
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS
INTRAHOSPITALARIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS**

TESIS DOCTORAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

JUAN MARTIN VARGAS

TESISTA

DRA. MARÍA ANGELA JURE
DIRECTORA

MARTA E. CECILIA DE CASTILLO
CO-DIRECTORA

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. María Ester Lucca

Dra. Natalia Cecilia Habib

Dra. Cintia Mariana Romero

Dra. Fernanda Corrales Chahar

Dr. Marcos Adrián Reynoso

Bioq. Isolina del Carmen Flores

Lic. Carlos Leandro Puig

Srta. Constanza Micaela Rubis

Srta. Bianca Agostina Kollrich

Sr. Juan Manuel Garrido

DECANA

Dra. María Inés Gómez

VICE-DECANA

Dra. María Eugenia Mónaco

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Carolina Serra Barcellona

JEFE DE DIVISIÓN DE DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Carlos Leandro Puig

.....
.....

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. María Carolina Navarro

Dra. María Cristina Rubio

Dra. Rossana Cristina Pérez Aguilar

Dra. Cintia Mariana Romero

Dr. Diego Alejandro Sampietro

Suplentes

Dra. Natalia Cecilia Habib

Dra. Nancy Roxana Vera

Dra. Marcela Susana Medina

Dra. Mirta María del Valle Rachid

Dra. Adriana Mónica Neske

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dr. Sergio Enrique Pasteris (Titular)

Dra. Cintia Mariana Romero (Suplente)

.....
.....

TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN BIOQUIMICA

CARRERA DE DOCTORADO EN BIOQUIMICA

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución nº: 732/00

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución nº: 489-CONEAU-12

Director:
Dr. Manuel Javier Aybar

Comité Académico:

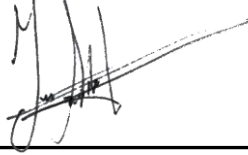
Dra. Aida Ben Altabef
Dra. Gladis Susana Álvarez
Dra. Inés del Carmen Ramos
Dra. Roxana Beatriz Medina
Dr. Raúl Armando Salomón

.....
.....

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS
INTRAHOSPITALARIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS”

TESISTA:



Bioq. Juan Martín Vargas

DIRECTOR/ A:



Dra. María Angela Jure

CODIRECTOR



Dra. Marta Elena Cecilia de Castillo

COMISION DE SUPERVISION :



Dra. Mónica A. Delgado



Dra. María Cristina Gaudio de Allori

PUBLICACIONES

Vargas JM, Moreno Mochi MP, Nuñez JM, Mochi S, Cáceres M, Campo R, Jure MA. (2022). Emergence and clonal spread of KPC-2 producing clinical *Klebsiella aerogenes* isolates in a hospital from Northwest Argentina. *Journal of Medical Microbiology* (*etapa de correcciones*).

Albarracin, L., Ortiz Moyano, R., Vargas, J. M., Andrade, B., Cortez Zamar, J., Dentice Maidana, S., Fukuyama, K., Kurata, S., Jure, M. Á., Kitazawa, H., & Villena, J. (2022). Genomic and Immunological Characterization of Hypermucoviscous Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST25 Isolates from Northwest Argentina. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7361. <https://doi.org/10.3390/ijms23137361>

Jure, M. A., Albarracin, L., Vargas, J. M., Maidana, S. D., Zamar, J. C., Kitazawa, H., & Villena, J. (2021). Draft genome sequences of two hypermucoviscous carbapenem-resistant ST25 *Klebsiella pneumoniae* strains causing respiratory and systemic infections. *Journal of global antimicrobial resistance*, 26, 174–176. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.05.018>

Vargas, J. M., Moreno Mochi, M. P., López, C. G., Alarcón, J. A., Acosta, N., Soria, K., Nuñez, J. M., Villafañe, S., Ramacciotti, J., Del Campo, R., & Jure, M. A. (2021). Impacto de un programa de vigilancia activa y medidas de control de infecciones sobre la incidencia de bacilos gram negativos resistentes a carbapenems en una unidad de cuidados intensivos [Impact of an active surveillance program and infection control measures on the incidence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in an intensive care unit]. *Revista Argentina de microbiología*, S0325-7541(21)00051-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.03.003>

Vargas, J. M., Moreno Mochi, M. P., Nuñez, J. M., Cáceres, M., Mochi, S., Del Campo Moreno, R., & Jure, M. A. (2019). Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*, 5(6), e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>

AGRADECIMIENTOS

De mi mayor agradecimiento a quienes quisieron, pudieron y están

Quisiera expresar brevemente mi agradecimiento a las personas que han contribuido a la realización de mi tesis doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer de forma sincera y auténtica a Mage, mi directora, por haberme acogido en su laboratorio y por darme la oportunidad de poder realizar mi tesis doctoral. Ha sido un camino de descubrimiento y crecimiento en el cual ambos nos hemos apoyado y construido un vínculo que sobrepasa el hecho de ser colegas en el día a día.

A mi codirectora de tesis, Marta, por haber confiado en mí, por transmitirme su entusiasmo por la investigación y, sobre todo, por el cariño y la dedicación con la cual nos ha acompañado a Mage y a mí.

A Pauli por su apoyo y amistad en cada día durante nuestra travesía en la investigación, mi coequiper para afrontar esta experiencia.

A Caro, con su chispa e ingenio, siempre brindando su optimismo para que no baje los brazos.

A mi Mamá, Lucía, Macario y Marcia, que han sabido acompañarme en mis éxitos y fracasos, siempre alentándome a superarme cuando no creo poder hacerlo.

A mis amigos de siempre, en especial a Ana, Diego, Eliana, Marina, Anabella y Janet que han sabido valorar cada experiencia que les he compartido.

A Roberto, Pombe, Juli, Andi, Vicki, Mili, Mile, Ani y José, mis compañeros de facultad y con quienes creamos una amistad que perdura en los años.

A mis colegas de la Cátedra de Bacteriología, Clara, Rodrigo, Ceci L., Ceci W., Stefi, Sole, Norma, Rosita y Cristina por acompañarme en distintos momentos de mi formación docente, y a José y Graciela por su ayuda y buena onda.

A los excelentes profesionales de Hospital Padilla, en especial a Juan Manuel, Silvana, Mariel, Sandra, Nancy, Karina, Mónica, y el personal de enfermería de la UCI 1, sin ustedes esta tesis no tendría el valor que tiene.

A Rosa, Manu, Juande, Marta, Claudia y todos los integrantes del Equipo de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal por abrirme sus puertas y enseñarme tan generosamente en mis estancias.

A Nico que me conoció al final de la travesía y supo comprender y acompañarme en mi último tramo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
UNIDADES DE MEDIDA	4
RESUMEN – PALABRAS CLAVES	5
ABSTRACT – KEYWORDS	8
1. INTRODUCCION	11
1.1. Orden <i>Enterobacterales</i>	12
1.2. Resistencia a los antimicrobianos	14
1.3. Antibióticos β-lactámicos	17
1.3.1. Clasificación	18
1.3.2. Mecanismo de acción	20
1.3.3. Mecanismos de resistencia	21
1.3.3.1. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	25
1.4. Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC)	26
1.4.1. Clasificación de carbapenemasas	27
1.4.1.1. Carbapenemasas de clase A	29
1.4.1.2. Carbapenemasas de clase B	29
1.4.1.3. Carbapenemasas de clase D	30
1.5. Epidemiología y diseminación	32
1.5.1. Estructura poblacional de <i>K. pneumoniae</i> productora de carbapenemasas	36
1.5.2. Plásmidos asociados a la diseminación de carbapenemasas en <i>Enterobacterales</i>	38
1.5.3 Factores de virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
1.5.3.1. Hipermucoviscosidad	40
1.5.3.2. Aerobactina	40
1.5.3.3. Serogrupo capsular	41
1.5.3.4. Otros factores de virulencia	41
1.6. Epidemiología Nacional y Regional de EPC	41

1.6.1. Carbapenemasas KPC	45
1.6.2. Carbapenemasas VIM	45
1.6.3. Carbapenemasas NDM	46
1.7. Colonización por Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y otros bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes (BRC)	46
1.7.1. Métodos de detección y confirmación de portadores de EPC y BRC	48
1.7.2. Prevención y Control	51
2. HIPÓTESIS	52
3. OBJETIVOS	54
3.1. OBJETIVO GENERAL	55
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1. Evaluación clínico/epidemiológica de <i>Enterobacterales</i> resistentes a carbapenemes en pacientes admitidos en un hospital público	58
4.1.1. Descripción del ámbito de estudio: características del hospital seleccionado y diseño	58
4.1.2. Población objetivo: pacientes infectados por ERC, incidencia y relación con la mortalidad	58
4.1.3. Definición de variables clínico/epidemiológicas	59
4.1.4. Identificación bacteriana y estudio del perfil de sensibilidad/resistencia de ERC	65
4.1.4.1. Confirmación de la identificación bacteriana	65
4.1.4.2. Estudio del perfil de sensibilidad/resistencia de enterobacterias	68
4.1.5. Caracterización fenotípica y molecular de mecanismos de resistencia	69
4.1.5.1. Detección fenotípica de carbapenemasas	69
4.1.5.1.1. Test de doble difusión con discos	69
4.1.5.1.2. Test de Hodge Modificado	71

4.1.6. Caracterización molecular de β-lactamasas	72
4.1.6.1. Detección de genes <i>bla</i> de carbapenemasas	72
4.1.6.2. Detección de genes <i>bla</i> de BLEE	74
4.1.7. Transferencia horizontal de genes	74
4.1.7.1. Conjugación en medio sólido	74
4.1.7.2. Tipificación de plásmidos por PCR	76
4.2. Caracterización molecular de los aislamientos recuperados y descripción de la epidemiología regional	79
4.2.1. Estructura poblacional	79
4.2.1.1. Electroforesis de campo pulsado (Pulsed-field Gel Electrophoresis-PFGE)	79
4.2.1.2. Tipificación Multilocus de secuencias (Multi locus sequence typing -MLST)	80
4.2.2. Factores de Virulencia	82
4.2.2.1. Fenotipo Hiper mucoviscoso	82
4.2.2.2. Detección de genes asociados a la virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	83
4.3. Implementación de un programa de vigilancia activa para BRC	86
4.3.1. Sitio de implementación: descripción edilicia y funcional	86
4.3.2. Periodo de desarrollo del estudio	88
4.3.3. Diseño del estudio	89
4.3.4. Consideraciones éticas	90
4.3.5. Estudio de portación (Colonización)	90
4.3.6. Implementación del programa de prevención y control de infecciones	91
5. RESULTADOS	93
5.1. Descripción del contexto clínico y epidemiológico de las principales Enterobacterias asociadas a carbapenemasas en un hospital regional de referencia	
5.1.1. Población objetivo: pacientes infectados por ERC, incidencia y relación con la mortalidad	94

5.1.2. Detección de β -lactamasas y caracterización de plásmidos involucrados en la diseminación y persistencia de la resistencia a los carbapenemes	100
5.1.2.1. Detección y secuenciación de genes codificadores de enzimas	100
5.1.2.2. Ensayos de conjugación y caracterización molecular de plásmidos	100
5.2. Caracterización molecular de aislamientos bacterianos recuperados, tipos clonales y su implicancia epidemiológica.	104
5.2.1. Estructura poblacional	104
5.2.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	104
5.2.1.2. <i>Klebsiella aerogenes</i>	106
5.2.2. Factores de virulencia vinculados con aislamientos clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a carbapenemes	109
5.3. Desarrollo de un protocolo integral de vigilancia activa para bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes en una Unidad de Cuidados Intensivos	112
6. DISCUSIÓN	120
7. CONCLUSIONES	133
8. PROYECCIONES	137
9. BIBLIOGRAFÍA	139

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulánico
AMP	Ampicilina
AMS	Ampicilina/Sulbactam
AP	Ácido borónico
BGN	Bacilos Gram negativos
BGNCR	Bacilos Gram negativos carbapenem resistentes
BHI	Cerebro Corazón Infusión
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
BRC	Bacilos resistentes a carbapenemes
CAZ	Ceftazidima
CC	Complejo clonal
CDC	Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)
CIP	Ciprofloxacina
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COL	Colistina
CTX	Cefotaxima
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético (Ethylene diamine tetra acetic acid)
EPC	<i>Enterobacteriales</i> productores de carbapenemasas
ERC	<i>Enterobacteriales</i> resistentes a carbapenemes
ERT	Ertapenem
EVR	<i>Enterococcus</i> Resistente a la Vancomicina
FEP	Cefepime
FOS	Fosfomicina

GEN	Gentamicina
KPC	Carbapenemasa producida por <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase)
IMI	Imipenem
IMP	Resistencia en <i>Pseudomonas</i> a Imipenem (Imipenem-resistant <i>Pseudomonas</i>)
INEI-ANLIS	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud.
K	Antígeno capsular
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Espectrometría de masas acoplada a tiempo de vuelo de proteínas (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight)
MBL	Metalo-β-lactamasa
MDR	Multirresistente (Multidrug-resistant)
MER	Meropenem
MH	Müller Hilton
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing)
NDM	Metalo-β-lactamasa detectada en New Delhi (New Delhi metallo-β-lactamase)
NT	No tipificable
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA	Oxacilinas
PCI	Programa de control de infecciones
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PDR	Panresistentes (pandrug-resistant)
PFGE	Electroforesis en campo pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis)
PROAs	Programas para la Optimización del Uso de Antimicrobianos
PTAZ	Piperacilina/Tazobactam
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
SEIMC	Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica
ST	Secuenciotipo

TAE	Solución amortiguadora tris-acetato-EDTA
TBE	Solución amortiguadora tris-borato-EDTA
TGI	Tracto gastrointestinal
TIG	Tigeciclina
TMS	Trimetoprima sulfametoxazol
TSA	Tripteína de soya Agar
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIM	Metalo-β-lactamasa codificada por integrón en Verona (Verona integron encode metallo-β-lactamase)
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
XDR	Extremadamente resistentes (Extensively drug-resistant)

UNIDADES DE MEDIDA

°C	Grados centígrados
h	Horas
pb	Pares de bases
mg	Miligramos
mm	Milímetros
µg	Microgramos
ng	Nanogramos
min	Minutos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
pmol	Picomolar
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos

RESUMEN

Resumen

La resistencia a carbapenemes mediada por carbapenemasas se ha incrementado notablemente en los últimos años. La implicancia clínica de esta resistencia es relevante debido a las escasas alternativas terapéuticas y la elevada morbi-mortalidad asociada. Los avances en metodologías de mayor complejidad permiten abordar de manera integral el problema de la multiresistencia. En *Enterobacteriales* intrahospitalarios, este fenómeno dinámico hace necesario el estudio permanente de los patrones y mecanismos de resistencia en los aislamientos circulantes. En la presente tesis doctoral, de investigación aplicada con transferencia al medio, los objetivos fueron: 1-Recopilar información clínico-epidemiológica de pacientes con infecciones por *Enterobacteriales* resistentes a carbapenemes (ERC) y estudiar su perfil de sensibilidad/resistencia; 2-Detectar las principales carbapenemasas y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE); 3-Characterizar los plásmidos involucrados en su diseminación y persistencia, y 4-Establecer la relación clonal y transferir los resultados obtenidos a las autoridades nosocomiales para implementar un programa piloto de vigilancia activa. Inicialmente se incluyeron 69 pacientes con infecciones por ERC identificados en el Hospital Ángel Cruz Padilla. Del análisis realizado a partir de la ficha clínico-epidemiológica recuperada de las historias clínicas, resultaron el 50,7% de los pacientes inmunodeprimidos y la causa más frecuente de internación, politraumatismo. El promedio de días de internación previos al aislamiento de ERC fue 30 y la incidencia global de infecciones por ERC fue 11,6 por cada 1000 pacientes. La mortalidad global fue 28% y la mortalidad atribuible 21,7%. Las **cepas de Enterobacteriales se recuperaron** de pacientes internados en diferentes salas del hospital, siendo más frecuentes la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y el Quirófano. La cepas fueron resistentes a β -lactámicos (100%), quinolonas fluoradas (80%), gentamicina (81%) y Trimetoprima-Sulfametoxazol (90%). Los niveles de resistencia a los antibióticos de reserva resultaron: Amicacina (9%) y colistina (12%), permitiendo su utilización en esquemas terapéuticos combinados. Las especies predominantes fueron *K. pneumoniae* (65%) y *K. aerogenes* (20%). Se realizó la **caracterización molecular de β -lactamasas** y la totalidad de las ERC recuperadas resultaron productoras de serin-carbapenemasas tipo KPC-2. En *K. pneumoniae*, el 45,7% resulto positivo para los genes *bla*_{CTX-M-2}, el 28,6% para *bla*_{SHV-2} y el 14,5% para ambos genes (*bla*_{CTX-M-2}/*bla*_{SHV-2}). Los

transconjugantes obtenidos resultaron KPC-2 positivos , asociados a relaxasas de plásmidos tipo IncL/M. Los estudios de **relación clonal** en **ERC**, detectaron 17/35 pulsotipos diferentes de *K. pneumoniae* y un cluster predominante (12/14) en *K. aerogenes*. El **tipo clonal dominante** entre los aislamientos de *K. pneumoniae* fue el ST25 y en 4 aislamientos se obtuvieron variaciones alélicas no documentadas. Se identificaron 16/35 perfiles de virulencia en las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas. Se **implemento un sistema piloto de vigilancia activa** que permitió reducir la colonización de ERC del 16,92% al 9,67% ($\chi^2=0,014$). En este estudio se determinó que la diseminación de *K. pneumoniae* se realizó a expensas de diferentes clones productores de KPC-2 y BLEE tipo SHV-2 y CTX-M-15 distribuidos en varios ST; no se observó persistencia de un clon particular y ningún aislamiento presentó factores de virulencia asociados a hipervirulencia. Podemos concluir, que en este trabajo de tesis doctoral se logró confirmar la elevada diseminación de ERC e identificar a KPC-2 como la principal carbapenemasa en el Hospital Ángel C. Padilla. *K. pneumoniae* ST25 hipermucoviscoso fue caracterizado como el clon predominante. Se demostró que el cultivo de vigilancia activa en unidades de alto riesgo reduce significativamente la diseminación nosocomial de bacterias multirresistentes.

Palabras clave: enterobacterias, carbapenemasas, diseminación nosocomial.

ABSTRACT

ABSTRACT

Carbapenem resistance mediated by carbapenemases has increased in recent years. The clinical implication of this resistance is relevant due to the scarce therapeutic alternatives and the associated high morbidity and mortality. Advances in methodologies of more complexity allow to address in a comprehensive way the problem of multiresistance. In nosocomial *Enterobacterales*, this dynamic phenomenon makes it necessary to permanently study the patterns and mechanisms of resistance in circulating isolates. In this doctoral thesis, of applied research with transfer to community, the objectives were: 1-Collect clinical-epidemiological information from patients with *Enterobacterales* infections resistant to carbapenems (ERC) and study their sensitivity/resistance profile; 2-Detect the main carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases (ESBL); 3-Characterize the plasmids involved in their dissemination and persistence; and 4- Establish the clonal relationship and transfer the results obtained to nosocomial authorities to develop a pilot program of active surveillance. Initially, 69 patients with ERC infections identified at Ángel Cruz Padilla Hospital were included. With the analysis of the clinical histories and clinical-epidemiological record, it was observed that 50.7% of the patients were immunosuppressed and the most frequent causes of hospitalization were polytraumatism. The average number of days of hospitalization prior to ERC isolation was 30 days and the overall incidence of ERC infections was 11.6 per 1000 patients. Overall mortality was 28% and attributable mortality 21.7%. **Enterobacterial strains** were recovered from patients hospitalized in different hospital wards, with the Intensive Care Unit (ICU) and the Surgery being more frequent. The strains were resistant to β -lactamics (100%), fluoroquinolones (80%), gentamicin (81%) and Trimethoprim-Sulfamethoxazole (90%). The levels of resistance to reserve antibiotics were: Amicacin (9%) and colistin (12%), allowing their use in combined therapeutic schemes. The predominant species were *K. pneumoniae* (65%) and *K. aerogenes* (20%). The **molecular characterization of β -lactamases** was also carried out and all recovered ERC were producers of KPC-2 serin-carbapenemases type. In *K. pneumoniae*, 45.7% were carriers of *bla*_{CTX-M-2}, 28.6% of *bla*_{SHV-2} and 14.5% of the *bla*_{CTX-M-2}/*bla*_{SHV-2} genes. The transconjugants obtained were KPC positive and associated with relaxases of plasmids type IncL/M. The **clonal relationship of ERC** detected 17/35 differentiable pulsetypes of *K. pneumoniae*, while in *K. aerogenes* one predominant cluster was also detected (12/14). The **clonal type dominant** in *K. pneumoniae* was ST25 and 4 isolates with undocumented allelic variations. 16/35 virulence profiles were identified, among carbapenem-resistant strains of *K. pneumoniae*. **A pilot active surveillance system** was implemented to reduce colonization from 16.92% to 9.67% ($\chi^2=0.014$). In this project, it was determined that the dissemination of *K. pneumoniae* was carried out at the expense of different clones producing KPC-2 and BLEE-type SHV-2 and CTX-M-15, distributed in several ST; the persistence of a specific clone was not observed, and non strain presented virulence factors associated with hypervirulence. In conclusion, the results of this doctoral thesis allowed us to conclude that it was possible to confirm the high dissemination of ERC and identify KPC-2 as the main carbapenemase in the Ángel

C. Padilla Hospital. Hipermucoviscous *K. pneumoniae* ST25 was characterized as the predominant clone. Active surveillance based in culture in high-risk units showed a significantly reduce of nosocomial spread of multidrug-resistant bacteria.

Keywords: enterobacteria, carbapenemases, clonal dissemination.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria constituyen un importante problema de salud pública, teniendo mayor relevancia aquellas infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Fernando *et al.*, 2017).

Se estima que el número de pacientes con infecciones por bacilos Gram negativos multirresistentes y el número de fallecidos asciende con el tiempo, mientras las alternativas terapéuticas se limitan cada vez más. El costo que conlleva la resistencia antibiótica es muy elevado ya que las infecciones causadas por este tipo de microorganismos tienen peores resultados clínicos, prolongan la estancia hospitalaria y la tasa de mortalidad es elevada con respecto a la misma infección producida por un microorganismo sensible (Friedman *et al.*, 2016).

En este estudio se aborda la detección y estudio de *Enterobacterales* con resistencia a los carbapenemes como consecuencia de la producción de carbapenemasas. La caracterización microbiológica, en conjunto con la identificación de las enzimas y su localización en elementos móviles es de suma importancia para establecer el cuadro epidemiológico local. Adicionalmente, es importante conocer su asociación con los denominados clones de alto riesgo, ligados a epidemias en instituciones sanitarias y responsables de su diseminación mundial. Finalmente, desarrollamos un protocolo de vigilancia epidemiológica integral para abordar la problemática y contribuir al control de la diseminación y persistencia de bacilos Gram negativos multirresistentes intrahospitalarios.

1.1. Orden *Enterobacterales*

El orden *Enterobacterales* (dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*) es un amplio y diverso grupo de bacterias Gram negativas recientemente clasificado, que incluye 7 familias: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* y *Budviciaceae*. Estas bacterias presentan una morfología característica de bacilo o cocobacilo y un tamaño intermedio (0,3-1µm x 0,6-6µm), son inmóviles o móviles por flagelos peritricos y no esporuladas. Son anaerobias facultativas, catalasa positivas, oxidasa negativas, reductoras de nitrato a nitrito y fermentadoras de glucosa y otros azúcares (Adeolu *et al.*, 2016).

Los géneros que integran este orden presentan entre sus principales factores de virulencia al lipopolisacárido (LPS) de la pared celular, la producción de fimbrias o pili que permiten la unión a otras bacterias y a las células del hospedador, y la formación por parte de algunas especies de una cápsula polisacáridica o proteica con función protectora (Adeolu *et al.*, 2016).

El hábitat principal de los miembros del orden *Enterobacterales* en los seres humanos y otros mamíferos es el tracto gastrointestinal (TGI), por lo cual reciben el nombre común de enterobacterias (del griego “enteron”, intestino). De manera

circunstancial se pueden encontrar colonizando otras partes del cuerpo como la zona perineal, la vagina, la cavidad oral o la región nasofaríngea. Algunas bacterias de este orden se encuentran también ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose encontrar asociadas a diversos nichos ecológicos, tanto terrestres como acuáticos, e incluso con otros organismos vivos como plantas o insectos (Adeolu *et al.*, 2016).

Las enterobacterias representan menos del 0,1% ($<10^8$ ufc/gr) de la microbiota intestinal, pero mantienen una relación mutualista y llevan a cabo importantes funciones metabólicas (Davin-Regli *et al.*, 2015). Algunas especies como *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella granulomatis* y algunas cepas de *Escherichia coli*, son patógenos entéricos primarios y se asocian siempre a enfermedad. Sin embargo, especies como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* y *Morganella morganii*, entre otras, son comensales y solamente causan infección como patógenos oportunistas extraintestinales (Guitérrez Saborida *et al.*, 2014).

E. coli es el coliforme aerobio facultativo más frecuente del TGI (10^5 - 10^8 células por gramo de contenido intestinal). La mayor parte de los aislamientos de *E. coli* que se encuentran colonizando el TGI mantienen una relación simbiótica con las células intestinales y persisten en el hospedador durante meses o años, causando infecciones únicamente como patógenos oportunistas (Kaper *et al.*, 2004). Sin embargo, el genoma de *E. coli* es altamente flexible, por lo que la adquisición de genes asociados con factores de virulencia o resistencia por parte de cepas comensales puede dar lugar a patógenos altamente adaptados causantes tanto de infecciones intestinales como extraintestinales graves. Aunque es el principal agente responsable de infecciones comunitarias (primera causa de infecciones del tracto urinario y bacteriemia), también es el principal causante de infecciones nosocomiales (Guitérrez Saborida *et al.*, 2014).

K. pneumoniae tiene como hábitat principal las superficies mucosas de humanos y otros mamíferos, principalmente el TGI y la mucosa nasofaríngea. A diferencia de *E. coli*, esta enterobacteria también tiene como hábitat natural nichos ambientales como el agua, el suelo o las plantas. Es inmóvil y posee una cápsula de polisacáridos que le confiere virulencia y aspecto mucoso (Holt *et al.*, 2015). Aunque puede producir infecciones de origen comunitario, *K. pneumoniae* es considerado un importante patógeno nosocomial y se asocia con frecuencia a brotes hospitalarios y elevadas tasas de mortalidad (Patel *et al.*, 2008). Las manos del personal sanitario son consideradas la principal vía de transmisión de esta enterobacteria, especialmente de determinados clones epidémicos (clones de alto riesgo) que están bien adaptados al medio sanitario y que han adquirido factores de virulencia o genes de resistencia a antibióticos mediante elementos genéticos móviles. Las enfermedades subyacentes y las alteraciones del sistema inmunológico de los pacientes, así como la terapia antimicrobiana previa (especialmente con fluoroquinolonas y penicilinas antipseudomónicas) y las largas estancias hospitalarias, son considerados importantes factores de riesgo para la

colonización y posterior infección por cepas epidémicas de *K. pneumoniae* (Josephine *et al.*, 2004).

Klebsiella aerogenes, anteriormente denominado *Enterobacter aerogenes*, al igual que *K. pneumoniae* es considerado un patógeno nosocomial asociado a la resistencia a antimicrobianos y a una gran diversidad de infecciones graves, incluyendo neumonía y bacteriemia (Davin-Regli *et al.*, 2015). Las infecciones ocasionadas por este microorganismo pueden tener un origen endógeno (al integrar parte de la microbiota intestinal) o ser adquiridas después de que un paciente fue admitido en una institución sanitaria (transmisión horizontal, colonización del personal, contaminación de dispositivos, etc). El principal factor de riesgo atribuido a infecciones por este microorganismo es la administración de antibióticos de amplio espectro por periodos prolongados, aunque también se han asociado con inmunosupresión, ventilación mecánica y estancias hospitalarias prolongadas (Davin-Regli *et al.*, 2015).

Otras enterobacterias, como *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.* o *K. oxytoca*, también pueden producir infección en el ámbito hospitalario, aunque con menor frecuencia (Pérez Guerrero *et al.*, 2014).

1.2. Resistencia a antimicrobianos

Actualmente, la resistencia a antimicrobianos (RAM) constituye una de las principales amenazas para la Salud Pública mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo de instituciones sanitarias. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus o parásitos) son capaces de resistir al efecto inhibitorio o letal de los antimicrobianos tras la exposición a los mismos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos o antiparasitarios) (OMS 2020).

Por su elevada prevalencia y las repercusiones clínicas y epidemiológicas a la cual se encuentran asociadas, la resistencia bacteriana a antibióticos es actualmente la más relevante. La resistencia a antibióticos se ha definido como la capacidad de una bacteria de sobrevivir a concentraciones de antibiótico que normalmente inhiben o matan a otras bacterias sensibles pertenecientes a la misma especie (Alós 2015).

La resistencia se puede producir de manera natural (resistencia intrínseca) o por adquisición de mecanismos de resistencia (resistencia adquirida). La resistencia natural (intrínseca) se produce cuando el microorganismo posee mecanismos propios codificados a nivel cromosómico, que lo hacen insensible a la acción de un determinado antimicrobiano. La resistencia adquirida a antibióticos es un fenómeno natural que surge como consecuencia de modificaciones en el cromosoma bacteriano (mutaciones puntuales ocurridas al azar y posterior selección de cepas resistentes tras la exposición a los fármacos) o por transferencia genética (por recombinación de ADN exógeno con el

cromosoma bacteriano o por transferencia horizontal de genes mediante elementos genéticos móviles) (Munita y Arias 2016).

Los mecanismos de resistencia transmisibles mediante elementos genéticos móviles son los más relevantes desde el punto de vista clínico y epidemiológico, ya que pueden albergar más de un mecanismo de resistencia y tienen la capacidad de transmitirse a otras bacterias (incluso entre bacterias pertenecientes a distintos géneros y especies), contribuyendo a la emergencia y propagación de microorganismos multirresistentes. Una bacteria es considerada multirresistente (MDR) cuando presenta resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos de uso clínico habitual, y dicha resistencia tiene relevancia clínica (se encuentran asociados a dificultades en el tratamiento de las infecciones producidas por dichas bacterias) y epidemiológica (es causante de brotes epidémicos, de la transmisión de diferentes mecanismos de resistencia, etc.) (López-Pueyo *et al.*, 2011). En los últimos años se han definido otros términos como “extremadamente resistentes” (XDR), cuando los microorganismos son únicamente sensibles a una o dos categorías de antimicrobianos, y panresistentes (PDR), cuando los aislamientos bacterianos son resistentes a todas las clases de antibióticos disponibles (Magiorakos *et al.*, 2012) (Figura 1).

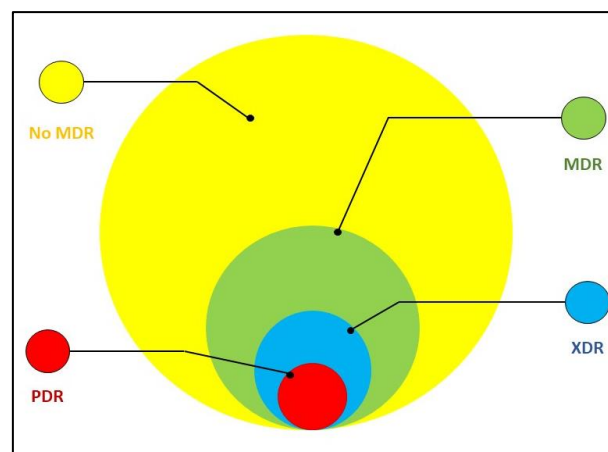


Figura 1. Diagrama demostrando la proporción de aislamientos pertenecientes a cada categoría de multirresistencia.

Según considera la Organización Mundial de la Salud, existen múltiples factores que promueven la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos (OMS, 2016). En el área de salud humana, la presión selectiva surge principalmente de la combinación del uso abusivo e incorrecto de los antibióticos, el inapropiado control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación inadecuada de los alimentos. Las diversas políticas sobre el uso de antimicrobianos en los distintos países, las infraestructuras sanitarias deficientes en los países subdesarrollados, el comercio y la globalización, han contribuido también a la rápida difusión de la resistencia en todo el mundo (Ruppé *et al.*, 2015). Asimismo, el inadecuado y excesivo consumo de

antimicrobianos en salud animal y la diseminación de los residuos de estos medicamentos a través del suelo, los cultivos y el agua, contribuyen a la emergencia y circulación de estos microorganismos resistentes (FAO, 2021) (Figura 2).



