* en ST4204 y ST59, y *bla<sub>CTX-M-27</sub>* en ST131 (tablas 3.16 y 3.17), lo que podría deberse a una frecuente dispersión horizontal de los elementos que los contienen. Se ha descrito que estos genes se localizan en plásmidos del tipo IncFII, un grupo heterogéneo denominado “epidemic resistance plasmids” por su gran capacidad de adquirir genes de resistencia y transferirlos a otras bacterias (Mathers et al., 2015), existiendo secuencias típicas de estos replicones en los 6 genomas que codifican *bla<sub>CTX-M</sub>* en este trabajo (tabla 3.17). En la movilización del gen *bla<sub>CTX-M</sub>* también participa la casete génica con ISEcp1 (por ejemplo 10.1128/Aac.49.1.447-450.2005), constituyendo un transposón compuesto que se detecta en HSPEB05 y HSPEB06, dos de las tres cepas de este estudio portadoras del gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, así como en HSPEB07 y HSPEB13, que portan el gen *bla<sub>CTX-M-55</sub>*, mientras que en los genomas obtenidos para las cepas HSPEB02 (*bla<sub>CTX-M-15</sub>*) y HSPEB08 (*bla<sub>CTX-M-27</sub>*), la secuencia del gen de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro está contenido en secuencias truncadas que no permiten definir con seguridad su inmediata vecindad.

La disponibilidad de uno de los genomas (HSPEB06) secuenciado mediante “Nanopore”, lo que disminuye drásticamente el número de secuencias ensambladas a solo 6, ha permitido reconstruir con una mayor precisión la naturaleza de los plásmidos identificados en esta cepa (tabla 3.18). Así, los 8 replicones potenciales inicialmente detectados en el genoma “Illumina” (tabla 3.17) se redujeron a 5, correspondiendo a plásmidos IncN (168084pb), IncFIA-like (112589pb), IncX4 (33272pb) y los dos últimos, no tipificables con PlasmidFinder pero presentando elevada identidad con secuencias plasmídicas de la base de datos “nt” rastreada mediante BLASTN y que son p04 (38973pb) y p05 (9440pb). Bandas con tamaños similares a los cuatro primeros

plásmidos se han visualizado en esta cepa, tras su análisis por PFGE-S1 (Hernández et al., 2017).

### 3.2.5.3. Agrupamiento filogenético de los aislados resistentes a la colistina

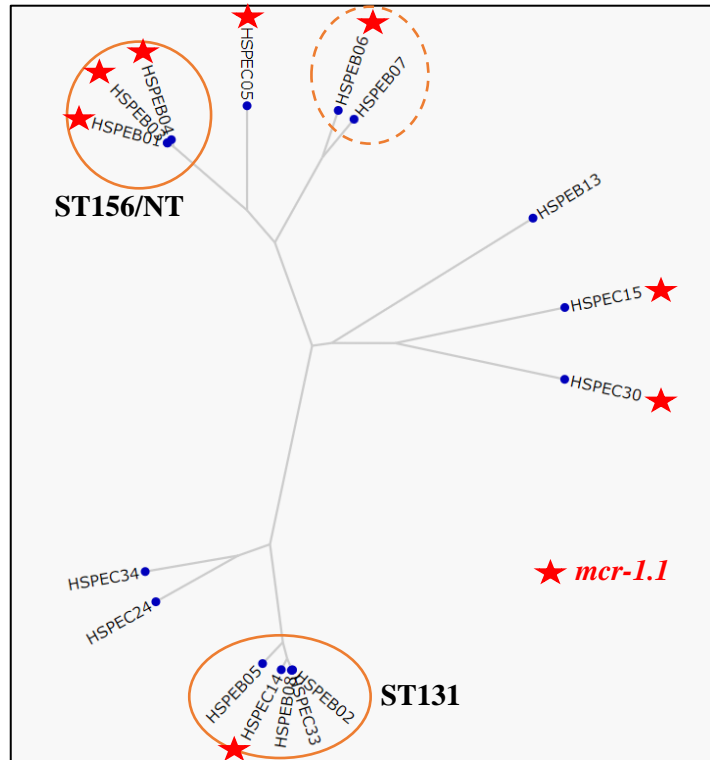
Un árbol filogenético construido para las 16 cepas de *E. coli* resistentes a la colistina mediante el programa Ntree, que rastrea y compara sus genomas, localizando posiciones polimórficas y agrupando según su semejanza, muestra la existencia de 3 clústeres de 2 ó más cepas (figura 3.11). En dos de estos grupos, las cepas comparten los pulsotipos más prevalentes en este estudio, ST131 o ST156, si bien este último grupo incluye una cepa con MLST no tipificable. El grupo correspondiente a ST156 está restringido a portadores de *mcr-1*, una posible indicación de su transmisión vertical. Por otro lado, el clúster ST131 incluye solo un portador de *mcr-1*, no existiendo asociación genética para el resto de cepas con este genotipo, lo que sugiere la transmisión horizontal del elemento. Por tanto, los dos posibles mecanismos de dispersión de *mcr-1*, transmisión clonal y transferencia conjugativa se evidencian en este estudio.

**Tabla 3.18.** Reconstrucción completa de los plásmidos de la cepa HSPEB06.\*

“Illumina” (pb)	%	Plásmidos	%	“Nanopore” (pb)	Elemento
NODE_71 (15784)	99.48	<b>IncFIA</b>	99.48		
NODE_218 (493)	-	<b>IncFIA(HI1)</b>	98.5		pHSPEB06- IncFIA-like
NODE_98 (7007)	98.24	<b>IncFIB(AP001918)</b>	98.39	Contig_3 (112589)	
NODE_116 (3994)	95.79	<b>IncFII</b>	95.63		
NODE_149 (1560)	95.42	<b>IncFII</b>	95.65		
NODE_86 (9346)	97,3	<b>IncFII(29)</b>	97.3		
NODE_49 (32124)	99,81	<b>IncN</b>	100	Contig_2 (168084)	pHSPEB06-IncN
NODE_93 (7353)	98,4	<b>IncX1</b>	98.66		
NODE_48 (32946)	99.47	<b>IncX4</b>	100	Contig_4 (33272)	pHSPEB06-IncX4
NODE_109 (4842)	-	-	-	Contig_5 (9440)	pHSPEB06-04
NODE_44 (39157)	-	-	-	Contig_6 (38973)	pHSPEB06-05

\*HSPEB06, denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017), se secuenció mediante “Illumina” y “Nanopore”, y se muestra el resultado de la identificación con PlasmidFinder (CGE/DTU) de sus replicones potenciales.





**Figura 3.11.** Agrupamiento filogenético de 16 cepas de *E. coli* resistentes a la colistina. El árbol filogenético se construyó usando NDtree (“Nucleotide Difference”, disponible en CGE/DTU), utilizando los genomas en formato fasta de las 16 cepas, secuenciadas mediante Illumina. Se indican los MLST más prevalentes y las cepas portadoras de *mcr-1.1*.

### 3.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *K. pneumoniae* ESBL RESISTENTE A COLISTINA

#### 3.3.1 Cepas resistentes a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro: origen de los aislados y fenotipos de sensibilidad frente a los antimicrobianos

Se identificaron un total de 21 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a colistina (tabla 3.19), lo que representa un 9,81% de las 214 cepas que expresan ESBLs identificadas en este trabajo (ver capítulo 1). Estas cepas, que crecieron en placas de Mueller-Hinton con colistina (2mg/L), correspondían a un paciente colonizado y 20 infectados, de las cuales 17 procedían de infecciones del tracto urinario, una bacteriemia, una infección respiratoria y un paciente con infección de piel y partes blandas (IPPB). Cronológicamente, en el año 2016 fue donde hubo mayor número de aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a colistina (n=7).

**Tabla 3.19.** Características epidemiológicas de *K. pneumoniae* resistente a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido y colistina

Cepa	Año	B lactamasa*	Muestra	Tipología
HSPKB01	2016	SHV	Orina	Infección
HSPKB02	2016	SHV	Orina	Infección
HSPKB03	2016	SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB04	2015	CTX-M, SHV	Orina	Infección
HSPKB05	2016	CTX-M, SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB07	2015	CTX-M, SHV, TEM	Respiratoria	Infección
HSPKB08	2015	CTX-M, SHV	Orina	Infección
HSPKB09	2016	CTX-M, SHV	Sangre	Infección
HSPKB10	2016	CTX-M, SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB11	2016	SHV	Orina	Infección
HSPKB12	2017	CTX-M, SHV	Orina	Infección
HSPKB13	2017	CTX-M, SHV	Orina	Infección
HSPKB14	2017	SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB15	2017	SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB16	2017	CTX-M, SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB17	2018	SHV	Orina	Infección
HSPKB18	2018	CTX-M, SHV, TEM	Orina	Infección
HSPKB19	2018	CTX-M, SHV, TEM	Rectal/heces	Colonización
HSPKB20	2016	CTX-M, SHV	Orina	Infección
HSPKB21	2018	SHV	IPPB	Infección
HSPKB22	2018	CTX-M, SHV, TEM	Orina	Infección

\*Identificado mediante PCR múltiple (Monstein et al., 2007; ver capítulo 1 de Resultados).

Los resultados de antibiogramas realizados mediante el sistema MicroScan WalkAway (Beckman Coulter) mostraron que todas las cepas resultaron resistentes a cefotaxima y ceftazidimia, mientras que sólo 19 lo eran a cefepime (tabla 3.20). Además, la mayoría de las cepas (18/21) fueron resistentes a amoxicilina/clavulánico y a piperacilina/tazobactam (13/21), destacando también la gran resistencia encontrada frente a carbapenemas en estos aislados, donde 12 fueron resistentes a ertapenem y 3 frente a imipenem.

**Tabla 3.20.** Fenotipos de susceptibilidad frente a los antibióticos de *K. pneumoniae* resistente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y a colistina.

Cepas	Antibióticos**														
	AMX	A/C	CFM	CFT	CTZ	CFP	P/TZ	GEN	TOB	CIP	SXT	FOS	FD	ERT	IMI
HSPKB01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
HSPKB02	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R
HSPKB03	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
HSPKB04	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S
HSPKB05	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S
HSPKB07	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPKB08	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
HSPKB09	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
HSPKB10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
HSPKB11	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S
HSPKB12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
HSPKB13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
HSPKB14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
HSPKB15	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
HSPKB16	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
HSPKB17	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
HSPKB18	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
HSPKB19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
HSPKB20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
HSPKB21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
HSPKB22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

\*Se representa la resistencia medida mediante el sistema MicroScan (Beckman Coulter), en base a microdilución en caldo y teniendo en cuenta los puntos de corte definidos por Eucast. \*\*AMX, amoxicilina; A/C, amoxicilina/ác.clavulánico; CFM, cefixima; CFT, cefotaxima; CTZ, ceftazidima; CFP, cefoperazona; P/TZ, piperacilina/tazobactam; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; FOS, fosfomicina; FD, nitrofurantoína; ERT, ertapenem IMI, imipenem. &Cepa denominada inicialmente HSP38 (Sánchez-Benito et al., 2017).

Con respecto a los antimicrobianos no  $\beta$  lactámicos testados (tabla 3.20), la mayoría de cepas presentaron resistencia a ciprofloxacina (n=19), cotrimoxazol (n=15), gentamicina y tobramicina (n=17), y fosfomicina (n=14). El antimicrobiano que mostró menor número de cepas resistentes fue la nitrofurantoina (n=5), el cual representa una

alternativa en el tratamiento de la infección urinaria causada por este tipo de microorganismos.

### 3.3.2. Identificación de mecanismos de resistencia a colistina

La caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a colistina en los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* resistente a  $\beta$  lactámicos comenzó mediante la PCR para detectar la posible presencia de genes *mcr* (desde *mcr-1* hasta *mcr-8*; Campos et al., 2023), ya utilizada en este trabajo (Capítulo 2, apartado 2.3.1.), evidenciándose tras la correspondiente electroforesis, que en ninguno de ellos se encontraban estos determinantes (resultado no mostrado). Puesto que varios determinantes potenciales confieren resistencia a colistina en *K. pneumoniae*, incluyendo mutaciones en *mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA* y *pmrB* (Olaitan et al., 2014), en este caso y a diferencia de la estrategia utilizada para las cepas de *E. coli* (Capítulo 2, apartado 2.3.2.), se llevó a cabo la secuenciación del genoma de las 21 cepas mediante tecnología “Illumina”.

#### 3.3.2.1 Identificación de polimorfismos génicos potencialmente implicados en la resistencia a colistina

Una vez descartada mediante PCR la presencia de genes *mcr* en la totalidad de las 21 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a colistina (ver punto anterior), los propios genomas fueron escrutados mediante BLASTN, confirmándose su ausencia en ellos (resultado no mostrado). Tampoco se detectó ninguna copia extra de los genes que constituyen el operón *arnBCADTEF*, que recientemente ha sido detectado en *E. coli* resistentes a la colistina y ubicado en un plásmido (Gallardo et al., 2021). A continuación, los genomas de las 21 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina se escrutaron en búsqueda de polimorfismos en los genes *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* y *phoQ* (tabla 3.21), principales determinantes no transmisibles descritos en esta especie (Olaitan et al., 2014), usando como referencia el genoma de la cepa de *K. pneumoniae* que representa el pulstipo 1 descrito en el capítulo 4 de este trabajo.

El principal determinante de resistencia a la colistina identificado fue la inactivación de *mgrB*, ya que 10 de las 21 cepas analizadas presentan diferentes tipos de elementos genéticos móviles integrados en su secuencia codificante; ISL3-like, IS1-like e IS5-like, con 6, 3 y 1 evento cada una y por orden de frecuencia de aparición, y además

otras 2 cepas presentan la mutación G37S en *mgrB* (tabla 3.21), siendo todos ellos polimorfismos previamente descritos que inactivan o disminuyen la actividad de este regulador que actúa negativamente sobre el sistema de doble componente *phoPQ* (Olaitan et al., 2014). A continuación, siguen por frecuencia de aparición las 4 mutaciones detectadas en *pmrB*; T157P en dos eventos, T140P y G207V, habiendo sido las dos primeras asociadas a la resistencia a la colistina, y aunque la tercera no aparece mencionada en la bibliografía, constan determinantes descritos en su inmediata vecindad (Olaitan et al., 2014). Entre las tres mutaciones detectadas en *pmrA*, solo los dos cambios alélicos G53S y G53V corresponden a un determinante previamente descrito, mientras que A217V tiene un papel incierto ya que, aunque se ha detectado en cepas con fenotipos resistentes a la colistina, en nuestro trabajo aparece asociado a la inactivación de *mgrB*, como ya había sido descrito con anterioridad (Jaidane et al., 2018). En PhoQ se detectó un único polimorfismo, L30Q, previamente asociado a la resistencia a la colistina (Azam et al., 2021) y, por último, tres cepas (HSPKB05, HSPKB19 y HSPKB22) escapan a la identificación de determinantes potenciales. Por otro lado, si bien todas las cepas presentaron valores de CMI para la colistina relativamente elevados, no se observa ninguna correlación entre su magnitud y los genotipos identificados (tabla 3.21).

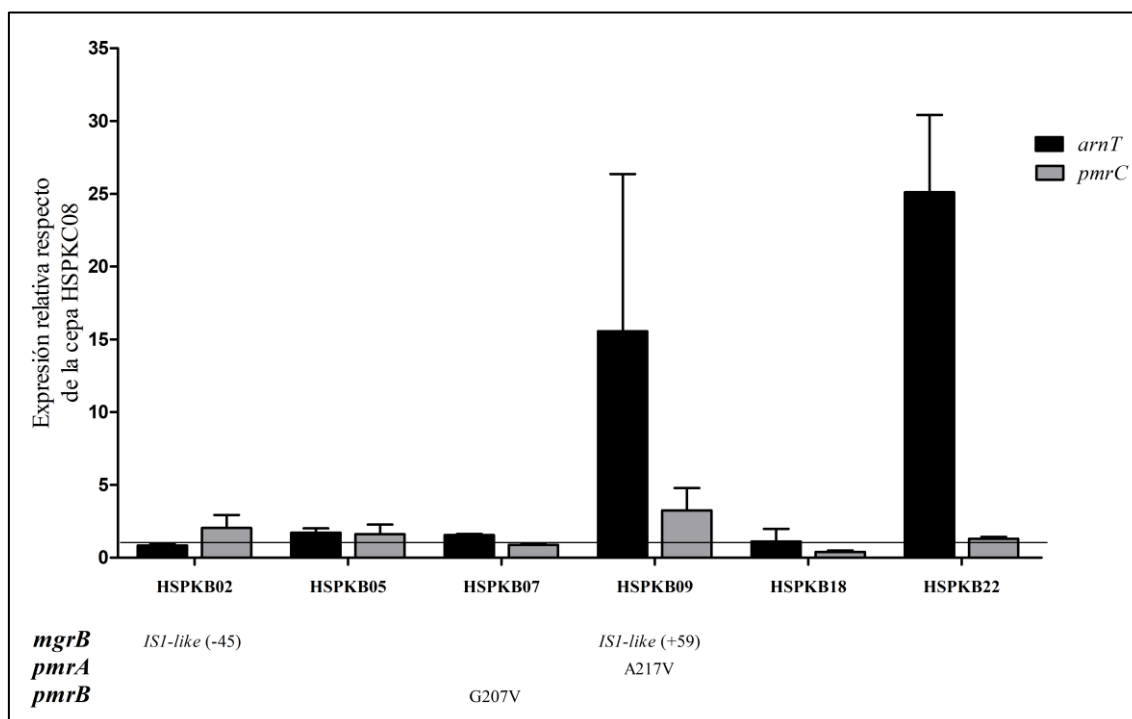
**Tabla 3.21.** Genotipos de *K. pneumoniae* resistente a colistina\*.

HSPKB	<i>mgrB</i> **	<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>phoP</i>	<i>phoQ</i>	COL***
HSPKB01	ISL3-like (+133)	-	-	-	-	32
HSPKB02	IS1-like (-45)	-	-	-	-	128
HSPKB03	ISL3-like (+133)	-	-	-	-	32
HSPKB04	-	G53S	-	-	-	64
HSPKB05	-	-	-	-	-	64
HSPKB07	-	-	G207V	-	-	64
HSPKB08	G37S	-	-	-	-	32
HSPKB09	IS1-like (+59)	A217V	-	-	-	12
HSPKB10	-	-	T157P	-	-	32
HSPKB11	-	G53V	-	-	-	64
HSPKB12	IS5-like ( $\Delta^{yobH-mgrB-YebO}$ )	-	-	-	-	>128
HSPKB13	IS1-like (+119)	-	T140P	-	-	>128
HSPKB14	ISL3-like (+133)	-	-	-	-	32
HSPKB15	ISL3-like (+133)	-	-	-	-	32
HSPKB16	ISL3-like (+129)	-	-	-	-	128
HSPKB17	ISL3-like (+133)	-	-	-	-	32
HSPKB18	-	-	-	-	-	64
HSPKB19	-	-	-	-	L30Q	4
HSPKB20	G37S	-	-	-	-	128
HSPKB21	-	-	T157P	-	-	64
HSPKB22	-	-	-	-	-	16

\*Solo se muestran los polimorfismos estrechamente asociados con resistencia a la colistina, descartándose todos los que se han detectado en cepas sensibles. \*\*Entre paréntesis se indica la posición de cada inserción respecto al primer nucleótido de la secuencia codificante de *mgrB*. \*\*\*CMI (mg/L) para la colistina, determinado mediante E-test (Liofilchem<sup>R</sup>).

### 3.3.2.2. Impacto de los determinantes de resistencia a colistina sobre la expresión génica

Para determinar la participación de los polimorfismos encontrados en la regulación transcripcional de los operones *pmrCAB* y *arnBCADTEF*, cuya sobreexpresión se considera principal efector de la resistencia a colistina (Olaitan et al., 2014), se realizó una qPCR a 6 cepas, incluyendo 3 que representan algunos de los determinantes de resistencia identificados en el análisis de polimorfismos (tabla 3.21); HSPKB02 (inserción de un elemento IS1-like aguas arriba del inicio de traducción de *mgrB*), HSPKB07 (mutación G207V en *pmrB*, no descrita previamente) y HSPKB09 (inserción de un elemento IS1-like en la secuencia codificante de *mgrB*). Las otras tres cepas seleccionadas para este estudio; HSPKB05, HSPKB18 y HSPKB22, carecen de determinante conocido tras el análisis de polimorfismos. Mientras que no se detectó en ningún caso la alteración de la expresión basal de *pmrC*, solo en HSPKB09 y HSPKB22 se observó la sobreexpresión de *pmrK*, correspondiendo respectivamente al único aislado que presenta un determinante inequívoco de resistencia por inactivación de *mgrB*, y a una de las tres cepas sin determinante conocido (figura 3.12).