Figura 2. Factores que promueven la aparición y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos (Adaptado de OMS, 2016).

Las infecciones por microorganismos multirresistentes se han asociado a un aumento de la mortalidad debido a las limitadas opciones terapéuticas existentes y, en muchas ocasiones, a la adquisición conjunta de genes asociados a mayor virulencia. Se estima que en el año 2050 la resistencia a antimicrobianos podrá causar hasta 10 millones de muertes al año en todo el mundo. Estas infecciones representan un desafío no solo para la ciencia y los sistemas sanitarios, sino también una carga económica importante para las instituciones sanitarias (OMS, 2016).

Para combatir la RAM es necesario implementar el concepto “One Health”, es decir, deben implementarse estrategias y medidas de manera coordinada entre la Salud Pública, la sanidad animal y el medio ambiente (McEwen y Collignon 2018). El plan de

acción mundial elaborado por la Asamblea Mundial de la Salud en 2015 establece cinco objetivos estratégicos para combatir la resistencia: 1) mejorar la concienciación y la comprensión de la población con respecto a la RAM; 2) reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación; 3) reducir la incidencia de las infecciones; 4) utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos en salud humana y animal; y 5) aumentar la inversión en nuevos medicamentos, métodos de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones, así como llevar a cabo una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países (OMS, 2016).

Actualmente, el incremento experimentado a escala global en la frecuencia de aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) constituye una amenaza creciente para la seguridad del paciente y las instituciones sanitarias de todo el mundo. Los principales factores que han contribuido a la exitosa propagación de estas EPC han sido la diseminación de clones considerados exitosos o de alto riesgo, el establecimiento de reservorios en hospitales y otros centros sanitarios, la asociación con otros genes de resistencia que favorecen la co-selección, y la presencia de estos genes en diferentes estructuras genéticas de transferencia horizontal que facilitan su dispersión (Cantón *et al.*, 2012).

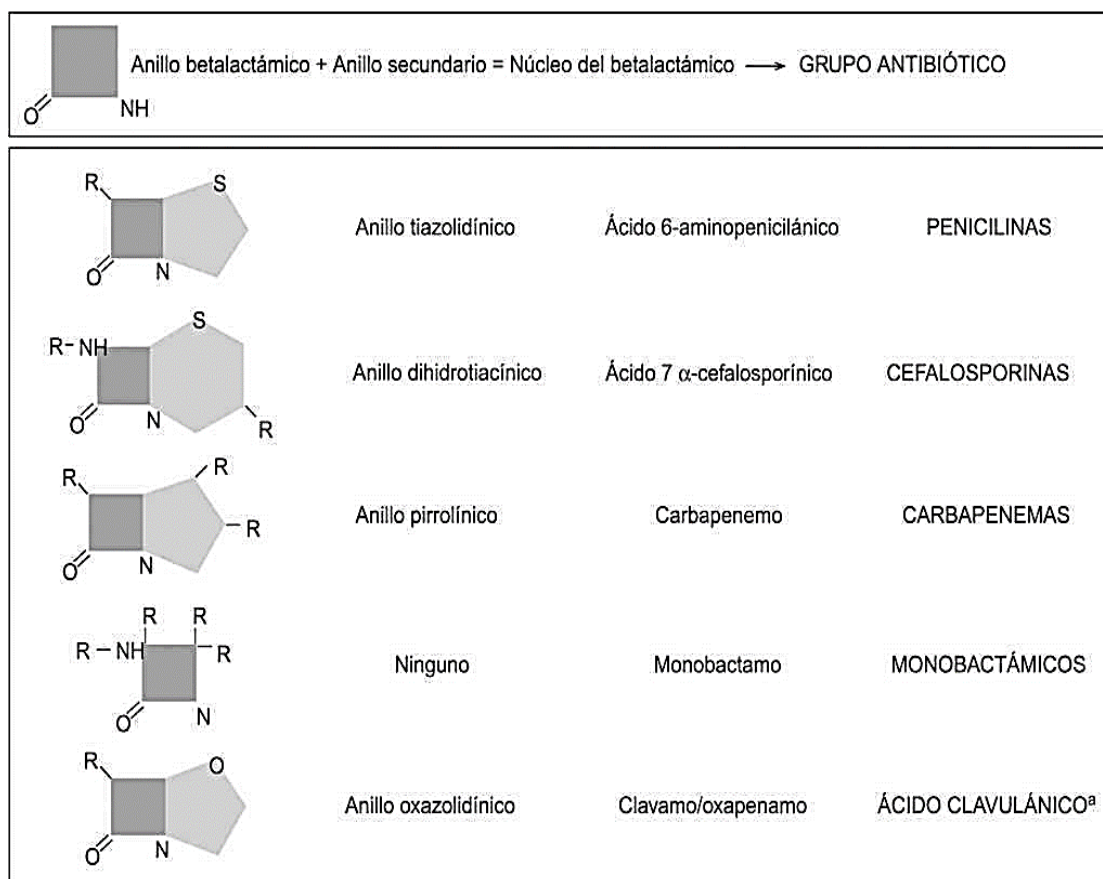
En Argentina, en los últimos años se ha producido un importante aumento en la incidencia de brotes hospitalarios por EPC, con un incremento de las diferentes clases moleculares de carbapenemasas y variaciones en su dispersión geográfica. Simultáneamente, están aumentando los casos extrahospitalarios, elevando el riesgo de diseminación de estas enterobacterias multirresistentes en la comunidad (García-Betancur *et al.*, 2021).

1.3. Antibióticos β -lactámicos

En 1929, Alexander Fleming documentó el hallazgo de una sustancia producida por un hongo ambiental que lisaba las colonias de estafilococos con las que trabajaba, dando inicio a la denominada “Era Antibiótica”. Más de 10 años después de su hallazgo, la FDA (del inglés, “Food and Drug Administration”) aprobó la utilización de los antibióticos β -lactámicos en la práctica clínica para el tratamiento y profilaxis de infecciones causadas por bacterias patógenas humanas y animales, dando inicio al descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas capaces de ser utilizadas para el tratamiento de una gran diversidad de infecciones. Actualmente, los antibióticos β -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias gramnegativas, grampositivas y espiroquetas (Suárez y Gudiol 2009).

1.3.1. Clasificación

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico formado por tres átomos de carbono y uno de nitrógeno. Los miembros de esta gran familia de antibióticos se clasifican en 5 grupos en función del anillo adyacente al β -lactámico y las cadenas laterales complementarias (Castanheira *et al.*, 2021). En la Figura 3 pueden observarse las estructuras funcionales asociadas a cada grupo de β -lactámicos.



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 3. Estructura molecular de los diferentes grupos de β -lactámicos. (Adaptado de Castanheira *et al.*, 2021).

A) **Penicilinas:** fueron el primer grupo de agentes β -lactámicos desarrollado por la industria farmacéutica y utilizados masivamente para el tratamiento de infecciones bacterianas. Se clasifican en penicilinas naturales (bencilpenicilina o penicilina G), semisintéticas (ampicilina y amoxicilina) y penicilinas resistentes a penicilinasas (metecilina, cloxacilina y piperacilina).

B) **Cefalosporinas:** es el grupo más amplio en cuanto a moléculas desarrolladas y comercializadas. Se agrupan en 5 grupos o generaciones cuya evolución se ha

orientado a incrementar el espectro frente a bacterias gramnegativas a expensas de una reducción progresiva de la actividad frente a grampositivos. Las cefalosporinas de tercera generación (C3G) son las más ampliamente utilizadas para tratar infecciones nosocomiales causadas por enterobacterias, y entre ellas destacan la cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima. Las cefalosporinas de 4ª generación (C4G), como la cefepima, presentan una mayor actividad frente a las bacterias productoras de AmpC cromosómica. Recientemente, las cefalosporinas de 5ª generación (C5G) o cefalosporinas avanzadas (Ceftobiprole y Ceftarolina) se caracterizan por no verse afectadas, al contrario que las anteriores, por la resistencia a la meticilina, pero su uso se encuentra limitado a cocos Gram positivos y algunas patologías.

C) **Carbapenemes:** este grupo incluye los antibióticos β -lactámicos con mayor espectro bacteriano, actividad y resistencia a las β -lactamasas. Derivan del antibiótico tienamicina, un producto natural obtenido a partir de la bacteria grampositiva *Streptomyces cattleya*. Se dividen en dos grupos en función de su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. El primer grupo incluye tres carbapenemes (imipenem, meropenem y doripenem) con marcada actividad antipseudomonas, que son empleados en el tratamiento de infecciones graves polimicrobianas o causadas por bacilos Gram negativos resistentes a cefalosporinas y aminoglucósidos. El meropenem es el más indicado para tratar infecciones graves mixtas adquiridas en el hospital o relacionadas con la asistencia sanitaria debido a su forma de administración y performance farmacodinámica. El segundo grupo de carbapenemes incluye antibióticos con actividad muy limitada frente a *P. aeruginosa*; el único miembro de este grupo actualmente comercializado es el ertapenem, y está indicado en el tratamiento empírico de infecciones intraabdominales, de partes blandas y neumonías aspirativas producidas por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), incluyendo infecciones graves de origen comunitario.

D) **Monobactams:** son antibióticos β -lactámicos con un único anillo en su estructura. El aztreonam es el único disponible para uso clínico y presenta actividad solamente frente a bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Es resistente a la hibrólisis por metalo- β -lactamasas (MBL), pero es inactivado por BLEE, carbapenemasas de clase A, C y D, y su actividad disminuye por la hiperproducción de β -lactamasas de tipo AmpC.

E) **Inhibidores de β -lactamasas:** son moléculas cuya estructura química permite la unión irreversible a las enzimas β -lactamasas. Los inhibidores de β -lactamasas más empleados en la práctica clínica son los denominados inhibidores suicidas: el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Se administran en combinación con otros antimicrobianos, principalmente penicilinas, para la recuperación de su actividad antibacteriana (amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam). En su perfil de inhibición no se incluyen las carbapenemasas. Recientemente se ha comercializado el avibactam asociado con ceftazidima o aztreonam, relebactam con imipenem y el vaborbactam con meropenem. Son inhibidores de β -lactamasas con estructura no β -lactámica. Su perfil inhibitorio incluye las

carbapenemasas de clase A, y en el caso del avibactam, también a algunas de las carbapenemasas de clase D, entre ellas OXA-48. Ninguno tiene actividad inhibitoria sobre las MBL (carbapenemasas de clase B) (Bush *et al.*, 2015; Mansour *et al.*, 2021).

1.3.2. Mecanismo de acción

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto a través de dos mecanismos, la inhibición de la síntesis de la pared celular y la inducción de autólisis bacteriana. La pared bacteriana de las bacterias Gram negativas es una estructura compleja que consta de una fina capa interna de peptidoglicano (PG) y de una membrana externa formada por lípidos y proteínas. El PG es un polímero formado por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetil-glucosamina (NAG) unidas mediante enlaces covalentes β -1,4. En la última etapa del ensamblaje, las enzimas transpeptidasas, también conocidas como PBP (del inglés “penicillin binding protein”, proteína ligada a penicilina), se unen a las subunidades peptídicas precursoras del péptido glicano y eliminan sus aminoácidos terminales D-alanil-D-alanina, dando lugar a tetrapéptidos que se fijan al ácido murámico y se unen entre sí formando una malla. En la Figura 4 puede observarse la formación de las unidades poliméricas y la conformación de la membrana externa (Hernandez M *et al.*, 2018).

Transpeptidación y formación del PG

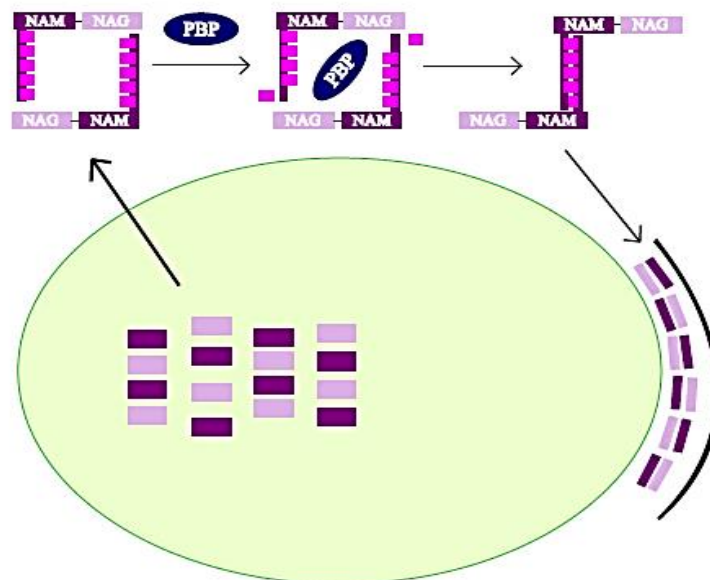


Figura 4. Esquema de formación de péptidoglican y conformación de membrana externa.

El anillo β -lactámico guarda similitud estructural con el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas, por lo que es capaz de unirse a ellas covalentemente e impedir la transpeptidación (Josephine *et al.*, 2004). El segundo mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos es la activación de una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Kitano *et al.*, 1979). En la Figura 5 se observa la interacción del compuesto β -lactámico con las PBP con la consecuente inhibición de la síntesis de pared celular y activación de las autolisinas endógenas.

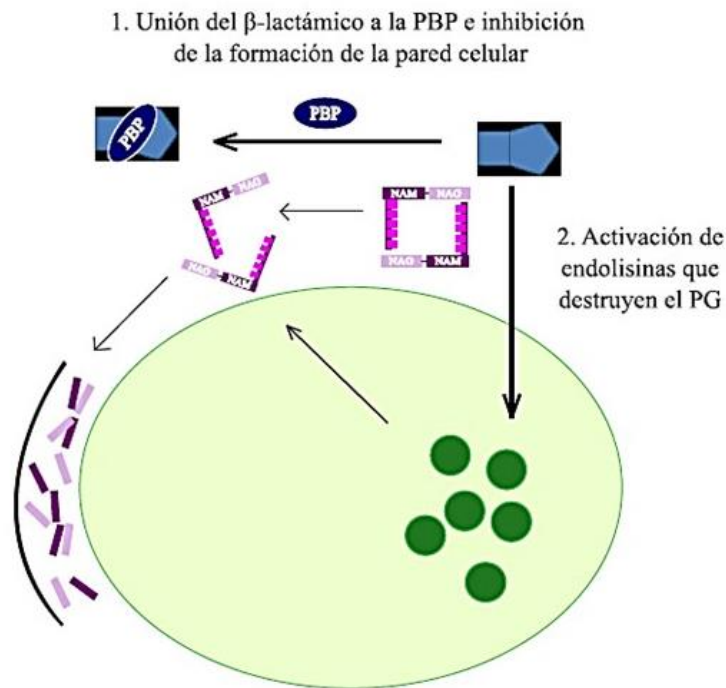


Figura 5. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.

1.3.3. Mecanismos de resistencia

Las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos, entre ellos: a) la alteración de la permeabilidad de la membrana externa (pérdida o modificación de porinas), b) la producción de bombas de expulsión o eflujo, c) la modificación de la diana (PBP), y el más importante, d) la producción de enzimas que modifican o destruyen los antimicrobianos, entre los que se encuentran las β -lactamasas (Wike *et al.*, 2005).

Las enzimas β -lactamasas guardan homología con las PBP de la pared celular y actúan hidrolizando el anillo β -lactámico e impidiendo su unión a dichas proteínas. Es el mecanismo más frecuente y eficaz de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias Gram negativas, y pueden encontrarse en conjunto con otros mecanismos. Los genes que codifican estas enzimas (*bla*) se pueden localizar en el cromosoma bacteriano

o en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones, y su producción puede ser constitutiva o inducible. Las β -lactamasas pueden ser transferibles si su producción está mediada por plásmidos, y en tal caso, suelen ser sensibles a los inhibidores de β -lactamasas. Las β -lactamasas de origen cromosómico, como las AmpC, son normalmente inducibles por la exposición a β -lactámicos, especialmente cefalosporinas, y no suelen ser sustrato de los inhibidores (Bush *et al.*, 2020).

Han sido registradas más de 1500 β -lactamasas (www.lahey.org/studies.webt.htm) y clasificadas en función de su estructura molecular (Ambler 1980) y sus características enzimáticas (Bush *et al.*, 2010). La clasificación de Ambler divide a las β -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) de acuerdo a los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de la proteína (Ambler 1980). Las enzimas de las clases A, C y D son serin- β -lactamasas que contienen un residuo de serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo- β -lactamasas que utilizan Zn^{+2} como cofactor y se inhiben por agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetracético), pero no por el ácido clavulánico o el tazobactam. La clasificación funcional propuesta por Bush-Jacoby establece distintos grupos en función de la afinidad de la enzima por el sustrato y su sensibilidad a los inhibidores de β -lactamasas (Bush *et al.*, 2010). En la Tabla 1 se detallan las principales β -lactamasas acorde a ambas clasificaciones. El uso indiscriminado e incorrecto de los antimicrobianos durante las últimas décadas ha favorecido la evolución de las β -lactamasas hacia una nueva generación de enzimas: BLEE, β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas y carbapenemasas (Wike *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación general de β -lactamasas.

Bush-Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Sustrato preferente	Actividad del Ácido clavulánico o Tazobactam	Inhibición por EDTA	Características	β -lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
1	C	Cefalosporinas	-	NO	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamicinas	AmpC, P99, AACT-1, CYM-2, FOX-1, MYR-1	Cromosómica Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i>
1e	C	Cefalosporinas	-	NO	Hidrólisis elevada de ceftazidima y de otros oximiino- β -lactámicos	GC1, CMY-37	Cromosómica Plasmídica	<i>Enterobacterales</i>
2a	A	Penicilinas	SI	NO	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PC1	Cromosómica Plasmídica	<i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas 1ª generación	SI	NO	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Cromosómica Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>H. influenzae</i>
2be	A	Cefalosporinas, monobactam	SI	NO	Hidrólisis elevada de oximiino- β -lactámicos y aztreonam	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1	Cromosómica Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i>
2br	A	Penicilinas	-	NO	Resistentes al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10	Plasmídica	<i>E. coli</i>
2ber	A	Cefalosporinas	-	NO	Hidrólisis elevada de oximiino- β -lactámicos y resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50	Plasmídica	<i>Enterobacterales</i>
2c	A	Carbenicilina	SI	NO	Hidrólisis elevada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3	Cromosómica/ Plasmídica	<i>Moraxella catarrhalis</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i>
2ce	A	Carbenicilina, Cefepime	SI	NO	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima y cefpiroma	RTG-4	Plasmídica	<i>A. baumannii</i>

Tabla 1. Continuación.

Bush-Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Sustrato preferente	Actividad del Ácido clavulánico o Tazobactam	Inhibición por EDTA	Características	β-lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
2d	D	Cloxacilina	Variable	NO	Hidrólisis de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10	Cromosómica/Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i>
2de	D	Cefalosporinas	Variable	NO	Hidrólisis elevada de oxiimino-β-lactámicos, cloxacilina y oxacilina	OXA-11, OXA-15	Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i>
2df	D	Carbapenemes	Variable	NO	Hidrólisis carbapenemes, cloxacilina y oxacilina	OXA-23, OXA-48	Cromosómica/Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>A. baumannii</i>
2c	A	Cefalosporinas	SI	NO	Hidrólisis de cefalosporinas, Inhibición por ácido clavulánico, pero no aztreonam	CepA	Cromosómica/Plasmídica	<i>Bacteroides spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Carbapenemes	Variable	NO	Hidrólisis elevada de carbapenemes, oxiimino-β-lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME	Cromosómica/Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i>
3a	B (B1 y B3)	Carbapenemes	NO	SI	Hidrólisis de amplio espectro, incluidos carbapenemes, pero no los monobactames	IMP-1, VIM-1, NDM, L1, FEZ-1	Cromosómica/Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3b	B (B2)	Carbapenemes	NO	SI	Hidrólisis de carbapenemes	CphA, Sfh-1	Cromosómica/Plasmídica	<i>Aeromonas spp.</i>

1.3.3.1. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a las clases A y D de Ambler (grupos funcionales de Bush 2be y 2de, respectivamente). Las familias mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Existen otras BLEE como SFO, TLA, GES, IBC y BEL, pero se encuentran escasamente documentadas en aislamientos clínicos. Todas las BLEE son capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas y el aztreonam, pero no las cefamicinas ni los carbapenemes. Además, son inhibidas el ácido clavulánico y el sulbactam (Castanheira *et al.*, 2021, Bush *et al.*, 2020).

Actualmente, las enzimas tipo CTX-M son las BLEE más prevalentes a nivel mundial, tanto en el ambiente comunitario como en el nosocomial (Bush *et al.*, 2020), y se han asociado principalmente a cepas de *E. coli* causantes de infecciones comunitarias y a clones hospitalarios de *K. pneumoniae* (Bush *et al.*, 2020). Estas enzimas se caracterizan por tener mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima (Bonnet *et al.*, 2004). Actualmente hay descritas más de 200 variantes y en función de su secuencia de aminoácidos se dividen en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Bush *et al.*, 2020). Todas ellas derivan de una β -lactamasa cromosómica procedente de distintas especies del género *Kluyvera* (Rodríguez *et al.*, 2004). La movilización de los genes *bla*_{CTX-M} desde el cromosoma de *Kluyvera spp.* a diferentes plásmidos y la asociación con elementos genéticos en su transferencia a otras especies de enterobacterias ha sido bien caracterizada (Rodríguez *et al.*, 2010). A menudo, estos elementos genéticos integran genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas (Bush *et al.*, 2020).

La diseminación de CTX-M mediante plásmidos epidémicos altamente transmisibles ha sido uno de los factores responsables de la compleja epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE y de su rápida expansión mundial, primero en el ámbito hospitalario y después en la comunidad (Bush *et al.*, 2020; Woerther *et al.*, 2013). La difusión de estas enzimas a través de clones exitosos de *E. coli*, como el clon de alto riesgo ST131, asociados a la producción de variantes como CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-27, ha sido también determinante para la propagación y el establecimiento de las BLEE en todo el mundo (Castanheira *et al.*, 2021, Bush *et al.*, 2020).

Según el programa global de vigilancia SMART, los datos recopilados entre 2015-2019 demostraron que la incidencia de aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE recuperados de pacientes hospitalizados está aumentando simultáneamente en muchas regiones del mundo, principalmente en Latinoamérica, Estados Unidos y Canadá (Karlowsky *et al.*, 2022). Además, en voluntarios sanos, la prevalencia de colonización por BLEE en América oscila entre el 5% y el 12% (Figura 6) y este porcentaje continuará aumentando, especialmente en pacientes sin antecedentes de internación (Woerther *et al.*, 2013).

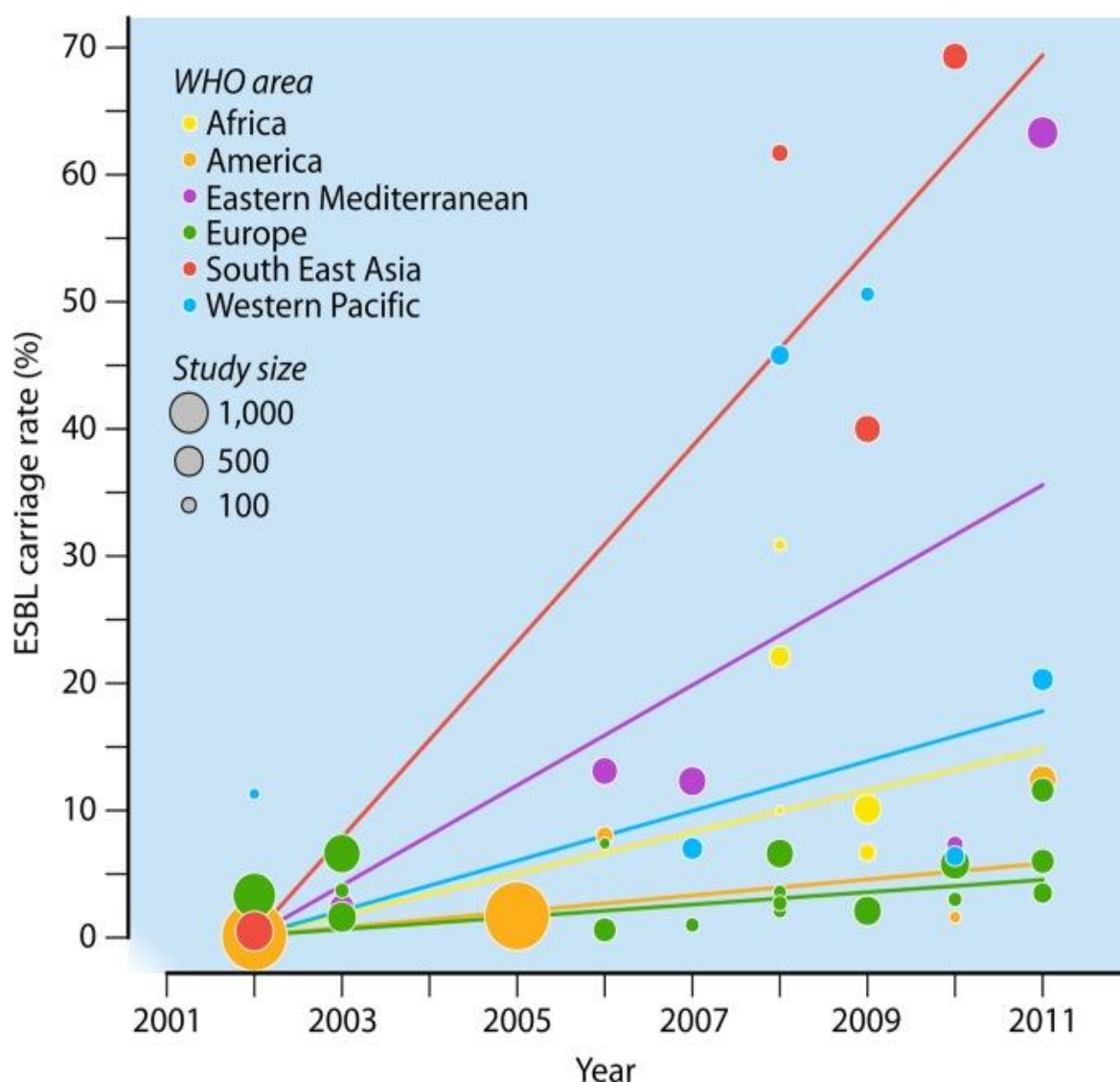


Figura 6. Incremento en la colonización por *Enterobacteriales* productores de BLEE en voluntarios sanos (Woerther *et al.*, 2013).

1.4. Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC)

En los últimos años, la diseminación de las EPC ha generado la necesidad de reforzar las medidas de control sobre estos microorganismos. Se ha descrito que la producción de BLEE o AmpC asociada a la pérdida de porinas disminuye la sensibilidad a los carbapenemes (Aurilio *et al.*, 2022, Matínez-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, el mecanismo más frecuente de resistencia a carbapenemes en enterobacterias es la producción de carbapenemasas (Aurilio *et al.*, 2022).

1.4.1. Clasificación de carbapenemasas

Según la clasificación molecular de Ambler, las carbapenemasas se agrupan en las clases moleculares A (penicilinasas), B (metalo- β -lactamasas o MBL) y D (oxacilinasas), que se corresponden con los grupos funcionales propuestos por Bush-Jacoby 2f, 3 y 2df, respectivamente. En la Tabla 2 se detallan las carbapenemasas más relevantes, los microorganismos en los que se encuentran habitualmente y sus principales características (Navarro *et al.*, 2011).

TABLA 2. Clasificación general de las carbapenemasas.

Bush-Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Actividad del Ácido clavulánico o Tazobactam	Inhibición por EDTA	Características	β -lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
2f	A	Variable	NO	Hidrólisis de carbapenemes, oximiino β -lactámicos y monobactam	Sme, IMI, NmCA	Cromosómica	<i>S. marcescens</i> <i>E. cloacae</i>
		SI	NO	Hidrólisis de carbapenemes, oximiino β -lactámicos y monobactam	KPC	Plasmídica	<i>Enterobacterales</i>
		SI	NO	Hidrólisis de carbapenemes, oximiino β -lactámicos y monobactam	GES	Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i>
3	B	NO	SI	Hidrólisis de carbapenemes, oximiino β -lactámicos y sensibilidad monobactam	L1	Cromosómica	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		NO	SI		CcrA		<i>Bacteroides fragilis</i>
		NO	SI		Cpha		<i>Aeromonas hydrophila</i>
		NO	SI		BcII		<i>Bacillus cereus</i>
		NO	SI		IMP, SPM, SIM, VIM, NDM	Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>P. aeruginosa</i>
2df	D	Variable	NO	Hidrólisis de carbapenemes y actividad variable frente a oximiino β -lactámicos y sensibilidad monobactam	Familia OXA-48	Cromosómica/Plasmídica	<i>Enterobacterales</i> <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>

1.4.1.1. Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de clase A, conocidas como serincarbapenemasas, tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de β -lactámicos entre los que se incluyen las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenemes y el aztreonam. Son parcialmente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam (Bush *et al.*, 2020).

La primera carbapenemasa de clase A, SME-1 ("*Serratia marcescens* enzyme"), fue descrita en 1982 en una cepa de *S. marcescens* (Yang *et al.*, 1990). En 1984 se aisló una enzima inhibidora de imipenem (IMI-1, "Imipenem-hydrolysing β -lactamase") a partir de una cepa de *E. cloacae* aislada de un paciente hospitalizado en EE.UU. (Rasmussen *et al.*, 1996). Posteriormente, en 1993, se aisló un tercer tipo de carbapenemasa denominada NmCA ("not-metallo-enzyme-carbapenemase A") a partir de una cepa de *E. cloacae* (Naas *et al.*, 1994). Todas estas carbapenemasas han sido localizadas en el cromosoma bacteriano, aunque algunas variantes de IMI, como IMI-2, se han identificado en plásmidos (Queenan *et al.*, 2007). Las enzimas GES ("Guiana extended spectrum") fueron identificadas inicialmente como BLEE, pero con el tiempo se describió que hidrolizaban parcialmente imipenem (Vourli *et al.*, 2004); además los genes que codifican las enzimas GES son de localización plasmídica.

Dentro del grupo de serincarbapenemasas, las que tienen mayor transcendencia clínica e importancia epidemiológica son las denominadas KPC ("*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase") (Pitout *et al.*, 2015). Estas enzimas son inhibidas por el ácido borónico, compuesto que se emplea para su reconocimiento mediante métodos fenotípicos. Las KPC se distinguen del resto de carbapenemasas de clase A en que se encuentran siempre en plásmidos transferibles y en que su espectro de hidrólisis incluye el anillo aminotiazol de las cefalosporinas (Queenan *et al.*, 2007). La primera enzima KPC (KPC-1) se identificó en un aislamiento de *K. pneumoniae* de Estados Unidos en 1996 (Yigit *et al.*, 2001). Desde entonces, se han detectado en distintas especies hasta 24 variantes, siendo KPC-2 y KPC-3 las más frecuentes (Stoesser *et al.*, 2015).

1.4.1.2. Carbapenemasas de clase B

Las metalo- β -lactamasas (MBL) son el grupo de carbapenemasas más diverso y diseminado a nivel mundial. Poseen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos β -lactámicos, aunque presentan muy baja afinidad por los monobactams como el aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, el sulbactam o el tazobactam. A diferencia de las clases A y D, el sitio activo de las MBL contiene un ion (o iones) de Zn^{+2} , que es esencial para la hidrólisis del anillo β -lactámico. Esta característica estructural permite que sean inhibidas por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA o el ácido dipicolínico (Bush *et al.*, 2010). El EDTA y los derivados del ácido

dipicolínico se utilizan en el reconocimiento fenotípico de esta familia de carbapenemasas.

Las enzimas MBL más importantes desde el punto de vista epidemiológico, por su prevalencia y por su elevada capacidad de diseminación, son las de tipo IMP, VIM y NDM. La enzima IMP-1 (“Imipenem-resistant *Pseudomonas*”) fue la primera carbapenemasa transferible descrita en bacilos gramnegativos, en concreto en *P. aeruginosa* (Watanabe *et al.*, 1991). Estas enzimas se empezaron a detectar posteriormente asociadas a otras especies del género *Pseudomonas* y en enterobacterias como *S. marcescens* y *K. pneumoniae* (Osano *et al.*, 1994; Senda *et al.*, 1996). Al día de hoy se han descrito más de 50 variantes en todo el mundo, siendo especialmente prevalentes en Japón, China, Corea del Sur y el Sudeste asiático (Bush *et al.*, 2020).