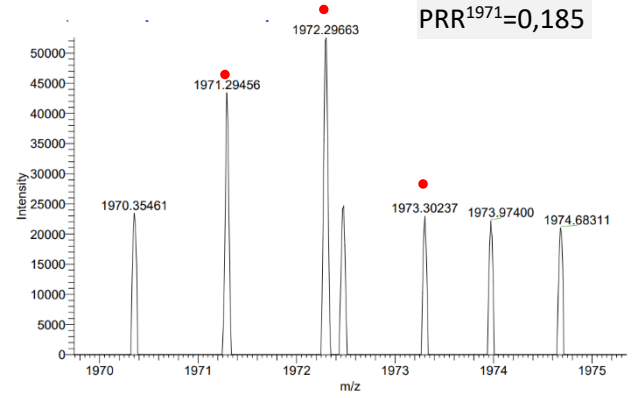
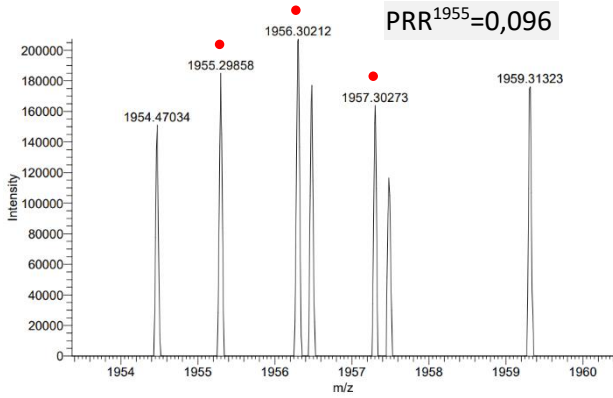
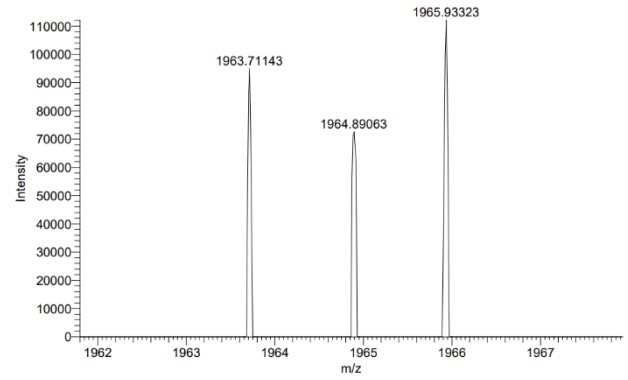
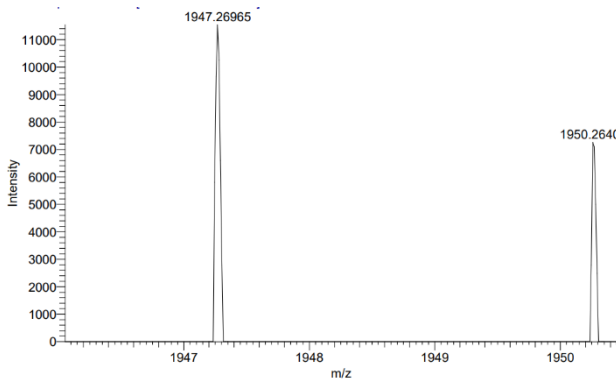
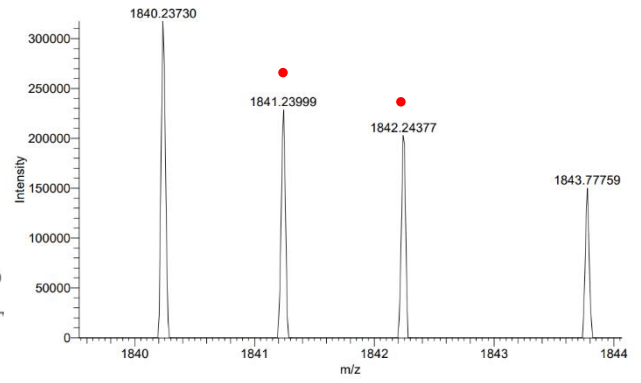
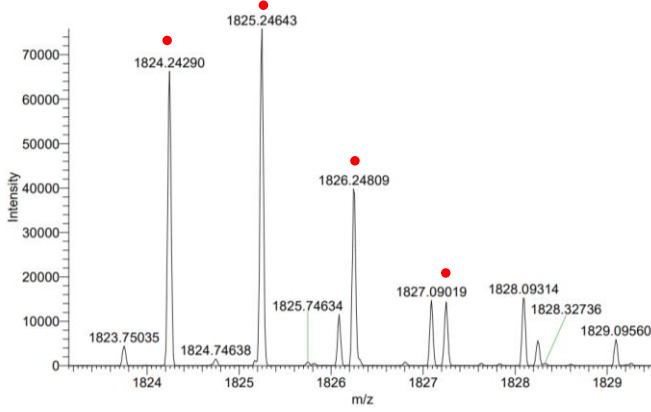


**Figura 3.12** (Página anterior). Control de la expresión de los genes *arnT* y *pmrC* de *K. pneumoniae* por determinantes de resistencia a la colistina, determinado mediante PCR cuantitativa (qPCR). Como expresión génica relativa se muestra el valor de  $\Delta\Delta C_t$  para cada mRNA y cepa analizada, utilizándose la cepa *K. pneumoniae* HSPKC08 como control y el mRNA de *recA* como calibrador interno de cada preparación de mRNA. La qPCR se llevó a cabo con las cepas indicadas según se describe en Materiales y Métodos, utilizándose dos experimentos independientes (incluyendo cultivo celular, extracción de RNA y síntesis de cDNA) para el cálculo de las medias y del error de cada determinación. En la parte inferior se muestran los polimorfismos que presentan las cepas utilizadas en determinantes de resistencia a la colistina (tabla 3.21).

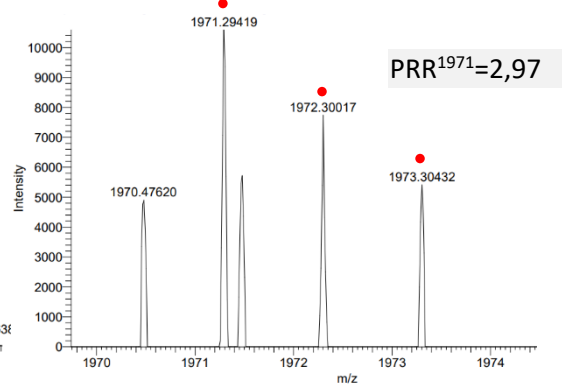
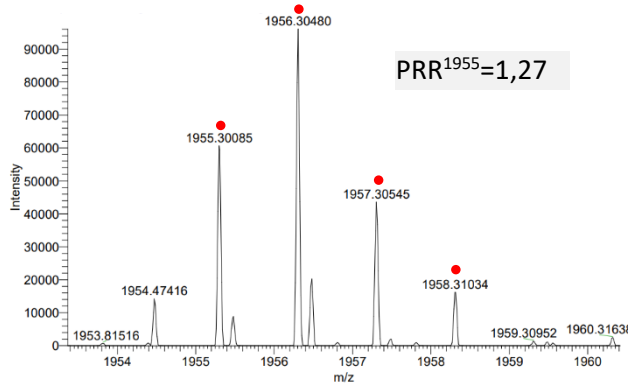
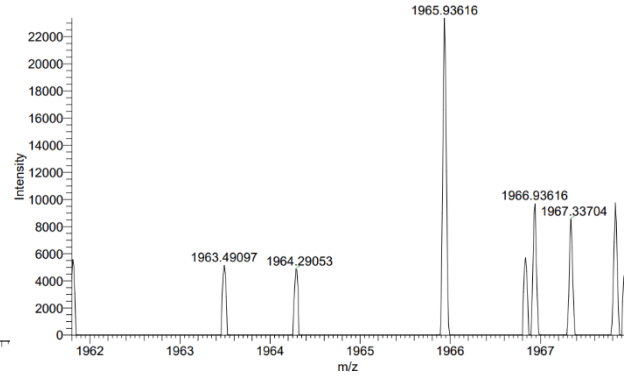
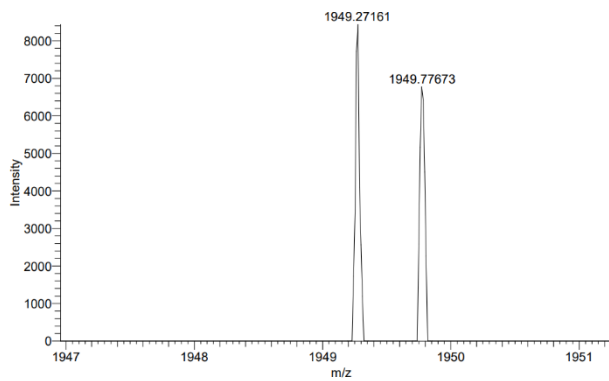
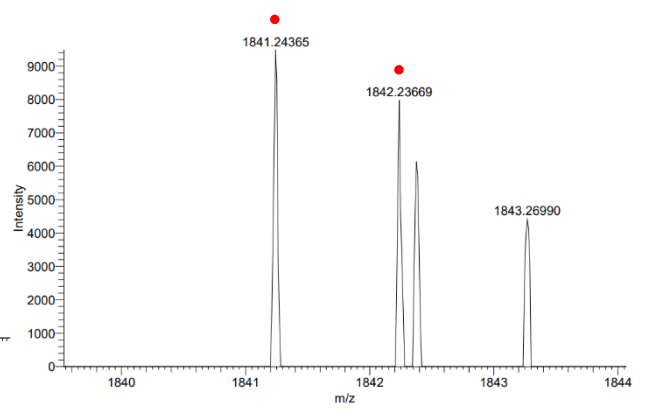
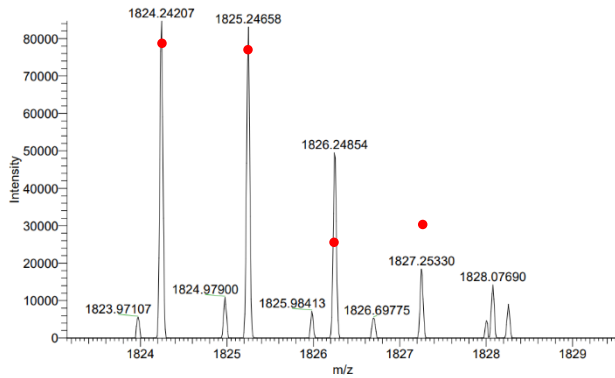
### 3.3.2.3. Decoración del lípido A

La posible presencia de modificaciones estructurales que reducen la carga negativa del LPS y su interacción con las polimixinas y otros antimicrobianos peptídicos cargados positivamente, mediante la adición de fosfoetanolamina y/o 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (ver apartado 2.3.3, capítulo 2 de los resultados de este trabajo), se analizó mediante espectrometría de masas de extracciones de lípido A de cinco cepas de *K. pneumoniae* resistentes a colistina (figura 3.13). Entre las cepas seleccionadas para este estudio, HSPKB02 presenta una inserción fuera (aguas arriba) de la secuencia codificante de *mgrB*, HSPKB07 tiene una mutación de efecto desconocido en *pmrB*, mientras que HSPKB05, HSPKB18 y HSPKB22 carecen de genotipo asociable con su fenotipo de resistencia a la colistina (tabla 3.21). No obstante, en las 5 cepas se observan las alteraciones previsibles del valor m/z del lípido A cuando resulta estar modificado con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, con o sin hidroxilación, si bien esta última especie se presenta con una PRR (relación de resistencia a polimixina) mayor (aproximadamente el doble) que la primera (Figura 3.13). Además, en la cepa HSPKB02 los valores de PRR fueron muy inferiores a los de las otras 4 cepas, entre las que destaca HSPKB22, la única que sobreexpresa *arnT* (Figuras 3.12 y 3.13).

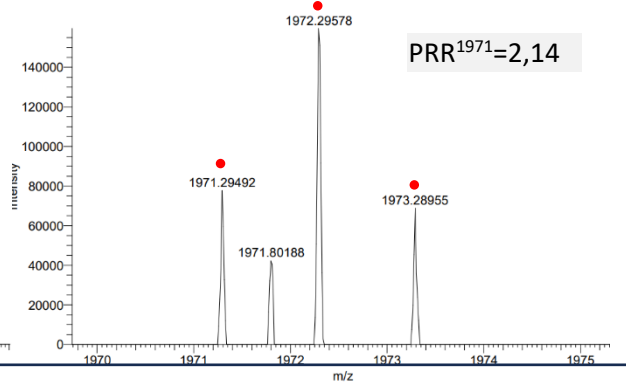
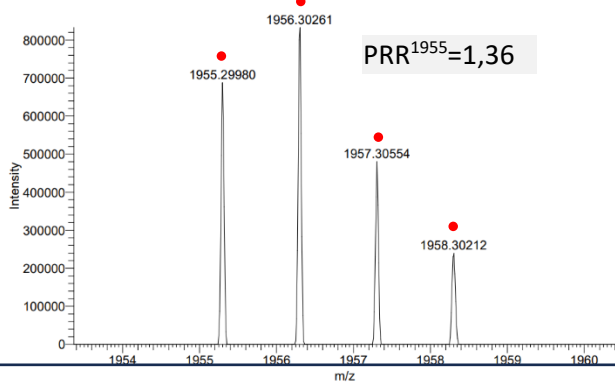
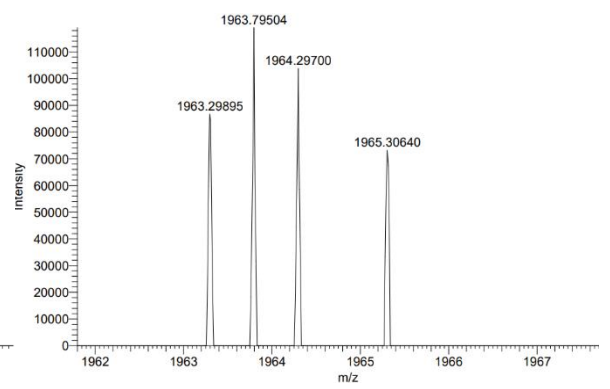
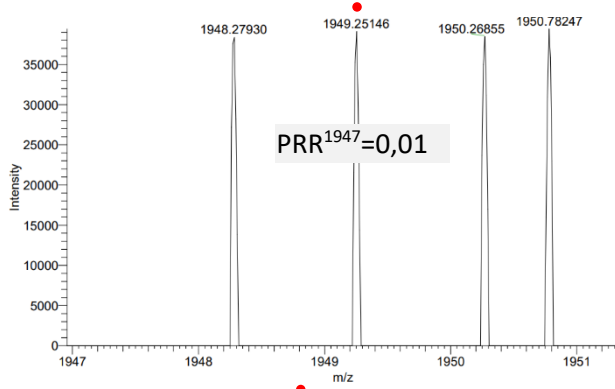
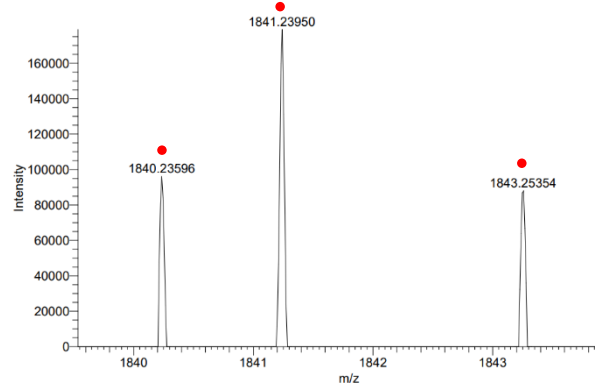
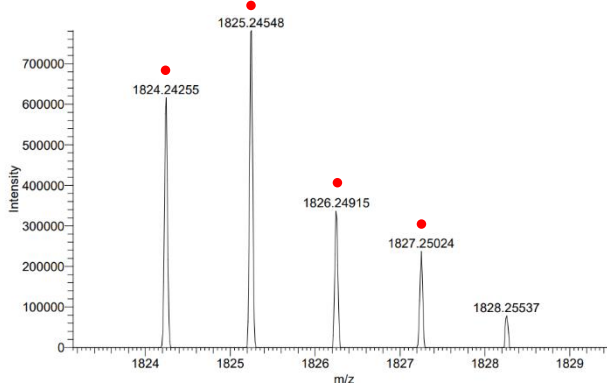
A.



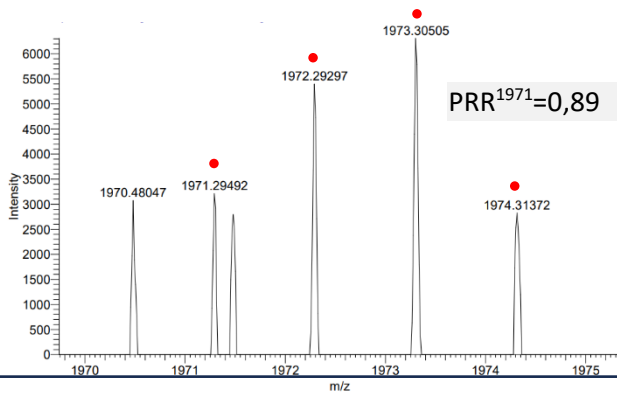
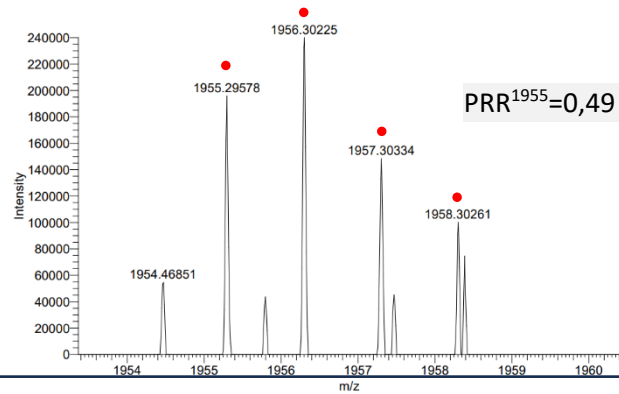
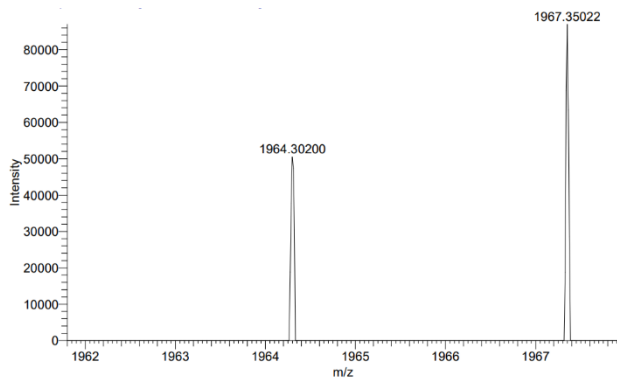
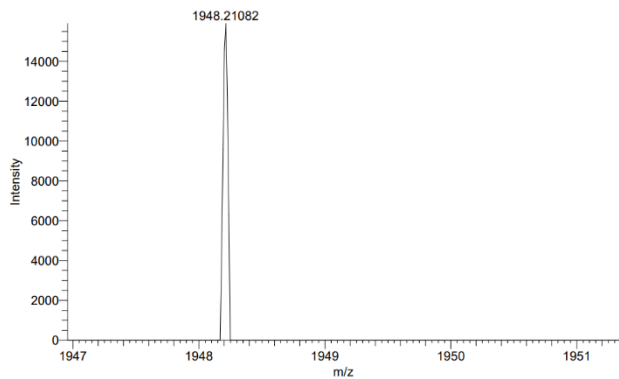
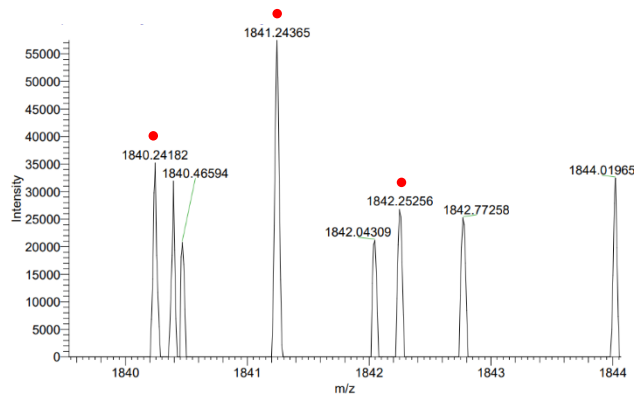
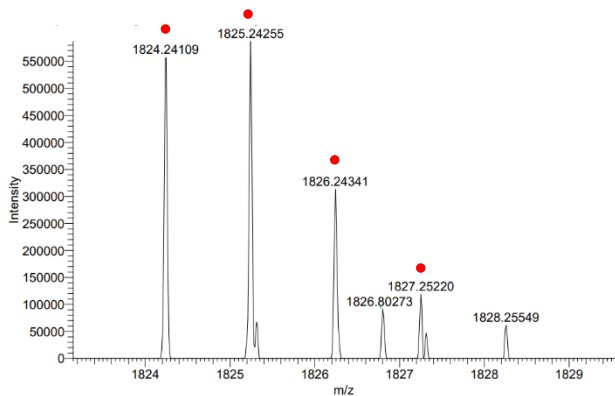


**B**

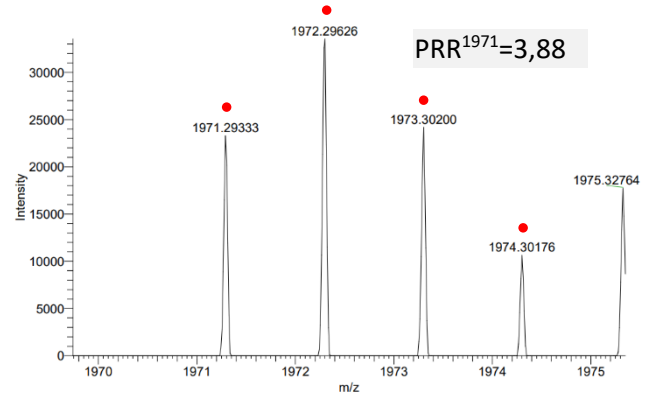
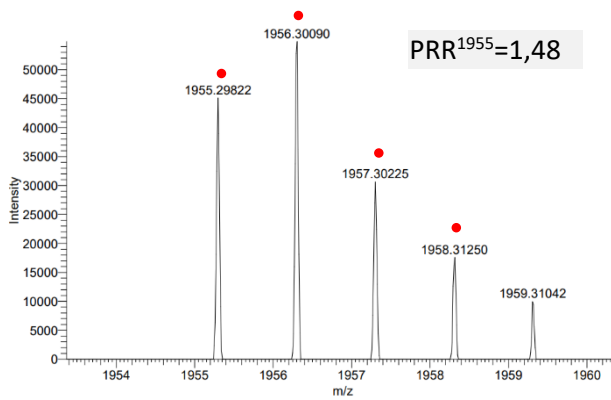
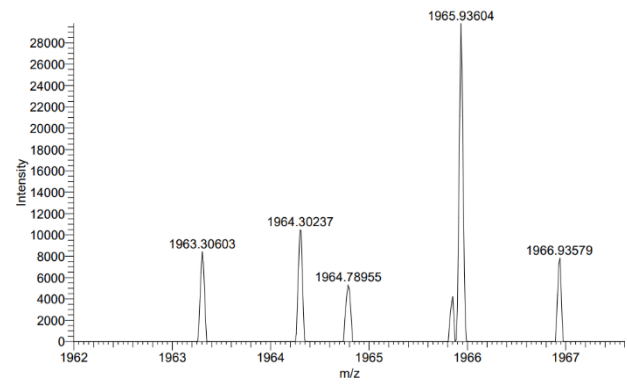
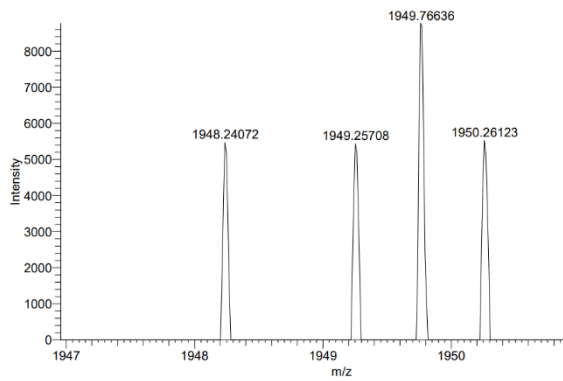
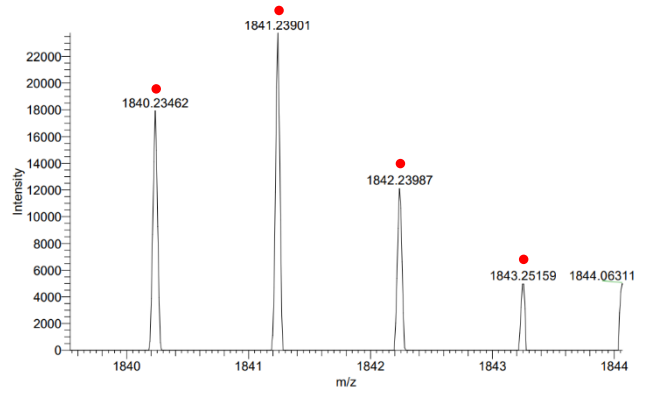
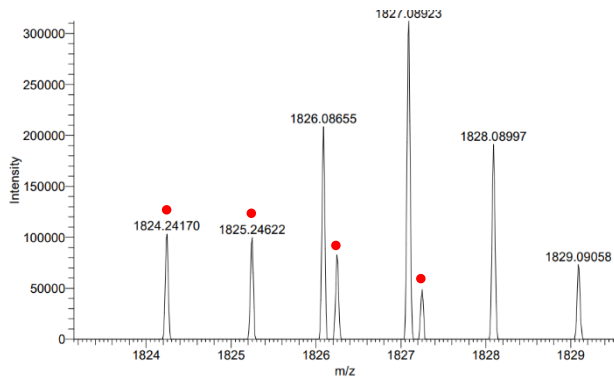
C



D



# E



**Figura 3.13** (Páginas anteriores). Espectros UHPLC-HRMS de preparaciones de lípido A de cepas de *K. pneumoniae*: A, HSPKB02; B, HSPKB05; C, HSPKB07; D, HSPKB18; E, HSPKB22. Los extractos lipídicos se obtuvieron mediante el método “blight & dyer” (Materiales y Métodos). Las áreas de los picos señaladas con puntos rojos se integraron para calcular la PRR correspondiente ( $PRR^{1955} = 1955/1824$ ;  $PRR^{1971} = 1971/1840$ ), considerando un máximo de 4 isotopólogos (+1Da respecto al valor mínimo esperado) y únicamente los valores m/z esperados con  $\pm 0,01$ Da de precisión para el lípido A hexaacilado con las siguientes modificaciones: sin modificar, 1824,24 / 1825,24 / 1826,24 / 1827,24; hidroxilado, 1840,24 / 1841,24 / 1842,24 / 1843,24; +fosfoetanolamina, 1947,25 / 1948,25 / 1949,25 / 1950,25; +4-amino-4-desoxi-L-arabinosa; 1955,30 / 1956,30 / 1957,30 / 1958,30; hidroxilado + fosfoetanolamina, 1963,25 / 1964,25 / 1965,25 / 1966,25; hidroxilado + 4-amino-desoxi-arabinosa, 1971,30 / 1972,30 / 1973,30 / 1974,30.