Las enzimas VIM (“Verona integron encode metallo- β -lactamase”) se describieron por primera vez en Verona (Italia) en 1997 en una cepa de *P. aeruginosa* (Lauretti *et al.*, 1999). Poco después se comunicó en Francia una segunda variante, VIM-2, localizada en un plásmido transferible de *P. aeruginosa* (Poirel *et al.*, 2000). Desde entonces, se han descrito más de 40 variantes asociadas tanto a *P. aeruginosa* como a enterobacterias, siendo VIM-1 la más difundida a nivel mundial (Hansen *et al.*, 2021).

Las enzimas NDM (“New Delhi metallo- β -lactamase”) son las carbapenemasas con amplia distribución geográfica más recientemente identificadas. La primera descripción (NDM-1) se realizó en 2009, asociada a dos aislamientos (*K. pneumoniae* y *E. coli*) procedentes de un paciente sueco que había recibido asistencia sanitaria en un hospital de Nueva Delhi (India) (Yong *et al.*, 2009). Desde 2010 se han descrito 16 variantes y todas ellas muestran un perfil hidrolítico similar al de otras MBL. En Argentina se han descrito aislamientos de NDM-1 asociados a especies del género *Acinetobacter* (Rodgers *et al.*, 2020; Adams *et al.*, 2020) y *P. stuartii* (Pasterán *et al.*, 2014) principalmente. En el año 2020, en un estudio realizado en un hospital de tercer nivel especializado en pacientes con COVID-19 de Tucumán (datos no publicados), fueron detectadas cepas de *K. pneumoniae* productoras de NDM y coproductoras de NDM y OXA-48-like.

1.4.1.3. Carbapenemasas de clase D

La clase D comprende más de 200 enzimas OXA (“Oxacillin-hydrolysing carbapenemase”), cuya producción se ha asociado mayoritariamente con la especie *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*). Se denominan oxacilinasas por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la penicilina. No hidrolizan, o difícilmente hidrolizan, a las cefalosporinas de espectro extendido (excepto la variante OXA-163) y en general tienen una actividad carbapenemasa muy débil. No son inhibidas por el ácido clavulánico, el ácido borónico, ni por agentes quelantes como el EDTA, aunque sí por el NaCl (Yoon *et*

al., 2021). Una característica única de este grupo de enzimas que las diferencia de las serin-carbapenemasas de las clases A y C es que presentan una elevada resistencia a temocilina (Hartl *et al.*, 2013).

Dentro de la clase D, solo unas pocas variantes poseen actividad carbapenemasa, siendo una de las principales representantes en este grupo la enzima OXA-48. Desde su primera descripción en Turquía en 2001 en una cepa de *K. pneumoniae* (Poirel *et al.*, 2004), la diseminación de OXA-48 ha sido mundial, y principalmente asociada a enterobacterias productoras de BLEE, en concreto la CTX-M-15. En 2011 se describió en India una variante de esta enzima, OXA-181, con un perfil hidrolítico idéntico a OXA-48 (Potron *et al.*, 2011). Los niveles de resistencia a carbapenemes de estas enzimas son muy bajos, siendo sólo detectables en muchos casos cuando van asociados a otros mecanismos de resistencia como BLEE o pérdida de permeabilidad de la membrana (Nordmann *et al.*, 2012).

La familia de enzimas OXA-48, conocida como OXA-48-like, integra un gran número de variantes de la β -lactamasa OXA-48. Como puede observarse en la Tabla 3 (Dabos *et al.*, 2020), algunas de estas variantes mantienen su actividad carbapenemasa mientras que otras sólo poseen actividad BLEE. Todas estas enzimas comparten la capacidad de diseminarse por medio de plásmidos y otros elementos genéticos móviles

TABLA 3. Variantes de enzimas pertenecientes a la familia OXA-48, actividad hidrolítica frente a Imipenem y fenotipo esperable.

Variante OXA-48	K_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) Imipenem	Fenotipo
OXA-181	550	Carbapenemasa
OXA-16	420	
OXA-20	420	
OXA-48	369	
OXA-436	300	
OXA-232	38	
OXA-244	20	
OXA-517	14	
OXA-438	4.4	
OXA-519	2.1	
OXA-405	0.2	No carbapenemasa
OXA-247	0.2	
OXA-163	0.06	

1.5. Epidemiología y diseminación

La aparición y diseminación de las EPC está aumentando en todo el mundo y se ha convertido en un problema global de Salud Pública.

Una década atrás, el acrónimo ESKAPE fue usado para describir el nombre de seis bacterias patógenas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) con disminución en la respuesta al tratamiento con los antimicrobianos y aumento en las tasas de resistencia a los mismos (Rice 2008; De Oliveira *et al.*, 2020). Desde esta descripción inicial, la diseminación global de la resistencia a los carbapenemes por producción de diferentes carbapenemasas entre los bacilos Gram negativos incrementó dramáticamente generando la necesidad de intensificar las medidas asociadas al control e investigación de estos microorganismos, en especial las EPC.

En 2017, la OMS emitió un comunicado identificando las bacterias resistentes a antibióticos más importantes que requieren el desarrollo de nuevos tratamientos y metodologías diagnósticas (OMS 2017). Estas bacterias fueron agrupadas en tres categorías de prioridad (Crítica, Alta y Moderada) considerando múltiples factores como la gravedad de las infecciones a las cuales se encuentran asociadas, la diversidad de tratamientos disponibles y la capacidad de diseminarse a nuevos entornos, entre otros (Tabla 4).

A su vez, a nivel mundial, las características clínicas de los organismos resistentes a carbapenemes varían con las condiciones locales y las regiones geográficas. En la Figura 7 puede observarse la distribución geográfica de las diferentes carbapenemasas y el estado epidemiológico atribuido a las mismas hasta 2017 (Logan *et al.*, 2017). Desde entonces, las MBL, principalmente del tipo NDM, han incrementado su frecuencia de detección en países donde no se registraban o lo hacían esporádicamente, entre ellos Argentina.

Tabla 4. Listado de patógenos y prioridad de desarrollo e investigación atribuida (Adaptado de OMS 2017).

Prioridad 1: CRÍTICA
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenemes <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenemes <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a cefalosporinas de tercera generación y/o carbapenemes
Prioridad 2: ALTA
<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente, vancomicina intermedio y resistente <i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina <i>Campylobacter</i> resistente a quinolonas fluoradas <i>Salmonella spp.</i> resistente a quinolonas fluoradas <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a quinolonas fluoradas y cefalosporinas de tercera generación.
Prioridad 3: MEDIA
<i>Streptococcus pneumoniae</i> no susceptible a penicilina <i>Haemophilus influenzae</i> resistente a ampicilina <i>Shigella spp.</i> resistente a quinolonas fluoradas

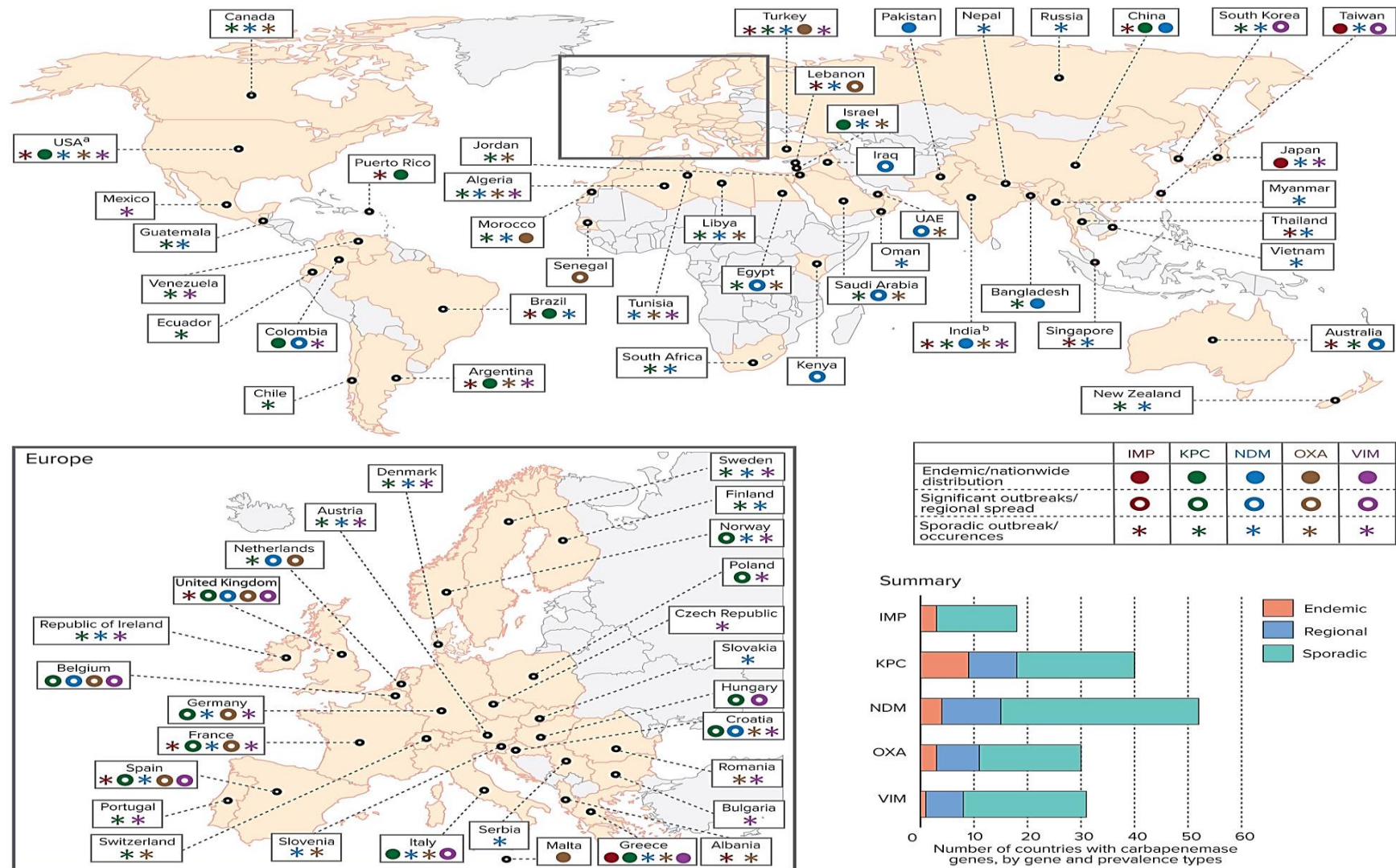


Figura 7. Distribución global de *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas por país y por región (Tomado de Logan *et al.*, 2017). Descripción de las principales carbapenemasas en diferentes países y estatus epidemiológico atribuido en los mismos.

Los aislamientos productores de carbapenemasas, principalmente los productores de KPC, están diseminados mundialmente y asociados con elevadas tasas de morbi-mortalidad (Bialek-Davenet *et al.*, 2014). *K. pneumoniae* es la especie a la cual se le atribuye la diseminación global de las carbapenemasas pertenecientes a este grupo, principalmente las variantes alélicas KPC-2 y KPC-3. El éxito de este fenómeno se encuentra asociado a aislamientos pertenecientes a un secuenciotipo (ST) dominante denominado ST258, el cual pertenece a un Complejo Clonal (CC) con distribución mundial, el CC258 (Bowers *et al.*, 2015). Este clon emergió en el año 2010, y rápidamente se convirtió en el ST prevalente. Los miembros del CC258 incluyen microorganismos multidroga resistentes (MDR), con resistencia a todos los β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) (Bowers *et al.*, 2015). Si bien los aislamientos pertenecientes al ST258 se encuentran asociados con elevadas tasas de mortalidad, esta se atribuye mayormente a la escasa eficacia de los tratamientos antimicrobianos disponibles para las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productoras de KPC y la gran diversidad de situaciones clínicas vinculadas a cada paciente, y no específicamente a la virulencia de estas cepas (Pitout *et al.*, 2015). Los aislamientos pertenecientes al CC258 suelen ser susceptibles al efecto bactericida del suero y la fagocitosis, carecen de factores de virulencia como la aerobactina, de genes de antígenos capsulares K1, K2 o K5, o del gen regulador del fenotipo hipermuviscoso *rmpA* (Chen *et al.*, 2014).

En los últimos años, han emergido nuevos aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas con sus respectivos clones hipervirulentos que han adquirido incluso la categoría de resistencia extrema (Krapp *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2015). Inicialmente, los aislamientos de *K. pneumoniae* considerados hipervirulentos no eran productores de carbapenemasas. Es interesante destacar que el Multilocus Sequence Typing (MLST) ha revelado que la mayoría de los aislamientos hipervirulentos cuyo antígeno capsular es K1 pertenecen al mismo complejo clonal, el CC23 (Liao *et al.*, 2014; Brisse *et al.*, 2009). Por otra parte, los aislamientos cuyo serotipo es K2 pertenecen a ST no relacionados, como el CC65 (incluye al ST65 y ST375), ST25, ST86 y ST380 (Lin *et al.*, 2014; Decrée *et al.*, 2011). El CC23 productor de carbapenemasas, principalmente KPC, se encuentra ampliamente diseminado en la región Asia-Pacífico, principalmente en China, Laos y Vietnam, mientras que en otras regiones representa menos del 2% de los aislamientos (Wyres *et al.*, 2020). Por otra parte, los ST considerados hipervirulentos productores de carbapenemasas diferentes del CC23 se encuentran diseminados por el mundo.

En Argentina, han sido descritos aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 pertenecientes al ST25 recuperados de muestras de pacientes hospitalizados en Buenos Aires (Cejas *et al.*, 2019) y Tucumán (Vargas *et al.*, 2019).

1.5.1. Estructura poblacional de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas

La combinación del análisis por PFGE y MLST permite agrupar a los aislamientos caracterizados, en pulsotipos y secuenciotipos respectivamente (Gona *et al.*, 2020). La información obtenida por estas metodologías, en conjunto con la detección molecular de mecanismos de resistencia y factores de virulencia permiten aproximar la caracterización de los clones y poder definir si los mismos son o no de alto riesgo al incorporar la información epidemiológica (Mathers *et al.*, 2015).

Acorde a lo recopilado por Mathers, para que un aislamiento de *K. pneumoniae* pueda ser considerado como un clon de alto riesgo debe cumplir con una serie de características:

- **Distribución global:** Algunos secuenciotipos incluidos dentro de un complejo clonal tienen una distribución más amplia que otros, por lo que estos pueden ser considerados cosmopolitas; mientras que otros se encuentran restringidos a zonas ocasionando brotes o aislamientos esporádicos. Por ejemplo, entre los miembros del CC258, el ST258 presenta una distribución global con regiones de mayor circulación como Estados Unidos, Israel, Grecia y Argentina, y otras zonas de circulación menos prevalente como Colombia (Nordmann *et al.*, 2009). Dentro del mismo complejo clonal, el ST11 ha sido considerado endémico en China y algunos países del Sudeste Asiático, pero con reportes esporádicos en Latinoamérica (con excepción de Brasil). Por último, el ST340 está emergiendo en algunos países desplazando otros secuenciotipos como el ST11 en Brasil y al ST258 en Grecia (Munoz-Price *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2014).
- **Asociación con mecanismos de resistencia:** los clones de alto riesgo pertenecientes a la especie *K. pneumoniae* suelen asociarse con resistencia a los carbapenemes por producción de carbapenemasas, siendo la resistencia a los otros antimicrobianos un conjunto de mecanismos acompañantes. Esto se debe a la capacidad del plásmido que contiene los genes *bla* de incorporar otros genes de resistencia o virulencia (Lee *et al.*, 2014, Vila *et al.*, 2013).
- **Capacidad de colonización y persistencia en pacientes:** los clones de alto riesgo suelen poseer factores de virulencia que facilitan la colonización asintomática de los pacientes. En el caso de los *Enterobacterales*, el tiempo de permanencia tras la colonización rectal varía entre las diferentes especies, siendo el tiempo

promedio entre 6 y 12 meses para *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente (Endimiani *et al.*, 2009).

- **Transmisión exitosa entre pacientes:** que una bacteria sea capaz de colonizar y persistir en el hospedador no es suficiente para que la misma sea considerada un clon de alto riesgo. Estos clones tienen la capacidad de transmitirse a través de los dispositivos médicos, personal sanitario y superficies por largos periodos de tiempo, por ello las medidas de control de infecciones son clave en el control de la diseminación y persistencia intrahospitalaria (Navon-Venezia *et al.*, 2009).
- **Patogenicidad/Virulencia:** el comportamiento de los clones puede variar entre las especies. Los clones de alto riesgo de *E. coli* suelen ser más virulentos que los que no son incluidos en esta categoría, siendo capaces de producir diferentes tipos de infecciones extraintestinales, manifestar diferentes perfiles metabólicos o desarrollar estructuras complejas como Biofilm. En el caso de aislamientos de *K. pneumoniae*, esta situación está poco esclarecida. Los aislamientos pueden revestir un elevado riesgo para la salud del paciente al adquirir múltiples genes de resistencia a diferentes antimicrobianos eliminando las opciones terapéuticas; como así también adquirir factores de virulencia que incrementen la capacidad de invasión y evasión de la respuesta inmune en conjunto con genes de resistencia a los antimicrobianos (DeLeo *et al.*, 2014).
- **Causar infecciones recurrentes y/o graves:** algunos clones de *K. pneumoniae* (como el CC258) revisten escasa virulencia por si mismos, pero afectan principalmente pacientes con sistemas inmunes comprometidos y presentan a su vez resistencia a casi todos los antimicrobianos útiles para el tratamiento de la infección documentada. Por otra parte, están emergiendo clones (como el CC23 y CC65) que demuestran un mayor fitness metabólico, combinados con mecanismos de resistencia y múltiples factores de virulencia que complican en gran medida el tratamiento de las infecciones (Lavigne *et al.*, 2013).

Considerando las características previamente detalladas, han sido identificados como clones de alto riesgo unos pocos secuenciotipos dentro de cada especie. Estos clones a su vez han sido asociados con diferentes carbapenemasas y son considerados los responsables de la diseminación de diversos mecanismos en múltiples regiones geográficas (Tabla 5) (Mathers *et al.*, 2015).

Tabla 5. Ejemplos de clones de alto riesgo pertenecientes a las especies *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Clon de Alto Riesgo	Distribución geográfica	Mecanismo de resistencia predominante	Extensión de la resistencia
<i>E. coli</i> ST131	Global	CTX-M-15	MDR
<i>K. pneumoniae</i>			
ST258	Global	KPC-2, KPC-3	XDR, PDR
ST11	América del Sur, Sudeste Asiático, Europa	KPC-2, NDM-1, VIM, OXA-48	
ST340	Oeste de Asia, América del Norte, Europa	NDM-1, KPC-2	
ST512	Europa, Oeste de Asia	KPC-3	
ST147	América del Norte, Europa, Asia	KPC-2, NDM-1, OXA-48-like, VIM	

1.5.2. Plásmidos asociados a la diseminación de carbapenemasas en *Enterobacterales*

Todas las carbapenemasas con relevancia clínica y epidemiológica han sido descritas en plásmidos. Los plásmidos son moléculas de Ácido Desoxiribonucleico (ADN) circular de doble hélice, capaces de replicarse de forma autónoma. Por definición, los plásmidos no llevan genes esenciales para el crecimiento y supervivencia de las bacterias, pero complementan a su adaptabilidad y capacidad de resistencia al ambiente y el estrés (Carattoli 2009).

La investigación y caracterización de plásmidos es de suma importancia para el estudio de la biología, adaptación y evolución de las poblaciones bacterianas. Los plásmidos son clasificados de acuerdo a su grupo de incompatibilidad (Inc) y por el grupo de replicón, que se basa en los factores de replicación expresados por el plásmido en las bacterias. Anteriormente, la incompatibilidad se determinaba mediante la introducción de un plásmido perteneciente a un grupo desconocido en un receptor con un plásmido de grupo conocido. Los dos plásmidos se asignan al mismo grupo o replicón si se elimina el plásmido residente. Si este plásmido no es eliminado, los dos plásmidos se asignan a diferentes grupos de incompatibilidad (Rozwandowicz *et al.*, 2020).

Actualmente, la caracterización de los plásmidos se realiza siguiendo un protocolo, el cual se basa en cinco PCR multiplex y tres PCR simples utilizando dieciocho pares de primers dirigidos contra secuencias conservadas de cada grupo de replicación de los plásmidos identificados en *Enterobacterales*. Esta metodología constantemente se actualiza para incorporar la detección de nuevos tipos de plásmidos en la medida que son identificados (Carattoli 2009).

Si bien esta metodología no posee la sensibilidad o eficiencia de otras metodologías como la Secuenciación de Genoma Completo (SGC), es sencilla de realizar, demuestra resultados reproducibles y está al alcance de todos los laboratorios de biología molecular (Villa y Carattoli 2020).

Los plásmidos asociados con la adquisición y diseminación de resistencia a los antimicrobianos, en especial aquellos que median la diseminación de carbapenemasas, lo hacen a través de un fenómeno conocido como conjugación, siendo denominados plásmidos móviles o plásmidos conjugativos (Halary *et al.*, 2010). La maquinaria necesaria se compone de una relaxasa, una proteína clave que reconoce el origen de transferencia (*oriT*) durante la conjugación bacteriana. Además, los plásmidos conjugativos cuentan con los genes necesarios para la expresión de un sistema de secreción tipo IV que facilita el transporte del ADN plasmídico a la bacteria receptora (Halary *et al.*, 2010).

Existen descriptos más de 27 grupos de plásmidos de incompatibilidad asociados con *Enterobacterales* y resistencia a los antimicrobianos. Entre ellos, la resistencia a los carbapenemes por producción de carbapenemasas ha sido descrita entre los de tipo IncF, N, X, A/C, L/M, R, P, H, I, y W, siendo los más prevalente los del grupo IncF (Mathers *et al.*, 2015; Carattoli 2009).

Otra forma de clasificar a los grupos de plásmidos de incompatibilidad es considerando su rango de receptores. Los plásmidos autotransmisibles de rango estrecho son principalmente IncF, IncH, y los tipos IncI, mientras que L/M, IncN, IncP e IncW puede replicarse en un amplio rango receptores (Carattoli 2009).

Si bien las carbapenemasas son frecuentemente asociadas a los plásmidos del grupo IncF, en Argentina se han documentado aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 con plásmidos de incompatibilidad IncL/M (Jure *et al.*, 2019). Adicionalmente, este grupo de incompatibilidad se encuentra asociado a otras carbapenemasas como OXA-48 y metalo- β -lactamasas como variantes NDM (Kopotsa *et al.*, 2019).

1.5.3 Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

Los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes y las cepas virulentas (incluidas las hipervirulentas) eran consideradas como dos linajes evolutivos diferentes. En la década de 1990, emergieron en Asia unas cepas capaces de producir infecciones invasivas y abscesos hepáticos piogénicos, dichas cepas fueron consideradas como cepas hipervirulentas debido al deterioro acelerado que sufrían los pacientes de los cuales eran recuperadas (Cheng *et al.*, 1991).

Por mucho tiempo, el fenotipo multirresistente y el hipervirulento no se encontraban relacionados. Por un lado, las cepas multirresistentes eran mucho menos

virulentas y su mortalidad se asociaba con los esquemas terapéuticos acotados o la falla de los mismos, y por otra parte las cepas hipervirulentas usualmente susceptibles a los antimicrobianos, pero con un pronóstico desalentador debido a la rapidez con la que progresaban los procesos infecciosos. A su vez, cada fenotipo se encontraba vinculado a secuenciotipos diferentes; por ejemplo, las cepas consideradas hipervirulentas se asociaban al ST23, ST25, ST65 y ST86, mientras que las multirresistentes con ST11, ST258 y ST512 (Wyres *et al.*, 2019; Bialek-Davenet *et al.*, 2014).

1.5.3.1. Hipermucoviscosidad

Los aislamientos de *K. pneumoniae* habitualmente producen una cápsula de lipopolisacárido que brinda protección frente a la acción bactericida del suero y la fagocitosis. Sin embargo, algunas cepas son capaces incrementar la producción de polisacárido, generando un fenotipo hipermucoviscoso. Existen múltiples factores que regulan este fenotipo, incluyendo el gen asociado a mucoviscosidad (*magA*), el regulador de fenotipo mucoide A (*rmpA*) y los tres componentes del sistema Rcs (*rcsAB*) (Rastegar *et al.*, 2019).

En el laboratorio, la hipermucoviscosidad se define con el String Test (o prueba del filamento), el cual se presenta como un filamento viscoso ≥ 5 mm al tocar una colonia desarrollada en un medio agarizado (Agar sangre ovino al 5%) con un ansa bacteriológica. Habitualmente, las cepas hipervirulentas son hipermucoviscosas y esta característica ha sido utilizada como un marcador (Hao *et al.*, 2020; Rastegar *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2014). Si bien los aislamientos que demuestran esta característica suelen ser más virulentos, existen aislamientos considerados hipervirulentos que no presentan este fenotipo, como también aislamientos hipermucosos con escasa virulencia (Catalán-Nájera *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2010).

1.5.3.2. Aerobactina

El hierro es un elemento vital limitado para el desarrollo y reproducción de las bacterias. *K. pneumoniae* es capaz de producir cuatro sideróforos (enterobactina, salmochelina, yersiniabactina y aerobactina) para adquirir hierro durante el proceso infeccioso. Si bien la aerobactina es el sideróforo de menor afinidad por el hierro, esta molécula contribuye en gran medida a la virulencia de los aislamientos que la producen (Holden *et al.*, 2015). Los determinantes genéticos de la aerobactina (*iutA*) como de su receptor (*iucABCD*) se encuentran en plásmidos de virulencia. Clínicamente, menos del 10% de los aislamientos recuperados de pacientes producen este sideróforo y fueron aislados principalmente en pacientes que cursan con abscesos hepáticos, endoftalmitis y otras infecciones metastásicas (Lam *et al.*, 2018).

1.5.3.3. Serogrupo capsular

Hasta el momento, han sido identificados 79 serogrupos por métodos serológicos tradicionales, de los cuales el K1, K2, K5, K20, K54 y K57 han sido asociados con aislamientos hipervirulentos (Rastegar *et al.*, 2019; Ku *et al.*, 2017; Holt *et al.*, 2015). Los aislamientos K1 y K2 han demostrado ser significativamente más resistentes a la fagocitosis y virulentos que los otros serogrupos, aunque estos expresen genes de hiperproducción de cápsula como *rmpA* (Yeh *et al.*, 2007). La mayor parte de las infecciones atribuidas a aislamientos hipervirulentos corresponden a los serogrupos K1 y K2, por esto, los aislamientos portadores de estos serogrupos reciben la categoría de ser hipervirulentos (Rastegar *et al.*, 2019).

1.5.3.4. Otros factores de virulencia

Al igual que otros microorganismos, *K. pneumoniae* cuenta con otros factores de virulencia que le permiten incrementar su eficiencia al colonizar e infectar individuos. Entre dichos factores destacan:

- Fimbrias y adhesinas como FmH, MrkD, Kpn. Las fimbrias tipo I como FimH permiten la adhesión a epitelios, principalmente el intestinal, mientras que las fimbrias tipo III promueven la adhesión a dispositivos médicos, superficies y en conjunto con los sideróforos promueven el desarrollo de biofilm (Struve *et al.*, 2009).
- Lipopolisacáridos y componentes de membrana externa codificados por genes como *wabG*, *uge*, *ycfM* (Candan *et al.*, 2015).
- Genes que mejoran la evasión de la respuesta inmune *allS*, *hly*, *cnf-1*. El gen *hly* codifica una hemolisina de gran actividad sobre los glóbulos rojos de oveja y humano, el gen *cnf-1* genera una proteína citotóxica que es capaz de lisar los glóbulos rojos y *allS* se encuentra íntimamente asociado al metabolismo de la alantoína, una molécula presente en el tejido hepático (Candan *et al.*, 2015).

1.6. Epidemiología Nacional y Regional de EPC

En el año 2020, el Servicio Antimicrobianos perteneciente al departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “DR.

CARLOS G. MALBRAN” publicó los resultados de diez años de investigación epidemiológica en Argentina. En el mismo se observa que la resistencia a los carbapenemes entre los miembros del orden *Enterobacterales* es heterogéneo (INEI 2020).

Hasta el año 2010, la circulación de carbapenemasas en el país se debía casi exclusivamente a aislamientos productores de serin-carbapenemasas tipo KPC, más puntualmente, cepas del clon ST258 productoras de KPC-2 (Gómez *et al.*, 2011).

Progresivamente han sido reportados brotes ocasionados por *K. pneumoniae* y otros *Enterobacterales* productores de otras carbapenemasas. Actualmente, en Argentina se considera a KPC-2 como endémica en el país, con reportes de otras carbapenemasas de forma esporádica y asociados a brotes intrahospitalarios o reportes de casos. Las MBL han incrementado su circulación entre otras especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, al igual que las Oxacilinasas, en especial las pertenecientes a la familia OXA-48-like (García-Betancur *et al.*, 2020).

En la Figura 8 puede observarse el porcentaje a aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de KPC por provincia y el promedio obtenido en el año 2016. En la Figura 9 puede observarse el porcentaje de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas por provincia y el promedio obtenido en el año 2020. Al comparar ambas figuras se puede observar que entre los años 2016 y 2020, la frecuencia de aislamiento de estos microorganismos incrementó considerablemente en todas las regiones, tanto en muestras de hemocultivo como en los urocultivos (INEI 2020).

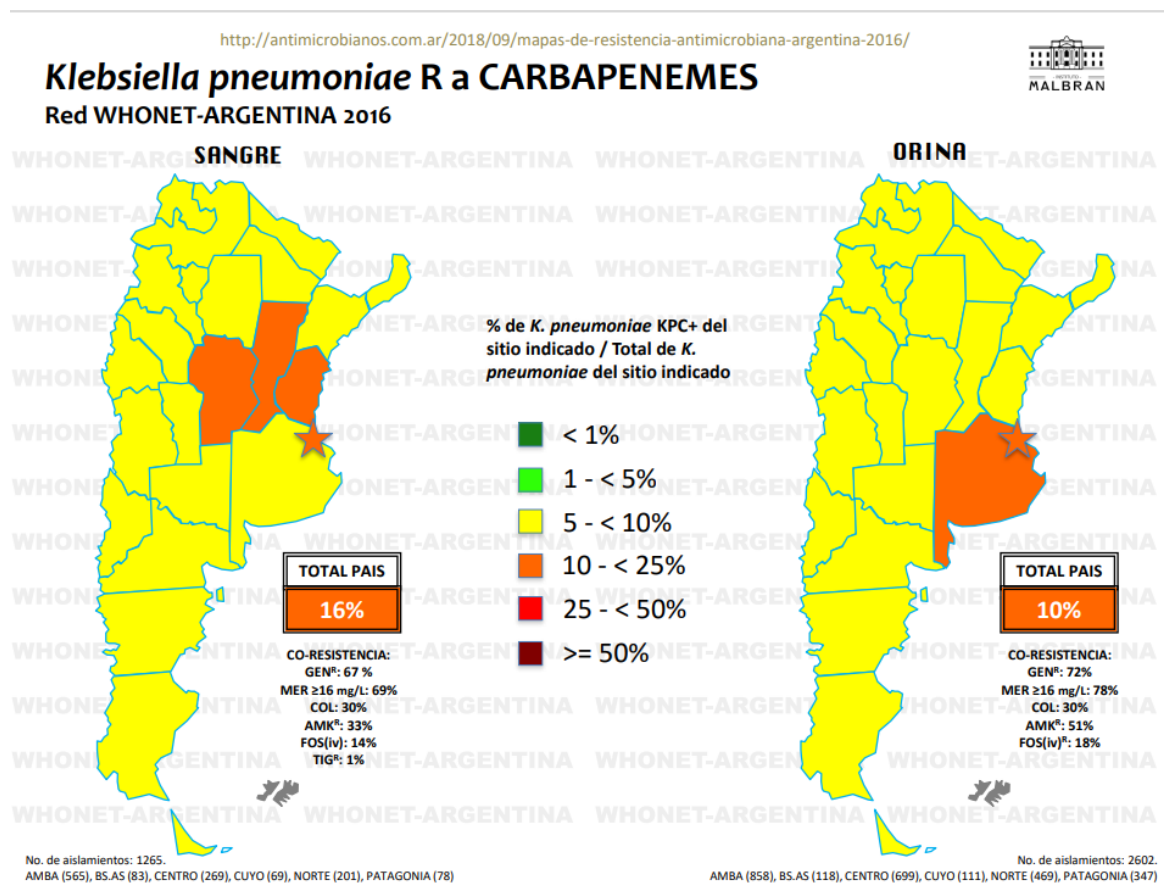


Figura 8. Aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes en Argentina, Año 2016 (Tomado de INEI 2020). Izquierda: Muestras de sangre (Hemocultivo). Derecha: Muestras de orina (Urocultivo).