### 3.3.3 Análisis genómico de los aislados resistentes a la colistina

#### 3.3.3.1 Detección de genes de resistencia frente a los antimicrobianos

Se determinó la presencia de los determinantes de resistencia existentes en los genomas bacterianos secuenciados, utilizando para ello el programa ResFinder, disponible en la plataforma web del CGE/DTU (“Center for Genomic Epidemiology, Technical University of Denmark”, <https://www.genomicepidemiology.org/>), incluyendo tanto la búsqueda de genes adquiridos (movilizables) como de mutaciones cromosómicas en *Klebsiella*, y utilizando los umbrales de sensibilidad ofrecidos por defecto, con un 90% de identidad y un 60% de cobertura como valores mínimos, analizándose en mayor detalle los casos dudosos tras descarga de su secuencia y análisis mediante BLAST frente a secuencias disponibles en las bases de datos del NCBI (Tabla 3.22).

Fruto de este estudio se identificaron los genes para resistencia a  $\beta$ -lactámicos (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>AmpC</sub>*) y carbapenemas, (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*), la mayoría de los cuales ya había sido detectados mediante una PCR múltiple para b-lactamasas de amplio espectro (para *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*; Monstein et al., 2007) y una PCR cuantitativa comercial para carbapenemasas (ver capítulo de resultados y sección de materiales y métodos), aunque ahora se pudieron identificar los alelos implicados con mayor precisión (Tabla 22). Así, entre las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina, los genes para  $\beta$ -lactamasas detectados con mayor frecuencia fueron *bla<sub>SHV</sub>* (en 21 cepas, n=21), *bla<sub>CTX-M</sub>* (n=13), *bla<sub>OXA</sub>* (n=10) y *bla<sub>TEM</sub>* (n=10). La única CTX-M detectada fue CTX-M-15 (grupo CTX-M-1). Entre los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>SHV-106</sub>* (n=8) y *bla<sub>SHV-11</sub>* (n=7) fueron los más prevalentes, seguidos por *bla<sub>SHV-12</sub>* (n=3), *bla<sub>SHV-134</sub>* (n=1), *bla<sub>SHV-27</sub>* (n=1) y *bla<sub>SHV-76</sub>* (n=1). Además 11 aislados presentaban *bla<sub>OXA</sub>* (*bla<sub>OXA-1</sub>* n=9 y *bla<sub>OXA-9</sub>* n=2) y 10 aislados *bla<sub>TEM-1</sub>*. Por lo que respecta a la presencia de

carbapenemasas, el gen más prevalente es *bla<sub>OXA-48</sub>* (n=9), seguido por *bla<sub>KPC 3</sub>* (n=2) y *bla<sub>VIMI</sub>* (n=1). Entre los determinantes para antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos destacan los de resistencia frente a *fluoroquinolonas*, detectándose *oqxAB* en la totalidad de los 21 aislados, además de *aac(6')-Ib-cr* (n=12), *qnrB1* (n=10) y *qnrS1* (n=1). Además, entre las 21 cepas secuenciadas se encontraron 19 cepas con diversos genes de resistencia a aminoglucósidos: *aac(3)-IIa* (n=13), *aac(6')-Ib-cr* (n=12), *aph(3'')-Ib* (n=10), *aph(6)-Id* (n=10), *aadA2* (n=3), *aac(6')-Ib* (n=2), , *aph(3')-Ia* (n=2), *aac(6')-Ib-Hangzhou* (n=1), *aadA1* (n=1), *rmtF* (n=1) y 18 aislados con genes de resistencia a sulfamidas (*sul2*, n=9; *sul1*, n=5; *dfrA14*, n=11; *dfrA12*, n=4; y *dfrB1*, n=1). Por último, la totalidad de aislados presentó genes plasmídicos de resistencia a fosfomicina (*fosA*).

### 3.3.3.2 Tipificación de las cepas: MLST e identificación de plásmidos

El ST (“Sequence Type”) de las cepas de *K. pneumoniae* se determinó mediante MLST (“Multi Locus Sequence Typing”) de acuerdo con las secuencias disponibles en PubMLST.org, que se basa en siete genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, y *tonB*) y el esquema de clasificación previamente descrito para *K. pneumoniae* (Bialek-Davenet et al., 2014), utilizando el programa MLST 2.0 (CGE/DTU). Este análisis mostró gran diversidad clonal entre las distintas cepas, siendo los clones más prevalentes ST11 (n=6) y ST15 (n=6), seguidos de ST307 (n=4), mientras que los otros STs identificados (ST36, ST101, ST280, ST405 y ST14) fueron únicos (Tabla 3.23).

La búsqueda de plásmidos en las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina se realizó mediante el programa PlasmidFinder, como ya se explicó en el apartado 3.2.5.2. Entre los replicones detectados el más prevalente fue IncFII (n=18), seguido de IncFIB (n=17), IncR (n=11), IncL (n=10), IncFIB (pQil) (n=8), ColpVC (n=6), Col440I (n=3) y Col440II (n=3), como se muestra en la tabla 3.23.

**Tabla 22.** Detección de determinantes de resistencia\* a los antibióticos mediante análisis genómico de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina.

Cepa	$\beta$ -lactámicos	Carbapenemas	Quinolonas	Aminoglucósidos	Sulfamidas+ Trimetoprim	Fosfomicina	Colistina
<b>HSPKB01</b>	<i>bla<sub>SHV-134</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB02</b>	<i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	<i>Bla<sub>VIM-1</sub></i>	<i>oqxAB, qnrS1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib3, aadA1</i>	<i>sul1, dfrB1</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB03</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-9</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB04</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	-	<i>oqxAB</i>	-	-	<i>fosA</i>	<i>pmrA-G53S</i>
<b>HSPKB05</b>	<i>bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub></i>	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA12</i>	<i>fosA</i>	-
<b>HSPKB07</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>pmrB-G207V</i>
<b>HSPKB08</b>	<i>bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>sul1, dfrA12</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-G37S</i>
<b>HSPKB09</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6')-Ib-hangzhou, rmtf, aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr</i>	-	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS, pmrA-A217V</i>
<b>HSPKB10</b>	<i>bla<sub>SHV-27</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>pmrB-T157P</i>
<b>HSPKB11</b>	<i>bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa</i>	-	<i>fosA</i>	<i>pmrA-G53V</i>
<b>HSPKB12</b>	<i>bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa</i>	-	<i>fosA</i>	<i>mgrB-Δ</i>
<b>HSPKB13</b>	<i>bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, aadA2</i>	<i>sul1, dfrA12</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS, pmrB-T140P</i>
<b>HSPKB14</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB15</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub>, bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB</i>	-	<i>dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB16</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB17</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	-	<i>oqxAB</i>	-	<i>dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-IS</i>
<b>HSPKB18</b>	<i>bla<sub>SHV-76</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub></i>	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	-
<b>HSPKB19</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>KPC-3</sub></i>	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	<i>phoQ-L30Q</i>
<b>HSPKB20</b>	<i>bla<sub>SHV-11</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa</i>	<i>sul1, dfrA12</i>	<i>fosA</i>	<i>mgrB-G37S</i>
<b>HSPKB21</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>pmrB-T157P</i>
<b>HSPKB22</b>	<i>bla<sub>SHV-106</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>OXA-9</sub></i>	<i>bla<sub>KPC-3</sub></i>	<i>oqxAB, qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>sul2, dfrA14</i>	<i>fosA</i>	-

\*Se muestran los determinantes detectados que presentan una identidad >98% con las secuencias disponibles en la base de datos de ResFinder (CGE/DTU).

Entre los plásmidos detectados en este estudio (tabla 3.23) se aprecia una asociación total entre los genes *bla<sub>OXA-48</sub>* (detectado en 9 cepas, n=9) y *bla<sub>VIM-1</sub>* (n=1) con secuencias típicas del replicón IncL (n=10). Así, *bla<sub>OXA-48</sub>* que está presente en las cepas HSPKB01, HSPKB03, HSPKB08, HSPKB12-HSPKB15, HSPKB20 y HSPKB21, se localizaría en plásmidos muy similares (cobertura e identidad cercana al 100%) a Kp11978 (JN626286) y pKP<sub>OXA-48</sub>N1 (NC\_021488.1), ambos de 60Kb y detectados en cepas de *K. pneumoniae* aisladas en Francia (Poirel et al., 2012; Berger et al., 2013). En estos plásmidos, el gen *bla<sub>OXA-48</sub>* se encuentra flanqueado por una o dos copias de IS4. Por otra parte, el gen *bla<sub>VIM-1</sub>*, presente en la cepa HSPKB02, se localizaría en un plásmido muy similar (cobertura e identidad cercana al 100%) a pKp1050-3 (CP023419.1), de 70 Kb y también del tipo IncL, identificado de una cepa de *K. pneumoniae* aislada en España, donde se localiza en un integron de clase 1 que contiene además otros genes de resistencia a antimicrobianos, además de la presencia aguas arriba de IS26 (Lázaro-Perona et al., 2018). A diferencia de los anteriores, el gen *bla<sub>KPC-3</sub>* de las cepas HSPKB19 y HSPKB22 estaría contenido en el Tn4401 y localizado en un replicón del tipo IncFIB(pQil), correspondiente con los plásmidos pKpQIL-IT (JN233705.2) y Pkpc (CP043971.1), de algo más de 110Kb y procedentes de cepas de *K. pneumoniae* aisladas en Italia y Francia, respectivamente (García-Fernández et al., 2012; Jousset et al., 2020).

Los aislados que contenían *bla<sub>CTX-M-15</sub>* mostraron diferentes perfiles de plásmidos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad, siendo los de tipo IncF los más comunes (tabla 3.23), y como ya se mencionó en el capítulo anterior (sección 2.4.2.), la secuencia de inserción ISEcp1 suele estar situada en su inmediata vecindad. Así, las cepas HSPKB07, HSPKB10, HSPKB16, HSPKB18, HSPKB19 y HSPKB22 presentarían plásmidos muy similares a pE16KP0133-1 (CP052307.1), de 200Kb y detectado en *K. pneumoniae* procedente de Corea, mientras que la cepa HSPKB09 contendría un plásmido del tipo de p2020C07-241-241k (CP129800.1), de 240Kb y detectado en *K. pneumoniae* procedente de España.

En 6 de las 21 cepas (KB04, KB05, KB08, KB12, KB13 y KB20) el gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>* se encontró integrado en el cromosoma bacteriano, presentando cinco de ellas ST11 y una ST15, lo que pone de manifiesto que *K. pneumoniae* puede portar genes *bla<sub>CTX-M</sub>* en diversos contextos genéticos, incluyendo el propio cromosoma. Así mismo, la alta prevalencia de *bla<sub>CTX-M</sub>* cromosómico (28.57%), ya mencionada en otros trabajos (Hammamoto e Hirai, 2019; Yoon et al., 2020), indicaría que su presencia añadida a



distintos determinantes de resistencia a la colistina así como al gen *bla<sub>OXA-48</sub>* (en HSPKB08, HSPKB12 y HSPKB20) no penaliza el potencial de dispersión de *K. pneumoniae*.

El entorno génico de los genes para  $\beta$ -lactamasas no pudo ser definido con precisión en las cepas analizadas en este trabajo mediante tecnología “Illumina” ya que la naturaleza repetitiva de las secuencias que los flanquean limita a su nivel un ensamblaje óptimo de los genomas.

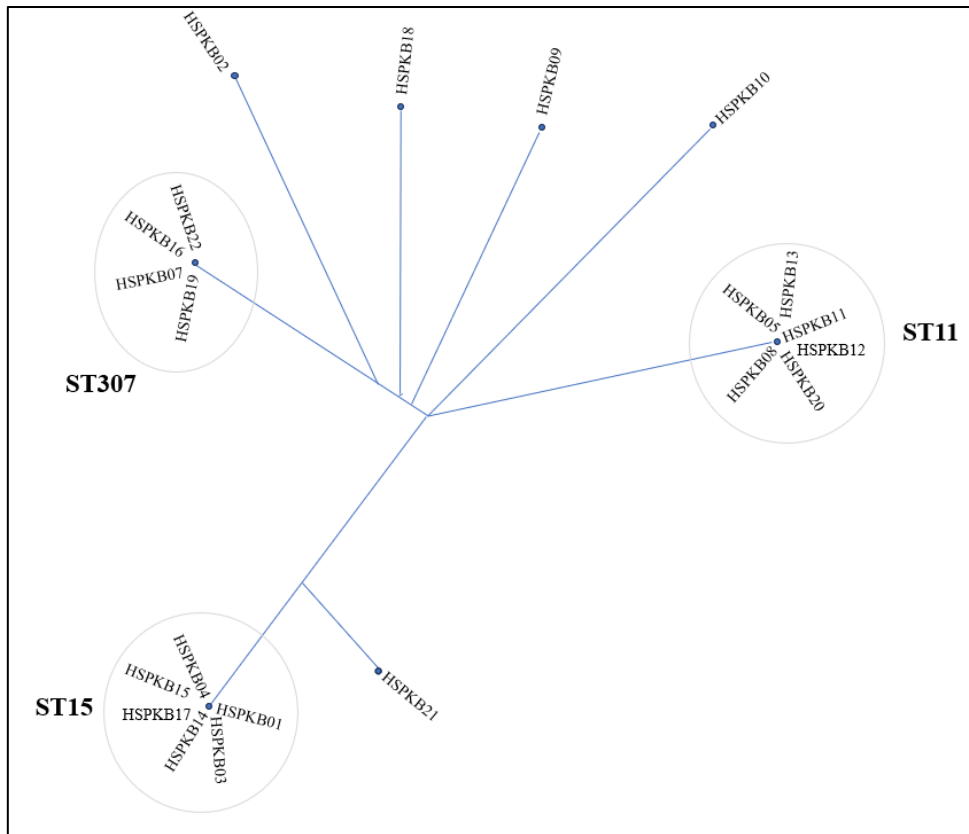
### 3.3.3.3 Agrupamiento filogenético de los aislados resistentes a colistina

El árbol filogenético de las 21 cepas de *K. pneumoniae*, construido a partir del algoritmo Neighbour-joining tree mediante NDtree (figura 3.14), muestra la existencia de relaciones clonales entre las cepas de *K. pneumoniae* resistente a  $\beta$  lactámicos y colistina analizadas en este trabajo. Así, se observa que existen tres clústeres con diferentes STs, dos de ellos con 6 cepas c/u pertenecen a los clones ST15 y ST11 mientras que el tercero engloba a 4 cepas del clon ST307, además de cinco cepas con diversos STs. En los clones ST11, ST15 y ST307 se detecta una cierta asociación, aunque incompleta, con determinantes de resistencia. Así, la mayoría de las cepas con *bla<sub>OXA-48</sub>* pertenecen a los clones ST11 (n=4) y ST15 (n=4), y las dos cepas con *bla<sub>KPC3</sub>* presentan ST307. Aún más, cepas que presentan en común determinantes de resistencia a la colistina y a  $\beta$ -lactámicos (carbapenemas, en estos casos) corresponden al mismo fondo genético, 4 cepas ST15 con inserciones ISL3-like (+133) en *mgrB* y 2 cepas ST11 con la mutación *mgrB*-G37S, lo que demostraría que la selección y acumulación de estos genotipos/fenotipos no compromete su elevado potencial de dispersión vertical (figura 3.14).

**Tabla 3.23.** Plásmidos identificados en las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina.

Cepas	ST	Plásmidos*
HSPKB01	15	<b>IncFIB(K), IncFIB(pQil), IncL, ColpVC, IncFII(K)</b>
HSPKB02	36	<b>IncL, IncFIB(K), IncFII(K), IncR, IncFIB (pKPHS1)</b>
HSPKB03	15	<b>IncFIB(K), IncFIB(pQil), IncL, IncR ColpVC, IncFII(K)</b>
HSPKB04	15	<b>IncFIB(pNDM-Mar), IncFII(pKP91), IncFIB(pKPHS1), IncR, repB(R1701)</b>
HSPKB05	11	<b>IncFIB(K), IncFII(K), IncR</b>
HSPKB07	307	<b>IncFIB(K), IncFIB(pNDM-Mar), IncFII(K)</b>
HSPKB08	11	<b>IncFIB(K), IncFII(K), IncL, IncR</b>
HSPKB09	101	<b>IncFIB(pQil), Col440II, IncFIB(K), IncFII(K), repB(R1701)</b>
HSPKB10	280	<b>IncFIB(K), IncFII(K)</b>
HSPKB11	11	<b>IncR</b>
HSPKB12	11	<b>IncFIB(K), IncFII(K), IncL, IncR, ColpVC</b>
HSPKB13	11	<b>IncFII(K), IncL, IncR</b>
HSPKB14	15	<b>IncFIB(K), IncL, IncR, ColpVC, IncFII(K)</b>
HSPKB15	15	<b>IncFIB(pQil), IncL, IncR, ColpVC, IncFII(K)</b>
HSPKB16	307	<b>IncFIB(pQil), IncFIB(K), IncFII(K)</b>
HSPKB17	15	<b>IncFIB(pQil), ColpVC, IncFII(K)</b>
HSPKB18	405	<b>Col440I, IncFIB(K)</b>
HSPKB19	307	<b>IncFIB(pQil), Col440I, Col440II, IncFIB(K), IncFII(K)</b>
HSPKB20	11	<b>IncFIB(K), IncFII(K), IncL, IncR</b>
HSPKB21	14	<b>IncL, IncFIB(K)</b>
HSPKB22	307	<b>IncFIB(pQil), Col440I, Col440II, IncFIB(K), IncFII(K)</b>

\*En negrita se indican solo los plásmidos cuya secuencia tipo se detecta con un 100% de identidad.



**Figura 3.14.** Agrupamiento filogenético de 21 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina. El árbol filogenético se construyó usando NDtree (“Nucleotide Difference”, disponible en CGE/DTU), utilizando los genomas en formato fasta de las 21 cepas, secuenciadas mediante Illumina. Se indican los MLST más prevalentes.

### **3.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UN BROTE DE *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>**

#### **3.4.1. Epidemiología y fenotipo de resistencia de *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>**

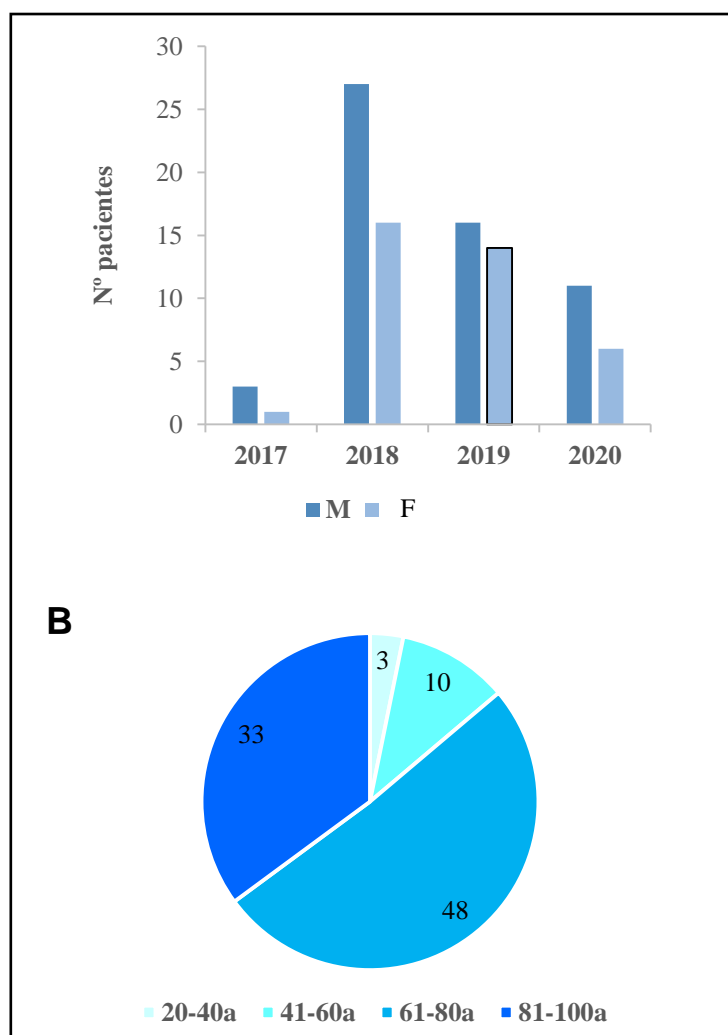
En este trabajo se procede al análisis de aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas en el contexto de un brote acaecido en el Complejo Hospitalario de Cáceres, que se inició en septiembre de 2017 y que se dio por concluido en mayo de 2020. Se trata de un Complejo Hospitalario que cuenta con unas 520 camas, y una cobertura poblacional de aproximadamente 199.000 habitantes, donde se originó un brote debido a *Klebsiella pneumoniae* ST307 multirresistente productora de carbapenemasa de clase A tipo KPC-3.