Klebsiella pneumoniae R a CARBAPENEMES

Red WHONET-ARGENTINA 2020

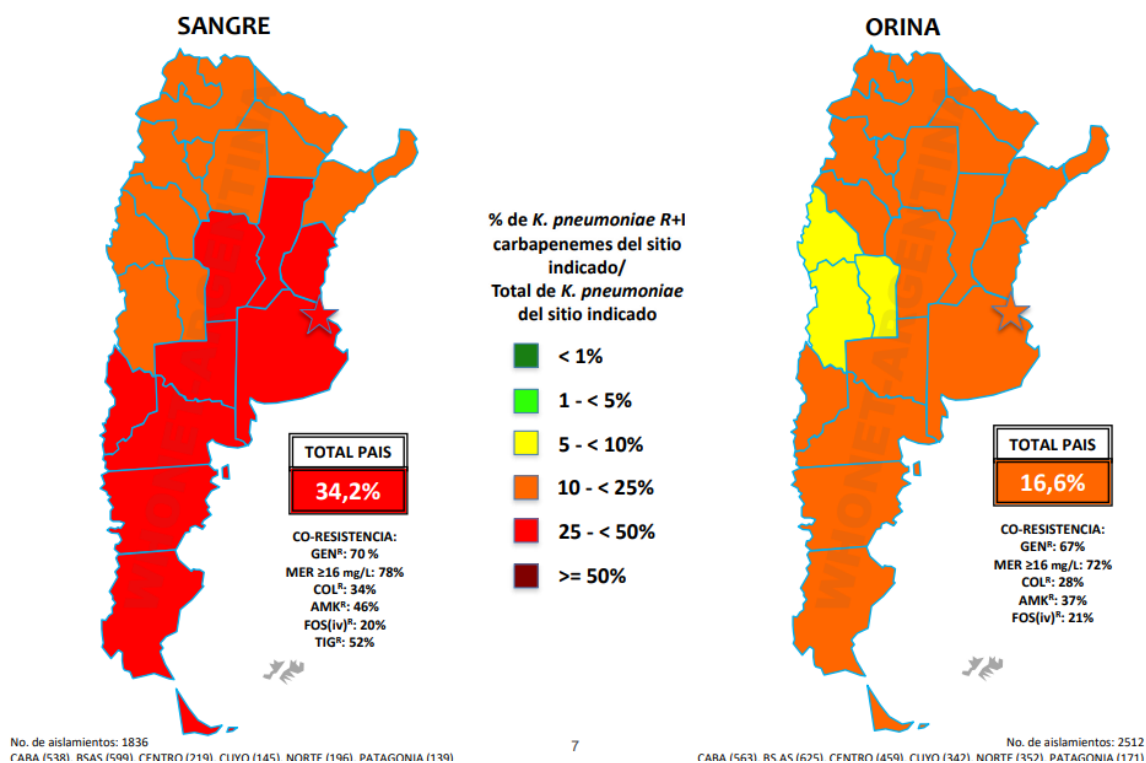


Figura 9. Aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes en Argentina, Año 2020 (Tomado de INEI 2020). Izquierda: Muestras de sangre (Hemocultivo). Derecha: Muestras de orina (Urocultivo).

1.6.1. Carbapenemasas KPC

Las enzimas KPC se describieron por primera vez en 2001 en la costa este de EE.UU., para posteriormente diseminarse por Estados Unidos hasta considerarse endémicas. Pocos años después se empezaron a describir importantes brotes en otros países de Latinoamérica, Asia y Europa, normalmente asociados a pacientes que habían recibido atención sanitaria en Estados Unidos (Hawser *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2007). Actualmente, las enterobacterias productoras de KPC, mayoritariamente *K. pneumoniae*, se consideran un problema endémico en países como EE.UU, Grecia, Italia, Israel, China y Argentina (Tängdén *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2011, Jure *et al.*, 2019; Vargas *et al.*, 2019).

La diseminación mundial de KPC ha estado influenciada por la expansión de determinados clones de *K. pneumoniae* y la capacidad de transferencia interespecie de los genes *bla*_{KPC} a través de plásmidos y transposones. La diseminación, primero en EE.UU y luego a nivel mundial, de las variantes más frecuentes (KPC-2 y KPC-3) se ha relacionado principalmente con la expansión del complejo clonal CC258 (ST258 y ST512) de *K. pneumoniae* (Lam *et al.*, 2018; Muñoz-Price *et al.*, 2015; Nordmann *et al.*, 2009).

En Argentina, la emergencia de enterobacterias productoras de KPC se describió por primera vez en 2006, asociada al clon ST258 de *K. pneumoniae* productor de KPC-2 y al transposón Tn4410a (Gómez *et al.*, 2011).

1.6.2. Carbapenemasas VIM

Aunque la diseminación de las MBL de tipo VIM se ha relacionado mayoritariamente con BGN no fermentadores como *P. aeruginosa*, estas enzimas se encuentran ampliamente diseminadas entre miembros del orden *Enterobacterales* (Hansen 2021). Desde su aparición en 1999, se han descrito casos de enterobacterias productoras de VIM en numerosos países de Europa, Asia y América. La variante VIM-2 es la más extendida en todo el mundo, y es considerada endémica en el sur de Europa y en el sudeste asiático (Zhao *et al.*, 2011). A diferencia de otras carbapenemasas, la diseminación de VIM no se ha asociado a clones concretos de enterobacterias, aunque se aísla principalmente en *K. pneumoniae* y *E. coli* (Albiger *et al.*, 2015; Tängdén *et al.*, 2015).

Todas las variantes de VIM son transportadas como genes cassette insertados en integrones de clase 1 o son movilizadas a través de elementos ISCR (del inglés “Insertion Sequence Common Region”). Estos integrones se caracterizan por transportar genes de resistencia a aminoglucósidos y cotrimoxazol (Gijón *et al.*, 2012).

En Argentina, la primera descripción de una variante VIM fue en 2013 en siete aislamientos de *S. marcescens* productores de VIM-16 (Nastro *et al.*, 2013). Desde

entonces, ha sido registrado solo un brote por *E. cloacae* productor de VIM-2 y VIM-11 y reportados casos esporádicos de enterobacterias productoras de estas enzimas (De Belder *et al.*, 2017).

1.6.3. Carbapenemasas NDM

Las enzimas NDM se describieron por primera vez en el año 2009. El centro nacional de referencia alertó la emergencia de estas enzimas en 2013 en aislamientos de *P. rettgeri* (Pasterán *et al.*, 2014). Desde entonces, fueron reportadas otras especies de enterobacterias productoras de NDM en el país (Martino *et al.*, 2016).

Actualmente, el Subcontinente Indio, Balcanes y Oriente Medio son considerados el principal reservorio de estas enzimas. La variante NDM-1 es la más extendida y su difusión se han descrito en un gran número de enterobacterias. A diferencia de otros tipos de carbapenemasas, la diseminación de NDM-1 se ha asociado a transmisión hospitalaria pero también a patógenos relacionados con la comunidad, como *E. coli* (Berrazeg *et al.*, 2014; Nordmann *et al.*, 2011). En India, también se ha descrito que fuentes ambientales como el suelo, el agua potable y las aguas residuales son reservorio de microorganismos productores de esta enzima (Walsh *et al.*, 2011).

La diseminación de *bla*_{NDM-1} se ha asociado a múltiples y diversos plásmidos transferibles que suelen estar asociados a otras β -lactamasas (AmpC, BLEE o incluso otras carbapenemasas) y a otros genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, nitrofurantoína y sulfonamidas, siendo en muchos casos únicamente sensibles a tigeciclina, colistina o fosfomicina (Castanheira *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2011).

1.7. Colonización por Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y otros bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes (BRC)

La colonización de los pacientes tiene un papel fundamental en la epidemiología de las infecciones producidas por EPC y otros BRC. La proporción de pacientes colonizados con EPC y BRC que posteriormente desarrollan una infección está influenciada por las características clínicas del paciente y por las particularidades propias de microorganismo (Palacios-Baena *et al.*, 2016; Tzouveleakis *et al.*, 2012).

En general, los pacientes procedentes de la comunidad presentan una tasa de colonización por EPC muy baja (Prabaker *et al.*, 2012). La adquisición de EPC se asocia mayoritariamente con el ámbito hospitalario y con otros centros de cuidados sanitarios (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2015; Navarro-San Francisco *et al.*, 2013; Prabaker *et al.*, 2012). Los principales factores que predisponen a la colonización con EPC son las estancias

hospitalarias prolongadas, utilización de antibióticos, colonización con otros patógenos resistentes, los procedimientos invasivos y las comorbilidades previas (Zhang *et al.*, 2021; Paño Pardo *et al.*, 2014). También se considera un factor de riesgo el contacto con regiones endémicas, especialmente el asociado al turismo sanitario (Ruppé *et al.*, 2015). Algunos estudios han determinado que, en un contexto de alta endemidad, el riesgo de colonizarse por una EPC es de aproximadamente el 5% (Swaminathan *et al.*, 2013; Wiener-Well *et al.*, 2010). Se estima que el tiempo medio de colonización con EPC es de 3 meses, aunque se han descrito colonizaciones que superan el año (Akova *et al.*, 2012), aumentando el riesgo de infección y de adquisición de otros microorganismos multirresistentes.

A. baumannii presenta relevancia creciente en infecciones nosocomiales, especialmente entre pacientes admitidos en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), como neumonía asociada a ventilación mecánica, endocarditis, meningitis, infecciones de piel y partes blandas, del tracto urinario y asociados a dispositivos protésicos. Aunque su reservorio no está bien definido, puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo en superficies tanto secas como húmedas y es común su aislamiento en el ambiente. La estancia en UCI, principalmente ante la presencia de otros pacientes colonizados con *Acinetobacter spp.*, predispone a la colonización a los pacientes intubados, con catéteres intravenosos, dispositivos invasivos, drenajes quirúrgicos, o sondas urinarias permanentes. En la actualidad, *A. baumannii* presenta resistencia a prácticamente todos los antibióticos de uso clínico (Bartal *et al.*, 2022). Según datos obtenidos de la red de vigilancia nacional: WHONET, se detectó una elevada resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, minociclina y rifampicina, lo cual indicaría que los aislamientos que se obtienen en la práctica clínica diaria muestran un perfil de MDR o XDR (INEI, 2020). *A. baumannii* se encuentra asociado con la producción de β -lactamasas pertenecientes a las clases B (MBL) y D (Oxacilinasas) de la clasificación de Ambler, siendo las carbapenemasas de clase D las más importantes tanto clínica como epidemiológicamente en este género (Rodríguez *et al.*, 2018). Estudios de genética poblacional han demostrado que los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenemes presentan una distribución clonal dentro de los nosocomios en los cuales son recuperados (Vargas *et al.*, 2021; Stietz *et al.*, 2013), con tendencia a predominar de algunos complejos clonales como CC113/CC79 en conjunto con CC103/CC15 y CC109/CC1 en la región (Rodríguez *et al.*, 2018).

P. aeruginosa, es un microorganismo ubicuo en la naturaleza con gran versatilidad, y uno de los principales patógenos implicados en infecciones humanas oportunistas (Bothelo *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* es una de las causas más frecuentes de infección en pacientes hospitalizados, afectando especialmente a pacientes ingresados en las UCIs con neumonía asociada a ventilación mecánica o con infección de quemaduras extensas, ambos procesos asociados con una elevada mortalidad. La creciente prevalencia de infecciones nosocomiales por cepas de *P. aeruginosa* MDR y XDR, llegando en ocasiones incluso a la PDR, compromete enormemente la selección de tratamientos efectivos, y por lo tanto se asocia con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. La prevalencia de cepas MDR se sitúa ya en cifras superiores al 30% a nivel

mundial, incluyendo los hospitales argentinos; aproximadamente la mitad de las cepas MDR serían además XDR. Estudios recientes demuestran que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas o BLEE, pertenecen a clones de alto riesgo, principalmente ST235, ST111 o ST175. Las MBL son frecuentemente descritas en *P. aeruginosa*, predominando VIM-2 (Bothelo *et al.*, 2019; Oliver *et al.*, 2015).

1.7.1. Métodos de detección y confirmación de portadores de EPC y BRC

Para la detección de EPC y BRC en portadores (o incluso en muestras clínicas) se han utilizado tradicionalmente medios selectivos (agar MacConkey) suplementados con concentraciones bajas de carbapenemes (1 mg/L) o discos de imipenem o ertapenem (10µg). En los últimos años se han desarrollado diferentes medios cromogénicos que han demostrado una alta sensibilidad para todos los tipos de carbapenemasas. Entre ellos se encuentran los medios chromID (bioMérieux, Francia), el medio CRE Brilliance (Thermo Fhiser Scientific, UK) y el medio CHROMagar mSuperCARBA. En algunos casos, se ha desarrollado un formato de biplaca con dos medios, uno para el aislamiento selectivo de bacterias productoras de OXA-48-like y otro para bacterias productoras de KPC o MBL (Aguirre-Quiñonero *et al.*, 2017). En las Figuras 10 y 11 se muestran ejemplos del crecimiento de estos patógenos en placa de medios agarizados para detección fenotípica de EPC y BRC.



Figura 10. ChromID, Biomerieux. Presentación comercial de biplaca para detección de BRC. Izquierda: cepa de *E. coli* resistente a carbapenemes; Derecha: cepa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes

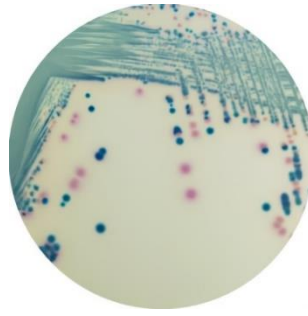


Figura 11. mSuperCARBA, CHROMagar. Presentación comercial para detección de BRC. Colonias rosas correspondientes a *E. coli* resistente a carbapenemes; Colonias Azules compatibles con *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes.

Las pruebas fenotípicas para la confirmación de la producción de carbapenemasas incluyen: el test de Hodge modificado, la medición de hidrólisis de los carbapenemes por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), métodos colorimétricos basados en cambios de pH (CarbaNP y BlueCarba), Inmunocromatografía y el método de inactivación de carbapenemes (CIM). Todas estas metodologías carecen de la especificidad y sensibilidad de las técnicas de biología molecular para identificar las carbapenemasas como tales y solo deben utilizarse como metodologías de screening (Tamma *et al.*, 2018).

Investigar a los pacientes para determinar si son o no portadores de EPC o BRC es de suma importancia para dictaminar el comportamiento clínico del personal frente a dicho paciente. Las sociedades científicas de cada país suelen desarrollar medidas o planes de acción frente a pacientes colonizados/infectados por estos microorganismos para reducir su diseminación dentro de los hospitales. Por ejemplo, en muchos hospitales de Argentina se acepta el esquema recomendado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC 2007), mientras que otros han desarrollado sus propios protocolos (Hospital Italiano de Buenos Aires 2017). En la Figura 12 se encuentra esquematizado el protocolo de vigilancia adoptado por el Hospital Italiano de Buenos Aires.

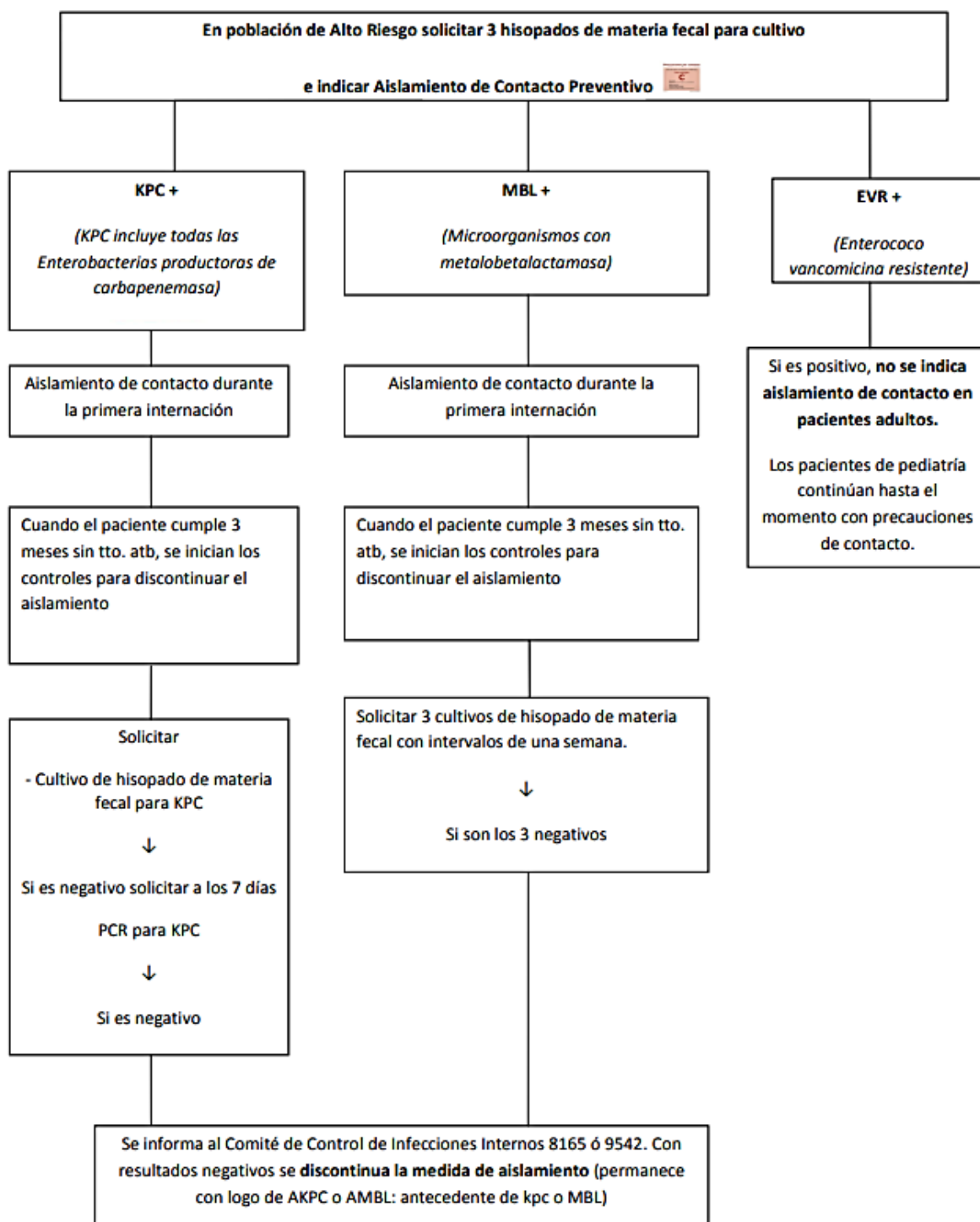


Figura 12. Protocolo de vigilancia para *Enterococcus* Resistente a la Vancomicina (EVR), *Klebsiella* productora de Carbapenemasa (KPC) y microorganismos productores de MBL.

1.7.2. Prevención y Control

Las EPC y los BRC se están propagando entre los *Enterobacterales* y otros bacilos Gram negativos de la misma manera en que ocurrió con los aislamientos productores de BLEE, particularmente las enzimas CTX-M. La detección precoz de pacientes colonizados por EPC y BRC, y la implementación de medidas de control y de aislamiento son imprescindibles para reducir las infecciones por estos microorganismos (Tiri *et al.*, 2020, Scheithauer *et al.*, 2018).

Es necesario incorporar a los programas de vigilancia hospitalarios, Programas para la Optimización del Uso de Antimicrobianos, conocidos habitualmente como PROAs. Además, el éxito de los programas de vigilancia activa se encuentra condicionado por el trabajo interdisciplinario de todos los profesionales involucrados en su ejecución, coordinados por el comité de Control de Infecciones para lograr una implementación oportuna y eficaz (Tiri *et al.*, 2020, Hayden *et al.*, 2015).

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Considerando que:

- 1) Las infecciones nosocomiales por bacilos Gram negativos (BGN) representan un desafío terapéutico.
- 2) Los principales mecanismos de resistencia a los carbapenemes descritos en *Enterobacterales* son enzimáticos, de naturaleza plasmídica y altamente transferibles.
- 3) Se desconoce la epidemiología molecular de BGN multirresistentes en la región.
- 4) La colonización por ERC es uno de los principales factores predisponentes para desencadenar una infección por BGN multirresistentes.
- 5) La detección precoz de portadores fecales de EPC mediante sistemas de vigilancia activa es fundamental para establecer medidas que permitan frenar su propagación.

HIPÓTESIS:

Conocer la expansión clonal de *Enterobacterales* multirresistentes en un nicho biológico y abordar el problema de la resistencia antimicrobiana por los equipos de salud permite una rápida detección y contención de estas superbacterias.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar enterobacterias intrahospitalarias productoras de carbapenemasas, determinar si son clones epidémicos y los plásmidos asociados a la diseminación y persistencia de mecanismos enzimáticos asociados con la resistencia a los carbapenemes con el propósito de implementar estrategias de control y vigilancia en nuestra región.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Enmarcado dentro del objetivo general, nos planteamos realizar el trabajo en etapas: A) Describir en un contexto clínico y epidemiológico intrahospitalario las principales enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital regional de referencia; B) Realizar la caracterización molecular de los aislamientos recuperados y describir la epidemiología regional; C) Desarrollar un protocolo integral de vigilancia activa para bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes en una Unidad de Cuidados Intensivos.

OBJETIVO A

Describir en un contexto clínico y epidemiológico las principales enterobacterias asociadas a carbapenemasas en un hospital regional de referencia.

- Evaluar las características clínicas de pacientes con diagnóstico de infección por enterobacterias resistentes a carbapenemes (ERC), conocer la incidencia de estas infecciones y su relación con la mortalidad.
- Estudiar el perfil de sensibilidad/resistencia de enterobacterias intrahospitalarias resistentes a Carbapenemes en el Hospital Ángel Cruz Padilla.
- Confirmar por métodos fenotípicos la resistencia a carbapenemes de tipo enzimática

OBJETIVO B

Realizar la caracterización molecular de los aislamientos recuperados y describir la epidemiología regional.

- Detectar los tipos de β -lactamasas implicadas por PCR. β -lactamasas de espectro extendido (SHV, CTX-M) y carbapenemasas: serin-carbapenemasas (KPC), metalo- β -lactamasas (IMP, VIM, SPM, NDM) y oxacilinasas (OXA-48like).
- Evaluar mediante PCR los principales factores de virulencia asociados a la patogenicidad de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes.
- Caracterizar los plásmidos involucrados en la diseminación y persistencia de la resistencia a los carbapenemes (IncN, IncF, IncFIIk, IncL/M) y las relaxasas asociadas a plásmidos transmisibles.
- Establecer la relación clonal mediante Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) en las enterobacterias resistentes a carbapenemes predominantes.
- Estudiar el tipo clonal dominante de *K. pneumoniae* por Multilocus Sequence Typing (MLST).

OBJETIVO C

Desarrollar un protocolo integral de vigilancia activa para bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes en pacientes internados en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

- Implementar un programa de vigilancia activa basado en cultivo en una unidad de cuidados intensivos.
- Evaluar la colonización por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes en la UCI a estudiar.
- Detectar los tipos de β -lactamasas implicadas por PCR: β -lactamasas de espectro extendido (SHV, CTX-M) y carbapenemasas: serin-carbapenemasas (KPC), metalo- β -lactamasas (IMP, VIM, SPM, NDM) y oxacilinasas (OXA-48like).
- Identificar y caracterizar los clones implicados en la diseminación y persistencia de carbapenemasas dentro de la UCI.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Evaluación clínico/epidemiológica de *Enterobacterales* resistentes a carbapenemes en pacientes admitidos en un hospital público

4.1.1. Descripción del ámbito de estudio: características del hospital seleccionado y diseño

El Hospital Ángel Cruz Padilla es un hospital polivalente destinado a la atención de pacientes adultos (mayores de 14 años) en estado crítico, principalmente con patologías agudas. Ofrece múltiples prestaciones, siendo pionero en neurología dentro de la región, funciona como centro de procuración de órganos y trasplantes, brinda atención en oncohematología y seguimiento integral al enfermo cardiológico. La institución cuenta con aproximadamente 500 camas distribuidas entre las diferentes prestaciones, y anualmente admite en promedio 25.000 pacientes.

El nosocomio integra la red de prestadores del Sistema Provincial de Salud, siendo una de las principales instituciones de tercer nivel de atención. En el hospital, considerado hospital escuela, se desarrollan actividades educativas coordinadas por un Comité Docente, para asegurar la formación continua de los profesionales de la salud

En el marco de un acta acuerdo entre la Cátedra de Bacteriología (Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán) y los servicios de Infectología y Bacteriología del Hospital Ángel C. Padilla, se realizó un estudio observacional, descriptivo y prospectivo de vigilancia epidemiológica, con variables clínico-epidemiológicas de pacientes con infecciones por *Enterobacterales* resistentes a carbapenemes (ERC), con confirmación molecular de mecanismos de resistencia.

La información clínica y epidemiológica se obtuvo cumpliendo un protocolo aprobado tanto por el Comité de Ética como el Comité de Docencia del hospital.

4.1.2. Población objetivo: pacientes infectados por ERC, incidencia y relación con la mortalidad

La población objetivo fueron todos los pacientes mayores de 14 años, internados en servicios y/o salas de especialidades clínicas, quirúrgicas, y de emergencias del

Hospital Ángel Cruz Padilla de la ciudad de San Miguel de Tucumán. Se inició el seguimiento de muestras y el ingreso de pacientes desde el 01 de mayo al 31 de octubre de 2014, y posteriormente se extendió hasta fines de noviembre del mismo año para valorar la variable de mortalidad a los 30 días.

La información de relevancia clínico/epidemiológica de los pacientes fue recuperada consultando las historias clínicas, datos demográficos (edad y sexo) y comorbilidades. Aquellos pacientes con infecciones por ERC que cumplieron estrictamente los criterios de inclusión fueron seleccionados luego de firmar el consentimiento informado.

Selección de pacientes

La selección de los pacientes que participaron en este estudio, se realizó en base a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Se incluyeron todos los pacientes con infecciones por ERC internados en el Hospital durante el período de estudio.

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron a todos aquellos pacientes infectados con ERC adquiridas de otro nosocomio o de origen comunitario.
- Se excluyeron aquellos pacientes que no cumplían con los criterios estrictos de infección.
- Se excluyeron los casos de colonización por ERC.

En los pacientes admitidos en este estudio, se accedió a la historia clínica y se registraron variables previamente consensuadas con los comités del hospital.

4.1.3. Definición de variables clínico/epidemiológicas

A continuación, se encuentran detalladas aquellas variables incluidas en la ficha clínico/epidemiológica de cada paciente:

-Edad: intervalo de tiempo estimado o calculado entre el día, mes y año del nacimiento, y el día, mes y año en que se realizó la toma del cultivo, medido en años

-Sexo: Se consignó el género que figura en el documento nacional de identidad o su equivalente (masculino o femenino).

-Fecha de internación: La señaló el día, mes y año del ingreso al Nosocomio.

-Fecha del cultivo: Se indicó el día, mes y año de realizada la toma de muestra.

-Lugar de probable adquisición de la ERC: Se consignó el sitio del hospital donde más probablemente haya adquirido la ERC (UTI, Guardia, Salas, Quirófano, otros).

-Tiempo de internación previo: fueron señalados el número de días transcurridos entre el ingreso al nosocomio y el momento de la toma de muestra del cultivo positivo.

-Paciente Inmunodeprimido: fueron considerados inmunodeprimidos aquellos pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en cualquier estadio, pacientes con menos de 1000 neutrófilos de cualquier etiología, y aquellos con tratamiento con drogas oncológicas o inmunosupresoras.

-Gravedad de la enfermedad: Para la evaluación de la gravedad del paciente en el momento de la toma de muestra de los cultivos se utilizó el score de Charlson (Charlson *et al.*, 2008). Este índice permite evaluar la esperanza de vida de un paciente considerando la edad en la que se lo evalúa, y las comorbilidades identificadas. Consta de 19 ítems, que, si están presentes, se ha comprobado que influyen de una forma concreta en la esperanza de vida (Tabla 6). Este índice permite agrupar a los pacientes en cuatro categorías: Ausencia de Comorbilidades (puntaje=0), Índice Bajo (puntaje=1), Índice Moderado (puntaje=2) e Índice Alto (puntaje ≥ 3). La estimación del Índice fue realizada por el equipo médico al momento de evaluar las condiciones de cada paciente y registrada en su correspondiente ficha.

-Tipo de tratamiento antibiótico utilizado: Se registró el nombre del antibiótico utilizado para el tratamiento empírico, es decir, el iniciado dentro de las 48 de tomados los cultivos.

-Tratamiento antimicrobiano empírico apropiado: Se considero un tratamiento apropiado, cuando al menos un antibiótico con actividad demostrada *in vitro*, se hubiera administrado dentro de las 48 hs. de realizada la toma de muestra para cultivo; a dosis e intervalos adecuados.

-Mortalidad global: fueron registradas todas aquellas muertes ocurridas luego de los 30 días de realizado el aislamiento del microorganismo, sin considerar la etiología.

-Mortalidad atribuible: se consideró mortalidad atribuible a aquella que ocurrió en el contexto de evidencia clínica de infección activa y cultivos positivos o en los 5 días posteriores al último cultivo positivo. También fueron incluidos en esta categoría a aquellos casos en donde la causa de fallecimiento fue compromiso orgánico secundario a la infección primaria.

Para complementar la información clínica previamente detallada, fueron documentados otros datos como posibles factores de riesgo (intervenciones médicas previas, uso de dispositivos médicos), identificación de áreas y servicios implicados, motivo o causa de ingreso al registro de la institución y tipo de muestra clínica en la que se aisló el microorganismo.

Las patologías y la clasificación de los diferentes tipos de infecciones, se definieron utilizando los criterios establecidos por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (Horan *et al.*, 2008). A continuación, se encuentran detallados los criterios y clasificaciones empleados:

-Infección del Tracto Urinario (ITU): el paciente presenta al menos uno de los siguientes signos o síntomas: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), tenesmo suprapúbico, urgencia miccional o disuria; y un cultivo de orina positivo con recuentos elevados de no más de dos especies de microorganismos y acompañado de piuria.

-Infección de Sitio Quirúrgico (ISQ): es aquella que se manifiesta antes de los 30 días y posteriormente a un procedimiento quirúrgico e involucra sólo la piel y el tejido subcutáneo en la zona de la incisión y además se acompaña de alguno de los siguientes signos/síntomas: a) drenaje purulento superficial de la zona de la incisión; b) aislamiento de un microorganismo tras la extracción aséptica de fluido o tejido en la zona afectada.

-Bacteriemia: un paciente sospechoso de bacteriemia es aquel que cumple con al menos dos de los siguientes criterios: a) Paciente con aislamiento de un patógeno frecuentemente implicado (*S. aureus*, *Enterococcus spp*, *E. coli*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, *Candida spp*, entre otros) en al menos una botella de hemocultivo y sin documentación de infección en otro sitio anatómico; b) Paciente febril con escalofríos o hipotensión y dos hemocultivos positivos a microorganismos habituales de la piel (*Corynebacterium spp*, *Bacillus* (no *B. anthracis*) *spp*, *Propionibacterium spp*, *S. epidermidis*, *Streptococcus grupo viridans*, *Micrococcus spp*)) sin documentación de infección en otro sitio anatómico; c) Paciente menor de un año, febril con escalofríos o

hipotensión y un hemocultivo positivo a microorganismos habituales de la piel (*Corynebacterium spp*, *Bacillus* (no *B. anthracis*) *spp*, *Propionibacterium spp*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* grupo *viridans*, *Micrococcus spp*)) sin documentación de infección en otro sitio anatómico.

-Infecciones osteoarticulares: el paciente debe presentar al menos uno de los siguientes criterios: a) Cultivo positivo de muestra de hueso y/o articulación; b) Paciente con evidencia de osteomielitis por examinación directa durante intervención quirúrgica o examen histopatológico; c) Paciente con al menos 2 de los siguientes signos o síntomas en caso de no identificarse la causa: febril y acompañado de temblores o drenaje espontáneo del sitio de infección ósea; d) Hemocultivo positivo a un microorganismo; e) Test de antígenos positivo a *H. influenzae*, *S. pneumoniae*; f) Hallazgos radiológicos anormales como abscesos.

-Infecciones del Sistema Nervioso Central: el paciente debe cumplimentar por lo menos uno de los siguientes criterios en caso de sospecha de infección intracraneal o meningitis: a) Cultivo positivo de muestras de cerebro, duramadre y/o líquido cefalorraquídeo (LCR); b) Abscesos o evidencia de infección durante procesos quirúrgicos intracraneales; c) Paciente febril con cefaleas e irritabilidad y al menos dos de los siguientes criterios: 1) observación microscópica de microorganismos en muestras obtenidas por punción o biopsias; 2) Test de antígenos positivos en muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre u orina a *H. influenzae*, *S. pneumoniae*.

-Infección del Tracto Respiratorio: las infecciones respiratorias suelen agruparse anatómicamente en Infecciones del Tracto Respiratorio Superior (ITRS) e Infecciones del Tracto Respiratorio Inferior (ITRI). Las ITRS incluyen principalmente faringitis, otitis media y sinusitis. El paciente suele presentar fiebre e inflamación perceptible de alguna de las mucosas. Las ITRI son aquellas que afectan tejidos inferiores a la tráquea como los bronquios y alveolos. Un paciente con ITRI debe presentar al menos uno de los siguientes criterios: a) Paciente febril con o sin incremento en la productividad de esputo, y ronquidos o aspiraciones bruscas al auscultar con cultivo positivo de esputo o muestras obtenidas quirúrgicamente; b) Paciente febril con o sin incremento en la productividad de esputo, y ronquidos o aspiraciones bruscas al auscultar con test de antígenos positivos a *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Legionella* entre otros; c) Paciente febril con o sin incremento en la productividad de esputo con evidencia radiológica o

quirúrgica de abscesos y cultivo positivo de los mismos obtenidos por punción superficial o quirúrgicamente.

Adicionalmente, los criterios expuestos por el CDC (Horan *et al.*, 2008) permiten identificar a un paciente en el que se obtuvieron cultivos positivos para diferentes muestras como paciente colonizado o infectado. Un paciente es considerado colonizado por un microorganismo, por ejemplo, una enterobacteria productora de carbapenemasas, cuando este microorganismo se recupera de una muestra de piel, membrana mucosa, secreción o a través de un hisopado de vigilancia, sin evidencia clínica (signos o síntomas) de estar implicado en un proceso infeccioso. En cambio, un paciente es considerado infectado cuando la evidencia microbiológica (aislamiento del microorganismo a través del cultivo de muestras o demostración de su presencia por otras metodologías) se condice con la evidencia clínica.

Entre los factores de riesgo, se detallaron también los días previos desde el ingreso hasta el aislamiento de EPC en una muestra clínica. Fueron incluidos en la ficha de cada paciente los antibióticos utilizados en los tratamientos empíricos y dirigidos con el fin de observar la eficacia de los mismos en los pacientes incluidos en el estudio.

Tanto la mortalidad global como la mortalidad global atribuible por EPC fueron calculadas por el Servicio de Estadísticas del hospital. Para ello, se estableció la relación entre el número de defunciones totales y aquellas asociadas a infecciones por EPC con el número total de pacientes admitidos en el nosocomio durante el desarrollo del estudio.

Tabla 6. Índice de Comorbilidad de Charlson. Parámetros utilizados para definir el índice.

Edad del paciente:	
Infarto de miocardio:	
Insuficiencia cardíaca congestiva:	
Enfermedad vascular periférica:	
Enfermedad cerebrovascular:	
Demencia:	
Enfermedad pulmonar crónica:	
Patología del tejido conectivo:	
Enfermedad ulcerosa:	
Patología hepática ligera:	
Patología hepática moderada o grave:	
Diabetes:	
Diabetes con lesión orgánica:	
Hemiplejía	
Patología Renal (moderada o grave)	
Neoplasia:	
Leucemia:	
Linfomas malignos:	
Metástasis sólida:	
SIDA	

4.1.4. Identificación bacteriana y estudio del perfil de sensibilidad/resistencia de ERC

Durante el desarrollo del estudio, se llevó a cabo una vigilancia epidemiológica de los cultivos ingresados al laboratorio, las muestras de los pacientes admitidos fueron procesadas por el Servicio de Microbiología del hospital siguiendo los lineamientos de su manual de procedimientos interno.

Variables Microbiológicas:

- **Tipo de Microorganismo aislado:** Se consignó género/especie de la bacteria aislada.
- **Antibiograma:** Se registraron los resultados del antibiograma realizado, colocando según corresponda si los antibióticos fueron sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia.
- **Concentración inhibitoria mínima (CIM):** Se consigno la CIM a Imipenem, Meropenem µg/ml, datos obtenidos por el sistema automatizado Vitek 2®.
- **Mecanismos de resistencia:** Se registraron los mecanismos de resistencia enzimáticos presuntivos, mediante ubicación estratégica de discos.

Selección de aislamientos bacterianos

Se incluyeron en este estudio los siguientes aislamientos:

- El primer aislamiento de enterobacterias recuperadas de muestras clínicas de pacientes incluidos en el estudio
- Enterobacterias con valores de CIM ≥ 1 para uno o ambos carbapenemes/ métodos presuntivos positivos.

4.1.4.1. Confirmación de la identificación bacteriana

Método automatizado Vitek 2®

En las enterobacterias incluidas en este estudio, se confirmó la identificación a nivel de especie, utilizando el método automatizado Vitek 2® (BioMérieux, Merck & Co., France) (Figura 13). Se procedió según las instrucciones del fabricante Vitek 2® GN (BioMérieux). A partir de un cultivo microbianos puro, se preparó un inóculo de una densidad óptica ajustada (0.40- 0.65) para lo cual se utilizaron tubos de hemólisis de plástico no refractario. Este inóculo posteriormente se depositó en un soporte

conteniendo tarjetas de identificación registradas mediante un lector de códigos y colocadas a continuación dentro del equipo (Figura 14).



Figura 13. Equipo Vitek 2® compact (BioMérieux, Merci l'Etoile, France).



Figura 14. Tarjetas Vitek 2® GN (BioMérieux) en soporte.

Espectrometría de Masas Acoplada a Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF)

Los aislamientos identificados por Vitek 2 fueron posteriormente analizados con MALDI-TOF. La identificación se realizó a partir de una colonia aislada la que se colocó sobre una placa de titanio punteada con una cuadrícula. Tras secarse a temperatura ambiente, se cubrió con 1 µl de matriz ionizante (ácido-ciano-4 hidroxicinamínico) preparada al momento de realizar la técnica (Figura 15). Se empleó el equipo

MALDI Biotyper Realtime (Bruker Daltonics, Alemania) (Figura 16) y el espectro resultante de cada cepa se analizó con el software FlexControl 3.0 comparándolo con la base de datos actualizada del Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España).

Los resultados se expresaron como puntuaciones de 0 a 3, los valores $\leq 1,7$ se consideraron como identificación no fiable; los valores entre 1,7-2 se correspondieron con una identificación de género; y finalmente los valores ≥ 2 una identificación fiable a nivel de especie.



Figura 15. Descripción del procedimiento para identificación bacteriana con tecnología MALDI-TOF.



Figura 16. MALDI Biotyper Realtime (Bruker Daltonics, Alemania)

4.1.4.2. Estudio del perfil de sensibilidad/resistencia de enterobacterias

En las enterobacterias seleccionadas, se utilizó la tecnología Vitek 2® para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos. Se siguieron las indicaciones descritas previamente, reemplazando las tarjetas GN por las AST-243. El uso de esta metodología permitió determinar la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) a Meropenem e Imipenem, en conjunto con los siguientes antimicrobianos: Amikacina, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Cefazolina, Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, Meropenem y Trimetoprima/Sulfametoxazol. La interpretación de los valores obtenidos se realizó siguiendo las indicaciones del Servicio Antimicrobianos (PROTOCOLO RED WHONET- INEI 2014). Los rangos de concentraciones definidos para los carbapenemes incluyeron valores comprendidos

entre 0,5 y 32 mg/L, indicando $\leq 0,5$ mg/L o ≥ 32 mg/L cuando el valor de CIM estuviera por debajo o por encima del límite indicado por el equipo, respectivamente.

4.1.5. Caracterización fenotípica y molecular de mecanismos de resistencia

4.1.5.1. Detección fenotípica de carbapenemasas

4.1.5.1.1. Test de doble difusión con discos

La producción de carbapenemasas se confirmó fenotípicamente empleando pruebas de difusión en agar. Considerando las indicaciones del documento M100 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (<http://clsi.org/m100>), a partir de una colonia aislada en una placa de agar sangre de 18-24 hs, se preparó un inóculo en NaCl 0,9% ajustado a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala McFarland. La suspensión se agitó durante 15-20 segundos y con un hisopo de algodón estéril se sembró la superficie de una placa de Mueller-Hinton agar (MHA).

Se utilizaron monodiscos de carbapenemes (Imipenem 10 μ g, Meropenem 10 μ g y Ertapenem 10 μ g) y de los diferentes inhibidores de carbapenemasas recomendados (Ácido borónico 300 μ g, EDTA 372 μ g). Los monodiscos fueron retirados del freezer (-20°C) 30 minutos antes de ser utilizados para evitar la formación de gotas de condensación y se conservaron nuevamente en frío tras ser utilizados. Se utilizaron como control de calidad cepas ATCC (de inglés, American Type Culture Collection) de *E. coli* 25922 y *P. aeruginosa* 27853.

Una vez inoculadas las placas, se procedió a colocar los monodiscos de carbapenemes e inhibidores de forma estratégica (Figura 17). Se consideró como positivo el fenómeno de sinergia, al visualizar un claro agrandamiento del halo de inhibición en las proximidades del monodisco conteniendo alguno de los inhibidores.



Figura 17. Ubicación estratégica de monodiscos para investigación de serin-carbapenemasas.

Se colocaron discos de Meropenem (10 μ g) e Imipenem (10 μ g) a 20 mm de distancia de Ácido Borónico (300 μ g). La interpretación tras el enfrentamiento con los inhibidores de carbapenemasas se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Lectura e interpretación de test fenotípico de doble disco para detección de carbapenemasas.

<i>Carbapenemes</i>	Sinergia con Ácido Borónico	Sinergia con EDTA	Tipo de carbapenemasa
<i>Imipenem y/o Meropenem Resistentes</i>	+	-	Serin-carbapenemasa
<i>Imipenem y/o Meropenem Resistentes</i>	-	+	MBL
<i>Imipenem y/o Meropenem Resistentes</i>	-	-	Probable OXA
<i>Imipenem y/o Meropenem Resistentes</i>	+	+	Doble productor de serin-carbapenemasa y MBL

4.1.5.1.2. Test de Hodge Modificado

Una vez evaluada la presencia de una carbapenemasa, se realizó el test de Hodge modificado (THM) (Lee *et al.*, 2010) en el que se utilizó una cepa control de *E. coli* ATCC 25922 sensible a los carbapenémicos carbapenemes. Para el desarrollo de esta prueba se preparó una suspensión bacteriana de la cepa control en solución fisiológica (NaCl 0.9%) ajustada al 0.5 de turbidez de McFarland. La suspensión se diluyó 1/10 y se inoculó en una placa de agar MH.

A continuación, se colocó un disco de carbapenem (10 µg) en el centro y se trazaron estrías con un ansa de siembra estéril desde el centro hacia los extremos de la placa tanto con la cepa control como con las cepas en estudio. Es importante considerar en esta técnica que el disco de carbapenem a utilizar varía entre los diferentes géneros de *Enterobacterales*, recomendándose el uso de Meropenem para los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*, y Ertapenem para los demás géneros.

Se incubó a 37°C durante 18-24 hs. Se consideró positivo, es decir, presencia de carbapenemasa, cuando el halo de inhibición del desarrollo de *E. coli* se distorsionó formando una flecha, debajo de las estrías realizadas con las cepas en estudio (Figura 18).

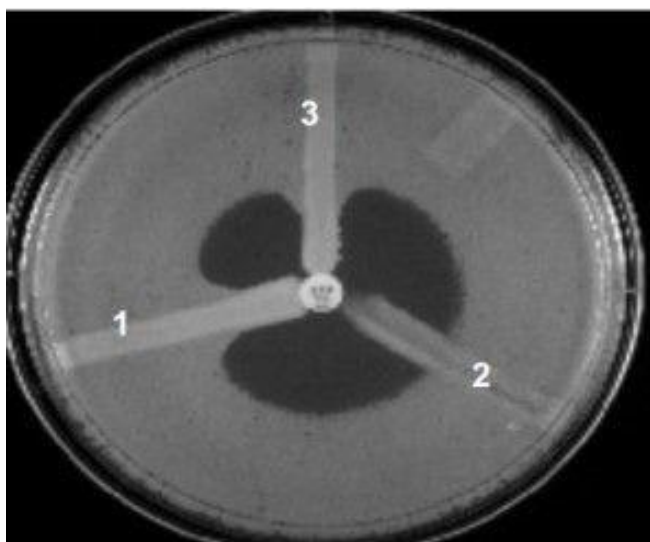


Figura 18. Test de Hodge Modificado. 1- Control positivo de carbapenemasa; 2- Control negativo de carbapenemasa; 3- Aislamiento clínico positivo para la producción de carbapenemasas.

4.1.6. Caracterización molecular de β -lactamasas

A partir de los aislamientos con confirmación fenotípica de producir alguna carbapenemasa, se procedió a la extracción del ADN total para su caracterización molecular.

La extracción del ADN total se realizó con la técnica de *boiling* o “hervido de colonias”. Una colonia pura tomada de un cultivo fresco (menos de 24 hs de desarrollo en medio agarizado) fue colocada en un eppendorf con 300 μ L de agua libre de RNAsas; posteriormente, fue colocado en un Termoblock (Multiblock, Selecta) a 100°C por 10 minutos y luego en freezer (-20°C) por 3 minutos. Tras retirarse del freezer, fue centrifugado a 13.000 rpm 5 minutos. El sobrenadante fue separado en un eppendorf estéril rotulado y conservado en freezer a -20°C hasta su utilización.

4.1.6.1. Detección de genes *bla* de carbapenemasas

La amplificación de los genes se efectuó mediante PCR. Fueron investigados los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, y *bla*_{OXA-48-like} por ser los tipos de carbapenemasas predominantes implicados en brotes nosocomiales en Argentina. En la Tabla 8 se detallan las secuencias de primers utilizadas y el tamaño de los fragmentos esperados.

Tabla 8. Descripción de primers utilizados para la investigación de carbapenemasas en aislamientos clínicos de *Enterobacterales*.

Genes	Primers	Secuencia de los cebadores 5'--3'	Tamaño del fragmento
IMP	IMP-UF1	GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA	404 pb
	IMP-UF2	GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT	
VIM	VIM-F	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	261 pb
	VIM-R	ATG AAA GTG CGT GGA GAC	
NDM	NDM-F	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC	512 pb
	NDM-R	GGC GTA GTG CTC AGT GTC	
KPC	KPC-F	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG	916 pb
	KPC-R	AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA	
OXA-48-like	OXA-48F	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG	775 pb
	OXA-48R	TGAGCACTCTTTTGTGATG	

La detección de carbapenemasas KPC y OXA-48-like se realizó por PCR simple de punto final. La mezcla de PCR consistió en 17,6 μ L de agua doble destilada purificada, 2,5

μl de buffer PCR 10X; MgCl₂ 0,75 mM; 0,5 μl de mezcla dNTP 10 mM; 0,5 μl de cada uno de los cebadores, 0,15 μl de Taq polimerasa (5U/μl) y 2,5 μl de templado para un volumen final de reacción de 25 μl.

En el caso de KPC, la mezcla se sometió a una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min y 29 ciclos de: 30 seg a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 50°C (“annealing” o hibridación) y 60 seg a 72°C (extensión). Finalmente, la reacción se completó con 10 min a 72°C. El producto de amplificación se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE 1X. La corrida se llevó a cabo a 80 Volts durante 30 min (Pasterán *et al.*, 2008).

Para detectar OXA-48-like, la mezcla se sometió a una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min y luego 29 ciclos de: 30 seg a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 52°C (“annealing” o hibridación) y 60 seg a 72°C (extensión). Finalmente, la reacción se terminó con 10 min a 72°C. El producto de amplificación se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE 1X. La corrida se llevó a cabo a 80 Volts durante 30 min (<http://antimicrobianos.com.ar/category/protocolos-de-metodos-moleculares/>).

La detección de los genes de MBL se realizó por PCR Múltiple utilizando los primers descritos en la Tabla 8. La mezcla de PCR consistió en 14,15 μl de agua doble destilada purificada, 2,5 μl de buffer PCR 10X; MgCl₂ 0,75 mM; 0,5 μl de mezcla dNTP 10 mM; 0,5 μl de cada uno de los cebadores para detectar VIM y NDM, 1,2 μl de cada primer para investigar IMP, 0,2 μl de Taq polimerasa (5U/μl) y 2,5 μl de templado para un volumen final de reacción de 25 μl. El producto de amplificación se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE 1X. La corrida se llevó a cabo a 80 Volts durante 30 min (<http://antimicrobianos.com.ar/category/protocolos-de-metodos-moleculares/>).

En cada prueba de PCR realizada, se utilizaron como controles positivos de la reacción muestras de ADN total, extraído de cepas control cedidas por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Carlos G. Malbrán, como control negativo se utilizó el ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (sin mecanismos de resistencia) y la mezcla de reacción sin templado se utilizó como control de reactivos.

4.1.6.2. Detección de genes *bla* de BLEE

La amplificación de los genes se efectuó mediante PCR Múltiple. Fueron investigados los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} por ser las BLEE implicadas en la resistencia nosocomial y comunitaria a las cefalosporinas de tercera generación predominantes en Argentina. En la Tabla 9 se detallan las secuencias de primers utilizadas y el tamaño de los fragmentos esperados.

Tabla 9. Descripción de primers utilizados para la investigación de BLEE en aislamientos clínicos de *Enterobacteriales*.

Genes	Primers	Secuencia de los cebadores 5' - 3'	Tamaño del fragmento
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445 pb
	TEM-R	ACGCTCACC GGCTCCAGATTTAT	
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	747 pb
	SHV-R	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593 pb
	CTX-M-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	

La mezcla de PCR consistió en 15,55 µl de agua doble destilada purificada, 2,5 µl de buffer PCR 10X; MgCl₂ 0,75 mM; 0,5 µl de mezcla dNTP 10 mM; 0,5 µl de cada uno de los cebadores, 0,2 µl de Taq polimerasa (5U/µl) y 2,5 µl de templado para un volumen final de reacción de 25 µl. El producto de amplificación se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE 1X. La corrida se llevó a cabo a 80 Volts durante 30 min (Monstein *et al.*, 2007).

4.1.7. Transferencia horizontal de genes

4.1.7.1. Conjugación en medio sólido

La transferencia *in vitro* de los genes *bla* asociados a producción de carbapenemasas se realizó por conjugación en medio sólido. La cepa utilizada como receptora fue *E. coli* J53 (resistente a azida sódica, sensible a β-lactámicos, lactosa positiva y libre de plásmidos). Esta metodología fue desarrollada únicamente para

evaluar la transferencia de genes *bla* de *K. pneumoniae* por su predominio frente a otras enterobacterias incluidas en este estudio.

Posteriormente a la reacción de conjugación, la cepa receptora (*E. coli* J53) se cultivó en medio Agar Base con Azida (200 µg/l, BritaniaLab), comprobando previamente que las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes (cepas dadoras) no desarrollaran a estas concentraciones de azida tras 48 hs de incubación a 37°C en aerobiosis.

Partiendo de un cultivo puro de las cepas donante y receptora en MacConkey Agar (BritaniaLab), se tomó una colonia, se inoculó un tubo con 10 ml de Caldo Cerebro Corazón (BHI) y se incubó por 18 hs. Cumplida la incubación se homogeneizó con vortex. Posteriormente se pusieron en contacto las cepas donante y receptora en una proporción 1:2 en una placa de CLED (Cisteína Lactosa Electrolito Deficiente, BritaniaLab). Las placas se incubaron por duplicado a 25°C y 37°C durante 18 horas.

Tras la incubación, se resuspendió el desarrollo bacteriano en 2 ml de BHI y se homogeneizó en vortex. Se inocularon 100 µL de la suspensión en una placa de Agar Base con Azida suplementada con 2 µg/ml de solución de Meropenem (Accordpharma) y se incubó a 37°C por 18 hs. Utilizamos como controles de medios de cultivo a las cepas receptoras y donante teniendo en cuenta lo expresado en la Tabla 10.

Tabla 10. Interpretación de placas y viabilidad de la metodología aplicada

Cepa	Desarrollo en Agar Base Sangre con Azida	Resistencia a carbapenemes	Desarrollo en Agar Base Sangre con Azida suplementado con Meropenem
<i>E. coli</i> J53 (Receptora)	+	-	-
Donante	-	+	-
Transconjugantes	+	+	+

+: desarrollo bacteriano; -: ausencia de desarrollo bacteriano.

Las colonias aisladas en las placas de Agar Base con Azida suplementadas con Meropenem se identificaron como *E. coli*, demostraron fenotípicamente resistencia a carbapenemes y resultaron positivas para los genes *bla* por PCR (apartado 4.1.6.1).

Los aislamientos considerados transconjugantes fueron conservados en BHI suplementado con glicerol 30% (agente crioprotector) a -20°C.

4.1.7.2. Tipificación de plásmidos por PCR

Los plásmidos portadores de los genes *bla* se clasificaron en relación a su grupo de incompatibilidad (Inc) (Carattoli *et al.*, 2009). Este esquema denominado PBRT (“PCR-based replicon typing”) se basa en la identificación mediante PCR de los replicones de los principales grupos de incompatibilidad de los plásmidos más relacionados con enterobacterias: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Ig, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, y FIIA. Los primers y condiciones que se utilizaron para la amplificación de los 18 replicones se muestran en la Tabla 11.

Los productos de amplificación se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE 1X. La corrida se llevó a cabo a 80 Volts durante 45 minutos.

Tabla 11. Primers y condiciones de amplificación de los 18 replicones descritos para plásmidos de enterobacterias según el esquema PBRT.

PCR	Tipo de plásmido	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones
PCR MÚLTIPLE 1	HI1 HI2 I1	HI1-F HI1-R HI2-F HI2-R I1-F I1-R	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC GGCTCACTACCGTTGTCATCCT CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
PCR MÚLTIPLE 2	X L/M N	X-F X-R L/M-F L/M-R N-F N-R	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTAGC GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGGCGATTCTTTAGG GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	
PCR MÚLTIPLE 3	FIA FIB W	FIA-F FIA-R FIB-F FIB-R W-F W-R	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCGT	
PCR MÚLTIPLE 4	Y P FIC	Y-F Y-R P-F P-R FIC-F FIC-R	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	

Tabla 11. Continuación.

PCR	Tipo de plásmido	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones
PCR MÚLTIPLE 5	A/C T FIIAs	A/C-F A/C-R T-F T-R FIIAs-F FIIAs-R	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAACTTCAGC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
PCR SIMPLE 1	K	K-F K-R	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
PCR SIMPLE 2	B/O	B/O-F B/O-R	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 52°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
PCR SIMPLE 3	F	F-F F-R	TGATCGTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	1 ciclo de 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 90s a 60°C, y 90 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C

4.2. Caracterización molecular de los aislamientos recuperados y descripción de la epidemiología regional

El segundo objetivo planteado consistió en determinar la estructura poblacional de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas empleando las técnicas de PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) y MLST (Multilocus sequence typing), determinar la virulencia de los aislamientos mediante PCR e integrar esta información con la información clínica y epidemiológica.

Adicionalmente, se evaluó la estructura poblacional de los aislamientos recuperados de *K. aerogenes* resistentes a carbapenemes, segundo microorganismo en frecuencia de aislamiento durante el desarrollo del estudio.

4.2.1. Estructura poblacional

4.2.1.1. Electroforesis de campo pulsado (Pulsed-field Gel Electrophoresis-PFGE)

Para determinar la relación clonal existente entre las diferentes cepas de una misma especie, se realizó electroforesis de campo pulsado en geles de agarosa (PFGE) mediante el protocolo propuesto por PulseNet (CDC 2017; Han *et al.*, 2013) para *Enterobacterales* con algunas modificaciones.

Las cepas se sembraron inicialmente en TSA (Britania Lab) y se incubaron a 37°C, durante 14 a 18 h. El desarrollo bacteriano de la zona de confluencia se recogió con un hisopo estéril y se resuspendió en 2 ml de buffer de suspensión celular (BSC, Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8) hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,95 y 1 a 620 nm. Los tacos de agarosa se prepararon a partir de 400 µl de suspensión celular estandarizada con 400 µl de agarosa SeaKen Gold 1% fundida (SeaKen, FMC Bioproducts, Maine, EEUU) y 20 µl de solución de Proteinasa K [20 mg/ml (PB-L, Bernal, Buenos Aires, Argentina)]. Las bacterias contenidas en los tacos de agarosa se lisaron con un buffer de lisis celular [Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8; + Sarcosina (Sigma, Saint Louis, EEUU) 1% y Proteinasa K (0.1 mg/ml)]. Posteriormente, se incubaron a 54°C, durante 2 hs con agitación (120 rpm). Luego los tacos se lavaron dos veces con agua de calidad molecular a 50°C, con agitación durante 10-15 minutos y 4 veces con buffer TE

1X estéril (Tris 10 mM:EDTA 1 mM, pH 8). Los tacos de agarosa se almacenaron en buffer TE 1X a 4°C hasta realizar la restricción enzimática. Estos tacos conteniendo el ADN bacteriano fueron almacenados hasta 3 meses a 4°C, posteriormente fueron descartados.

La digestión del ADN contenido en los tacos se realizó con dos endonucleasas de restricción diferentes: *XbaI* (30 U) y *SpeI* (300 U). Ambas se utilizaron en 200 µl del buffer de restricción 1X (provisto con la enzima), a 37°C, durante 1,5 - 2 hs.

Una vez finalizada la digestión, los tacos se colocaron en un gel de agarosa SeaKem Gold 1% en buffer TBE 0,5X [Tris 5,4 g; ácido bórico (Sigma) 2,75 g; 2,0 ml EDTA 0,5 M] en un molde (BioRad) de 150 ml de 15 calles. La corrida electroforética se realizó en el equipo CHEF DR III (BioRad) utilizando las siguientes condiciones: pulso inicial: 5 seg; pulso final: 20 seg; voltaje: 6 V/cm; ángulo: 120°; tiempo de corrida: 19 hs; con temperatura de buffer de corrida (TBE 0,5X) de 14°C. Se colocó el ADN de una cepa de *Salmonella Braenderup H9812*, digerida por las mismas enzimas, en dos calles externas y una central en cada gel, para permitir la normalización de las bandas entre los geles. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0,1 µg/ml, durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital (60 rpm), y luego se realizaron 3 lavados con 400 ml de agua tridestilada en las mismas condiciones. Para la documentación de los resultados los geles fueron fotografiados en un transiluminador de UV (Slider Imager, Maestrogen, Nevada, EEUU). Las imágenes fueron registradas utilizando una cámara fotográfica (Canon PowerShot G16, Tokio, Japón) y almacenadas en formato TIFF.

La presencia de bandas se determinó visualmente y los patrones de PFGE obtenidos fueron analizados manualmente siguiendo los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995) y con el programa BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando el coeficiente de Dice y mediante UPGMA para generar un dendrograma con 1,5% de valor de tolerancia.

4.2.1.2. Tipificación Multilocus de secuencias (Multi locus sequence typing - MLST).

Esta técnica consistió en amplificar y comparar las secuencias de siete genes conservados ("housekeeping") asignando un número a cada alelo. Las diferentes

combinaciones de alelos permitieron asignar un ST para cada microorganismo utilizando la base de datos indicada (Instituto Pasteur, <https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/>).

Se utilizó el esquema recomendado por el Instituto Pasteur (Diancourt *et al.*, 2005) basado en la amplificación de los siguientes genes “housekeeping”: *rpoB* (subunidad beta ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucoisomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor iniciador de la traducción 2) y *tonB* (transductor de energía periplásmico). Los primers y condiciones utilizados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Primers y condiciones utilizadas para la caracterización por MLST de *K. pneumoniae*.

PCR	Primers	Secuencia	Condiciones
<i>rpoB</i>	RpoF RpoR	GGCGAAATGGCGWAGAAACCA GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C.
<i>gapA</i>	gapF gapR	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C.
<i>mdh</i>	mdhF mdhR	CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C.
<i>pgi</i>	pgiF pgiR	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	phoF phoR	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	infF infR	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	tonF tonR	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCTGAGAG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron purificados con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EE.UU.), añadiendo 1 µl de reactivo y 1 µl de H₂O ultrapura estéril por cada 5 µl de producto de PCR, posteriormente se incubaron 15 minutos a 37°C y 15 minutos a 80°C. El producto de PCR purificado fue posteriormente secuenciado en

Macrogen Europe (Macrogen Inc., Amsterdam, TheNetherlands) en secuenciadores Applied Biosystems 3730XL de alto rendimiento y última generación.

Las secuencias obtenidas se controlaron en forma manual utilizando el software Chromas (Science Tools) y bases de datos alélicas del Instituto Pasteur para la asignación de cada alelo (Instituto Pasteur, <https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/>).

4.2.2. Factores de Virulencia

Existe un gran número de genes descritos que contribuyen a la virulencia de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. La diversidad de genes implicados en los procesos de adhesión, colonización, evasión de la respuesta inmune, citotoxinas, obtención de nutrientes, entre otros, otorgan a esta especie la capacidad de comportarse como un patógeno oportunista vinculado frecuentemente a infecciones nosocomiales.

4.2.2.1. Fenotipo Hiper mucoviscoso

La hiperproducción de cápsula representa al fenotipo hiper mucoviscoso y puede visualizarse en diferentes medios sólidos que habitualmente se utilizan para el aislamiento de *K. pneumoniae* a partir de muestras clínicas.

El String Test (o “Prueba del filamento”) consiste en sembrar por agotamiento en cinco estrías, un aislamiento de *K. pneumoniae* en un medio agarizado. Las cepas se sembraron en Agar sangre, Mac Conkey y CLED, y tras incubar a 37°C por 18 hs, se tocó una colonia con un ansa de siembra estéril y se la levantó lentamente observando la formación de un filamento continuo desde la superficie de la colonia hasta una longitud igual o mayor a 0,5 cm (Siu *et al.*, 2012) (Figura 19).

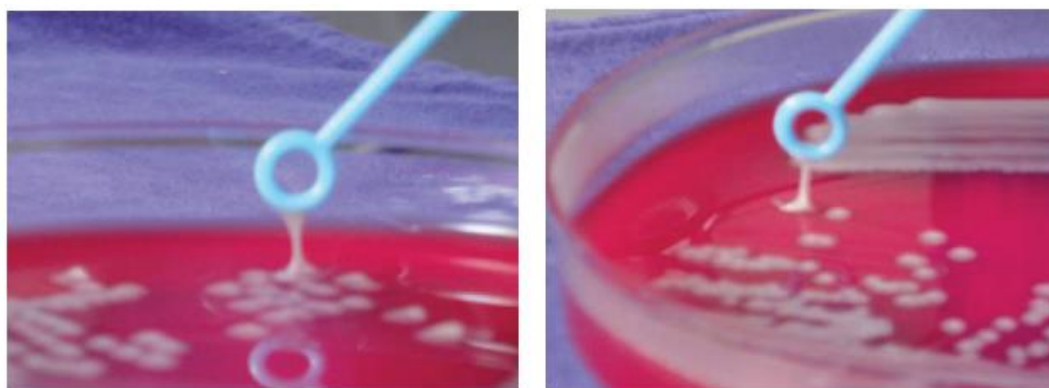


Figura 19. Fenotipo hipermucoviscoso (String Test) en dos cepas de *K. pneumoniae* sembradas en Agar Sangre de Oveja 5%.

4.2.2.2. Detección de genes asociados a la virulencia de *K. pneumoniae*

Se implementaron cuatro PCR múltiples para detectar diferentes genes asociados a la virulencia de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (Candan *et al.*, 2015). En la Tabla 13 se describen los primers utilizados, tipo de factor de virulencia y tamaño de fragmento amplificación.

Tabla 13. Primers utilizados, tipo de factor de virulencia y tamaño de fragmento de amplificación.