Las cepas aisladas procedían de pacientes infectados/colonizados, y fueron procesadas mediante el sistema MicroScan WalkAway (Beckman Coulter), la interpretación del antibiograma se realizó según criterios Eucast en cuanto a sensibilidad antibiótica y para corroborar la identificación de las cepas se utilizó el sistema Maldi Biotyper (Bruker). Para los cribados se utilizaron placas cromogénicas selectivas Chromagar (bioMerieux).

Las cepas que presentaron una CMI $\geq$ 0.12 a ertapenem/meropenem, o que crecieron en las placas de cribado, fueron analizadas para la detección de genes codificantes de carbapenemasas (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) utilizando una PCR múltiple a tiempo real (GeneXpert<sup>®</sup>, Cepheid). Ante la alta sospecha de brote se procedió a enviar 12 de estos aislados iniciales al Centro Nacional de Microbiología (Madrid) para su confirmación y caracterización; el informe remitido puso de manifiesto que se trataba de *K. pneumoniae* clon ST307, portadora de carbapenemasa clase A tipo KPC-3 y además de  $\beta$  lactamasa de amplio espectro CTX-M 15 (Oteo-Iglesias et al., 2020). Teniendo en cuenta esta situación epidemiológica, a partir de este momento se implementaron intensas medidas de vigilancia y control, realizándose los pertinentes estudios de colonización según los protocolos establecidos.

Durante el periodo estudiado se detectaron 94 pacientes infectados/colonizados por *K. pneumoniae* multirresistente productora de carbapenemasa de Clase A y tipo KPC. Desde el primer aislamiento en septiembre de 2017, el año con mayor incidencia fue 2018 (43 pacientes), incidencia que fue decreciendo en los años sucesivos con las medidas de vigilancia y control, siendo superior su prevalencia (60,64%) entre las personas del

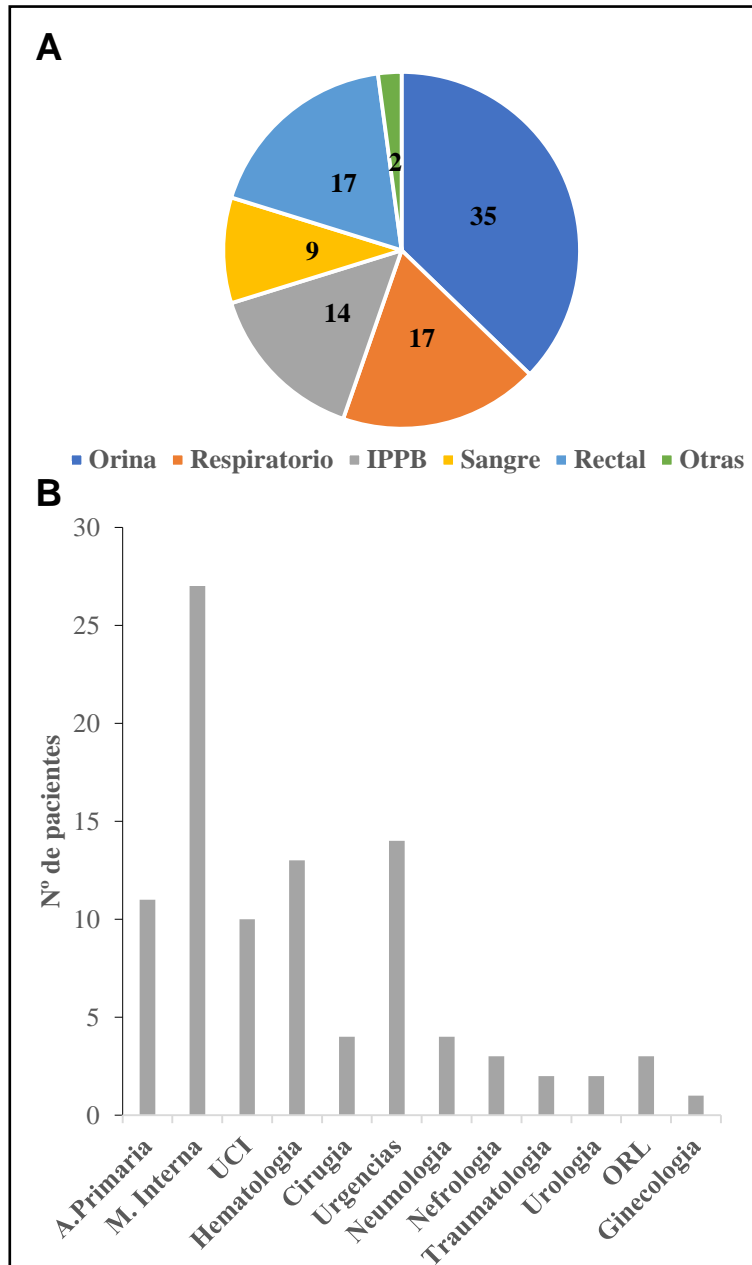
género masculino (figura 3.15A). Por otro lado, la distribución por edades fue mayor en pacientes entre 61 y 80 años, seguido de los pacientes mayores de 80 años, representando la franja de personas mayores de 60 años una gran mayoría (86,17%) de los afectados (figura 3.15B).



**Figura 3.15.** Características epidemiológicas del brote *K. pneumoniae* ST307<sub>blaKPC-3</sub>: evolución temporal, sexo y edad de los pacientes. **A**, incidencia del brote a lo largo del periodo de estudio. M/F, género de los pacientes, masculino o femenino, respectivamente. **B**, aislamientos del brote según la edad de los pacientes.

Entre los 94 pacientes, las colonizaciones (muestras rectales de los cultivos de vigilancia) representaron el 18,08%, mientras que los infectados fueron el 81,92 % (figura 3.16A). Por tipo de infección, las infecciones urinarias fueron las más frecuentes (37,23%), seguidas de infecciones respiratorias (18,08%), IPPB (14,89%) y bacteriemias (9,57 %). En cuanto a la procedencia de las muestras dónde se detectó *K. pneumoniae* ST307

*bla<sub>KPC-3</sub>*, 88,29% eran de origen hospitalario (incluyendo un 14,89% procedentes de Urgencias) mientras que un 11,71% fue extrahospitalario (figura 3.16B). Los servicios hospitalarios con más aislados fueron Medicina Interna (28,72%), Hematología (13,83%) y UCI (10,64%).



**Figura 3.16.** Distribución de los aislados de *K. pneumoniae bla<sub>KPC-3</sub>*. A, clasificación de los aislamientos por número de pacientes según el tipo de muestras clínicas de procedencia. B, distribución de los aislamientos según servicios de procedencia de las muestras

### 3.4.2 Susceptibilidad antimicrobiana de *K. pneumoniae* ST307 bla<sub>KPC-3</sub>

Mediante la detección de la susceptibilidad antibiótica por el sistema automatizado MicroScan WalkAway (Beckman Coulter) se confirmó la resistencia frente a carbapenemas de los aislamientos del brote *K. pneumoniae* ST307 bla<sub>KPC-3</sub> (tabla 3.24). Así, un porcentaje reducido de las cepas mostraron sensibilidad a imipenem, el más efectivo entre las carbapenemas ensayadas este estudio ya que frente a meropenem se obtuvo una sensibilidad aún menor y ninguna de las cepas fue sensible a ertapenem. Además, las cepas también presentaron resistencia al resto de los  $\beta$ -lactámicos y aztreonam. Con respecto a los antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos ensayados, los microorganismos presentaron alto nivel de resistencia a ciprofloxacina, a cotrimoxazol, a gentamicina, a tobramicina y a fosfomicina, mientras que la resistencia bajó para amikacina, colistina, tigeciclina y ceftazidima/avibactam (tabla 3.24). Las opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones quedaron por tanto reducidas a la amikacina, colistina, tigeciclina y ceftazidima/avibactam, mientras que la utilización de fosfomicina fue más limitada y se basó en el resultado del antibiograma para cada caso.

**Tabla 3. 24.** Susceptibilidad frente a los antibióticos del brote *K. pneumoniae* ST307 bla<sub>KPC-3</sub>

<u>Antibióticos</u>	<u>Sensibilidad (%)</u>
Amikacina	97.87
Ceftazidima/avibactam	97.87
Ciprofloxacino	1.06
Colistina	97.87
Cotrimoxazol	3.19
Fosfomicina	73.40
Gentamicina	13.82
Imipenem	17.02
Meropenem	2.12
Tigeciclina	91.48
Tobramicina	11.70

### 3.4.3. Caracterización genotípica de *K. pneumoniae* ST307 bla<sub>KPC-3</sub>

#### 3.4.3.1. MLST y relación clonal de las cepas analizadas.

Entre las 94 cepas detectadas en el brote de *K. pneumoniae* ST307 bla<sub>KPC-3</sub>, 48 aislamientos representativos de los distintos grupos (periodos, género y edad de los

pacientes, tipo de muestra y servicio de procedencia; tabla 3.25) fueron seleccionados y sometidos al análisis de sus características genéticas más relevantes.

**Tabla 3.25.** Características epidemiológicas de los aislados de *K. pneumoniae* ST307 *bla<sub>KPC-3</sub>* seleccionados para análisis profundo.

Cepas	Periodo <sup>1</sup>	Género <sup>2</sup>	Edad <sup>3</sup>	Muestra <sup>4</sup>	Servicio <sup>5</sup>
HSPKC01	2018	M	74	C	M
HSPKC02	2017	M	63	B	R
HSPKC03	2018	M	73	C	I
HSPKC04	2018	M	75	C	M
HSPKC05	2018	F	58	S	H
HSPKC06	2018	M	71	B	M
HSPKC07	2018	M	76	C	I
HSPKC08	2018	M	53	C	I
HSPKC09	2018	M	84	O	U
HSPKC10	2018	F	82	O	M
HSPKC11	2018	F	57	S	H
HSPKC12	2018	M	70	O	P
HSPKC13	2018	F	79	O	M
HSPKC14	2018	F	74	O	U
HSPKC15	2018	M	71	B	R
HSPKC16	2018	F	82	O	U
HSPKC17	2018	M	80	B	C
HSPKC18	2018	F	80	O	M
HSPKC19	2018	M	94	B	M
HSPKC20	2018	F	71	S	T
HSPKC21	2018	M	83	O	P
HSPKC22	2018	M	53	O	H
HSPKC23	2018	F	81	C	M
HSPKC24	2018	F	90	O	U
HSPKC25	2017	M	78	C	I
HSPKC26	2017	F	68	B	O
HSPKC27	2018	M	83	R	H
HSPKC28	2017	M	75	O	P
HSPKC29	2018	M	74	C	M
HSPKC30	2018	M	86	O	P
HSPKC31	2018	M	86	R	M
HSPKC32	2018	M	67	S	I
HSPKC33	2018	M	84	B	T
HSPKC34	2018	M	77	R	M
HSPKC35	2018	F	78	O	U
HSPKC36	2018	M	75	C	M
HSPKC37	2018	M	71	C	M
HSPKC38	2018	M	52	C	H
HSPKC39	2019	M	90	S	U
HSPKC40	2019	F	23	R	M
HSPKC41	2019	M	86	R	M
HSPKC42	2019	F	85	O	P
HSPKC43	2019	F	92	O	M
HSPKC44	2019	M	88	O	P
HSPKC45	2018	M	43	C	H
HSPKC46	2019	M	38	O	G
HSPKC48	2019	M	76	C	M
HSPKC49	2019	M	91	R	M

Datos epidemiológicos de los aislados de *K. pneumoniae bla<sub>KPC-3</sub>*. <sup>1</sup>Año de aislamiento. <sup>2</sup>Género de los pacientes; M, masculino; F, femenino. <sup>3</sup>Edad de los pacientes (años). <sup>4</sup>Tipo de muestra: O, orina; B, infección de piel y partes blandas (IPPB); R, respiratoria; C, colonización; S, sangre. <sup>5</sup>Origen de las muestras: M, Medicina Interna; I, Medicina Intensiva; H, Hematología; U, Urgencias, P, Atención Primaria; G, Ginecología; T, Traumatología; O, ORL; R, Urología; C, Cirugía.

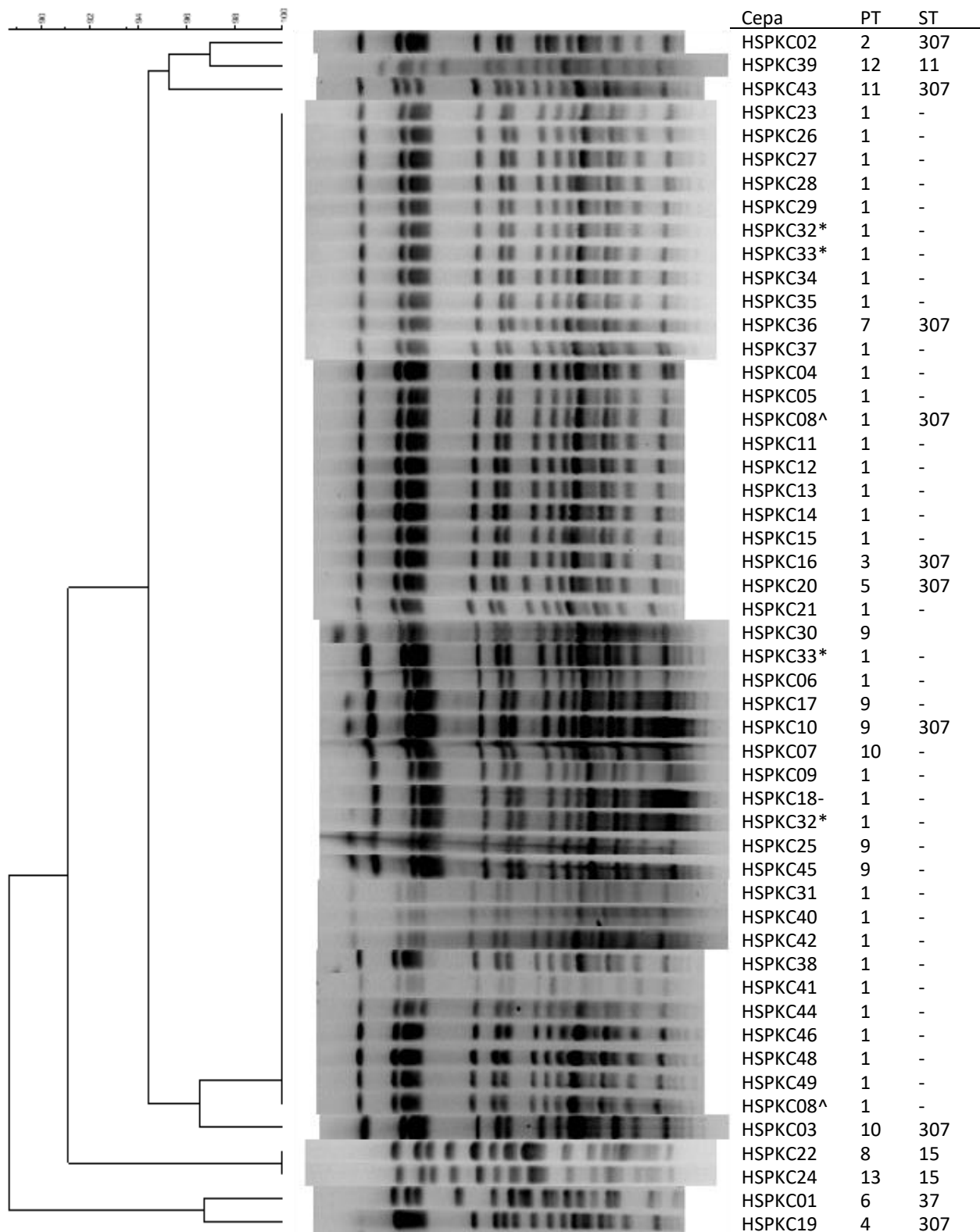


Las dos únicas cepas en este estudio que presentaron resistencia a la colistina y que presentan también KPC fueron incluidas en el estudio anterior (capítulo 3.3), denominándose HSPKB19 y HSPKB22, y correspondiendo a HSPKC09 y HSPKC18, respectivamente (tabla 3.25).

En primer lugar se realizó la tipificación de los 48 aislamientos mediante análisis PFGE-XbaI (figura 3.17). En un primer análisis efectuado manualmente comparando los perfiles de (macro) restricción del DNA genómico de las cepas seleccionadas, se determinaron 13 clústeres o pulsotipos potencialmente distintos, denominados P1 hasta P13. Entre ellos, P1 sería mayoritario, abarcando 31 de los 48 aislados, seguido de P9 (5 aislados), P3 y P10, con dos aislados cada uno, y estando representado por una sola cepa cada uno de los restantes perfiles asignados. Sin embargo, cuando estos mismos perfiles de (macro) restricción obtenidos mediante PFGE-XbaI fueron analizados mediante el programa Bionumerics, el dendrograma obtenido a partir de los 48 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* analizados mostró una menor diversidad clonal que la observada mediante el análisis manual inicialmente realizado, quedando los clústeres reducidos a 8: P1, P2, P4, P6, P8, P10, P11 y P12, quedando englobados en P1 los pulsotipos inicialmente asignados a P3, P5, P7, P9 y uno de los dos P10, que suman un total de 43 aislados, así como el inicial P13 que se asocia a P8 (figura 3.17). Los aislados que pertenecían al mismo grupo clonal mostraron una relación entre ellos de más de 98.0% de similitud de sus patrones de bandas, según el análisis obtenido con el Coeficiente de Sorensen-Dice.

#### 3.4.3.2. Análisis genómico del brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>

Una cepa representativa de cada uno de los 13 pulsotipos inicialmente detectados mediante el análisis manual de los perfiles de (macro) restricción observados mediante PFGE-XbaI fue enviada a un laboratorio externo para su estudio genómico mediante técnicas de secuenciación masiva mediante tecnología “Illumina”.



**Figura 3.18.** Análisis de similitud genómica del brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>. Los paneles electroforéticos muestran el resultado de la técnica PFGE-XbaI aplicada a las cepas seleccionadas. A la izquierda se despliega el dendograma elaborado con el programa Bionumerics, incluyendo la escala de similitud para el índice Sorensen-Dice, y a la derecha los pulsotipos (PT) potenciales asignados para cada cepa mediante análisis manual del PFGE-XbaI y los STs determinados mediante análisis de la secuencia genómica de las 13 cepas seleccionadas con PTs potencialmente diferentes. Las cepas indicadas (\*, \*\*, ^) aparecen repetidas en el análisis PFGE-XbaI.

El ST de las cepas de *K. pneumoniae* se determinó de manera similar a lo indicado en el apartado 3.3.3.2 de esta memoria, mediante MLST (“Multi Locus Sequence Typing”) de acuerdo con las secuencias disponibles en PubMLST.org, que se basa en siete genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, y *tonB*) y el esquema de clasificación previamente descrito para *K. pneumoniae* (Bialek-Davenet et al., 2014; <https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>), utilizando el programa MLST 2.0 (CGE/DTU). Se identificaron el clon más prevalente fue ST307 (n=45). Entre los 13 genomas secuenciados predominó ST307, presente en 9 de los pulsotipos inicialmente distinguidos mediante análisis manual del PFGE-XbaI (figura 3.17). ST15 se asignó a 2 cepas con distinto pulsotipo potencial, una muestra de orina proveniente de Urgencias y un hemocultivo de Hematología, mientras que ST11 correspondió a un hemocultivo de Urgencias y ST37 a un estudio de colonización de Medicina Interna (tabla 3.25). Estos resultados muestran una elevada agrupación clonal de las cepas del brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>, poniendo de manifiesto el elevado potencial de transmisión vertical del clon ST307.

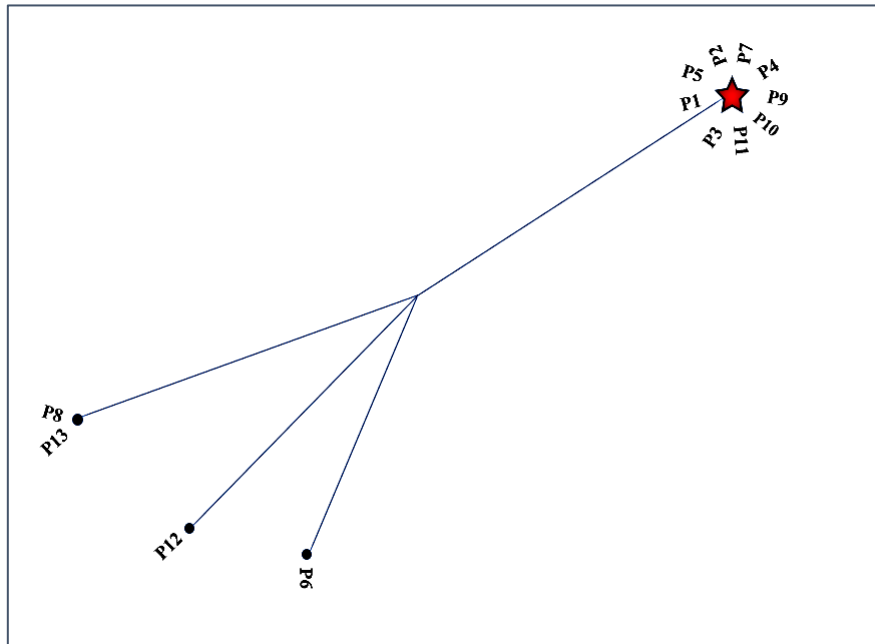
Finalmente, se elaboró mediante NDtree un árbol filogenético con los genomas de las 13 cepas de *K. pneumoniae* que representaban a los distintos pulsotipos potenciales (figura 3.19). Se observó así la existencia de dos clústeres: el más numeroso que incluye los 9 genomas asignados al ST307, y un segundo grupo incluyendo los dos genomas con ST15. Los otros dos genomas analizados, correspondientes a ST11 y ST37, se ubicaron independientemente del resto.

#### 3.4.3.3 Resistoma del brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>

Como ya se explicó en el apartado 3.3.3.1. de esta memoria, la presencia de genes de resistencia en los 13 genomas secuenciados se reveló mediante el programa ResFinder, disponible en la plataforma web del CGE/DTU (tabla 3.26).