PCR	Gen	Primers	Secuencia	Tamaño de fragmento	Factor de virulencia
PCR Múltiple 1	<i>magA</i>	magA-F magA-R	5'-GGTGCTCTTTACATCATTGC-3' 5'-GCAATGGCCATTTGCGTTAG-3'	1282 pb	Serogrupo K1.
	<i>fimH</i>	fimH-F fimH-R	5'-TGCTGCTGGGCTGGTCGATG-3' 5'-GGGAGGGTGACGGTGACATC-3'	688 pb	Fimbria tipo I.
	<i>uge</i>	uge-F uge-R	5'-TCTTCACGCCTTCCTTCACT-3' 5'-GATCATCCGGTCTCCCTGTA-3'	534 pb	Epimerasa.
	<i>iutA</i>	iutA-F iutA-R	5'-GGCTGGACATCATGGGAAGTGG-3' 5'-CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG-3'	300 pb	Aerobactina (Sideróforo).
PCR Múltiple 2	<i>wabG</i>	wabG-F wabG-R	5'-ACCATCGGCCATTTGATAGA-3' 5'-CGGACTGGCAGATCCATATC-3'	683 pb	Componente de pared celular.
	<i>rmpA</i>	rmpA-F rmpA-R	5'-ACTGGGCTACCTCTGCTTCA-3' 5'-CTTGCATGAGCCATCTTTCA-3'	516 pb	Gen regulador plasmídico de hipermucoviscosidad.
	<i>cnf-1</i>	cnf-F cnf-R	5'-AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG-3' 5'-CATTCAAGATCCTGCCCTCATTATT-3'	498 pb	Citotoxina.
	<i>ycfM</i>	ycf-F ycf-R	5'-ATCAGCAGTCGGGTCAGC-3' 5'-CTTCTCCAGCATTTCAGCG-3'	160 pb	Componente de pared celular.
PCR Múltiple 3	<i>hly</i>	hly-F hly-R	5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3' 5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'	1177 pb	Hemolisina
	<i>iroN</i>	iroN-F iroN-R	5'-AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG-3' 5'-GACGCCGACATTAAGACGCAG-3'	665 pb	Salmochelina (Sideróforo).
	<i>k2A</i>	k2A-F k2A-R	5'-CAACCATGGTGGTCGATTAG-3' 5'-TGGTAGCCATATCCCTTTGG-3'	543 pb	Serogrupo K2.
	<i>mrkD</i>	mrkD-F mrkD-R	5'-TTCTGCACAGCGGTCCC-3' 5'-GATACCCGGCGTTTTTCGTTAC-3'	240 pb	Fimbria tipo III.

Tabla 13. Continuación

PCR	Gen	Primers	Secuencia	Tamaño de fragmento	Factor de virulencia
PCR Múltiple 4	<i>kpn</i>	kpn-F kpn-R	5'-GTATGACTCGGGGAAGATTA-3' 5'-CAGAAGCAGCCACCACACG-3'	626 pb	Fimbria tipo I.
	<i>allS</i>	allS-F allS-R	5'-CCGAAACATTACGCACCTTT-3' 5'-ATCACGAAGAGCCAGGTCAC-3	508 pb	Metabolismo de alantoína.
	<i>entB</i>	entB-F entB-R	5'-ATTCCTCAACTTCTGGGGC-3' 5'-AGCATCGGTGGCGGTGGTCA-3'	371 pb	Enterobactina (sideróforo).
	<i>wcaG</i>	wcaG-F wcaG-R	5'-GGTTGGKTCAGCAATCGTA-3' 5'-ACTATTCCGCAACTTTTGC-3'	169 pb	Proteína de membrana externa.

Las mezclas de PCR se conformaron con las mismas proporciones para cada PCR múltiple y sus cebadores. La mezcla consistió en 16,5 µl de agua doble o bidestilada purificada, 2,5 µl de buffer PCR 10X; MgCl₂ 0,75 mM; 0,5 µl de mezcla dNTP 10 mM; 0,25 µl de cada uno de los primers, 0,25 µl de Taq polimerasa (5U/µl) y 2,5 µl de templado para un volumen final de reacción de 25 µl.

Las condiciones de amplificación de cada PCR múltiple fueron idénticas. Pre-desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94°C 60 segundos, annealing a 58°C por 60 segundos y elongación a 72°C por 60 segundos, un elongación final de 10 minutos a 72°C

Los productos de amplificación se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE 1X. La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 Volts durante 30 min.

El estudio exhaustivo del escenario epidemiológico asociado a bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes y desarrollado en los objetivos A y B de esta tesis doctoral, constituyeron la base para plantear el objetivo C.

4.3. Implementación de un programa de vigilancia activa para BRC

4.3.1. Sitio de implementación: descripción edilicia y funcional

El estudio se desarrolló en la unidad de cuidados intensivos 1 (UCI 1) del Hospital Ángel Cruz Padilla, San Miguel de Tucumán. Dicha unidad cuenta con 22 camas, donde son internados pacientes en estado crítico, especialmente con diagnóstico de politrauma y accidentes cerebrovasculares. Se trabajó con la totalidad de los pacientes allí internados. Este servicio cuenta con un código interno de comportamiento para prevenir accidentes, régimen de visita de familiares acotado y actividades formativas constantes para todo el personal.

La UCI 1 cuenta con cuatro sectores diferenciados (Figura 20) con personal de enfermería asignado para desempeñar sus funciones en cada uno.

Cada sector cuenta con zonas indicadas para la eliminación de residuos potencialmente peligrosos con bolsas rojas reforzadas.

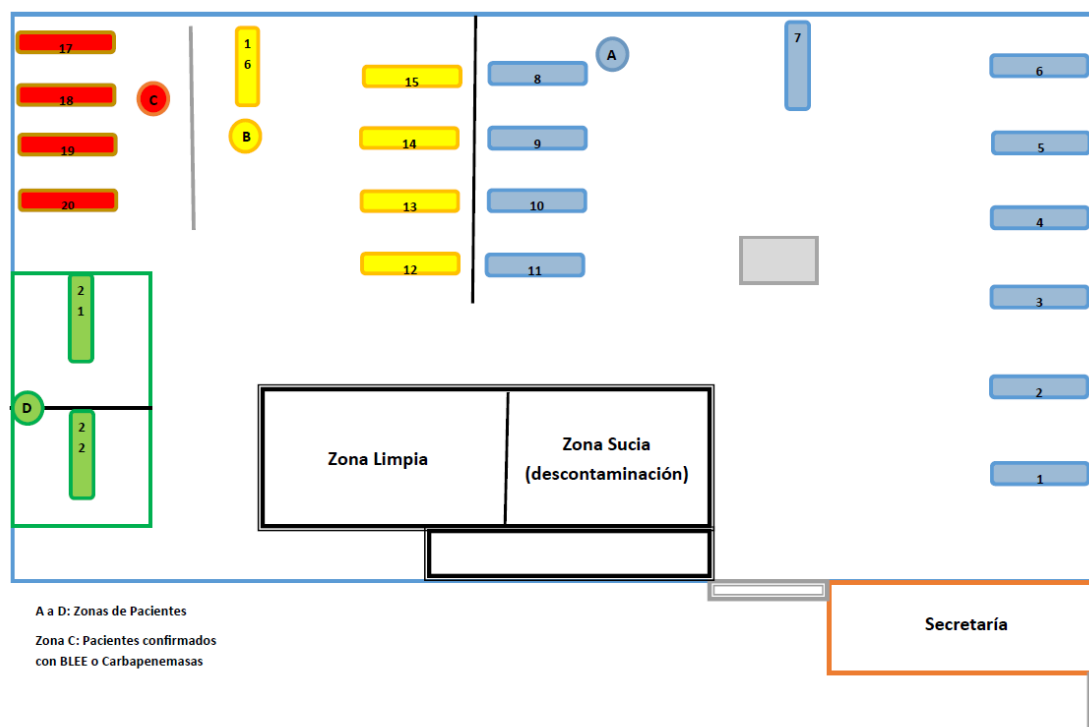


Figura 20. Distribución espacial de las camas y otros sectores de interés en UCI 1.

El **sector A** es aquel destinado al ingreso inmediato de nuevos pacientes en la unidad. Está conformado por 11 camas indicadas con numeración consecutiva 1-11. Posee acceso directo a zonas de descontaminación e higiene de personal.

El **sector B** se encuentra destinado a pacientes con un mayor tiempo de permanencia dentro de la instalación. Cuenta con personal de enfermería específico con turnos rotatorios de 8-16 horas. Entre el sector A y B se encuentra una división física que facilita la sectorización. Cuenta con cinco camas numeradas consecutivamente de 12-16.

El **sector C** se encuentra destinado a pacientes con documentación microbiológica de algún microorganismo MDR. Estos microorganismos pueden encontrarse colonizando al paciente o ser recuperados de muestras clínicas con documentación infectológica. El personal que desempeña sus funciones (interno y externo) sigue rigurosas medidas de contacto, utilizando los EPP (Elementos de protección personal) (Figura 21) indicados y extremando las medidas higiénicas. Entre el sector B y C se encuentran ubicadas unas mamparas móviles que sirven de separación entre los sectores. Actualmente, cuenta con 4 camas identificadas consecutivamente de 17 a 20. Cada paciente en este sector cuenta

con una tarjeta naranja que indica la condición de colonizado o infectado por bacterias MDR.

El **sector D** cuenta con 2 camas con aislamiento físico. Este sector se encuentra reservado a pacientes crónicos con patologías complicadas. El personal de este sector es exclusivo del mismo, como también el material presente dentro de cada habitación.



Figura 21. EPP disponibles para su uso y posterior descarte en UCI 1. De izquierda a derecha: cubrebocas, guantes de latex, camisolín, cofia y cubrebotas.

4.3.2. Periodo de desarrollo del estudio

El estudio se desarrolló en tres etapas. Las etapas 1 y 3 consistieron en periodos de nueve semanas de muestreo, mientras que el periodo 2 consistió en una etapa de implementación de mejoras y capacitación del personal.

- Etapa 1 (Octubre-Diciembre 2018): Se realizó una revisión del estado de situación de la sala UCI 1 y vigilancia basada en cultivo por nueve semanas consecutivas para conocer los BRC colonizantes e infectantes en los pacientes allí internados, sus perfiles de resistencia y los clones prevalentes en esta sala.
- Etapa 2 (Enero-Marzo 2019): Se implementaron acciones de mejora acorde a los resultados obtenidos en la Etapa 1 y se aplicaron normas y procedimientos necesarios, en conjunto con los trabajadores sanitarios a cargo de estos pacientes. En esta etapa se realizaron actividades formativas en conjunto con el Comité de Control de Infecciones del hospital.
- Etapa 3 (Abril-Junio 2019): Se verificó el éxito de las acciones de mejora implementadas; para ello, nuevamente se realizó una revisión del estado de situación 1 y vigilancia basada en cultivo por nueve semanas consecutivas para conocer la evolución/situación de los microorganismos colonizantes e

infectantes en los pacientes internados, sus perfiles de resistencia y la persistencia de clones previamente detectados en la sala UCI 1.

4.3.3. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y prospectivo en el que se analizaron variables clínico-epidemiológicas, microbiológicas y de biología molecular de los bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes aislados.

Para el desarrollo del estudio, fueron definidos los siguientes criterios:

- **Criterios de Inclusión:** se incluyeron todos aquellos pacientes internados en la UCI 1 del Hospital Ángel C. Padilla durante el período de estudio. El ingreso fue registrado por el personal del nosocomio e inmediatamente notificado para realizar la toma de muestra en conjunto con personal de enfermería del hospital.
- **Criterios de exclusión:** no fueron considerados en el desarrollo de este estudio aquellos pacientes pertenecientes a otros servicios del hospital.

En cuanto a las variables clínicas y epidemiológicas, fueron incluidos los siguientes datos:

-**Nombre y apellido:** Se consignaron los nombres y apellidos de los pacientes que figuren en el documento nacional de identidad, o en caso de no poseer uno, en la documentación que acredite la identidad del mismo.

-**Edad:** es el intervalo de tiempo estimado o calculado entre el día, mes y año del nacimiento, y el día, mes y año en que se realizó la toma del cultivo, medido en años.

-**Sexo:** se consignó el género que figura en el documento nacional de identidad (masculino, femenino).

-**Fecha de internación:** la señalará el día, mes y año del ingreso al servicio.

-**Paciente Inmunodeprimido:** Se consideró inmunodeprimido a aquellos pacientes que porten el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en cualquier estadio, pacientes con menos de 1000 neutrófilos de cualquier etiología, que estén en tratamiento con drogas inmunosupresoras o en pacientes oncológicos.

-**Causa de Ingreso:** se registró el diagnóstico que recibió el paciente al momento de ingresar en el servicio.

Las variables microbiológicas incluyeron:

- **Microorganismo aislado:** se consignaron solo las bacterias.
- **Mecanismos de resistencia.**
- **Variables de Biología Molecular.**
- **Genes asociados a la resistencia bacteriana.**

4.3.4. Consideraciones éticas

Previo a la realización del proyecto se solicitó la autorización del Director del Hospital, Comité de Docencia y Comité de Control de Infecciones.

El consentimiento informado no fue necesario para la inclusión de los pacientes dadas las políticas de funcionamiento del nosocomio.

4.3.5. Estudio de portación (Colonización)

Para realizar el estudio de portación de BRC se definieron previamente cuales serían las muestras representativas que aseguren la recuperación de los microorganismos a investigar (Miriagou *et al.*, 2010). Las muestras consideradas aptas para este estudio incluyeron:

- **Hisopado rectal:** para investigar la portación/colonización de *Enterobacterales* y *A. baumannii* resistentes a carbapenemes.
- **Hisopado perianal:** para investigar la portación/colonización de *P. aeruginosa* resistente a carbapenemes.

Los hisopados rectales se tomaron en el momento de la auditoria para evaluar el estado de situación y luego en el protocolo de vigilancia activa en 3 momentos de la hospitalización del paciente: al ingresar a UCI 1, a las 48 horas de internación y, en caso de mantenerse negativos, semanalmente mientras permanecían en el servicio.

Estudios microbiológicos: Las muestras recolectadas se enriquecieron en caldo cerebro corazón (BHI) (BritaniaLab®) con 2 µg/ml de Ertapenem por 6 hs; posteriormente, se sembraron en placas con medio de cultivo cromogénico (CHROMagar™ mSuperCARBATM base, Medica-Tec, Argentina) y se incubaron en aerobiosis a 37°C por 24-48 horas. La morfología de las colonias en mSuperCARBATM permitió orientar a la identificación de diferentes especies o grupos de microorganismos (Figura 22).

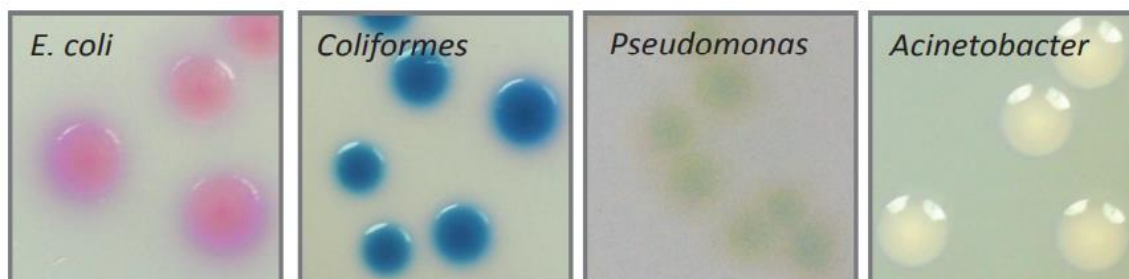


Figura 22. Medio de cultivo cromogénico CHROMagar™ mSuperCARBATM. El uso de medios cromogénicos permite realizar la identificación presuntiva rápida de diferentes microorganismos.

A partir de las colonias desarrolladas en el medio cromogénico, se confirmó la identificación bacteriana por MALDI-TOF (Bruker®); se aceptó su identificación con scores superiores o iguales a 2.000.

El ADN bacteriano total se extrajo por Boiling de las colonias desarrolladas en el medio cromogénico y posteriormente se conservó a -20°C para caracterizar las β -lactamasas implicadas como se detalla en el apartado 4.1.4. En los aislamientos de *K. pneumoniae* fueron evaluados los factores de virulencia descritos en el apartado 4.3.1.2.

Los aislamientos fueron conservados en BHI glicerol 30% a -20°C para estudios de genética poblacional posteriores. La clonalidad de los aislamientos de *K. pneumoniae* fue evaluada siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.1.1. y la definición del ST utilizando el protocolo descrito en el apartado 4.2.1.2.

Para evaluar la clonalidad de los aislamientos de *A. baumannii*, el ADN genómico fue digerido con la endonucleasa de restricción *ApaI* (Promega) y los fragmentos separados por electroforesis en un gel de agarosa preparado como ya fue descrito para *K. pneumoniae* (4.2.1.1.), pero con una modificación en los pulsos cada 5-35 seg por 24 horas (García-Salguero *et al.*, 2020).

4.3.6. Implementación del programa de prevención y control de infecciones

Se constituyó un equipo multidisciplinario con el cual trabajamos en forma conjunta, conformado por infectólogos, microbiólogos, enfermeros, kinesiólogos y personal de mantenimiento. Una vez finalizada la primera semana de muestreo (Auditoría o Sala de Situación), durante la implementación del protocolo de vigilancia activa y en los 3 meses posteriores a su finalización (enero-abril 2019), bajo la coordinación del Comité

de Control de Infecciones y el Servicio de Infectología del nosocomio, se realizaron actividades para optimizar las medidas de control de infecciones complementadas con reuniones multidisciplinarias.

Se reforzaron los siguientes aspectos: a) higiene de manos (monitorización y evaluación de la adherencia al programa de lavado de manos), se suministró jabón antibacteriano con triclosán al 0,4% p/v y solución antiséptica con gluconato de clorhexidina al 0,5% p/v, y alcohol isopropílico al 60% p/v delante de camas de UCI; b) precauciones de contacto para pacientes colonizados por BRC, incluyendo cohorte paciente y personal (designación de personal de enfermería para atender únicamente a los pacientes BRC positivos durante el mismo turno); c) limpieza ambiental, incluyó la desinfección de las camas y su entorno (solución de cloro para el suelo y paredes adyacentes o compuestos de amonio cuaternario para monitores, ventiladores, etc.), durante la hospitalización del paciente y después del alta; d) administración restringida de antimicrobianos (formulario restringido para carbapenemes, piperacilina/tazobactam, cefalosporinas, fluoroquinolonas, colistina y tigeciclina); y e) educación del personal: se realizaron reuniones periódicas y multidisciplinarias para impartir educación y capacitar al personal de la UCI (especial referencia a la diseminación BGNCR y a la importancia de aplicar la MCI para reducirla al mínimo) (Karampatakis *et al.*, 2018).

Finalmente, en la etapa 3 se verificó el éxito de las acciones de mejora implementadas; para ello, nuevamente se realizó una revisión del estado de situación y la vigilancia basada en cultivo, evaluando el impacto de este protocolo en la UCI estudiada.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Descripción del contexto clínico y epidemiológico de las principales Enterobacterias asociadas a carbapenemasas en un hospital regional de referencia

5.1.1. Población objetivo: pacientes infectados por ERC, incidencia y relación con la mortalidad

Durante el periodo mayo-octubre del 2014 fueron recuperados 126 aislamientos bacterianos no duplicados compatibles con *Enterobacterias* resistentes a carbapenemes de pacientes hospitalizados en el Hospital Ángel C. Padilla.

Todos los aislamientos fueron identificados taxonómicamente utilizando la tecnología Vitek 2® (Biomérieux) y MALDI-TOF (Bruker) hasta la categoría de especie. Considerando los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos, 69 pacientes entre los 126 identificados inicialmente (54,76%) fueron incluidos en el estudio y sus correspondientes aislamientos fueron posteriormente caracterizados. En la Figura 23 se encuentran detalladas las especies bacterianas recuperadas de aquellos pacientes infectados que cumplían con los criterios de inclusión propuestos. La especies bacterianas predominantes fueron *K. pneumoniae*, y en menor medida *K. aerogenes*.

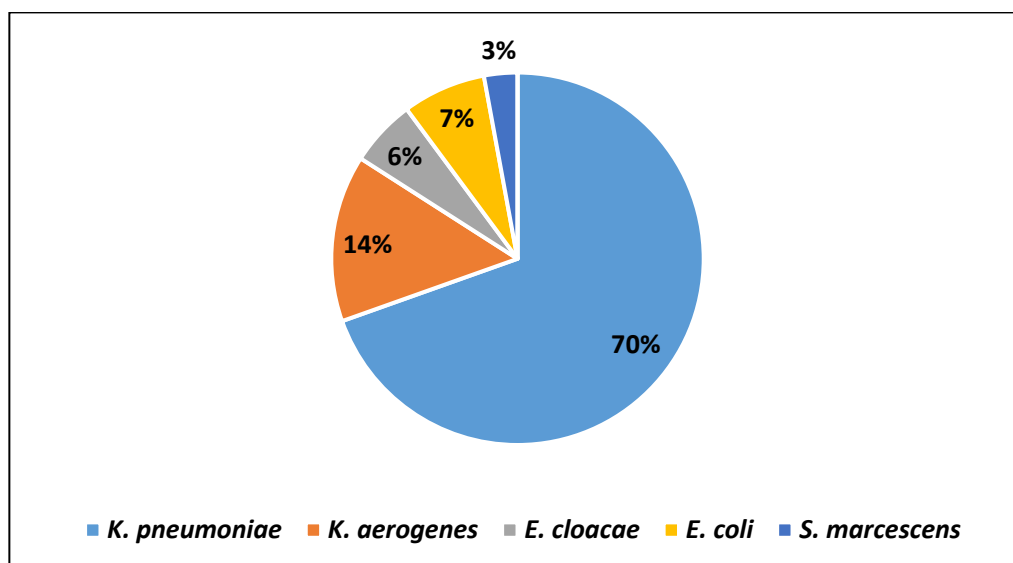


Figura 23. Especies bacterianas resistentes a carbapenemes recuperadas de pacientes infectados (n=69).

Este estudio se centró en los microorganismos recuperados de pacientes con documentación clínica de infección, por lo que los 57 aislamientos considerados como colonizantes no fueron incluidos en estudios posteriores.

Entre las 69 cepas incluidas en el estudio, *K. pneumoniae* resistente a los carbapenemes fue el microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento (69,56%; 48/69), seguido por *K. aerogenes* (14,49%; 10/69), *E. coli* (7,25%; 5/69), *Enterobacter* grupo *cloacae* (5,79%; 4/69) y *S. marcescens* (2,89%; 2/69).

El rango de edad de los pacientes infectados con ERC fue de 20 a 90 años, siendo la edad promedio del grupo 50 años. No se encontraron diferencias significativas en la edad de los pacientes entre los distintos servicios. El 66% (42/69) de los pacientes infectados con EPC eran hombres.

Las infecciones más frecuentes de donde se aislaron los patógenos fueron las del tracto urinario (ITU) (30,43%; 21/69), seguidas en igual medida por infecciones de sitio quirúrgico (ISQ) e infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI) (20,29%; 14/69), infecciones asociadas a catéteres e infecciones intraabdominales (8,69%; 6/69), infección osteoarticular (5,79; 4/69) y bacteriemias (5,79; 4/69).

La media de días de ingreso fue de 30 días para la adquisición de una infección por ERC con un rango de 3 a 160 días. Esta variación se mantuvo entre las áreas médicas del nosocomio y estuvo condicionada por la gravedad del paciente al momento de ingresar a la institución, y por la diversidad de procedimientos médicos a los cuales fueron expuestos.

En la Figura 24 pueden observarse las salas de adquisición de las ERC. Los aislamientos de ERC fueron recuperados principalmente de pacientes admitidos en UTI (57,97%; 40/69) y Sala 3 (13,04; 9/69). El hospital cuenta con 4 unidades de cuidados intensivos que no fueron diferenciadas al momento de registrar la procedencia de las muestras y sus correspondientes aislamientos.

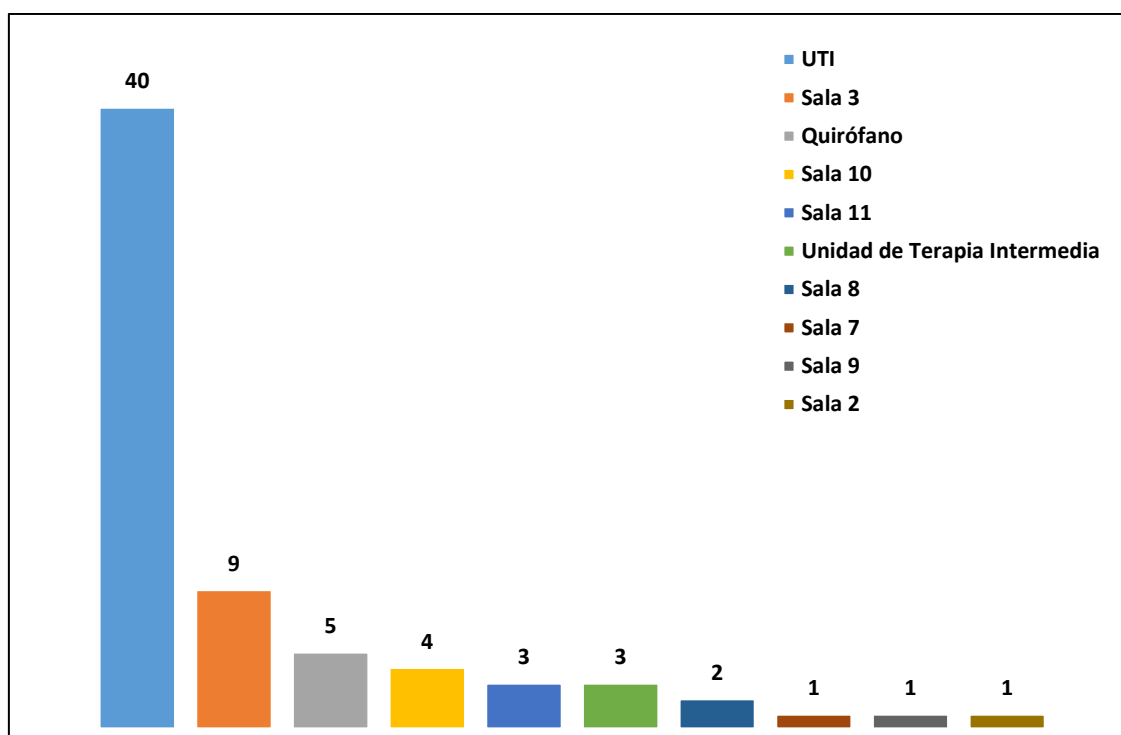


Figura 24. Salas de adquisición de *Enterobacterales* resistentes a carbapenemes en pacientes infectados.

La media del Score de Charlson fue de 2,9. Este sistema evalúa tanto la edad del paciente como sus comorbilidades. Valores superiores o iguales a 2, son predictores de mortalidad en los pacientes y severidad de los cuadros clínicos. Los pacientes con comorbilidades representaron el 43,48% (30/69) de la población incluida en el estudio; entre ellos, el 43,33% (13/30) fueron pacientes con diabetes, 26,67% (8/30) con neoplasias de órgano sólido, 23,33% (7/30) con insuficiencia renal y 6,67% (2/30) con enfermedad reumática.

Entre las causas de ingreso de los pacientes al nosocomio se destacaron los politraumas (27/69; 39,13%), complicaciones asociadas a diabetes (10/69; 14,49%), neoplasias de órgano sólido (8/69; 11,59%), y accidentes cerebrovasculares (8/69; 11,59%), entre otros. Las causas de admisión a la institución coincidieron con las situaciones clínicas para las cuales se encuentra preparada la institución (Tabla 14).

Tabla 14. Características clínicas-epidemiológicas de 69 pacientes incluidos en el estudio.

Características Poblacionales	Número de pacientes (%)
Sexo	
Masculino	42 (66%)
Femenino	27 (34%)
Comorbilidades	
Diabetes	13 (18,9%)
Neoplasia	8 (11,6%)
Insuficiencia Renal	7 (10,1%)
Enfermedad reumatoidea	2 (2,9%)
Sin comorbilidades	39 (56,5%)
Sala de Adquisición	
Unidad de Cuidados Intensivos	40 (57,9%)
Sala 3	9 (13,0%)
Quirófano	5 (7,3%)
Sala 10	4 (5,9%)
Sala 11	3 (4,4%)
Unidad de Cuidados Intermedios	3 (4,4%)
Sala 8	2 (2,9%)
Sala 7	1 (1,4%)
Sala 9	1 (1,4%)
Sala 2	1 (1,4%)
Tipo de infecciones	
Infección de Tracto Urinario	21 (30,4%)
Infección de Sitio Quirúrgico	14 (20,3%)
Infección Tracto Respiratorio	14 (20,3%)
Infección Intraabdominal	6 (8,7%)
Infección asociada a catéteres	6 (8,7%)
Infección Osteoarticular	4 (5,8%)
Bacteremia	4 (5,8%)
Causa de ingreso al hospital	
Politraumas	27 (39,1%)
Complicaciones asociadas a diabetes	10 (14,5%)
Neoplasia	8 (11,6%)
Accidente cerebro vascular	8 (11,6%)
Otras	16 (23,2%)

En la Figura 25 pueden observarse los porcentajes de resistencia de las especies recuperadas con mayor frecuencia a los principales grupos de antibióticos. Con respecto a las especies menos frecuentes, todos los aislamientos pertenecientes al complejo de especie *E. cloacae* demostraron resistencia a carbapenemes, fluoroquinolonas, TMS y

gentamicina; y presentaron sensibilidad a ampicacina, colistin y tigeciclina; mientras que los aislamientos de *S. marcescens* fueron resistentes a los carbapenemes y colistin (resistencia natural) y sensibles a las otras familias de antibióticos evaluados.

Los esquemas de tratamiento antibiótico, fueron definidos por el personal médico del departamento de infectología del nosocomio, los cuales fueron instaurados considerando la epidemiología local. En el caso de las infecciones por ERC, el 88% (60/69) de los pacientes recibió un esquema empírico inadecuado. Este esquema se basaba en la utilización de Piperacilina/tazobactam o quinolonas para los cuales los niveles de resistencia de los patógenos fueron elevados.

La mortalidad global y atribuible, y el índice de infecciones por ERC fueron calculados por el equipo de estadística del nosocomio. La mortalidad global durante el periodo de estudio fue del 31,88% (22/69); mientras que la mortalidad atribuida a infecciones por ERC fue 21,74% (15/69). La incidencia de ERC en el hospital fue de 11,6 cada 1000 pacientes.

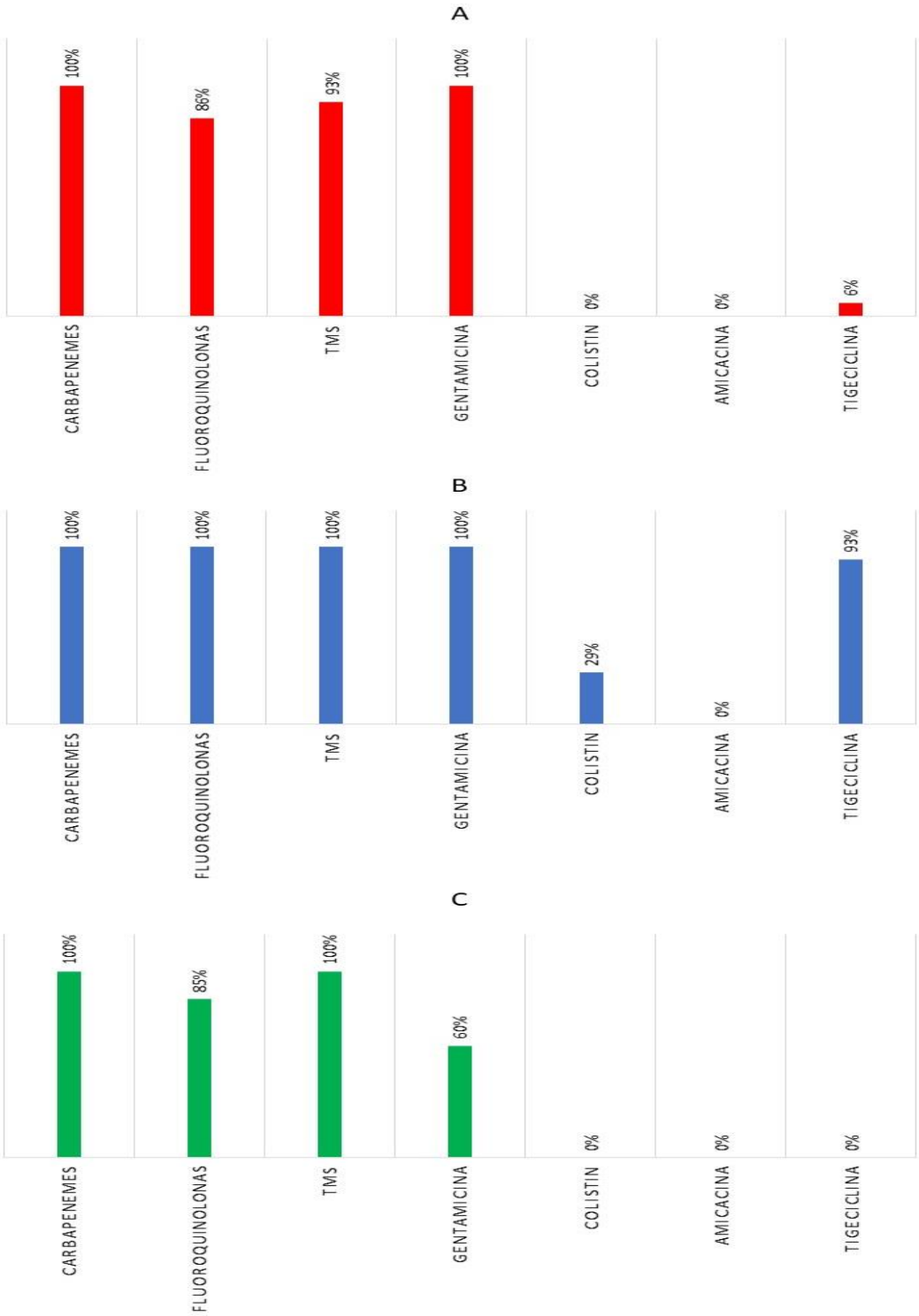


Figura 25. Porcentaje de resistencia a las principales familias de antimicrobianos de las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia en el periodo de estudio. A: Perfil de susceptibilidad de *K. pneumoniae*. B: Perfil de susceptibilidad de *K. aerogenes*. C: Perfil de susceptibilidad de *E. coli*.

5.1.2. Detección de β -lactamasas y caracterización de plásmidos involucrados en la diseminación y persistencia de la resistencia a los carbapenemes

Las 69 cepas resistentes a los carbapenemes aisladas durante el estudio fueron caracterizadas por biología molecular para evaluar el tipo de carbapenemasa implicada en el fenotipo demostrado previamente *in vitro*.

5.1.2.1. Detección y secuenciación de genes que codifican para las enzimas carbapenemasas

Los genes asociados con la resistencia a los carbapenemes de mayor relevancia clínica y epidemiológica tales como *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} fueron identificados por PCR. Los 69 aislamientos fueron positivos al gen *bla*_{KPC}. Por secuenciación se determinó la presencia de la variante alélica KPC-2. Ningún aislamiento fue productor de Oxacilinasas ni de MBL.

Los aislamientos correspondientes a las especies resistentes a carbapenemes detectadas con mayor frecuencia fueron seleccionados para evaluar la presencia de BLEE por PCR.

Los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes, presentaron además BLEE tipo CTX-M-2 (21/4845%;), tipo SHV-2 (14/4828,6%;) y asociaciones de CTX-M-2/SHV-2 (7/4814.3%;).

Todos los aislamientos de *K. aerogenes* presentaron, además del gen *bla*_{KPC-2}, los determinantes genéticos para las enzimas de tipo CTX-M-15 y SHV-2.

5.1.2.2. Ensayos de conjugación y caracterización molecular de plásmidos

Los ensayos de conjugación en medio sólido fueron realizados con 35 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-2. En este ensayo se observó que 32 de los 35 aislamientos fueron capaces de transferir el material genético de resistencia antibiótica, indicando su alta eficiencia de conjugación. Las cepas de *E. coli* transconjugantes resultaron resistentes a azida y a carbapenemes.

Todos los transconjugantes fueron confirmados como *E. coli* utilizando esquemas de identificación convencionales, y confirmación por PCR del gen *bla*_{KPC}.

Los ensayos de conjugación fueron realizados a dos temperaturas de contacto (25°C y 37°C) y en ambas se recuperaron cepas transconjugantes. La eficiencia de conjugación a 37°C fue mayor que a 25°C, obteniéndose ocho y cuatro colonias en promedio, respectivamente (Figura 26).

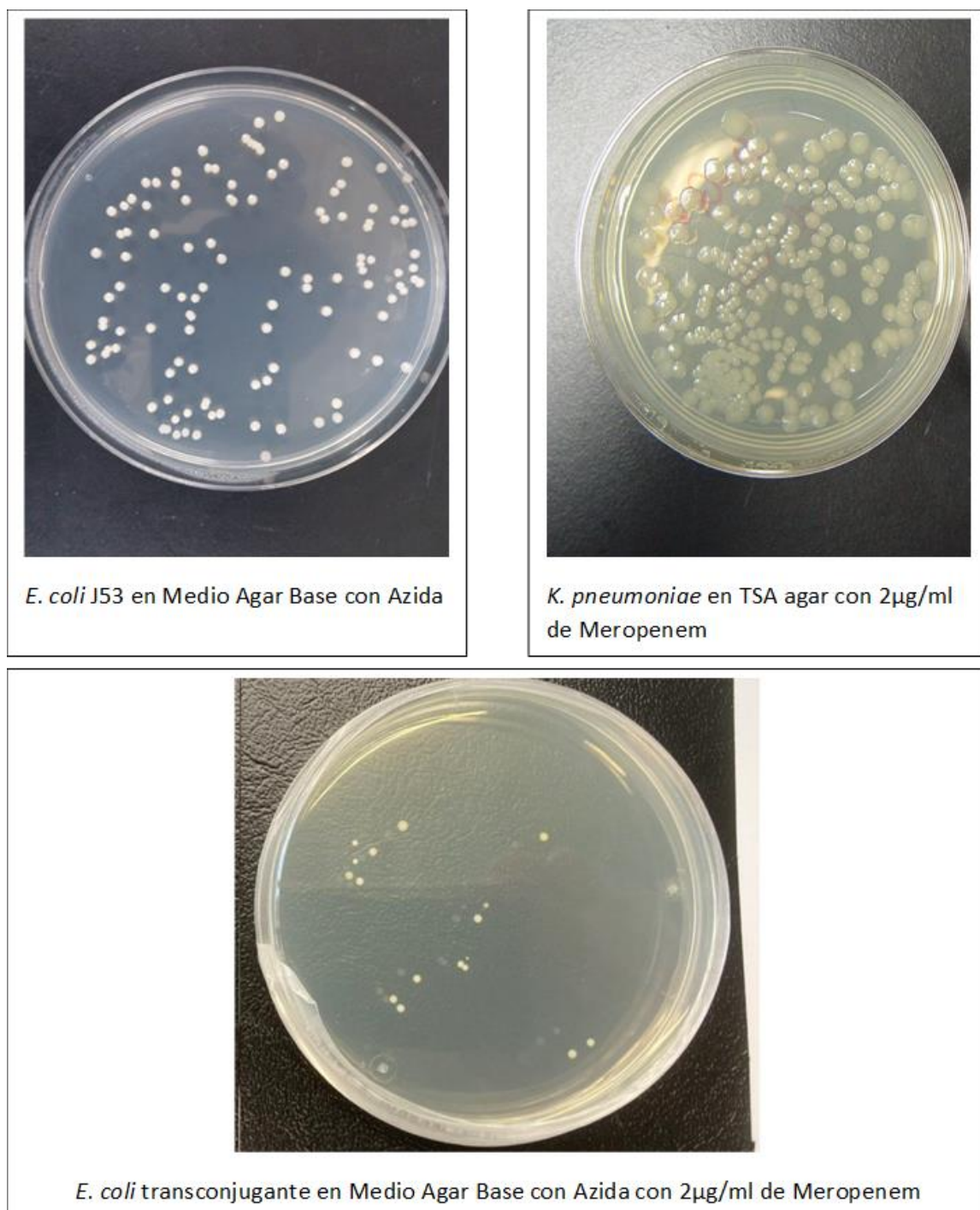


Figura 26. Morfología de colonias donantes, receptoras y transconjugantes observadas en sus correspondientes medios de cultivo.

Tras obtener los transconjugantes, se caracterizaron los grupos de incompatibilidad (Inc) por PCR siguiendo el protocolo de *Carattoli et al.*, 2009. Los plasmidos identificados en todos los aislamientos de *K. pneumoniae* incluidos en el estudio y los correspondientes transconjugantes en *E. coli* presentaron un producto de amplificación cuando se utilizaron los primers correspondientes al grupo de incompatibilidad IncL/M. Mientras que los genes de relaxasas asociados a los grupos de incompatibilidad HI1, HI2, I1, X, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIAs, K, B/O ò F, no fueron detectados.

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a diferentes antibióticos de todos los transconjugantes (*E. coli bla_{KPC}*), la cepa dadora (*E. coli* J53) y los aislamientos de *K. pneumoniae* sometidos al estudio. En la Tabla 15 se encuentran detallados los valores de CIM50 y CIM90 obtenidos para los distintos grupos de microorganismos.

Tabla 15. Valores de CIM50 y CIM90 obtenidos para los distintos grupos de microorganismos.

Antibióticos	<i>K. pneumoniae</i> Donantes		<i>E. coli</i> Receptor		<i>E. coli</i> Transconjugantes	
	CIM50 (mg/L)	CIM90 (mg/L)	CIM50 (mg/L)	CIM90 (mg/L)	CIM50 (mg/L)	CIM90 (mg/L)
Ampicilina	≥32	≥32	4	4	≥32	≥32
Ampicilina/Sulbactam	≥32	≥32	4	4	≥32	≥32
Piperacilina/Tazobactam	≥128	≥128	1	1	128	≥128
Cefalotina	≥64	≥64	1	1	≥64	≥64
Cefotaxima	64	≥64	0,064	0,064	32	≥64
Ceftazidima	16	≥16	0,25	0,25	16	≥16
Cefepime	16	≥16	0,064	0,064	16	≥16
Meropenem	≥32	≥64	0,125	0,125	8	8
Imipenem	≥32	≥64	0,125	0,125	8	8
Gentamicina	≥16	≥16	0,25	0,25	0,25	0,25
Amicacina	2	2	0,25	0,25	0,25	0,25
Colistina	0,5	0,5	-	-	-	-
Ciprofloxacina	2	2	0,015	0,015	0,015	0,015

5.2. Caracterización molecular de aislamientos bacterianos recuperados, tipos clonales y su implicancia epidemiológica.

5.2.1. Estructura poblacional

Las técnicas de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y “*Multilocus Sequence Typing*” demostraron una elevada diversidad clonal entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y una estrecha relación clonal entre las cepas de *K. aerogenes* intrahospitalarias en el periodo de estudio.

5.2.1.1. *Klebsiella pneumoniae*

En la Figura 27 pueden observarse los diferentes pulsotipos generados tras la digestión enzimática con *XbaI*. Fueron identificados 20 pulsotipos diferentes entre los 35 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 recuperados de pacientes infectados los que se agruparon en clusters (A-S). Teniendo en cuenta los criterios de agrupamiento definidos por Tenover, los aislamientos fueron considerados de un mismo clon cuando presentaban una identidad genética $\geq 70\%$, o menos de 4 fragmentos diferentes en los perfiles de PFGE. Para contribuir al agrupamiento de los clusters se definió un índice de Dice con optimización 1% y tolerancia 1%, es decir, mayor homología entre las asociaciones de bandas pesadas y livianas representan mayor identidad compartida.

Fueron seleccionados al menos dos representantes de cada pulsotipo para definir el ST por MLST. El MLST es la metodología de referencia para definir a que ST pertenece un aislamiento y de esta forma evaluar su comportamiento epidemiológico. Los pulsotipos correspondieron a 10 STs, siendo predominante el ST25 (Cluster A-C; n=14); dicho secuenciotipo es considerado emergente e hipervirulento debido a los factores de virulencia con los cuales es asociado. Fueron además detectados otros ST minoritarios como ST17 (Cluster D-F; n=5), ST629 (G-H; n=4), ST147 (J; n=2), ST268 (K; n=1), ST258 (L; n=1), ST995 (I; n=1), ST111 (Q; n=1), ST133 (R; n=1), ST551 (S; n=1) y cuatro aislamientos con combinaciones alélicas no descritas previamente. En la Figura 27 se encuentran detallados los pulsotipos y sus correspondientes ST.

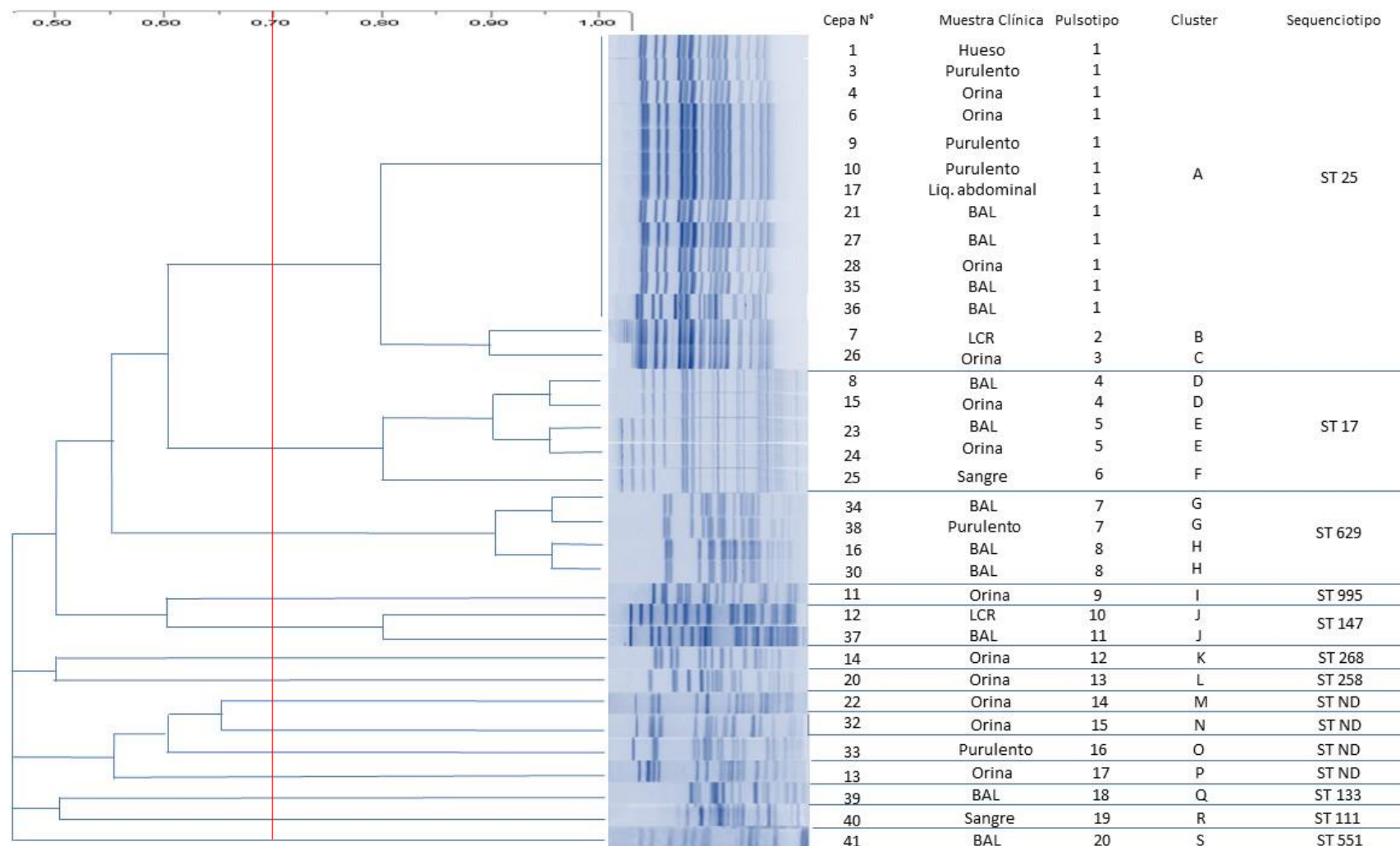


Figura 27. Dendrograma de aislamientos de *K. pneumoniae* KPC-2 recuperados de pacientes infectados.

5.2.1.2. *Klebsiella aerogenes*

Fueron identificados 14 aislamientos de *K. aerogenes* resistentes a carbapenemes, 10 en pacientes con documentación clínica de infección y 4 en pacientes colonizados.

Por PFGE (Figura 28) pudo detectarse un clon mayoritario que incluía a 12 de los 14 aislamientos, mientras que las dos cepas restantes demostraban ligeras similitudes entre ellas (Más de 4 bandas de diferencia). Combinando la información clínica de los pacientes de los cuales fueron recuperados los aislamientos previamente pudo evaluarse la relación epidemiológica entre los aislamientos y concluir que se trató de un brote (Figura 29).

El brote intrahospitalario se originó a mediados de junio entre pacientes ubicados en las UCI del hospital (n=3) y la Sala 10 (n=1). Posteriormente, hasta fines de septiembre fueron detectados aislamientos de *K. aerogenes* resistentes a carbapenemes en UCI y otras salas. Se analizó la sensibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *K. aerogenes* obtenidos en este periodo (Tabla 16). Los aislamientos demostraron resistencia a todos los β -lactámicos (100%), quinolonas fluoradas (100%), fosfomicina (100%), gentamicina (100%) y TMS (92,8%), y sensibilidad a ampicacina y tigeciclina. El 28% (4/14) de los aislamientos demostraron resistencia a polimixinas por mecanismos no plasmídicos; fueron negativos para el gen *mcr-1* por PCR (gen responsable de codificar la resistencia plasmídica a polimixinas en *Enterobacterales*). Estos resultados demuestran la importancia de identificar la dimensión del brote dentro del hospital ya que los aislamientos presentaron elevados niveles de resistencia a los antimicrobianos y la presencia de diferentes β -lactamasas simultáneamente.

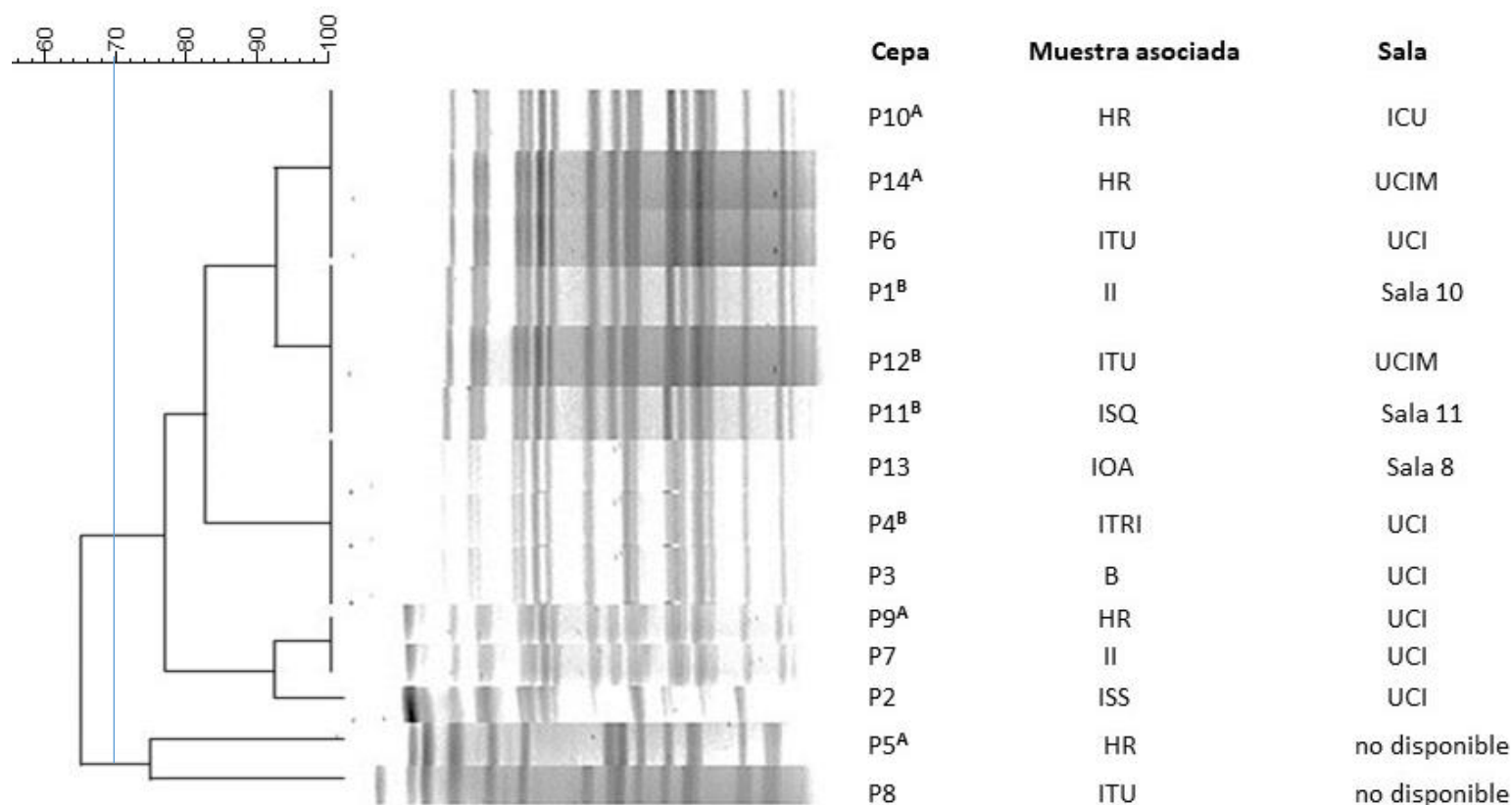


Figura 28. Dendrograma de aislamientos de *K. aerogenes* KPC-2 recuperados de pacientes infectados. Referencias: P: paciente; UCI: unidad de cuidados intensivos; UCIM: unidad de cuidados intermedios; HR: Hisopado rectal; II: infección intraabdominal; ISQ: infección de sitio quirúrgico; ITRI: infección del tracto respiratorio inferior; ITU: infección del tracto urinario; IOA: infección osteoarticular; B: bacteriemia. A: aislamiento recuperado de paciente colonizado; B: aislamiento resistente a colistin.

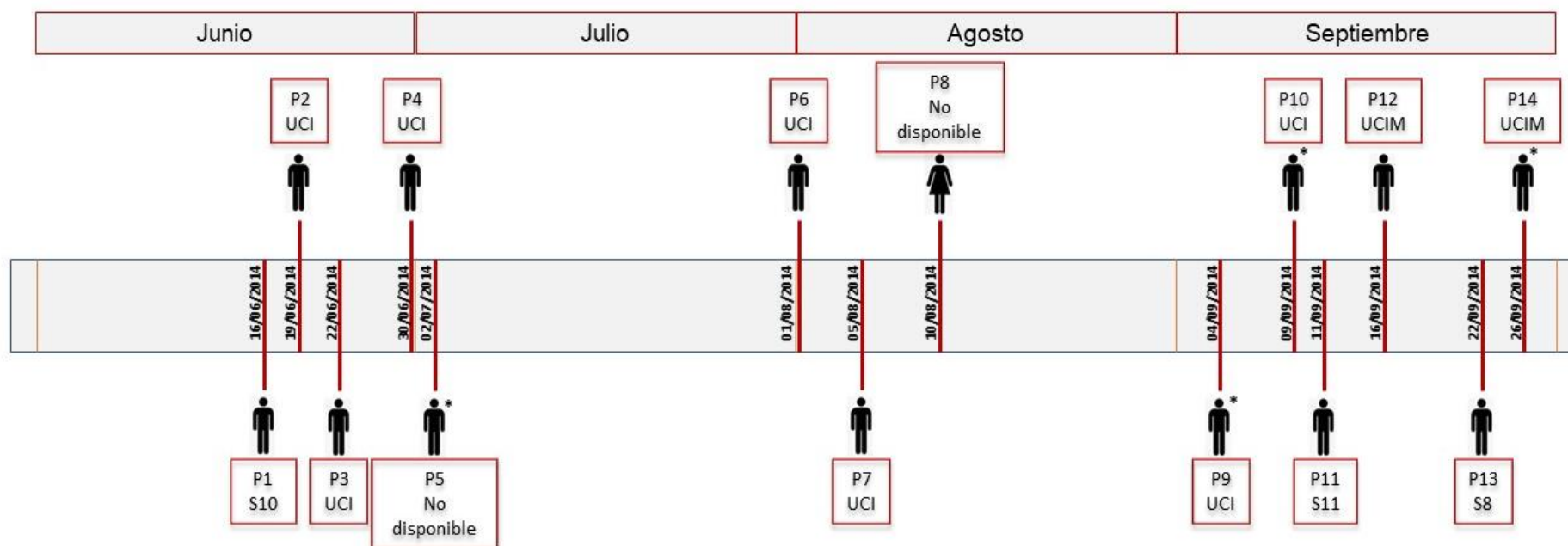


Figura 29. Distribución de aislamientos de *K. aerogenes* productores de KPC-2. Referencias: P: paciente; S: sala UCI: unidad de cuidados intensivos; UCIM: unidad de cuidados intermedios; *pacientes colonizados

Tabla 16. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *K. aerogenes* productores de KPC-2.

	Rango (µg/ml)	Punto de corte			CIM 50 (µg/ml)	CIM 90 (µg/ml)	Numero de cepas R (%)
		Susceptible (µg/ml)	Intermedio (µg/ml)	Resistente (µg/ml)			
AMP	32 - 128	≤8	16	≥32	32	32	14 (100)
SAM	32 - 128	≤8	16	≥32	32	32	14 (100)
PTAZ	128 - 256	≤16	32 - 64	≥128	128	128	14 (100)
CEF	16 - 128	≤2	4	≥8	64	64	14 (100)
CTX	32 - ≥64	≤1	2	≥4	64	64	14 (100)
CAZ	32 - 128	≤4	8	≥16	64	64	14 (100)
CEP	2 - ≥64	≤2	4 - 8	≥16	16	≥64	8 (57%)
IMP	16 - 64	≤1	2	≥4	≥16	≥16	14 (100)
MER	16 - 64	≤1	2	≥4	≥16	≥16	14 (100)
AK	≤2 - 16	≤16	32	≥64	8	16	0 (0)
GEN	16 - 32	≤4	8	≥16	16	32	14 (100)
FOS*	32 - 128	≤16	-	≥32	32	32	14 (100)
CIP	1 - ≥4	≤0,5	-	≥1	≥4	≥4	14 (100)
TGC*	0,125 - 0,25	≤0,5	-	≥0,5	0,25	0,25	0 (0)
COL	0,25 - 16	≤2	-	≥4	2	16	4 (28,6)
TMS	40 - ≥320	≤40	-	≥80	≥320	≥320	13 (92,8)

Referencias: R: Resistentes; AMP: ampicilina; SAM: ampicilina/sulbactam; PTAZ: piperacilina/tazobactam; CEF: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CEP: cefepime; MER: meropenem; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; AK: amikacina; TMS: trimetoprima/sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacina; TGC: tigeciclina; FOS: fosfomicina; COL: colistina.

5.2.2. Factores de virulencia de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes

Como se detalló previamente, evaluamos la presencia de los principales factores de virulencia descritos en la literatura en los aislamientos de *K. pneumoniae* debido a su marcado predominio. La evaluación de los factores de virulencia se realizó por PCR múltiple para los genes: *magA*, *fimH*, *uge*, *iutA*, *wabG*, *rmpA*, *cnf-1*, *ycfM*, *hly*, *iroN*, *k2A*, *mrkD*, *kpn*, *allS*, *entB* y *wcaG*. Entre los factores de virulencia investigados, los predominantemente detectados fueron adhesinas (97,1%, 34/35), sideróforos (94,3%; 33/35) y elementos de resistencia a la fagocitosis (74,3% 26/35). El serotipo capsular K2 fue identificado en el 68,6% (24/35) de los aislamientos y no fue detectado el serogrupo K1. Otros serogrupos no fueron investigados. En la Tabla 17 se encuentran detallados los factores de virulencia detectados en cada aislamiento. No fueron detectados los genes plasmídicos asociados al fenotipo hipermucoviscoso (*rmpA*), aunque todas las cepas demostraron este fenotipo. La información recolectada permitió completar la caracterización de los clones identificados.

Tabla 17. β -lactamasas y genes virulencia detectados en aislamientos de *K. pneumoniae*.

ST/ Tipo Capsular	Cepas	Muestras Clínicas	β -lactamasas	Perfil de genes de Virulencia
ST25/K2	1	Ósea	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge,wabG,ycfM,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
	3	Purulento	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
	4	Orina	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>Uge,ycfM,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
	6	Orina	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge,wabG,ycfM,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
	7	LCR	KPC-2, TEM	<i>uge,mrkD,kpn,entB</i>
	9	Purulento	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>Uge,wabG,ycfM,iroN,kpn,entB</i>
	10	Purulento	KPC-2, TEM	<i>uge,wabG,iroN,kpn,entB</i>
	21	BAL	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge,ycfM,mrkD,kpn,entB</i>
	26	Orina	KPC-2, CTX-M-U, SHV, TEM	<i>mrkD,kpn,entB</i>
	27	BAL	KPC-2, CTX-M-U, SHV, TEM	<i>ycfM,mrkD,kpn,entB</i>
	28	Orina	KPC-2, CTX-M-U, SHV, TEM	<i>ycfM,mrkD,kpn,entB</i>
	35	BAL	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge,wabG,ycfM,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
	36	BAL	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>Uge,wabG,ycfM,iroN,kpn,entB</i>
S25/NT	17	Líqu. Abdominal	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>ycfM,kpn,entB</i>
ST17/K2	8	BAL	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>Uge,ycfM,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
ST17/NT	15	Orina	KPC-2,SHV,TEM	<i>uge,wabG,ycfM,kpn,entB</i>
	23	BAL	KPC-2,SHV,TEM	-
	24	Orina	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>kpn,etnB</i>
	25	Hemocultivo	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>mrkD,kpn,entB</i>
ST629/K2	16	BAL	KPC-2, TEM	<i>wabG,ycfM,mrkD,kpn,entB</i>
	30	BAL	KPC-2,SHV,TEM	<i>uge,wabG,ycfM,iroN,mrkD,kpn,entB</i>
	34	BAL	KPC-2, TEM	<i>ycfM,kpn,entB</i>
ST629/NT	38	Purulento	KPC-2,SHV,TEM	<i>uge,kpn,entB</i>
ST995/K2	11	Orina	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge,mrkD,kpn,entB</i>
ST147/NT	12	LCR	KPC-2,SHV,TEM	<i>uge,kpn,entB</i>
	37	BAL	KPC-2,SHV,TEM	<i>uge,mrkD,kpn,entB</i>
ST258/K2	20	Orina	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>mrkD,kpn,entB</i>

Tabla 3. Continuación.

ST268/K2	14	Orina	KPC-2, CTX-M-U, SHV, TEM	<i>uge, mrkD, kpn, entB</i>
ST133/K2	39	BAL	KPC-2, SHV, TEM	<i>mrkD, kpn, entB</i>
ST111/NT	40	Hemocultivo	KPC-2, CTX-M-U, SHV, TEM	<i>uge, kpn, entB</i>
ST551/NT	41	BAL	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>entB</i>
Clon5/K2	13	Orina	KPC-2, SHV, TEM	<i>kpn, etnB</i>
Clon10/K2	22	Orina	KPC-2, SHV, TEM	<i>magA, uge, ycfM, mrkD</i>
Clon11/NT	32	Orina	KPC-2, CTX-M-U, TEM	<i>uge, wabG, iroN, kpn, entB</i>
Clon12/K2	33	Purulento	KPC-2, SHV, TEM	<i>uge, wabG, ycfM, iroN, mrkD, kpn, entB</i>

Referencias: genes asociados con resistencia a fagocitosis (*uge, ycfM, wca6*), adhesinas (*mrkD, kpn*), elementos capsulares (*magA, k2A*), sideróforos (*entB, iroN*), asociados con la pared celular (*wabG*). K2: antígeno capsular 2. NT: no tipable. BAL: lavado broncoalveolar. LCR: líquido cefalorraquídeo.