Además del gen *bla*<sub>KPC-3</sub>, que se detecta en la totalidad de los genomas analizados, todos fueron también positivos para los genes *bla*<sub>TEM</sub> (*bla*<sub>TEM1B</sub>, n=7; *bla*<sub>TEM1A</sub>, n=6) y *bla*<sub>OXA</sub> (*bla*<sub>OXA-1</sub>, n=7; *bla*<sub>OXA-9</sub>, n=13), 9 de ellos fueron positivos para el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (69%) y 12 (92%) fueron positivos para el gen *bla*<sub>SHV</sub> (*bla*<sub>SHV106</sub>, n=11; *bla*<sub>SHV187</sub>, n=1). Para la resistencia a quinolonas, se detectaron los genes *aac*(6')-Ib-cr (n=8) y *qnr* (n=9), mientras que para aminoglucósidos se identifican (además de *aac*(6')-Ib-cr) *aadA1*

(n=1), *aadA2* (n=3), *aph(6)-Id* (n=9), *aac(3)-IIa* (n=8) y *aph(3'')-Ib* (n=9), y para sulfamidas/Trimetroprim *sul1* (n=2), *sul2* (n=9) y *dfrA14* (n=10). Se observa una fuerte asociación genotípica de algunos de los determinantes de resistencia identificados con el pulstotipo 307: *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>SHV106</sub>*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* y *qnrB1*. Por otro lado, en todos los aislados se detectó el gen *fosA* (tabla 3.26).



**Figura 3.19.** Agrupamiento filogenético del brote *K. pneumoniae* ST307 *bla<sub>KPC-3</sub>*. El árbol filogenético se construyó usando NDtree (“Nucleotide Difference”, disponible en CGE/DTU), utilizando los genomas en formato fasta de las 13 cepas, secuenciadas mediante Illumina..

#### 3.4.3.3. Plásmidos característicos del brote *K. pneumoniae* ST307 *bla<sub>KPC-3</sub>*

Se determinaron los plásmidos presentes en cada uno de los pulstotipos analizando el genoma de las distintas cepas y comparando con la base de datos PlasmFinder, como ya se explicó en el apartado 3.2.5.2. Los plásmidos más prevalentes fueron IncFIB(pQiI), IncFIB(K) y IncFII(K), presentes en todas las cepas del brote, aunque otros elementos también fueron identificados: Col440II (en 12 cepas, n=12), Col440I (n=9), Col(pHAD28) (n=2), IncFIB(pKPHS1) (n=1) e IncN (n=1), como se refleja en la tabla 3.27. Entre todos ellos, el plásmido IncFIB(pQiI) fue el único detectado con el 100% de identidad en todas las cepas del brote.

**Tabla 3.26.** Resistoma asociado al brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>

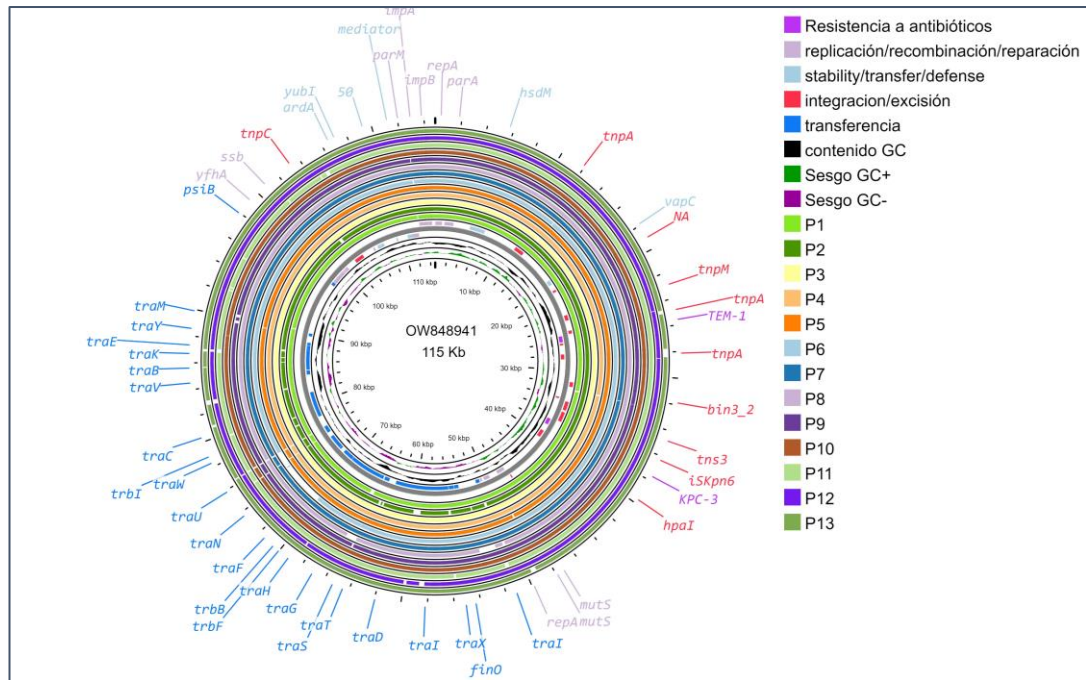
PTs		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
STs		307	307	307	307	307	37	307	15	307	307	307	11	15	
Determinantes de resistencia frente a:	<b>β-lactámicos</b>	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
		<i>bla</i> <sub>SHV-106</sub>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
		<i>bla</i> <sub>SHV-187</sub>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		<i>bla</i> <sub>TEM1A</sub>	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
		<i>bla</i> <sub>TEM1B</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
	<b>Aminoglucósidos</b>	<i>aac(3)-IIa</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
		<i>aac(6)-Ib cr</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
		<i>aph(3'')-Ib</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
		<i>aph(6)-Id</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
		<i>aadA1</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		<i>aadA2b</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	<b>Fluoroquinolonas</b>	<i>qnrB1</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
		<i>qnrS1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	<b>Sulfamidas + Trimetoprim</b>	<i>dfrA14</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
		<i>sul1</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
		<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
	<b>Fosfomicina</b>	<i>fosA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Resistencia	AMIKACINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		TIGECICLINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FOSFOMICINA		S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	
COLISTINA		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
GENTAMICINA		R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	
TOBRAMICINA		R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	
COTRIMOXAZOL		R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	
IMIPENEM		R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	
MEROPENEM		R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CIPROFLOXACINO		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

**Tabla 3.27.** Plásmidos identificados en el brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub>

PTs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
STs	307	307	307	307	307	37	307	15	307	307	307	11	15
<b>Col440I</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<b>Col440II</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>IncFIB(K)</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>IncFIB(pQiI)</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>IncFII(K)</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Col(pHAD28)</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<b>IncFIB(pKPHS1)</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>IncN</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

\* La identificación de secuencias típicas de los plásmidos indicados se muestra mediante “+/-”, representándose en azul aquéllos que presentan un 100% de identidad.

Para analizar qué naturaleza tiene el plásmido que codifica la carbapenemasa KPC-3 en el brote analizado, se identificó mediante Blastn el gen *bla*<sub>KPC-3</sub> en el genoma de la cepa HSPKC08 (PT1 y ST 307, figura 3.18), localizándose en una secuencia de algo más de 13 Kb, que a su vez se rastreó en la base de datos “nt” del NIH mediante Blastn para localizar sus homólogos más próximos. Entre las secuencias así detectadas, destacan plásmidos IncFIB(pQiI) identificados en *K. pneumoniae* ST307 de diversa procedencia, incluyendo centros hospitalarios en España, donde ya se han descrito brotes de esta naturaleza (Oteo-Iglesias et al., 2020; Cañada-García et al., 2022). La secuencia de uno de estos elementos (OW848941), de alrededor de 115 Kb y procedente de un aislado en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, se utilizó para reconstruir con máxima cobertura e identidad próxima al 100% el plásmido presente en las 13 cepas analizadas del brote de *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub> objeto de este estudio (figura 3.20). En este plásmido y en todas las cepas, el gen *bla*<sub>KPC-3</sub> se encuentra intercalado entre las secuencias de inserción ISKpn6 e ISKpn7 (IS21), formando parte de un transposón de tipo Tn3 denominado Tn4401 isoforma d (Rodrigues y col., 2016). Además, estrechamente asociado en el mismo plásmido que *bla*<sub>KPC-3</sub> se encontraría localizado *bla*<sub>TEM1</sub>, además de un pseudogen *bla*<sub>oxa</sub> (con la secuencia codificante truncada), que por su probable falta de funcionalidad se ha omitido del resistoma de estos microorganismos (tabla 3.26).



**Figura 3.20.** Reconstrucción del plásmido IncFIB(pQiI) detectado en el brote *K. pneumoniae* bla<sub>KPC-3</sub>.

## **4 DISCUSIÓN**

---



#### 4.1 EPIDEMIOLOGÍA DE CEPAS RESISTENTES A $\beta$ -LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO

En este estudio se ha realizado un análisis prospectivo para determinar la prevalencia de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y carbapenemas del Área de Salud de Cáceres, así como la detección de resistencia a colistina de las mismas, antibiótico estos últimos utilizados como de último recurso en el tratamiento de infecciones debidas a bacterias multirresistentes.

Hemos podido determinar que la prevalencia de *E. coli* resistente a cefalosporinas de amplio espectro (3ª y 4ª generación) aumentó desde el año 2015 al 2021 en un 4,59%, aumento más acusado en *K. pneumoniae*, cuya prevalencia aumentó un 4,68% en 2021 respecto al año 2020. En cuanto a la resistencia a carbapenemas, en *E. coli* se ha mantenido en cifras menores al 1%. Sin embargo, *K. pneumoniae* ha sufrido un aumento importante, del 10,37% desde el año 2015 hasta el 2021. Estos datos no difieren en gran medida respecto a los obtenidos en España por el European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), que refieren un aumento significativo de resistencias a cefalosporinas de amplio espectro en *E. coli* desde 2001 hasta 2012, manteniéndose estable desde entonces, con cifras alrededor del 14% en 2021 y debidas en su mayoría (86%) a la producción de ESBLs, mientras que la resistencia a carbapenemas en *E. coli* se ha mantenido baja, con una tasa del 0,2% en 2021. Sin embargo, en *K. pneumoniae* nuestros datos son más alarmantes que para *E. coli*, y similares a los obtenidos en otros trabajos donde se informa de un importante aumento a partir de 2011 de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, desde un 18% en 2014 hasta llegar a un 29,6% en 2021. Los datos en relación a la resistencia a carbapenemas en *K. pneumoniae* reflejan también un aumento del 2,8% en 2017 al 5,9% en 2021, principalmente debido a la producción de carbapenemasas (EARS-Net, 2022), siendo esta cifra muy superior en nuestro estudio, asemejándose más a la media europea. Los datos en España en relación a *E. coli* coinciden con la incidencia europea, pero esto no ocurre en *K. pneumoniae*, donde son inferiores a la media (35,9% resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y 13,6% a carbapenemas; ECDC, 2022)

Del total de cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro incluidas en este trabajo (n=811), un 73,61% correspondieron a *E. coli*, y un 26,39% a *K. pneumoniae*, distribuidas a lo largo de los tres periodos de nuestro estudio. Respecto a la edad y sexo de los pacientes, la gran mayoría de los aislados procedían de pacientes mayores de 60 años, siendo mayores de 80 años más del >50% de los pacientes originarios de *E. coli*,

una asociación con la edad elevada que ya ha sido descrita (Mahamat et al., 2019; Ljungquist et al., 2019), mientras que el predominio de mujeres entre los pacientes es también un hecho conocido (Ljungquist et al., 2019; Tejada-Llacsá et al., 2015). Así, se ha postulado que la edad avanzada y el hecho de ser mujer son factores de riesgo para la colonización prolongada por enterobacterias productoras de ESBLs (Ljungquist et al. 2019), cosa que no ocurre en nuestro estudio, donde las colonizaciones son más frecuentes en hombres.

Las infecciones más frecuentes detectadas en este estudio para las dos especies bacterianas fueron las del tracto urinario, donde predominaba más *E. coli*, seguido de IPPB y bacteriemias, de manera similar a lo descrito en otros trabajos (Sutherland et al., 2019; Gupta et al., 2019). En otros casos se han detectado algunas diferencias, como el estudio de Tejada-Llacsá et al (2015), en el que aunque predominan también las infecciones urinarias, le siguen las infecciones respiratorias, a diferencia de nuestro estudio en el que éstas fueron minoritarias, sobre todo en el 2º y 3º período. El microorganismo más prevalente en las infecciones respiratorias fue *K. pneumoniae*, las cuales fueron más comunes en hombres. De hecho, en un estudio sobre enterobacterias productoras de carbapenemasas donde el predominio era masculino y la especie más prevalente *K. pneumoniae*, la adquisición nosocomial de estos microorganismos se asoció entre otros factores con las infecciones respiratorias y el género masculino (Pintos-Pascual et al., 2020). En nuestro trabajo destaca un porcentaje global de colonizaciones por enterobacterias productoras de ESBLs del 7,39%, con intenso predominio de *K. pneumoniae* respecto a *E. coli*, similar a datos previos indicando una tasa del 8,2% con mayor prevalencia en el género masculino (Fernández et al., 2021). Esta prevalencia sufrió un aumento progresivo a lo largo de los distintos periodos como consecuencia del aumento de los cultivos de vigilancia llevados a cabo para controlar la propagación del brote. Un estudio llevado a cabo por Bezabih et al. (2021) concluyó que el mayor porcentaje de portadores de *E. coli* ocurre en el sudeste asiático (27%), mientras que la prevalencia más baja es europea (6%).

La mayoría de aislamientos de *E. coli* detectados en este trabajo fueron extrahospitalarios, así como en urgencias hospitalarias, reflejo de las infecciones adquiridas en la comunidad. Los servicios médicos de procedencia para *E. coli* fueron en primer lugar geriatría, seguido de hematología, medicina interna y nefrología. En cambio, *K. pneumoniae* fue más prevalente en aislados hospitalarios, correspondiendo en primer lugar a los servicios médicos, predominando en medicina interna y hematología. Cirugía

fue el servicio quirúrgico con más aislados de *E. coli*, y Urología de *K. pneumoniae*, de manera similar a lo descrito en otros estudios (Tejada-Llacsá et al., 2015; EARS-Net, 2021).

Los resultados de la PCR múltiple para detectar las  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> puso de manifiesto que la enzima más prevalente es CTX-M, cuyas cifras aumentaron desde un 78,12% en el primer periodo hasta el 88,49% en el tercero. La dominancia mundial de CTX-M-15, y su asociación con el clon pandémico de *E. coli* O25 y ST131 es un hecho muy bien documentado (Lau et al., 2008). La prevalencia de SHV (26-31%) y TEM (48-53%) fue elevada, siendo *K. pneumoniae* la especie donde se detectaron con mayor frecuencia. Todas las cepas que presentaban OXA-48 se asociaban a SHV en *K. pneumoniae*, y sólo algunas a CTX-M, como se ha referido con anterioridad (Vazquez-Ucha et al., 2021). En relación a AmpC, su prevalencia descendió a lo largo de los periodos un 4,5%, siendo *E. coli* la especie portadora mayoritaria, aunque en este trabajo no se realizó un escrutinio sistemático por PCR de genes *ampC*, siendo su detección fenotípica, según se describe en Materiales y Métodos. En España, en 2021 aproximadamente un 14% de las cepas de *E. coli* fueron productoras de ESBLs y un 7,8% eran resistentes a cefotaxima, pero no productoras de ESBL, siendo además resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, lo cual sugiere una posible producción de  $\beta$ -lactamasas del tipo AmpC (EARS-Net, 2022), cifras similares a las obtenidas en nuestro estudio. La mayoría de las cepas presentaron 2 o más genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, pudiéndose apreciar una fuerte asociación entre los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>, un fenómeno que se observa con frecuencia y que, según algunos autores, sería una estrategia común en *E. coli* y *K. pneumoniae* para contrarrestar el efecto de los antimicrobianos (Kassakian et al., 2014).

En este estudio se analizó la asociación entre la expresión de ESBLs y los fenotipos de resistencia a otros antimicrobianos. Así, se ha observado que *E. coli* resistente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro mostró gran resistencia a quinolonas, y algo menor a cotrimoxazol y aminoglucósidos, y solo un 14% fueron resistentes a piperacilina/tazobactam. *K. pneumoniae* presentó igualmente gran resistencia a quinolonas, cotrimoxazol y aminoglucósidos, destacando un alto % de resistencia a piperacilina/tazobactam y a fosfomicina entre las cepas de esta especie, unos datos que son en conjunto similares a los publicados a nivel europeo (EARS, 2021). Se pone así de manifiesto que la presión antimicrobiana ocasiona la adquisición de diferentes

mecanismos de resistencia, un proceso de adaptación bacteriana que podría estar mediado por la transferencia horizontal de elementos genéticos (plásmidos) portadores de múltiples determinantes de resistencia.

Entre los aislados de *K. pneumoniae* analizados en este trabajo existe una alta tasa de resistencia a carbapenemas, mientras que en *E. coli* se mantiene por debajo del 1%. Con estos datos, nuestro arsenal terapéutico queda severamente reducido, tan sólo disponiendo de antibióticos como amikacina, colistina y tigeciclina, que presentan bajas tasas de resistencia, para el tratamiento de infecciones graves causadas por estas cepas multirresistentes. Aun así, las cifras de resistencia a colistina no son despreciables (10,14% en *K. pneumoniae* y 2,18% en *E. coli*), lo que podría deberse a la selección de fenotipos resistentes motivada por su uso en infecciones causadas por cepas resistentes a carbapenemas. Según los datos del estudio CARB-ES-19 (referencia) las cifras de resistencia a colistina en las cepas de *K. pneumoniae* muestran valores del 9,5%, mientras que en *E. coli* son solamente algo menores, del 7,7%. Nuestros datos ofrecen un nivel similar de resistencia a colistina en *K. pneumoniae*, mientras que en *E. coli* encontramos una tasa de resistencia mucho menor.

A lo largo de este estudio se constató un aumento de cepas resistentes a carbapenemas, que fueron identificadas como productoras de carbapenemasas. Casi todas, excepto una, correspondían a *K. pneumoniae*. Entre las carbapenemasas detectadas, OXA-48 predominó durante el segundo periodo, encontrándose a menudo asociada a CTX-M, lo que coincide con otros trabajos (Serap Süzük Yıldız et al., 2021; Patiño-Navarrete et al., 2022). Durante el tercer periodo analizado se observó un reemplazo por KPC, fruto del brote iniciado en nuestro hospital, siendo la prevalencia del 12,17% en este periodo.

#### **4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *E. coli* RESISTENTE A COLISTINA**

En este estudio se ha analizado la prevalencia de la resistencia a colistina entre los aislados clínicos de *E. coli* en el Hospital S.P. de Alcántara, comparando cepas resistentes o sensibles a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, y procurando determinar con la mayor resolución posible los determinantes de resistencia implicados en los fenotipos detectados. Considerando que la dispersión de cepas con estas características supone una

amenaza potencial para la salud pública, se espera proporcionar herramientas para facilitar su vigilancia y control.

De las 597 cepas de *E. coli* resistentes a  $\beta$ -lactámicos seleccionadas sólo 13 presentaron resistencia a la colistina (2,18%), que fueron comparadas con un grupo de 26 cepas de *E. coli* sensibles a  $\beta$ -lactámicos y aisladas igualmente de muestras clínicas. Entre los mecanismos responsables de la resistencia a la colistina, se detectaron 8 cepas portadoras de *mcr-1* (8 de 39 cepas, un 20,5%), 4 en cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos (30,76%) y 4 en cepas sensibles (15,38%), siendo este gen el determinante plasmídico más prevalente a nivel mundial (Ling et al., 2020). En la mayoría de las restantes cepas (30 de 39 cepas, un 76,9%), la resistencia a colistina fue debida a mutaciones, identificándose diferentes polimorfismos en el sistema PmrAB que afectaron principalmente a PmrB (85,3%). Este es un hecho común, ya que las alteraciones en el sistema PmrAB suponen el mecanismo principal de resistencia a colistina en *Enterobacteriales*, con la consiguiente modificación del LPS (El-Sayed Ahmed MAE et al., 2020). En una única *E. coli* resistente a la colistina, entre las 39 cepas analizadas en este trabajo (HSPEC24, un 2,6%), no se ha podido identificar el determinante que confiere el fenotipo, aunque sí se ha detectado decoración del lípido A con pEtN y con L-Ara4N. Aunque la intensidad de las modificaciones del lípido A en la cepa HSPEC24 es relativamente baja (figura 3.8C), la diferencia con la cepa sensible es muy significativa y todo parece indicar que el fenotipo de resistencia estaría provocado por la sobreexpresión del gen *eptA* y del operón *arnBCADTEF*, cuyos productos llevan a cabo la decoración con pEtN y con L-Ara4N, respectivamente (El-Sayed Ahmed MAE et al., 2020), aun cuando se desconoce qué determinante provoca su desregulación.

Entre las mutaciones detectadas en el gen *pmrA* de las cepas incluidas en nuestro estudio, se encontraron G15R, G53D, R81C, R81L y D82N (tabla 3.15), todas ellas descritas con anterioridad (Bourrelet et al., 2019; Janssenet et al., 2020b; Miltgen et al., 2021; Olain et al., 2014; Quesada et al., 2015; Sun et al., 2009). Además de las 5 cepas con *pmrA* mutante, otras 25 cepas presentaron mutaciones en *pmrB*, 21 de las cuales han sido descritas con anterioridad (tabla 3.15): L10R, G19E (x4), G19R (3X), R93P (2x), P94L, D149A, D149N, G160E, V161G (2x), V161A, L167P y L194P (2x), y G206E, considerando que para este último había sido identificada la mutación G206D, lo que supone un cambio prácticamente insignificante (Bourrelet et al., 2019; Delannoyet et al., 2017; Dos Santos et al., 2021; Huang et al., 2020; Janssenet et al., 2020b; Kuanget et al.,

2020; Quesada et al., 2015; Wang et al., 2021, Sato et al., 2018). Otros tres polimorfismos de *pmrB* no han sido aún descritos como determinantes de resistencia a colistina; V30D, P157Q y  $\Delta^{18-24}$ , aunque las dos primeras se encuentran adyacentes a variantes ya descritas que confieren resistencia a colistina y, respecto a la tercera, se han identificado diversas deleciones en PmrB que confieren este fenotipo (Sun et al., 2009; Wang et al., 2021). No se conoce sin embargo la implicación de la mutación S138N, detectada sólo en cepas resistentes a colistina (Kim et al., 2019), aunque asociada frecuentemente a genes *mcr-1* (Delannoy et al., 2017).

En este trabajo se ha analizado la expresión génica a nivel de abundancia de los RNAm de los operones *pmrCAB* y *arnBCADTEF* de 10 de las cepas con diferentes polimorfismos en el sistema PmrAB: R81L en PmrA; y L10R, G19E, V30D, R93P, D149A, D149N, P157Q, G160E y V161G en PmrB (figura 3.9). Se observó la sobreexpresión del gen *arnB* en todas ellas, aunque para *pmrC* sólo se detectó desregulación significativa en 4 de ellas, con las mutaciones G19E, R93P, P157Q y V161G, todas ellas en PmrB. No existe una explicación para este fenómeno, a pesar de ser recurrente en la bibliografía la descripción de cepas donde el polimorfismo de PmrAB solo desregula uno de los dos sistemas de decoración del lípido A (Mora et al., 2022). En todo caso, la sobreexpresión del operón *arnBCADTEF* significa que una probable modificación con L-Ara4N del lípido A es la responsable de la resistencia a la colistina en las 10 cepas cuya expresión génica se ha analizado y que presentan polimorfismos en PmrAB, incluyendo V30D y P157Q, dos polimorfismos que no habían sido descritos previamente a este trabajo. Por otro lado, y como cabía esperar, las 3 cepas portadoras del gen *mcr-1* tenían reprimida la expresión génica de *arnB* y *pmrC*, una señalización negativa cuyo mediador se desconoce y que ya había sido previamente descrita (Gallardo et al., 2021). Por otro lado, se han determinado las modificaciones con pEtN y L-Ara4N en el lípido A de dos de las cepas de *E. coli* resistentes a la colistina, las cepas HSPEC01, con la mutación S138N, y la cepa HSPEC24 que no presentaba ninguna mutación. El resultado mostró modificaciones en ambos, más acusado para la L-Ara4N, lo que muestra también que en ambas cepas la resistencia a la colistina está producida por la decoración de su lípido A, lo que podría deberse a la mutación S138N de PmrB en la cepa HSPEC01 y a algún determinante desconocido en HSPEC24, única cepa de *E. coli* en este estudio que escapa a la identificación de su mecanismo de resistencia y/o de algún determinante genético potencial de la misma.

En cuanto al papel de los plásmidos como mediadores de la resistencia frente a la colistina, 7 de las 8 cepas portadoras de *mcr-1* lo tienen asociado a plásmidos de tipo IncX4, el elemento más prevalente que ha contribuido a la dispersión de este gen (Matamoros et al., 2017; Sun et al., 2017), y sólo en una de las cepas a un plásmido tipo IncHI2. Desde la primera descripción del gen *mcr-1*, que se encontró asociado a un plásmido tipo IncI2 (Liu et al., 2016), se ha comprobado que los miembros de esta familia génica se han movilizad o mediante plásmidos pertenecientes a 37 grupos de incompatibilidad (Mmatli et al., 2022). Si bien IncX4, IncHI2 e IncI2 son los elementos más prevalentes en todos los entornos analizados, sus frecuencias relativas presentan variaciones regionales, siendo IncI2 más frecuente en Asia, Oceanía y América, mientras que IncHI2 es más frecuente en Europa y África (Elbediwi et al., 2019, Hassen et al., 2022). En uno de los primeros estudios donde se analizaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* y aisladas en bacteriemias se mostró predominio de plásmidos IncI2, seguido de plásmidos IncX4 (Quan et al., 2016). En un estudio retrospectivo realizado en Argentina se analizaron cepas de *E. coli* aisladas entre los años 2012-2018, siendo los plásmidos IncI2 (85,4%) los más prevalentes, aunque también se detectaron IncX4 (9,4%) e IncHI2 (Faccone et al., 2020). Similarmente, se ha descrito alta prevalencia del gen *mcr-1* en *Enterobacteriaceae* obtenidas de muestras de aguas residuales de plantas de tratamiento y ríos en el área de Barcelona, con el determinante de resistencia asociado mayoritariamente a plásmidos IncI2 (Delgado-Blas y González-Zorn, 2018), si bien varios trabajos con aislados de *E. coli* de origen porcino describen como plásmidos predominantes IncX4 e IncHI2 (Manageiro et al., 2019; García-Meniño et al., en 2019; Gallardo et al., 2021).

El elemento IncX4 es un plásmido altamente transmisible (Xavier et al., 2016) con un coste biológico relativamente bajo (Wu et al., 2018) que lo convierte en un mecanismo eficaz para la diseminación de determinantes de resistencia (aparte de *mcr-1*), entre los que se han descrito ESBLs (CTX-M) o carbapenemasas (Lo et al., 2014; Brauer et al., 2016; Mendes et al., 2018). En la mayoría de estudios *mcr-1* se asocia a genes CTX-M en aislados de *E. coli* (Sadek et al., 2021; Bastidas-Caldes et al., 2023; Hassen et al., 2020; García-Meniño et al., 2019) aunque en *K. pneumoniae* se ha asociado con más frecuencia a SHV-12 (Bastidas-Caldes et al., 2023). En nuestro estudio estos plásmidos sólo albergan genes *mcr-1*, aunque coexisten con genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, principalmente SHV-12, que se localizan en plásmidos de tipo IncFII.

Últimamente se están incrementando las notificaciones sobre este tipo de plásmidos, principalmente en aislados de *E. coli* pertenecientes a diversos clones procedentes de diferentes fuentes tanto animales, humanas como ambientales que lo convierten en un “plásmido epidémico” (Majewski et al., 2021; Migura-Garcia et al., 2019; Sun et al., 2023).

En los 7 plásmidos IncX4 reconstruidos en este estudio, su contexto genético incluye el casete *mcr-1-pap2*, un sistema de secreción tipo IV (T4SS) y la secuencia de inserción IS26. El único plásmido IncHI2 detectado en este trabajo, identificado en la cepa HSPEC14, presenta el casete *mcr-1-pap2*, que no tiene las secuencias de inserción flanqueantes que se han descrito en otras cepas (Sun et al., 2023). Se ha propuesto que originalmente este determinante formaba parte del transposón Tn6330, con la secuencia IS*Apl1*-*mcr-1-pap2*-IS*Apl1*, y que su evolución estaría conduciendo a la pérdida del elemento IS*Apl1*, lo que podría aumentar su estabilidad, incrementando el potencial de diseminación de estos genes de resistencia (Snesrud et al., 2018).

La mayoría de las cepas con *mcr-1* identificadas en este trabajo no están relacionadas clonalmente, perteneciendo a diversos STs: ST38, ST69, ST131, ST167 y ST410. Las otras tres cepas forman parte del mismo clúster genómico, dos aislados ST156 y una cepa no tipificable. Aunque ST10 y ST101 son los principales clones responsables de la diseminación de genes *mcr* en animales y fuentes ambientales, y ST116 con plásmidos IncX4 en cepas de *E. coli* es el más prevalente en humanos (Elbediwi et al., 2019), ninguno de estos clones ha sido detectado en nuestro estudio, aunque los STs identificados se habían descrito con anterioridad asociados a la diseminación de *mcr-1* (Elbediwi et al., 2019; Majewski et al., 2021; Mmatli et al., 2022; Qing-wen He et al., 2017).

La asociación en *E. coli* de la resistencia a la colistina con la expresión de ESBLs tampoco parece deberse a la dispersión vertical de clones, ya que entre las 9 cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos sometidas a análisis genómico se detectaron diversos STs, siendo ST131 el más prevalente (3x), seguido de ST156 (2x), ST59, ST167 y ST4204, más una cepa no tipificable; mientras que las 7 cepas sensibles presentaron ST131 (2x), ST38, ST69, ST73, ST127 y ST410. Excepto ST131 compartido, por 5 cepas tanto sensibles como resistentes a  $\beta$ -lactámicos, los demás clones diferían, y sólo se asoció a CTX-M-15 en dos de las cepas. Los STs asociados a *mcr-1* diferían igualmente, aunque



dos de las cepas se asociaban a ST156 (2x), 167, 410, 131, 38, 69 y uno no tipificable, por lo que para la mayoría no existen relaciones clonales, como ya se había descrito en otros casos (Li et al., 2020; Faccone et al., 2019; Madubuike Umunna Anyanwu et al., 2023).

### **4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *K. pneumoniae* RESISTENTE A COLISTINA Y $\beta$ -LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO**

La transmisión de aislados resistentes a la colistina de animales a humanos a través de los alimentos y la exposición a la colistina en la clínica son las principales razones del aumento de la prevalencia de Enterobacterales resistentes a la colistina *en* humanos en las últimas décadas (Binsker et al., 2022). Sin embargo, la resistencia a la colistina mediada por mutaciones cromosómica en microorganismos no zoonóticos como *K. pneumoniae* solo puede deberse al uso de este antibiótico en la clínica humana, donde cada vez más es un tratamiento de último recurso para los patógenos productores de carbapenemasas. Algunos de estos genotipos pueden tener una alta estabilidad, convirtiéndose en un problema de salud importante cuando se asocian a linajes patógenos humanos clave. En humanos, las enterobacterias representan alrededor del 80% de los aislados Gram negativos responsables de una variedad de enfermedades que incluyen infecciones del tracto urinario, neumonía, diarrea, meningitis, sepsis, shock endotóxico y otras (Oliveira y Reygaert, 2021).

Varios estudios han informado tasas crecientes de resistencia a colistina en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (Meletis et al., 2015; Galani et al., 2018). En 2013, las tasas de resistencia de los aislados en España y la UE fueron del 31% y 43%, respectivamente (Monaco et al., 2014; Pena et al., 2014). Un estudio reciente en Italia informó de tasas del 26,9% en 2019 (Basso et al., 2020), mientras que, en Noruega, la cifra fue del 21% (Samuelsen et al., 2017), y en Alemania del 13,3% (Koppe et al., 2018). Estos datos son muy preocupantes, ya que brotes de enterobacterias resistentes a carbapenemas y colistina tienen muy limitadas las opciones de tratamiento (Weterings *et al.*, 2015; Haller *et al.*, 2019). De hecho, el uso generalizado de colistina en medicina humana aumentó de manera constante en la UE entre 2005 y 2018, probablemente debido a un aumento de aislados resistentes a carbapenemas, existiendo sin embargo heterogeneidad geográfica en cuanto al consumo de colistina entre los países europeos,

con un mayor uso en Grecia, Malta y el Reino Unido y ningún consumo en Austria, Portugal o Alemania ([www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database](http://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database)). En 2016, la OMS clasificó las polimixinas en el grupo de antimicrobianos de importancia crítica con máxima prioridad para la medicina humana (OMS, 2019).

Entre las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos analizadas en este trabajo, un 9,95% presentaron fenotipo resistente a colistina, resultados similares a los observados en el estudio CARB-ES-19 realizado en España, que obtuvieron cifras de resistencia a colistina del 9,55% (Cañada-García et al., 2022). La mayoría de los aislados detectados en nuestro trabajo proceden de infecciones del tracto urinario, a diferencia del estudio CARB-ES-19 en el que procedían de bacteriemias. La mayoría de los trabajos realizados refieren la asociación de la resistencia a la colistina y a carbapenemas en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, incluyendo tasas del 28% (Grundmann et al., 2017), 7% (Rossi et al., 2017), 29,5% (Conceição-Neto et al., 2022) y 2,2% (Tietgen et al., 2022). Como ocurre en nuestro estudio, un alto porcentaje de las cepas son productoras de carbapenemasas, pudiéndose asumir que la principal causa del aumento en la resistencia a colistina en estas cepas se deba al uso de este antibiótico como último recurso en el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.

Respecto a la asociación de estas cepas a resistencia frente a otros antimicrobianos, la mayoría de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino (90,47%), cotrimoxazol (71,43%), aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina 80,95%), fosfomicina (66,67%), piperacilina/tazobactam (61,9%), y a ertapenem (57,14%), como se muestra en la tabla 3.20 de resultados. Los antibióticos más activos in vitro fueron imipenem (85,71% sensibilidad) y nitrofurantoina (76,2% sensibilidad), siendo frecuentes los informes de corresponsión a colistina y otros antimicrobianos en *K. pneumoniae* (Pitt et al., 2018; Tietgen et al., 2022; De la Cadena et al., 2021).

En ninguna de las cepas analizadas en este trabajo se detectaron genes *mcr*, y su resistencia a colistina se debió, en todos los casos, a mutaciones en *mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA* o *pmrB*, que son los principales determinantes de resistencia a colistina en esta especie (Mathers et al., 2015).

El polimorfismo del gen *mgrB*, que codifica un regulador negativo del sistema de señalización PhoQ/PhoP, fue el fenómeno más frecuentemente encontrado asociado a la

resistencia a la colistina (12 de 21 cepas, un 57,14%), valor similar al detectado en aislados de *K. pneumoniae* resistentes a colistina en Italia (59%; Cannatelli et al., 2014) y en Grecia (69,5%; Hamel et al., 2020). En la mayoría de los polimorfismos detectados en nuestro trabajo se interrumpe la secuencia codificante de *mgrB* por integración de diversas secuencias de inserción de las familias IS1 (2 cepas), IS5 (1 cepa) o ISL3 (6 cepas), destaca entre estos últimos 5 cepas con ISL3 integrado en la misma posición (+133) de *mgrB*, una mutación que ya había sido detectada asociada a la resistencia a la colistina (Giordano et al., 2018; Tietgen et al. en 2022) y que parece haberse amplificado por dispersión clonal del fondo genético ST15, uno de los dos con mayor potencial de dispersión y posiblemente más robustos de los identificados en este estudio. A diferencia de nuestro trabajo, donde solo se detecta una integración de IS5 que provoca la delección completa de *mgrB*, éste es el determinante más frecuentemente asociado a la resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* descrito en otros estudios (Pitt et al., 2018; Martins da Silva, 2021; Fordham et al., 2022), mientras que IS3 fue detectado menos frecuentemente (Cannatelli et al., 2014; Halaby et al., 2016; Tietgen et al., 2022), como también IS1, cuya inserción +119 en *mgrB* ya había sido descrita (Yang et al., 2020). La mutación adicional en *pmrB* (T140P) detectada en esta cepa, así como otra en *pmrA* (217V) asociada a IS1 +59 en *mgrB*, no parece tener un papel en la resistencia a la colistina ya que se han detectado siempre asociadas a determinantes bien definidos (Ekelund et al., 2021; Azam et al., 2021), como la mutación G37S de MgrB (Cannatelli et al., 2014), detectado en dos cepas en este estudio. Por último, el elemento IS1 integrado aguas arriba de la secuencia codificante de *mgrB* en una de las cepas analizadas en este trabajo presenta un papel incierto en la resistencia a la colistina.

Además del polimorfismo de *mgrB*, los restantes determinantes potenciales de resistencia a la colistina identificados en este trabajo son 6 mutaciones, detectadas en PmrA, PmrB y PhoQ, entre las que 5 habían sido previamente descritas: G53S y G53V en PmrA (Diene et al., 2013; Lin et al., 2018; Bourrel et al., 2019; Azam et al., 2021), T157P en dos cepas en PmrB (Jayol et al., 2014) y L30Q en PhoQ (Macesic et al., 2020; Azam et al., 2021). Además, la mutación G207V en PmrB no se había aún descrito y, finalmente, tres de las cepas resistentes a colistina no presentan determinantes potenciales para su resistencia a la colistina. Para estos análisis también se ha incluido el análisis del posible polimorfismo en el sistema de doble componente CrrAB que, aunque mucho más

infrecuentemente que los referidos, también se ha descrito como posible determinante de resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* (Olaitan et al., 2014).

Se determinó mediante análisis de expresión génica (qPCR) la posible desregulación de los dos sistemas de modificación del lípido A que confieren la resistencia a la colistina (Mora et al., 2022): *pmrC* (cuyo producto introduce la modificación con pEtN) y *arnBCADTEF*, que introduce la L-Ara4N). Así, se observó que de las cepas 6 cepas analizadas, solo sobreexpresan *arnT* y *pmrC* una cepa con polimorfismo en *mgrB* (IS1+59) y una cepa sin determinante conocido para la resistencia a la colistina (HSPKB22), que deberían por tanto su fenotipo a estos mecanismos de modificación del lípido A. Las dos cepas con genotipos no descritos previamente, la mutación G207V en PmrB y la integración aguas arriba (-45) de *mgrB* de la IS1, y las otras dos cepas donde no se detectó ninguna mutación, no sobreexpresan tampoco los sistemas analizados, por lo que no parece que estos mecanismos estén implicados en su fenotipo. Sin embargo, la espectrometría de masas realizada a las cuatro cepas que no sobreexpresan *arnT* ni *pmrC* permitió observar en todas ellas la modificación del lípido A con L-Ara4N, lo que sugiere que su fenotipo de resistencia a la colistina estaría mediado por esta decoración del LPS, aunque no implicaría al operón *arnBCADTEF*, que sí estaría involucrado en el caso de la cepa HSPKB22 donde se detectan ambos fenómenos, desregulación génica y modificación con L-Ara4N.

Los aislados de *K. pneumoniae* resistentes a la colistina fueron agrupados en 8 STs, siendo los más prevalentes ST11(n=6), ST15 (n=6) y ST307 (n=4), los mismos considerados clones epidémicos en el estudio CARB-ES-19 (García-Cañada et al., 2022). Las dos cepas portadoras de *bla<sub>KPC3</sub>* forman parte del cluster ST307, y 8 de las 9 cepas con *bla<sub>OXA-48</sub>* pertenecen a los clusters ST11 (4 cepas) y ST15 (4 cepas), siendo destacable también que cinco de las cepas que poseen *bla<sub>CTX-M-15</sub>* cromosómico pertenecen al clúster ST11. La asociación de fenotipos de resistencia en *K. pneumoniae* es un fenómeno de gran trascendencia clínica, y en nuestro estudio la mayor prevalencia de ST11, ST15 y ST307 merece ser destacada, ya que podría suponer la adquisición de resistencia a la colistina en los principales brotes epidémicos que expresan carbapenemasas según un reciente estudio multicéntrico llevado a cabo en España (García-Cañada et al., 2022).

#### 4.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UN BROTE DE *K. pneumoniae* *bla*<sub>KPC-3</sub>

En *Enterobacteriales*, la mayoría de las cepas productoras de carbapenemasas corresponden a aislados de *K. pneumoniae*, y las carbapenemasas más frecuentemente identificadas son enzimas del tipo KPC, que debido a su alarmante diseminación se han convertido en un serio peligro para la población mundial, contribuyendo en gran medida al aumento de la mortalidad y de la morbilidad de los pacientes infectados por estos microorganismos, lo cual lleva asociado un fuerte impacto socioeconómico. La primera enzima KPC se detectó en EE.UU en 1996 procedente de un aislado de *K. pneumoniae*, denominándose KPC-1 (Yigit et al., 2001). Desde entonces estas enzimas se han diseminado por todo el mundo, y esto se atribuye a una combinación de factores tanto sociales como microbiológicos, donde la transmisión horizontal de genes desempeña un importante papel (Goodman et al., 2016; Nordmann y Poirel, 2014; Sidjabat et al., 2009). Así, aunque existen hasta la fecha más de 20 variantes diferentes de KPC descritas, son KPC-2 y KPC-3 las formas más comunes, siendo la diferencia entre ellas un único cambio aminoacídico de histidina a tirosina en la posición 272 (Woodford et al., 2004).

Entre los factores microbiológicos que intervienen en la diseminación geográfica e interespecie de KPC destaca el transposón Tn4401 (Nordmann y Poirel, 2014; Naas et al., 2008), su movilización mediante una amplia variedad de plásmidos (Cuzon et al., 2010; Gootz et al., 2009), y su asociación con clones de alto riesgo por su distribución global, mayor capacidad de colonización, diseminación y persistencia en una gran variedad de nichos (Nordmann y Poirel, 2014; Baquero et al., 2013). El elemento Tn4401 que codifica el gen *bla*<sub>KPC</sub> tiene un tamaño aproximado de 10 Kb, está delimitado por dos secuencias de repeticiones invertidas imperfectas de 39 pb y se encuentra flanqueado por una repetición directa de 5 pb. Además, contiene los genes *tnpA* y *tnpR* y las ISKpn6 e ISKpn7, y se caracteriza por una elevada frecuencia de transposición, del orden de  $10^{-6}$ /célula receptora (Pitout et al., 2015). Este elemento se caracteriza por su capacidad de integración en diferentes plásmidos de bacterias Gram negativas y ha sido identificado en plásmidos conjugativos y no conjugativos movilizables. Los plásmidos que albergan el gen *bla*<sub>KPC</sub> suelen estar asociados con determinantes genéticos de resistencia a otros antimicrobianos, como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol. Se ha descrito la asociación del gen *bla*<sub>KPC</sub> con

diferentes grupos de incompatibilidad: IncF (replicones FIIK1, FIIK2 y FIA), IncI2, IncX, IncA/C, IncR, IncL/M y ColE1, siendo el grupo IncF, con el replicón FIIK, el predominante (Peirano et al., 2017). Estos plásmidos tienen una amplia distribución geográfica, favoreciendo que *K. pneumoniae bla<sub>KPC</sub>* muestre una amplia distribución global, considerándose actualmente endémica en América del Norte y Sur, Oriente Medio, Grecia, Italia y China (Hammoudi Halat et al., 2020), mientras que en otros países como España, Francia y Alemania se han notificado brotes hospitalarios esporádicos debidos a este microorganismo. La enzima KPC se encuentra presente en más de 100 secuenciotipos (STs) diferentes, aunque la pandemia de KPC se debe principalmente a la propagación de miembros del complejo clonal (CC) 258, con ST258 como clon predominante, identificado en el 70 % de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC, y las variantes ST11, ST340 y ST512 (Peirano et al., 2017). Sin embargo, en los últimos años se ha informado la emergencia y diseminación de nuevos clones exitosos en diversos países, como ST307, que se habría convertido en un nuevo clon pandémico.

El clon ST307 se considera endémico en países como Italia, Colombia, Estados Unidos y Sudáfrica, y ha sido introducido en zonas no endémicas ocasionando brotes nosocomiales a nivel mundial, como el ocurrido en nuestro hospital. Este clon puede albergar mutaciones genéticas (*gyrA*, *parC*), o adquirir plásmidos con otros determinantes de resistencia como *bla<sub>CTX-M-15</sub>* o genes de resistencia a carbapenemas (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*), dando lugar a cepas multirresistentes, y contribuyendo así su distribución mundial. Esto convierte al clon ST307 en un clon de “alto riesgo” que emerge como un importante vehículo en la diseminación global de determinantes de resistencia a antimicrobianos. *K. pneumoniae* ST307 aparece en 2008 en el database MLST remitido desde Holanda, pero no es hasta el año 2013 cuando se publica por primera vez en Estados Unidos y Pakistán en cepas recuperadas en los años 2010 y 2009 respectivamente, la primera de ellas conteniendo *bla<sub>KPC-2</sub>* y la segunda *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Posteriormente se notificarán otros casos en diversos países, como Italia, Colombia, Corea, Túnez, España, Rusia y Japón (Peirano et al., 2020). Previamente se había determinado que aislados ST307 con *bla<sub>CTX-M-15</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>* pertenecían a dos linajes diferentes, uno de ellos conteniendo las mutaciones GyrA S83I y ParC S80I en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR), con distribución “global”, y el segundo presentando una mutación adicional GyrA D87N, sólo identificado en

Estados Unidos con el 99% de los aislados portando además *bla<sub>CTX-M-15</sub>* y situado junto a ISEcp1, alojado en plásmidos similares a FIB (Wyres et al., 2019). En otro estudio posterior (Lowe et al., 2019) llevado a cabo en Sudáfrica donde los aislados ST307 se dividieron en seis clados (I-VI), se observó que los clados I-IV se correlacionaron con el segundo linaje descrito por Wyres et al., mientras que el clado V se correlacionó con el linaje “global”. Esto pone de manifiesto la gran distribución y prevalencia del clon ST307 en múltiples nichos (Peirano et al., 2020), que está aumentando, pudiendo reemplazar a otros clones de alto riesgo como ST258, como ha ocurrido en determinadas regiones de Italia, y también en Sudáfrica, dominando la población de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas en situaciones de brote (Lowe et al., 2019). Esto viene a ocurrir en nuestro trabajo, y también en el resto del país, donde este clon se ha convertido en el más prevalente (García-Cañada et al., 2022). Parece ser que estamos ante un escenario similar a *E. coli* ST131, donde la resistencia a fluoroquinolonas debida a mutaciones en QRDR, asociada con adquisición de plásmidos conteniendo *bla<sub>CTX-M-15</sub>* podrían explicar el progresivo aumento en su prevalencia (Peirano et al., 2020).

Como se comentó anteriormente, el clon ST307 se asocia con frecuencia a otros determinantes de resistencia a antimicrobianos. El estudio de Peirano et al. (2020) indica que las bacteriemias fueron las infecciones más frecuentes, como también muestra el estudio CARB-ES-19, a diferencia de nuestro estudio, donde la mayoría eran aislados urinarios. Nuestros aislados presentaron altas tasas de resistencia a la mayoría de antimicrobianos, excepto a amikacina, colistina, tigeciclina y ceftazidima/avibactam, y una sensibilidad moderada a fosfomicina, datos que difieren de los publicados por algunos autores (di Pilato et al., 2021; Monaco et al., 2014), donde la resistencia a colistina muestra valores elevados (48,4% y 43% respectivamente), pues sólo dos de nuestros aislados eran resistentes. El mecanismo de resistencia a colistina se debió principalmente a mutaciones en *mgrB* (di Pilato et al, 2021), mientras que uno de nuestros aislados mostró una mutación en PhoQ, y no se pudo identificar ningún determinante en la otra. Parece ser que la alta resistencia a colistina en Italia se debe al aumento en su uso para tratar las infecciones causadas por este clon (Monaco et al., 2014). En nuestro caso, solo inicialmente se trató a los pacientes con colistina, ya que posteriormente fue sustituido por tratamiento con ceftazidima/avibactam, antibiótico que fue introducido en nuestro arsenal terapéutico al inicio del brote, lo que justificaría la escasa resistencia de nuestros aislados.

La estructura poblacional de nuestros aislados de *K. pneumoniae* KPC-3 sugiere una estructura policlonal, diversidad poblacional que también informan otros autores (Peirano et al., 2020; Cañada-García et al., 2022), pero dada la situación de “brote epidémico” la mayoría de los aislados se agrupan en un clúster que corresponde al clon ST307, mostrando una expansión clonal del mismo (di Pilato et al., 2021).

Desde la aparición de nuestro brote causado por *K. pneumoniae* ST307, este clon está adquiriendo relevancia, sobre todo en la diseminación de carbapenemasas, y según los informes del estudio CARB-ES-19 en España, se ha convertido en el más prevalente entre las cepas productoras de carbapenemasas (García-Cañada et al., 2022). Además, los resultados del presente trabajo muestran que el brote *K. pneumoniae* ST307 *bla*<sub>KPC-3</sub> se caracteriza por codificar la carbapenemasa en un plásmido tipo IncFIB(pQiI), similarmente a lo previamente descrito (Villa et al., 2017; Hernández-García et al., 2022), y puede adquirir distintos determinantes de resistencia a la colistina, entre los que se ha identificado el polimorfismo L30Q de PhoQ, quedando otro genotipo sin identificar pero detectándose en ambos casos la modificación del lípido A con L-Ara4N, como se muestra en el capítulo 3.3 de este trabajo.



## **5 CONCLUSIONES**

---

1. La prevalencia de aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido procedentes del área de salud de Cáceres, ha aumentado durante el periodo 2015-2018, concentrándose en pacientes de edad avanzada (mayor de 60 años) y en el muestreo urinario, y siendo CTX-M la enzima mayoritaria detectada, frecuentemente asociada con TEM.
2. La resistencia a la colistina es un carácter relativamente infrecuente, aunque más prevalente en *K. pneumoniae* (9,81%) que en *E. coli* (2,18%) productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y procedentes del área de salud de Cáceres durante el periodo 2015-2018.
3. La resistencia a la colistina en *E. coli* procedente del área de salud de Cáceres durante el periodo 2015-2018 se asocia mayoritariamente con el polimorfismo genético del sistema PmrAB que conduce a la sobreexpresión de enzimas que decoran el lípido A con fosfoetanolamina y/o con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa.
4. La resistencia a la colistina en *E. coli* procedente del área de salud de Cáceres durante el periodo 2015-2018, independientemente de la expresión de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, se asocia minoritariamente a la presencia de *mcr-1*, un determinante plasmídico que se transmite horizontalmente con elevada eficiencia y que está asociado a elementos del tipo IncX4, y en menor medida IncHI2.
5. La transmisión de la resistencia a la colistina en *E. coli* del área y periodo estudiados ha ocurrido mediante dos mecanismos, la dispersión vertical de los clones de mayor prevalencia (ST131 y ST56) y la transferencia horizontal de *mcr-1*-IncX4.
6. La resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* procedente del área de salud de Cáceres durante el periodo 2015-2018 se asocia mayoritariamente con el polimorfismo del gen *mgrB*, seguido del sistema PmrAB, si bien un número significativo de cepas carecen de determinantes potenciales, aunque se detecta la decoración de su lípido A con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa en mucha mayor medida que con fosfoetanolamina, independientemente de la sobreexpresión de los genes que la llevan a cabo.
7. La resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* del área y periodo estudiados ha ocurrido mayoritariamente en tres clones de mayor prevalencia (ST11, ST15 y ST307), destacando en dos de ellos la probable transmisión vertical conjunta de

*mgrB* -ISL3-like(+133) y *bla*<sub>OXA-48</sub> (ST15), y *mgrB*-G37S y *bla*<sub>OXA-48</sub> (ST11), lo que implicaría que la asociación de estos determinantes de resistencia a la colistina y a carbapenemas no compromete la viabilidad celular.

8. La resistencia a la colistina detectada en el clon *K. pneumoniae* ST307 forma parte de un brote caracterizado por su resistencia a carbapenemas mediada por *bla*<sub>KPC-3</sub> y codificada en un plásmido tipo IncFIB(pQiI).

## **6 BIBLIOGRAFÍA**

---

**AEMPS.** Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Jornada de presentación del plan de acción sobre resistencias antimicrobianas, 18 de noviembre de 2013 <https://www.aemps.gob.es/j-plan-resistencias-antimicrobianas/>

**AEMPS.** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Reunión de coordinación del Plan Nacional de Resistencia a los antibióticos; 9 de julio de 2015.

**AEMPS.** Proyecto ESVAC 2009-2013. Principales resultados Jornada de presentación del Plan de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas. Madrid, 18 Noviembre 2013. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e igualdad y AEMPS.

**Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G.** Colistin in the post-antibiotic era. *Rev Chilena Infectol.* 2016; 33: 166-176.

**Ainsworth GC, Brown AM, Brownlee G.** Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer. *Nature.* 1947; 159: 263.

**Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST.** Molecular analysis of antibiotic resistance determinants and plasmids in Malaysian isolates of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2015; 10: e0133654.

**Alós JI.** Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23: 3-8.

**Anaya-López JL, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A.** Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Crit Rev Microbiol.* 2013; 39: 180-195.

**Antunes NT, Fisher JF.** Acquired Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antibiotics (Basel).* 2014; 3: 398-434.

**Anyanwu MU, Jaja IF, Okpala COR, Njoga EO, Okafor NA, Oguttu JW.** Mobile colistin resistance (*mcr*) gene-containing organisms in poultry sector in low- and middle-income countries: epidemiology, characteristics, and one health control strategies. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12: 1117.

**Azam M, Gaiind R, Yadav G, Sharma A, Upmanyu K, Jain M, Singh R.** Colistin resistance among multiple sequence types of *Klebsiella pneumoniae* is associated with diverse resistance mechanisms: a report from India. *Front Microbiol.* 2021; 12: 609840.

**Baquero F, Tedim AP, Coque TM.** Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol.* 2013; 4: 15.

**Barlow M, Hall BG.** Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol.* 2002; 55: 314-321.

**Barthélémy M, Peduzzi J, Verchère-Beaur C, Ben Yaghlane H, Labia R.** Purification and biochemical properties of Pitton's type 2 beta-lactamase (SHV-1). *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985); 137B:* 19-27.

**Basso M, Zago D, Pozzetto I, De Canale E, Scaggiante R, Biasolo MA, Peracchi M, Onelia F, Baldasso E, Palù G, Parisi SG.** Intra-hospital acquisition of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and carriage evolution: A longitudinal analysis in an Italian teaching hospital from January 2017 to August 2019. *Int J Infect Dis.* 2020; 92: 81-88.

**Bastidas-Caldes C, Cisneros-Vásquez E, Zambrano A, Mosquera-Maza A, Calero-Cáceres W, Rey J, Yamamoto Y, Yamamoto M, Calvopiña M, de Waard JH.** Co-harboring of beta-lactamases and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from healthy carriers and backyard animals in rural communities in Ecuador. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12: 856.

**Benedict RG, Langlykke AF.** Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol.* 1947; 54: 24.

**Berger S, Alauzet C, Aissa N, Hénard S, Rabaud C, Bonnet R, Lozniewski A.** Characterization of a new blaOXA-48-carrying plasmid in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 4064-4067.

**Bezabih YM, Sabiiti W, Alamneh E, Bezabih A, Peterson GM, Bezabhe WM, Roujeinikova A.** The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76: 22-29.

**Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, Garin B, Le Hello S, Arlet G, Nicolas-Chanoine MH, Decré D, Brisse S.** Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 1812-1820.

**Bialvaei AZ, Samadi Kafil H.** Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin.* 2015; 31: 707-721.

**Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA.** Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol Rev.* 2022; 46: fuab049.

**Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ.** Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13: 42-51.

**Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1-14.

**Bontron S, Poirel L, Nordmann P.** Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (*mcr-1*) from cultured bacteria and stools. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71: 2318-2320.

**Bourrel AS, Poirel L, Royer G, Darty M, Vuillemin X, Kieffer N, Clermont O, Denamur E, Nordmann P, Decousser JW; IAME Resistance Group.** Colistin resistance in Parisian inpatient faecal *Escherichia coli* as the result of two distinct evolutionary pathways. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74: 1521-1530.

**Brauer A, Telling K, Laht M, Kalmus P, Lutsar I, Remm M, Kisand V, Tenson T.** Plasmid with colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from pig slurry in Estonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 6933-6936.

**Brink AJ, Richards GA, Colombo G, Bortolotti F, Colombo P, Jehl F.** Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43: 1-6.

**Bryskier A.** Antibiotics and antibacterial agents: classifications and structure-activity relationship. Bryskier A (1ed). Antimicrobial Agents. Antibacterial and antifungals. ASM Press. 2005. Washington DC: 13-38.

**Burkholder PR, McVeigh I.** Synthesis of Vitamins by Intestinal Bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1942; 28: 285-289.

**Campos MJ, Gallardo A, Quesada A.** Optimized design of degenerate primers for PCR based on DNA or protein sequence comparisons. Methods Mol Biol. 2023; 2967: 239-251.

**Campos PA, Fuga B, Ferreira ML, Brígido RTES, Lincopan N, Gontijo-Filho PP, Ribas RM.** Genetic alterations associated with polymyxin B resistance in nosocomial KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. Microb Drug Resist. 2021; 27: 1677-1684.

**Cañada-García JE, Moure Z, Sola-Campoy PJ, Delgado-Valverde M, Cano ME, Gijón D, González M, Gracia-Ahufinger I, Larrosa N, Mulet X, Pitart C, Rivera A, Bou G, Calvo J, Cantón R, González-López JJ, Martínez-Martínez L, Navarro F, Oliver A, Palacios-Baena ZR, Pascual Á, Ruiz-Carrascoso G, Vila J, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Oteo-Iglesias J; GEMARA/GEIRAS-SEIMC/REIPI CARB-ES-19 Study Group.** CARB-ES-19 multicenter study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from all Spanish provinces reveals interregional spread of high-risk clones such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. Front Microbiol. 2022; 13: 918362.

**Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, Rossolini GM.** In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57: 5521-5526.

**Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, Tryfinopoulou K, Vatopoulos A, Rossolini GM; COLGRIT Study Group.** MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58: 5696-5703.

**Cao YP, Lin QQ, He WY, Wang J, Yi MY, Lv LC, Yang J, Liu JH, Guo JY.** Co-



selection may explain the unexpectedly high prevalence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a Chinese broiler farm. *Zool Res.* 2020; 41: 569-575.

**Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF.** Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2017; 22: 30589.

**Caroff M, Karibian D.** Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res.* 2003; 338: 2431-2447.

**Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Lopez Navas A, Mackay D, Magiorakos AP, Moreno Romo MA, Moulin G, Muñoz Madero C, Matias Ferreira Pomba MC, Powell M, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Törneke K, van Duijkeren E, Torren Edo J.** Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 46: 297-306.

**Chen L, Chavda KD, Melano RG, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN.** Complete sequence of a *bla*(KPC-2)-harboring *IncFII*(K1) plasmid from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 1542-1545.

**Cisneros-Herreros JM, Sánchez-González M, Prados-Blanco MT, Llanos-Rodríguez C, Vigil-Martín E, Soto-Espinosa de los Monteros B, Pachón-Díaz J.**

**Conceição-Neto OC, da Costa BS, Pontes LDS, Silveira MC, Justo-da-Silva LH, de Oliveira Santos IC, Teixeira CBT, Tavares E Oliveira TR, Hermes FS, Galvão TC, Antunes LCM, Rocha-de-Souza CM, Carvalho-Assef APD.** Polymyxin resistance in clinical isolates of *K. pneumoniae* in Brazil: Update on molecular mechanisms, clonal dissemination and relationship with KPC-producing strains. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12: 898125.

**Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P.** Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*KPC-2 gene. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 1349-1356.

**De La Cadena E, Mojica MF, García-Betancur JC, Appel TM, Porras J, Pallares CJ, Solano-Gutiérrez JS, Rojas LJ, Villegas MV.** Molecular analysis of polymyxin resistance among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Colombia. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10: 284.

**Delannoy S, Le Devendec L, Jouy E, Fach P, Drider D, Kempf I.** Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. *Front Microbiol*. 2017; 8: 2278.

**Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, Azza S, Gavory F, Barbe V, La Scola B, Raoult D, Rolain JM.** The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 369-383.

**Di Pilato V, Errico G, Monaco M, Giani T, Del Grosso M, Antonelli A, David S, Lindh E, Camilli R, Aanensen DM, Rossolini GM, Pantosti A;** AR-ISS laboratory study group on carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. *J Antimicrob Chemother*. 2021; 76: 355-361.

**EARS-Net:** European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Resistencia a antibióticos en aislados invasivos en España (EARS-Net). Memoria anual 2021; 18 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>.

**ECDC.** Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2020. 25 Jul 2022.

**ECDC.** ECDC/EMA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react; 17 Sep 2009.

**ECDC.** European Centre for Disease Control/European Medicines Agency. (September 2009). ECDC/EMA Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: EMA doc. ref. EMA/576176/2009. Disponible en: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) (hipervínculo revisado el 9 de julio de 2015).

**ECDC.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance atlas of infectious diseases. Stockholm: ECDC; 2022. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>.

**ECDC.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: ECDC; 2022. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021>.

**Ekelund O, Klokkhammer Hetland MA, Høyland Löhr I, Schön T, Somajo S.** Rapid high-resolution detection of colistin resistance in Gram-negative bacteria using flow cytometry: a comparison with broth microdilution, a commercial screening test and WGS. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76: 3183-3191.

**Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan H, Li X, Xie S, Rajkovic A, Feng Y, Fang W, Rankin SC, Yue M.** Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980-2018). *Microorganisms.* 2019; 7: 461.

**El-Sayed Ahmed MAE, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB.** Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 868-885.

**Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR.** Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002; 4: 837-851.

**ESVAC.** European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. Trends from 2011 to 2014 Sixth ESVAC report; 14 October 2016.

**ESVAC.** European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011. Third ESVAC report; 15 October 2013. (EMA/236501/2013).

**EUCAST** guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance – Version 2.0, July 2017. Available from: [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms).

**European Antimicrobial Resistance Collaborators.** The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Public Health.* 2022; 7: e897-e913.

**Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcón L, Nieves VF, Corso A.** Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *bla<sub>CTX-M</sub>* genes isolated from swine in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019; 18: 160-162.

**Faccone D, Rapoport M, Albornoz E, Celaya F, De Mendieta J, De Belder D, Lucero C, Gomez S, Danze D, Pasteran F, Corso A;** Mobilizable colistin resistance group. plasmidic resistance to colistin mediated by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* clinical isolates in Argentina: a retrospective study, 2012-2018. *Rev Panam Salud Publica.* 2020; 44: e55.

**Falagas ME, Kasiakou SK.** Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 1333-1341.

**Fernández P, Moreno L, Yagüe G, Andreu E, Jara R, Segovia M.** Colonization by multidrug-resistant microorganisms in ICU patients during the COVID-19 pandemic. *Medicina Intensiva.* 2021; 45: 313-319.

**Fordham SME, Mantzouratou A, Sheridan E.** Prevalence of insertion sequence elements in plasmids relating to *mgrB* gene disruption causing colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiologyopen.* 2022; 11(1): e1262.

**Galani I, Karaikos I, Karantani I, Papoutsaki V, Maraki S, Papaioannou V, Kazila P, Tsorlini H, Charalampaki N, Toutouza M, Vagiakou H, Pappas K, Kyratsa A, Kontopoulou K, Legga O, Petinaki E, Papadogeorgaki H, Chinou E, Souli M, Giamarellou H; on behalf of the study collaborators.** Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill.* 2018; 23: 1700775.

**Gallardo A, Iglesias MR, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Gutiérrez G, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez L, Quesada A.** Plasmid-mediated *Kluyvera*-like *arnBCADTEF* operon confers colistin (hetero)resistance to *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2023; 65(5): e00091-21.

**Gallardo A, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez L, Quesada A.** Involvement of *hpap2* and *dgkA* genes in colistin resistance mediated by *mcr* determinants. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9: 531.

**García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A.** *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 2143-2145.

**García-Meniño I, Díaz-Jiménez D, García V, de Toro M, Flament-Simon SC, Blanco J, Mora A.** Genomic characterization of prevalent *mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5* *Escherichia coli* within swine enteric colibacillosis in Spain. *Front Microbiol*. 2019; 10: 2469.

**Giordano C, Barnini S, Tsioutis C, Chlebowicz MA, Scoulica EV, Gikas A, Rossen JW, Friedrich AW, Bathorn E.** Expansion of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with various *mgrB* mutations giving rise to colistin resistance: the role of ISL3 on plasmids. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51: 260-265.

**Girlich D, Grosperin V, Naas T, Dortet L.** CHROMagar™ ESBL/mSuperCARBA bi-plate medium for detection of ESBL- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from spiked stools. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019; 95: 107-112.

**Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, Milstone AM.** Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016; 14: 95-108.

**Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC.** Genetic organization of transposase regions surrounding *blaKPC* carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 1998-2004.

**Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen CY, Graham M, Van Domselaar G, Stothard P.** Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51: W484-W492.

**Grossman TH.** Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016; 6: a025387.

**Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Monnet DL; European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EUSCAPE) working group.** Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: 153-163.

**Gupta, S., Abhishek, Shrivastav, S. and Verma, A.K.** Isolation, Identification, Molecular characterization and antibiogram of *E. coli* isolates from neonatal calves. *International Journal of Current microbiology and Applied Sciences.* 2019; 8: 1996-2007.

**Gunn JS.** The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* 2008; 16: 284-290.

**Halaby T, Kucukkose E, Janssen AB, Rogers MR, Doorduyn DJ, van der Zanden AG, Al Naiemi N, Vandenbroucke-Grauls CM, van Schaik W.** Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 6837-6843.

**Haller S, Kramer R, Becker K, Bohnert JA, Eckmanns T, Hans JB, Hecht J, Heidecke CD, Hübner NO, Kramer A, Klaper K, Littmann M, Marlinghaus L, Neumann B, Pfeifer Y, Pfennigwerth N, Rogge S, Schaufler K, Thürmer A, Werner G, Gatermann S.** Extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak, north-eastern Germany, June to October 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24: 1900734.

**Hamamoto K, Hirai I.** Characterisation of chromosomally-located bla<sub>CTX-M</sub> and its surrounding sequence in CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019; 17: 53-57.

**Hamel M, Chatzipanagiotou S, Hadjadj L, Petinaki E, Papagianni S, Charalampaki N, Tsiplakou S, Papaioannou V, Skarmoutsou N, Spiliopoulou I, Christofidou M, Papamichalopoulos N, Skalidis T, Legakis N, Fountoulis K, Perivolioti E, Kraniotaki H, Bournia M, Ioannidis A, Baron Sophie A, Rolain JM.** Inactivation of mgrB gene regulator and resistance to colistin is becoming endemic in carbapenem-

resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece: A nationwide study from 2014 to 2017. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 55: 105930.

**Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C.** The current burden of carbapenemases: review of significant properties and dissemination among Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9: 186.

**Hancock RE.** The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol*. 1997; 5: 37-42.

**Hankins JV, Madsen JA, Needham BD, Brodbelt JS, Trent MS.** The outer membrane of Gram-negative bacteria: lipid A isolation and characterization. *Methods Mol Biol*. 2013; 966: 239-258.

**Hassen B, Abbassi MS, Benlabidi S, Ruiz-Ripa L, Mama OM, Ibrahim C, Hassen A, Hammami S, Torres C.** Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020; 27: 44368-44377.

**Hassen B, Hammami S, Hassen A, Abbassi MS.** Molecular mechanisms and clonal lineages of colistin-resistant bacteria across the African continent: a scoping review. *Lett Appl Microbiol*. 2022; 75: 1390-1422.

**He QW, Xu XH, Lan FJ, Zhao ZC, Wu ZY, Cao YP, Li B.** Molecular characteristic of mcr-1 producing *Escherichia coli* in a Chinese university hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017; 16: 32.

**Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C.** Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 1998; 30: 221-232.

**Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A.** Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 2321-2324.

**Hernández-García M, Castillo-Polo JA, Cordero DG, Pérez-Viso B, García-Castillo M, Saez de la Fuente J, Morosini MI, Cantón R, Ruiz-Garbajosa P.** Impact

of ceftazidime-avibactam treatment in the emergence of novel KPC variants in the ST307-*Klebsiella pneumoniae* high-risk clone and consequences for their routine detection. *J Clin Microbiol.* 2022; 60: e0224521.

**Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada N, Miguela-Villoldo P,** Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Euro Surveill.* 2017; 22: 30586.

**Huang J, Dai X, Ge L, Shafiq M, Shah JM, Sun J, Yi S, Wang L.** Sequence Duplication within *pmrB* gene contribute to high-level colistin resistance in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* 2020; 26: 1442-1451.

**Huang PH, Chen WY, Chou SH, Wang FD, Lin YT.** Risk factors for the development of colistin resistance during colistin treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Microbiol Spectr.* 2022; 10(3): e0038122.

**Huovinen P.** Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1608-1614.

**Ibrahim ME, Abbas M, Al-Shahrai AM, Elamin BK.** Phenotypic Characterization and Antibiotic Resistance Patterns of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria in a Referral Hospital, Saudi Arabia. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2019; 2019: 6054694.

**Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR.** A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.* 201; 22: 101-107.

**Jacoby GA, Munoz-Price LS.** The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 2005; 352: 380-391.

**Jacoby GA.** AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 161-182.

**Jaidane N, Bonnin RA, Mansour W, Girlich D, Creton E, Cotellon G, Chaouch C, Boujaafar N, Bouallegue O, Naas T.** Genomic insights into colistin-resistant *Klebsiella*



pneumoniae from a tunisian teaching hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62: e01601-17.

**Janssen AB, Bartholomew TL, Marciszewska NP, Bonten MJM, Willems RJL, Bengoechea JA, van Schaik W.** Nonclonal emergence of colistin resistance associated with mutations in the BasRS two-component system in *Escherichia coli* bloodstream isolates. *mSphere.* 2020; 5: e00143-20.

**Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P.** Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 4762-4766.

**Jiang SS, Liu MC, Teng LJ, Wang WB, Hsueh PR, Liaw SJ.** *Proteus mirabilis* pmrI, an RppA-regulated gene necessary for polymyxin B resistance, biofilm formation, and urothelial cell invasion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 1564-1571.

**Jordan E, Voide C, Petignat PA, Gobin N.** Céphalosporines: quelques considérations en pratique Clinique. *Rev Med Suisse.* 2020; 16: 1906-1911.

**Jousset AB, Bonnin RA, Takissian J, Girlich D, Mihaila L, Cabanel N, Dortet L, Glaser P, Naas T.** Concomitant carriage of KPC-producing and non-KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 within a single patient. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75: 2087-2092.

**Kalynysh S, Morona R, Cygler M.** Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiol Rev.* 2014; 38: 1048-1065.

**Kassakian SZ, Mermel LA.** Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2014; 3: 9.

**Kato A, Groisman EA.** Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev.* 2004; 18: 2302-2313.

**Kieffer N, Royer G, Decousser JW, Bourrel AS, Palmieri M, Ortiz De La Rosa JM, Jacquier H, Denamur E, Nordmann P, Poirel L.** *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63: e00965-19.

**Kim S, Woo JH, Kim N, Kim MH, Kim SY, Son JH, Moon DC, Lim SK, Shin M, Lee JC.** Characterization of chromosome-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from livestock in Korea. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 3291-3299.

**Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG.** Species-specific mutation rates for *ampC* derepression in Enterobacterales with chromosomally encoded inducible AmpC  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73: 1530-1536.

**Koppe U, von Laer A, Kroll LE, Noll I, Feig M, Schneider M, Claus H, Eckmanns T, Abu Sin M.** Carbapenem non-susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates in hospitals from 2011 to 2016, data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS). *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018; 7: 71.

**Kuang Q, He D, Sun H, Hu H, Li F, Li W, Hu G, Wu H, Yuan L.** R<sup>93</sup>P substitution in the *PmrB* Hamp domain contributes to colistin heteroresistance in *Escherichia coli* isolates from swine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64: e01509-20.

**Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J.** Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 449-465.

**Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, Stamper K, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Fox AJ, Upton M.** UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 1241-1244.

**Lázaro-Perona F, Sotillo A, Troyano-Hernández P, Gómez-Gil R, de la Vega-Bueno Á, Mingorance J.** Genomic path to pandrug resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52: 713-718.

**Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA.** The *PmrA*-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2004; 186: 4124-4133.

**Lee KY, Hopkins JD, Syvanen M.** Direct involvement of IS26 in an antibiotic resistance operon. *J Bacteriol.* 1990; 172: 3229-3236.

**Leekitcharoenphon P, Nielsen EM, Kaas RS, Lund O, Aarestrup FM.** Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One.* 2014; 9: e87991.

**Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K.** Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25: 11-25.

**Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL.** Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6: 589-601.

**Li LG, Huang Q, Yin X, Zhang T.** Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment - Challenges, progress, and prospects. *Water Res.* 2020; 185: 116127.

**Lin QY, Tsai YL, Liu MC, Lin WC, Hsueh PR, Liaw SJ.** *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 5181-5190.

**Lin YW, Yu HH, Zhao J, Han ML, Zhu Y, Akter J, Wickremasinghe H, Walpola H, Wirth V, Rao GG, Forrest A, Velkov T, Li J.** Polymyxin B in combination with enrofloxacin exerts synergistic killing against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(6): e00028-18.

**Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR.** Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75: 3087-3095.

**Lippa AM, Goulian M.** Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* 2009; 5: e1000788.

**Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J.** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and

human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16: 161-168.

**Liu YY, Zhou Q, He W, Lin Q, Yang J, Liu JH.** mcr-1 and plasmid prevalence in *Escherichia coli* from livestock. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20: 1126.

**Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.

**Ljungquist O, Schönbeck M, Riesbeck K, Tham J.** Risk factors associated with prolonged intestinal colonization of ESBL-producing Enterobacteriaceae- a prospective cohort study. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 2637-2648.

**Lowe M, Kock MM, Coetzee J, Hoosien E, Peirano G, Strydom KA, Ehlers MM, Mbelle NM, Shashkina E, Haslam DB, Dhawan P, Donnelly RJ, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD.** *Klebsiella pneumoniae* ST307 with bla<sub>OXA-181</sub>, South Africa, 2014-2016. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25: 739-747.

**Macesic N, Nelson B, Mcconville TH, Giddins MJ, Green DA, Stump S, Gomez-Simmonds A, Annavajhala MK, Uhlemann AC.** Emergence of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* through diverse genetic adaptations: a genomic, retrospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2020; 70: 2084–2091.

**Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268-281.

**Majewski P, Gutowska A, Smith DGE, Hauschild T, Majewska P, Hryszko T, Gizycka D, Kedra B, Kochanowicz J, Glowinski J, Drewnowska J, Swiecicka I, Sacha PT, Wiczorek P, Iwaniuk D, Sulewska A, Charkiewicz R, Makarewicz K, Zebrowska A, Czaban S, Radziwon P, Niklinski J, Tryniszewska EA.** Plasmid mediated mcr-1.1 colistin-resistance in clinical extraintestinal *Escherichia coli* strains isolated in Poland. *Front Microbiol.* 2021; 12: 547020.

**Manageiro V, Clemente L, Romão R, Silva C, Vieira L, Ferreira E, Caniça M.** IncX4 plasmid carrying the new mcr-1.9 Gene variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine. *Front Microbiol.* 2019; 10: 367.

**Martin RM, Bachman MA.** Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 4.

**Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F.** Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 472-476.

**Matamoros S, van Hattem JM, Arcilla MS, Willemse N, Melles DC, Penders J, Vinh TN, Thi Hoa N, Bootsma MCJ, van Genderen PJ, Goorhuis A, Grobusch M, Molhoek N, Oude Lashof AML, Stobberingh EE, Verbrugh HA, de Jong MD, Schultsz C.** Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep.* 2017; 7: 15364.

**Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD.** The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28: 565-591.

**Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM.** AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection.* 2019; 47: 363-375.

**Meletis G, Oustas E, Botziori C, Kakasi E, Koteli A.** Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *New Microbiol.* 2015; 38: 417-421.

**Mendes AC, Novais Â, Campos J, Rodrigues C, Santos C, Antunes P, Ramos H, Peixe L.** mcr-1 in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with hospitalized patients, Portugal, 2016-2017. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24: 762-766.

**Meštrović T, Ikuta KS, Swetschinski L, Gray A, Robles Aguilar G, Han C, Wool E, Gershberg Hayoon A, Murray CJ, Naghavi M.** The burden of bacterial antimicrobial resistance in Croatia in 2019: a country-level systematic analysis. *Croat Med J.* 2023; 64: 272-283.

**Migura-Garcia L, González-López JJ, Martínez-Urtaza J, Aguirre Sánchez JR, Moreno-Mingorance A, Perez de Rozas A, Höfle U, Ramiro Y, Gonzalez-Escalona N.** *mcr*-colistin resistance genes mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 plasmids in *Escherichia coli* of pigs and white stork in Spain. *Front Microbiol.* 2020; 10: 3072.

**Miltgen G, Bour M, Allyn J, Allou N, Vedani T, Vuillemenot JB, Triponney P, Martinet O, Lugagne N, Benoit-Cattin T, Dortet L, Birer A, Jaffar-Bandjee MC, Belmonte O, Plésiat P, Potron A.** Molecular and epidemiological investigation of a colistin-resistant OXA-23-/NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* outbreak in the Southwest Indian Ocean Area. *Int J Antimicrob Agents.* 2021; 58: 106402.

**Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G et al.** Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32: 253-259.

**Mmatli M, Mbelle NM, Osei Sekyere J.** Global epidemiology, genetic environment, risk factors and therapeutic prospects of *mcr* genes: A current and emerging update. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12: 941358.

**Mohr KI.** History of antibiotics research. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016; 398: 237-272.

**Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S; Network EuSCAPE-Italy; Grundmann H, Pantosti A, Rossolini GM.** Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19: 20939.

**Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE.** Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS.* 2007; 115: 1400-1408.

**Mora A, Campos MJ, Quesada A.** Editorial: Zoonotic microorganisms and spread of acquired polymyxin resistance determinants. *Front Microbiol.* 2022; 13: 849316.

**Munita JM, Arias CA.** Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016; 4: 10.

**Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al.** Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022; 399: 629–655.

**Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P.** Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1257-1263.

**Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P.** Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 1262-1270.

**Nation RL, Velkov T, Li J.** Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clin Infect Dis*. 2014; 59: 88-94.

**National Library of Medicine's Internet Taxonomy**  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.chl?id=543>)

**Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B.** Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29: 524-534.

**Needham BD, Trent MS.** Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11: 467-481.

**Nikaido H.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67: 593-656.

**Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH.** Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 939-946.

**Nordmann P, Poirel L.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 821-830.

**Olaitan AO, Morand S, Rolain JM.** Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014; 5: 643.

**Oliveira J, Reygaert WC.** Gram negative bacteria. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>

**OMS.** World Health Organization. (2019). The 2019 WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/327957>.

**Oteo-Iglesias J, Pérez-Vázquez M, Sola Campoy P, Moure Z, Sánchez Romero I, Sánchez Benito R et al.** Emergence of blood infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75: 3402-3405.

**Ouchar Mahamat O, Lounnas M, Hide M, Dumont Y, Tidjani A, Kamougam K, Abderrahmane M, Benavides J, Solassol J, Bañuls AL, Jean-Pierre H, Carrière C, Godreuil S.** High prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in Chadian hospitals. *BMC Infect Dis.* 2019; 19: 205.

**Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B.** Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 1050-1053.

**Palkovicova J, Sukkar I, Delafuente J, Valcek A, Medvecky M, Jamborova I, Bitar I, Phan MD, San Millan A, Dolejska M.** Fitness effects of blaCTX-M-15-harboring F2:A1:B- plasmids on their native *Escherichia coli* ST131 H30Rx hosts. *J Antimicrob Chemother.* 2022; 77: 2960-2963.

**Partridge SR, Hall RM.** Evolution of transposons containing blaTEM genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1267-1268.

**Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 657-686.

**Patiño-Navarrete R, Rosinski-Chupin I, Cabanel N, Zongo PD, Héry M, Oueslati S, Girlich D, Dortet L, Bonnin RA, Naas T, Glaser P.** Specificities and commonalities of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated in France from 2012 to 2015. *mSystems.* 2022; 7: e0116921.



**Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JD.** Importance of clonal complex 258 and IncF<sub>K2</sub>-like plasmids among a global collection of *Klebsiella pneumoniae* with bla<sub>KPC</sub>. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61: e02610-16.

**Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD.** Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64: e01148-20.

**Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I.** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43: 460-464.

**Pérez Guerrero P, Galán Sánchez F, Gutiérrez Saborido D, Guerrero Lozano I.** Infecciones por enterobacterias. *Medicine. Programa sistemático de actualización en Medicina y protocolos de práctica clínica. Enfermedades infecciosas (VII): Infecciones por anaerobios y enterobacterias.* 2014; 11; 3276-3282.

**Perez JC, Groisman EA.** Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2007; 63: 283-293.

**Phetburom N, Boueroy P, Chopjitt P, Hatrongjit R, Akeda Y, Hamada S, Nuanualsuwan S, Kerdsin A.** *Klebsiella pneumoniae* complex harboring mcr-1, mcr-7, and mcr-8 isolates from slaughtered pigs in Thailand. *Microorganisms.* 2021; 9: 2436.

**Pimenta AC, Fernandes R, Moreira IS.** Evolution of drug resistance: insight on TEM  $\beta$ -lactamases structure and activity and  $\beta$ -lactam antibiotics. *Mini Rev Med Chem.* 2014; 14: 111-122.

**Pintos-Pascual I, Cantero-Caballero M, Muñoz Rubio E, Sánchez-Romero I, Asensio-Vegas A, Ramos-Martínez A.** Epidemiología y clínica de las infecciones y colonizaciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de tercer nivel [Epidemiology and clinical of infections and colonizations caused by Enterobacteriales producing carbapenemasas in a tertiary hospital]. *Rev Esp Quimioter.* 2020; 33: 122-129.

**Pitout JD, Nordmann P, Poirel L.** Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 5873-5884.

**Pitt ME, Elliott AG, Cao MD, Ganesamoorthy D, Karaiskos I, Giamarellou H, Abboud CS, Blaskovich MAT, Cooper MA, Coin LJM.** Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Genom.* 2018; 4: e000158.

**Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P.** Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 559-562.

**Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P.** The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 75-80.

**Poirel L, Jayol A, Nordmann P.** Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30: 557-596.

**Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 622-632.

**Pratt RF.**  $\beta$ -Lactamases: Why and How. *J Med Chem.* 2016; 59: 8207-20.

**Quesada A, Porrero MC, Téllez S, Palomo G, García M, Domínguez L.** Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 71-74.

**Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, Sun L, Ruan Z, Feng Y, Akova M, Yu Y.** Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: 400-410.

- Raetz CR, Whitfield C.** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71: 635-700.
- Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G.** Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *Braz J Infect Dis.* 2020; 24: 231-238.
- Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat.* 2016; 29: 13-29.
- Romero Hurtado S, Iregui CA.** Lipopolysaccharide. *Rev. Med. Vet.* 2010; 19: 37-45.
- Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida JN Jr, Duarte AJ.** Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis.* 2017; 21: 98-101.
- Sadek M, Ortiz de la Rosa JM, Abdelfattah Maky M, Korashe Dandrawy M, Nordmann P, Poirel L.** Genomic features of MCR-1 and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterales from retail raw chicken in Egypt. *Microorganisms.* 2021; 9: 195.
- Saiman L.** Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8: 249-255.
- Samuelsen O, Overballe-Petersen S, Bjornholt JV, Brisse S, Doumith M, Woodford N, Hopkins KL, Aasnæs B, Haldorsen B, Sundsfjord A; Norwegian Study Group on CPE.** Molecular and epidemiological characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Norway, 2007 to 2014. *PLoS One.* 2017; 12: e0187832.
- Sánchez-Benito R, Iglesias MR, Quijada NM, Campos MJ, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Pazos C, Rodríguez-Lázaro D, Garduño E, Domínguez L, Quesada A.** *Escherichia coli* ST167 carrying plasmid mobilisable mcr-1 and bla<sub>CTX-M-15</sub> resistance determinants isolated from a human respiratory infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 50: 285-286.

**Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Sepehr A, Salimi A, Badmasti F.** Molecular epidemiology of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Microbiol.* 2021; 13: 257-265.

**Sato T, Shiraishi T, Hiyama Y, Honda H, Shinagawa M, Usui M, Kuronuma K, Masumori N, Takahashi S, Tamura Y, Yokota SI.** Contribution of novel amino acid alterations in Pmra or PmrB to colistin resistance in mcr-negative *Escherichia coli* clinical isolates, including major multidrug-resistant lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and non-x. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62: e00864-18.

**Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K.** Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care.* 2020; 8: 13.

**Schnaitman CA, Klena JD.** Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev.* 1993; 57: 655-682.

**Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A.** Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; 28: 519-542.

**Seemann T.** Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30: 2068-2069.

**SEIMC.** Registro Hospitalario de Pacientes Afectados Por Las Resistencias Bacterianas. 15 may 2018.

**SEMPSP.** Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 31: 2021. Informe España Prevalencia de infecciones (relacionadas con la asistencia sanitaria y comunitarias) y uso de antimicrobianos en hospitales de agudos. Versión 1.0 27/12/2021.

**SEQ.** HIRIS. Informe sobre Resistencia Antimicrobiana 2021. Hiris [Internet]. 2021; Available from: <https://seq.es/wp-content/uploads/2021/10/Informe-RAM-2021.pdf>

**Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH.** Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993; 57: 138-163.

**Sherry N, Howden B.** Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomicin, colistin and ceftazidime-avibactam - epidemiology, laboratory detection and treatment implications. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018; 16: 289-306.

**Sidjabat HE, Silveira FP, Potoski BA, Abu-Elmagd KM, Adams-Haduch JM, Paterson DL, Doi Y.** Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 1736-1738.

**Silva DMD, Faria-Junior C, Nery DR, Oliveira PM, Silva LOR, Alves EG, Lima GRCEC, Pereira AL.** Insertion sequences disrupting mgrB in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021; 24: 53-57.

**Snesrud E, McGann P, Chandler M.** The birth and demise of the ISAp11-mcr-1-ISAp11 composite transposon: the vehicle for transferable colistin resistance. *mBio.* 2018; 9: e02381-17.

**Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T et al.** An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis.* 2010; 50: 364-373.

**Stansly PG, Schlosser ME.** Studies on polymyxin: isolation and identification of *Bacillus polymyxa* and differentiation of polymyxin from certain known antibiotics. *J Bacteriol.* 1947; 54: 549-556.

**Stec B, Holtz KM, Wojciechowski CL, Kantrowitz ER.** Structure of the wild-type TEM-1 beta-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2005; 61: 1072-1079.

**Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 664-89.

**Suárez C, Gudiol F.** Antibióticos betalactámicos [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 116-129.

**Sun J, Fang LX, Wu Z, Deng H, Yang RS, Li XP, Li SM, Liao XP, Feng Y, Liu YH.** Genetic analysis of the IncX4 plasmids: implications for a unique pattern in the mcr-1 acquisition. *Sci Rep.* 2017; 7: 424.

**Sun S, Negrea A, Rhen M, Andersson DI.** Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 2298-2305.

**Sutherland T, Mpirimbanyi C, Nziyomaze E, Niyomugabo JP, Niyonsenga Z, Muvunyi CM, Mueller A, Bebell LM, Nkubana T, Musoni E, Talmor D, Rickard J, Riviello ED.** Widespread antimicrobial resistance among bacterial infections in a Rwandan referral hospital. *PLoS One.* 2019; 14: e0221121.

**Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kılıç S, Alp Meşe E.** The epidemiology of carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in 2019 in Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2021; 55: 1-16.

**Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N; WHO Pathogens Priority List Working Group.** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 318–327.

**Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ.** Antibacterial resistance leadership group. A primer on AmpC  $\beta$ -lactamases: necessary knowledge for an increasingly multidrug-resistant world. *Clin Infect Dis.* 2019; 69: 1446-1455.

**Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY.** Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 78: 3-13.

**Tejada-Llacsá PJ, Huarcaya JM, Melgarejo GC, Gonzales LF, Cahuana J, Pari RM, Bohorquez HL, Chacaltana J.** Characterization of ESBL-producing bacteria infections on a national referral hospital. *An. Fac. med.* 2015; 76: 161-166.

**Tekele SG, Teklu DS, Tullu KD, Birru SK, Legese MH.** Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC beta-lactamases producing gram negative bacilli isolated from clinical specimens at International Clinical Laboratories, Addis Ababa, Ethiopia. PLoS One. 2020; 15: e0241984.

**Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233-2239.

**Thomson KS.** Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1019-1025.

**Tietgen M, Sedlacek L, Higgins PG, Kaspar H, Ewers C, Göttig S.** Colistin resistance mechanisms in human and veterinary *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Antibiotics (Basel). 2022; 11: 1672.

**Vázquez-Ucha JC, Seoane-Estévez A, Rodiño-Janeiro BK, González-Bardanca M, Conde-Pérez K, Martínez-Gutián M, Alvarez-Fraga L, Arca-Suárez J, Lasarte-Monterrubbio C, Gut M, Gut I, Álvarez-Tejado M, Oviaño M, Beceiro A, Bou G; GEMARA-SEIMC/REIPI Enterobacterales study group.** Activity of imipenem/relebactam against a spanish nationwide collection of carbapenemase-producing Enterobacterales. J Antimicrob Chemother. 2021; 76: 1498-1510.

**Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J.** Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. Future Microbiol. 2013; 8: 711-724.

**Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, Endimiani A, Mammina C, Ocampo AM, Jimenez JN, Doumith M, Woodford N, Hopkins K, Carattoli A.** Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. Microb Genom. 2017; 3: e000110.

**Wang CH, Siu LK, Chang FY, Chiu SK, Lin JC.** A Resistance Mechanism in Non-mcr Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Taiwan: R81H Substitution in PmrA Is an Independent Factor Contributing to Colistin Resistance. Microbiol Spectr. 2021; 9: e0002221.

**Weterings V, Zhou K, Rossen JW, van Stenis D, Thewessen E, Kluytmans J, Veenemans J.** An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34: 1647-1655.

**WHO.** World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 1 April 2014.

**Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006; 60: 1136-1151.

**Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM.** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 4793-4799.

**Wösten MM, Kox LF, Chamnongpol S, Soncini FC, Groisman EA.** A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell.* 2000; 103: 113-125.

**Wu C, Wang Y, Shi X, Wang S, Ren H, Shen Z, Wang Y, Lin J, Wang S.** Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008-2014. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 30.

**Wyres KL, Lam MMC, Holt KE.** Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18: 344-359.

**Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S.** Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21.

**Xu Y, Liu L, Zhang H, Feng Y.** Co-production of Tet(X) and MCR-1, two resistance enzymes by a single plasmid. *Environ Microbiol.* 2021; 23: 7445-7464.

**Yang T, Wang S, Lin J, Griffith BT, Lian S, Hong Z, Lin L, Lu P, Tseng S.** Contributions of insertion sequences conferring colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55: 105894.



**Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1151-1161.

**Yoon EJ, Gwon B, Liu C, Kim D, Won D, Park SG, Choi JR, Jeong SH.** Beneficial Chromosomal integration of the genes for CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* for stable propagation. *mSystems.* 2020; 5: e00459-20.

**Zeng KJ, Doi Y, Patil S, Huang X, Tian GB.** Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 3862-3863.

**Zhang Z, Tian X, Shi C.** Global spread of MCR-producing *Salmonella enterica* isolates. *Antibiotics (Basel).* 2022; 11: 998.