5.3. Desarrollo de un protocolo integral de vigilancia activa para bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes en una Unidad de Cuidados Intensivos

Nos propusimos desarrollar un protocolo integral basado en cultivo para evaluar la presencia de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes en pacientes internados en una UCI. Para ello, conformamos un equipo multidisciplinario con la finalidad de evaluar la presencia y diseminación de estos microorganismos, y a su vez, implementar medidas de control fundamentadas en evidencia microbiológica.

Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo de tesis detallan la epidemiología y diversidad de especies de Bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemasas (BRC) aislados en la UCI 1 del Hospital Ángel C. Padilla durante el desarrollo del programa de vigilancia activa. También se caracterizaron los genes de resistencia y la diversidad clonal de las especies bacterianas predominantes a lo largo del tiempo.

Se incluyeron en este estudio 169 pacientes internados en una UCI (denominada UCI1 dentro del nosocomio). 37 pacientes fueron registrados durante las auditorías (primera semana de muestreo de cada etapa; las auditorías permiten evaluar el status sanitario para identificar pacientes colonizados y generar un punto de partida para la toma de decisiones) correspondientes a la primera semana de cada etapa; y 132 participantes del programa de vigilancia activa (etapas 1 y 3).

Evaluamos la distribución semanal de pacientes colonizados vs total de pacientes muestreados a lo largo del estudio (Figura 30), además de los BRC aislados y las carbapenemasas asociadas a estos (Figura 31).

En la auditoría correspondiente a la etapa 1 del desarrollo del protocolo, fueron identificados un total de 18 pacientes. 7/18 pacientes (38,9%) presentaron colonización rectal por BRC: *A. baumannii* productor de IMP-1 (n=3), *K. pneumoniae* KPC-2 (n=1), asociación de diferentes especies (n=3), *A. baumannii* IMP-1 + *K. pneumoniae* KPC-2 (n=2) y *A. baumannii* IMP-1 + *P. aeruginosa* VIM-2 (n=1). En la segunda auditoría, 6/19 pacientes

resultaron colonizados (31,6%), con predominio de *K. pneumoniae* productor de KPC-2 (n=6). Ningún paciente presentó asociación de BRC en esta auditoría.

Durante el periodo de vigilancia activa, 13 de los 68 pacientes (19%) que participaron en la etapa 1 resultaron colonizados con BRC, 12 (92%) con *K. pneumoniae* KPC-2 y un paciente (8%) simultáneamente con *K. pneumoniae*, *E. coli* y *A. baumannii* productores de OXA-48-like. Posteriormente, en el segundo período de este programa participaron 64 pacientes, de los cuales 8 demostraron estar colonizados con BRC (12%), 5 con *K. pneumoniae* KPC-2, 2 (25%) con *A. baumannii* OXA-48-like y VIM-1 y un paciente (12%) con *E. coli* OXA-48-like (Figura 31).

RESULTADOS

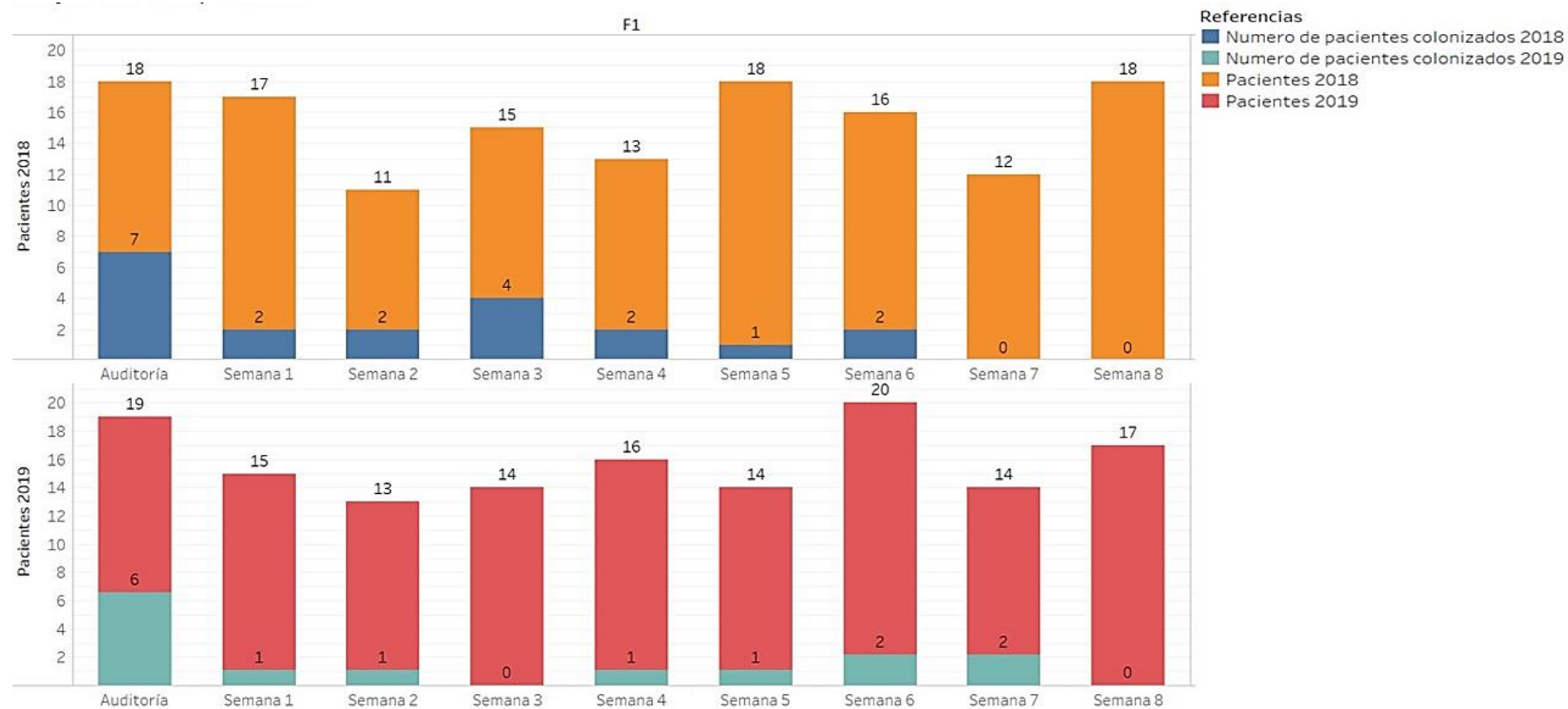


Figura 30. Distribución semanal de pacientes colonizados vs total de pacientes muestreados en UCI 1 durante la ejecución del protocolo.

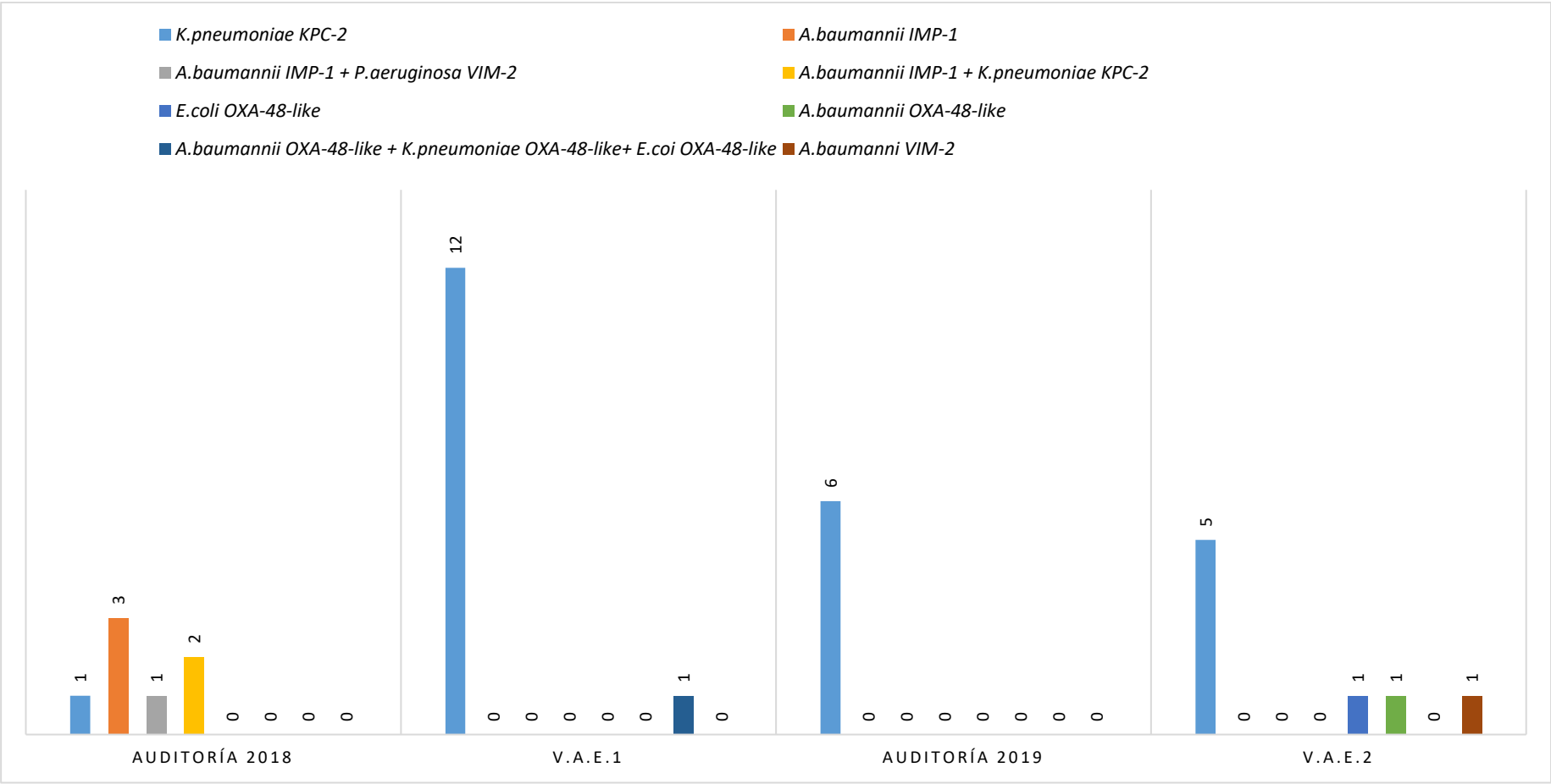


Figura 31. BRC aislados y carbapenemasas asociadas. Referencias. V.A.E.1: vigilancia activa etapa 1; V.A.E.2: vigilancia activa etapa 2.

Entre ambas etapas, auditorías/vigilancia activa, se implementaron mejoras y capacitaciones en el servicio, como internación por cohorte de los pacientes colonizados en un sector de la terapia; adhesión al procedimiento de lavado de manos y su correcta realización; compra de material apropiado para realizar la limpieza y división de tareas entre el personal (limpieza-alimentación-recolección de residuos), restricción del ingreso de pacientes y alumnos al servicio; limitación del flujo del personal por la unidad de terapia intensiva; disminución de la permanencia de pacientes colonizados; uso racional de antibióticos; jornadas de capacitación para el personal perteneciente a la UCI y de otros servicios asociados y reuniones multidisciplinarias para informar al equipo los resultados obtenidos; de esta manera, se pusieron en relieve las deficiencias y los problemas y se logró reforzar la aplicación de una gestión integrada.

Para evaluar la efectividad del protocolo desarrollado, fueron considerados los aislamientos recuperados de pacientes con más 72 horas de permanencia en el servicio, esta consideración reviste importancia porque la adquisición nosocomial de microorganismos resistentes a los antimicrobianos se manifiesta luego de el periodo de tiempo indicado. Teniendo en cuenta esta consideración, la incidencia global de BRC en la etapa previa a implementar mejoras y capacitaciones fue del 16,92% vs. 9,67%. El coeficiente arrojado fue $X^2 = 0,014$; lo que implicó diferencia significativa ($X^2 < p=0,05$).

Evalúamos por PFGE la estructura poblacional de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* por tratarse de las especies más frecuentes aisladas durante el desarrollo del estudio. Además, los aislamientos de *K. pneumoniae* fueron caracterizados por MLST y PCR múltiple para factores de virulencia siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

El análisis de PFGE en *A. baumannii* individualizó 6 pulsotipos diferentes designados del I al VI y agrupados en 3 clusters; ningún aislamiento fue productor de las enzimas BLEE estudiadas. En la Figura 32 se detallan las características clínicas y moleculares asociadas a estos aislamientos.

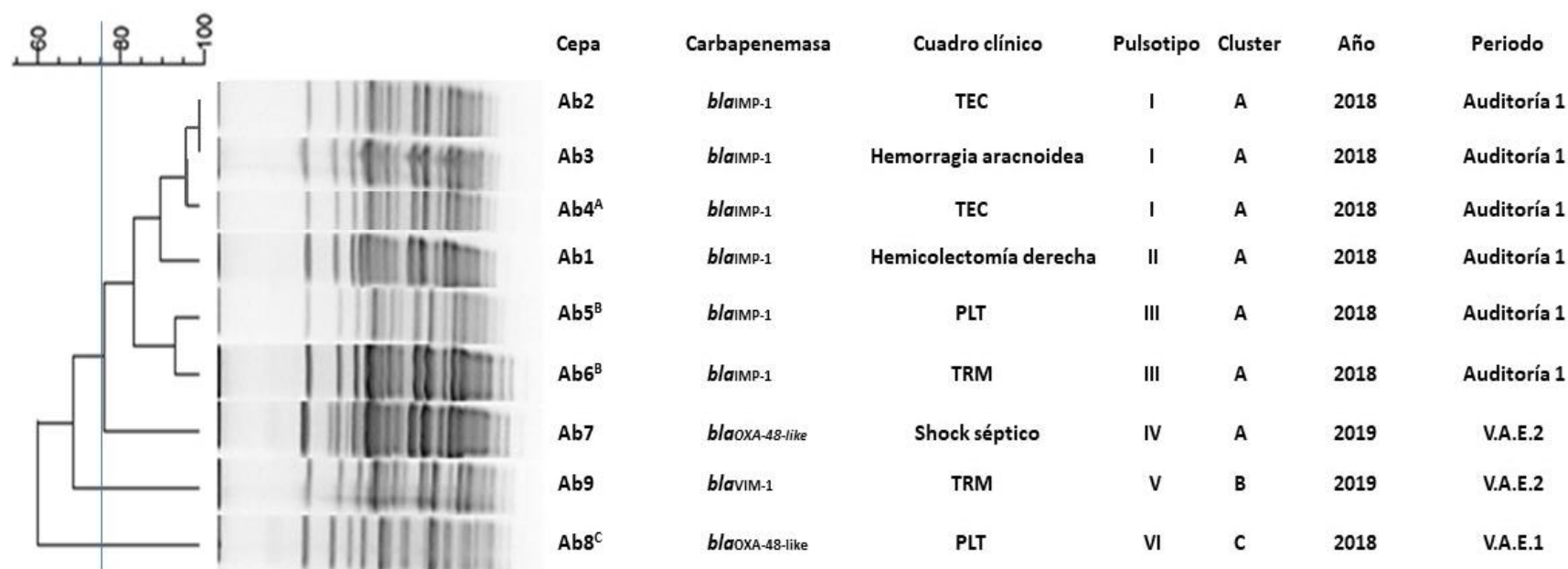


Figura 32. Características clínicas y estructura poblacional de *A. baumannii* resistentes a carbapenemes recuperados de pacientes internados en UCI 1 durante el desarrollo del protocolo de vigilancia. Referencias. PLT: politraumatismo; TEC: traumatismo encéfalo-craneal; TRM: traumatismo raquimedular; V.A.E.1: vigilancia activa etapa 1; V.A.E. 2: vigilancia activa etapa 2. ^A: coexistencia con *P. aeruginosa* VIM-2. ^B: coexistencia con *K. pneumoniae* KPC-2. ^C: coexistencia con *K. pneumoniae* OXA-48-like y *E. coli* OXA-48-like.

En *K. pneumoniae*, el análisis de PFGE individualizó 10 pulsotipos designados del I al X y agrupados en 6 clusters correspondientes a 6 secuenciotipos: ST17 (n =5), ST86 (n=3), ST2256 (n=3), ST13 (n=3), ST353 (n=11) y un secuenciotipo no determinado NT (n=1). En la Figura 33 se detallan las características clínicas y moleculares asociadas a estos. El protocolo implementado impactó en la ecología de la UCI reduciendo no sólo el número de pulsotipos detectados, sino la reducción de los factores de virulencia asociados al clon ST353.

Todos los aislamientos fueron coproductores de BLEE pertenecientes a los grupos SHV-2 y CTX-M-15 con excepción de dos aislamientos. El aislamiento Kp2 recuperado de la auditoría correspondiente a la primera etapa fue sólo productor de CTX-M-15, mientras que el aislamiento Kp3B perteneciente a la segunda auditoría no fue productor de ninguna de las BLEE investigadas.

Durante la primera etapa del protocolo (Auditoría 1 + Vigilancia Activa Etapa 1) fueron detectados 5 clones: ST17 (n =5), ST86 (n=3), ST2256 (n=3), ST13 (n=3) y un aislamiento perteneciente a un ST no identificado. Como puede observarse en la Figura 33, los aislamientos pertenecientes a un mismo ST se encontraron asociados perfiles de virulencia idénticos, pero no necesariamente con el mismo tipo de carbapenemasa. Tras implementar las mejoras y capacitaciones la diversidad clonal se demostró modificada (Auditoría 2 + Vigilancia Activa Etapa 2), no sólo en el número de clones circulantes, sino también en el ST identificado como predominante. Todos los aislamientos correspondieron al ST353 productor de KPC-2, SHV-2 y CTX-M-15 y con un perfil de virulencia idéntico.

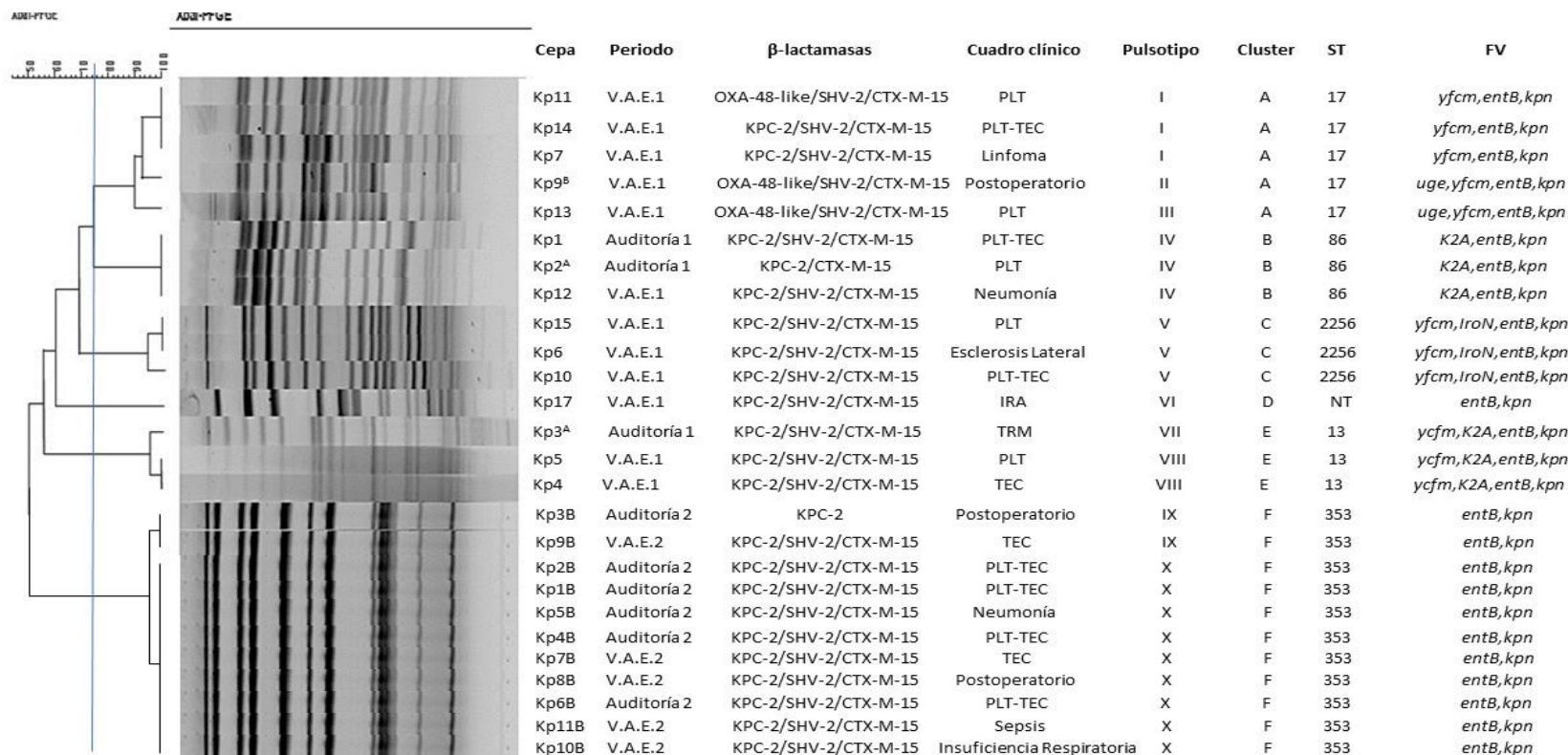


Figura 33. Características clínicas y estructura poblacional de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes recuperados de pacientes internados en UCI 1 durante el desarrollo del protocolo de vigilancia. Referencias. V.A.E.1: vigilancia activa etapa 1; V.A.E.2: vigilancia activa etapa 2; NT: no tipificable; IRA: insuficiencia renal aguda; PLT: politraumatismo; TEC: traumatismo encéfalo-craneal; TRM: traumatismo raquímedular; FV: factores de virulencia. ^A: coexistencia con *A. baumannii* IMP-1; ^B: coexistencia con *A. baumannii* OXA-48-like y *E. coli* OXA-48-like.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de la tesis doctoral logramos identificar y caracterizar aquellos bacilos Gram negativos pertenecientes al orden *Enterobacterales*, que al ser productores de carbapenemasas han logrado convertirse en un verdadero problema de salud pública por su difícil control y tratamiento. Con los resultados obtenidos, logramos desarrollar un programa de vigilancia activa interdisciplinar basado en cultivo para una UCI del hospital Ángel C. Padilla ubicado en San Miguel de Tucumán.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), considera a Argentina como uno de los países latinoamericanos con más especies "pandroga resistentes" en aislamientos clínicos intrahospitalarios cuando se compara con otros países de la región (OMS 2014).

En nuestro país se vigila activamente en los hospitales adheridos a la red WHONET la aparición y proporción de cepas de resistentes a carbapenemes pertenecientes al orden *Enterobacterales* y otras especies de BGN. La diseminación de estas cepas asociada con resistencia a piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos es alarmante (Bowers *et al.*, 2015). En nuestro trabajo, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 presentaron además resistencia a otros antibióticos de uso terapéutico como las quinolonas fluoradas y la gentamicina, y sensibilidad a antimicrobianos de reserva como colistina, tigeciclina y ampicilina, situación previamente descrita en nuestro país (Cejás *et al.*, 2019; Gomez *et al.*, 2011).

En la primera parte del estudio, identificamos un elevado porcentaje de pacientes con comorbilidades y factores de riesgo asociados a infecciones por *K. pneumoniae* productora de KPC-2, como los periodos de internación prolongados y administración previa de antimicrobianos; estos resultados son coincidentes con los publicados por otros autores (Lee *et al.*, 2016, Rodríguez-Baño *et al.*, 2011, Schwaber *et al.*, 2008) en los cuales también identificaron la presencia de comorbilidades y el uso previo de antimicrobianos, principalmente cefalosporinas y quinolonas, como factores de riesgo. En un estudio controlado, Falagas *et al.*, 2006 demostraron que las fluoroquinolonas y penicilinas anti-pseudomonas como la asociación Piperacilina/Tazobactam fueron factores de riesgo independientes asociados

a infecciones por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes. Los pacientes incluidos en la primera etapa del estudio habían sido tratados empíricamente con Piperacilina/Tazobactam o quinolonas debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana.

En promedio, el tiempo de internación previo a la documentación clínica de los cuadros infecciosos fue 30 días, lo que denota la elevada permanencia hospitalaria previa a la adquisición de la infección, similar a lo informado por Cordova *et al.*, 2012.

Las unidades de cuidados intensivos han sido identificadas como el sitio de mayor frecuencia de adquisición de *K. pneumoniae* productora de KPC (Girmenia *et al.*, 2016; Pravaker *et al.*, 2012; Hayden *et al.*, 2015; Zaragoza *et al.*, 2020), esta situación se encuentra favorecida por la mayor complejidad de los procedimientos realizados a los pacientes, el uso más frecuente de medidas invasivas y la utilización de antibióticos de amplio espectro, por lo cual en la tercera etapa de este trabajo de tesis doctoral implementamos un protocolo de vigilancia activa basado en cultivo microbiológico en UCI. Implementar un programa de vigilancia activa de microorganismos multirresistentes permite identificar a los pacientes colonizados, y mediante protocolos de aislamiento de contacto y monitorización de los microorganismos implicados pueden implementarse protocolos de uso racional de antimicrobianos, mejorar el uso de recursos, entre otras medidas.

En un estudio multicéntrico realizado en siete hospitales de Bélgica (De Laveleye *et al.*, 2017) se reportaron tasas de resistencia a β -lactámicos y quinolonas fluoradas inferiores a las observados entre los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 caracterizados en este estudio. Por otra parte, la sensibilidad a amicacina y colistina en nuestros aislamientos fue mayor a la descrita por De Laveleye *et al.*, 2017, (100% sensibles a ambos antibióticos) y la sensibilidad a tigeciclina (94%) resulto similar a la descrita por el grupo de trabajo mencionado (95.4%).

Los tratamientos antimicrobianos empíricos aplicados a los pacientes admitidos en el hospital e incluidos en el estudio apropiadamente fueron escasos (11.5%) por múltiples razones: multiresistencia de las cepas estudiadas, desconocimiento de la magnitud del brote nosocomial por parte del personal médico y la falta de disponibilidad de otras opciones terapéuticas (tigeciclina y fosfomicina) en la farmacia del hospital. Recientemente, Zaragoza *et al.*, 2020 han definido una estrategia basada en la necesidad

de complementar la vigilancia activa de microorganismos multirresistentes con el uso estratégico de antibióticos por sectores, esta modalidad permite optimizar la eficiencia de estos tratamientos frente a las neumonías asociadas a ventilador incrementado su adecuación al 37%.

En las infecciones por *K. pneumoniae* productora de KPC-2 predominaron las muestras respiratorias y Orina, seguidas por purulentos. Zheng *et al.*, 2017 evaluaron 51 pacientes infectados por *K. pneumoniae* productora de KPC y encontraron que las muestras predominantes fueron del tracto respiratorio (32/51, 62.7%) seguidas de hemocultivo (5/51, 9.8%) e infecciones de tracto urinario (5/51, 9.8%), mientras que otros estudios refieren bacteriemia e infecciones del tracto urinario como los principales sitios de infección (Falagas *et al.*, 2007). Al igual que otros autores, coincidimos en la prevalencia de muestras respiratorias, aunque la frecuencia de aislamientos a partir de hemocultivos fue escasa.

En Argentina no existen publicadas tasas regionales de incidencia de infecciones por microorganismos multirresistentes. En comparación a las tasas de incidencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas de centros hospitalarios publicados por otros países, en nuestro estudio la misma fue de 0.290 cada 1000 pacientes hospitalizados, mayor a la registrada en un estudio realizado en Bélgica donde la incidencia promedio entre 9 hospitales fue de 0.223 cada 1000 pacientes (De Laveleye *et al.*, 2017) y con mayor diferencia respecto a Alemania en la que es significativamente menor (0.047 cada 1000 pacientes) (Kaase *et al.*, 2016).

Considerando la caracterización molecular de las cepas de este estudio, encontramos la emergencia de BLEE en las cepas productoras de KPC con marcado predominio de enzimas CTX-M, similar a lo detallado por Karlowsky *et al.*, 2022 y Canton *et al.*, 2012. La principal BLEE detectada fue CTX-M-2 epidemiológicamente predominante en Argentina, mientras que en otros países como España predomina CTX-M-15 (Canton *et al.*, 2012); con respecto a las carbapenemasas, el 100% fueron *bla_{KPC-2}* a diferencia de otros países latinoamericanos que presentan KPC-2 y KPC-3 (Mathers *et al.*, 2015; Muñoz-Price *et al.*, 2015). No detectamos aislamientos productores de metalo- β -lactamasas, a diferencia de otros países Latinoamericanos como Perú en el que habían sido reportadas junto con NDM u otros países como Reino

Unido donde predominan carbapenemasas mixtas como VIM y NDM, o India donde predominan las de tipo NDM seguidas por OXA-48 (Mathers *et al.*, 2015).

Entre los aislamientos de *K. pneumoniae* incluidos en el estudio identificamos un total de 17 patrones de PFGE diferentes que se correspondieron con 10 secuenciotipos y se observó un marcado predominio de ST25. En Latinoamérica, los tipos clonales ST11 y ST437, se encuentran asociados a la diseminación de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} (Monteiro *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Castanheira *et al.*, 2021). En Argentina, se ha descrito como tipo clonal dominante el ST258 (Gomez *et al.*, 2011) en este trabajo de tesis sólo detectamos un aislamiento perteneciente a dicho ST. En el año 2019 se reportaron en nuestro país otros clones exitosos de *K. pneumoniae* como el ST25 asociado a KPC-2 y el clon de alto riesgo ST307 asociado con KPC-3 (Cejas *et al.*, 2019), también es importante recalcar que estudios previos realizados en nuestra región indican que la circulación de estos clones de alto riesgo puede no estar presente o subestimarse frente a diferentes tipos clonales (Jure *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2019).

La importancia del complejo clonal 65 (el cual incluye al ST25 y ST65, entre otros) ha sido previamente descrita por Brisse *et al.*, 2009. Este complejo clonal comprende aislamientos de *K. pneumoniae* productores de serin-carbapenemasas, como KPC-2 y KPC-3, los que presentan además una gran diversidad de factores de virulencia y se asocian principalmente al serogrupo capsular K2. Es importante recalcar que, en este estudio, el tipo clonal ST25 se asoció con cepas productoras de KPC-2 y tipo capsular K2. Desde la aparición de variantes hipermucoviscosas de *K. pneumoniae* en el mundo, muchos casos de infecciones invasivas causadas por estos patógenos han sido descritas y la hipermucoviscosidad parecía estar asociada con esta forma de infección agresiva. Actualmente estos términos no son sinónimos y sabemos que estos fenotipos son completamente diferentes e independientes; así un String Test negativo sería insuficiente para concluir si una cepa es o no capaz de producir una infección invasiva por sí mismo (Russo *et al.*, 2018). En este trabajo de tesis se estudiaron algunos genes asociados a la virulencia en las cepas hipermucoviscosas causantes de procesos infecciosos. Si bien en cepas hipervirulentas los tipos capsulares K1 y K2 fueron los más exhaustivamente descritos, está demostrado que las cepas de *K. pneumoniae* causantes de infección y no hipervirulentas también pueden presentar el serotipo K2; en nuestro estudio se observó un elevado porcentaje de cepas K2 (68,6%).

Entre los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 recuperados en la primera etapa del trabajo presentados, no fueron detectados aislamientos conteniendo los genes *iutA*, *fimH*, *rpmA*, *WcaG*, *cnf-1*, *hly* o *allS*. Los genes *magA* (mucoviscosidad asociada con el gen A y específico del serotipo capsular K1) y *k2A* (específico del serotipo capsular K2) tienen un rol decisivo en la patogénesis del absceso hepático en aislamientos pertenecientes al serotipo K1 y K2 respectivamente (Yeh *et al.*, 2007; Brisse *et al.*, 2009). El gen *allS* (asociado al metabolismo de la alantoína) ha sido vinculado a la capacidad de aislamientos K1 de producir abscesos hepáticos en Asia y se encuentra vinculado al CC23 (Yeh *et al.*, 2007). La ausencia de los genes *magA* y *allS* se correlaciona con el hecho de que no fueron recuperadas cepas de abscesos hepáticos en este estudio.

Los genes asociados a la cápsula (*wabG*, *uge* y *ycfM*) promueven la infección por resistencia a la fagocitosis (Yu *et al.*, 2008). Estos genes son encontrados frecuentemente en aislamientos de *K. pneumoniae*, y son la base de su patogenicidad. En este estudio, la frecuencia de detección de estos elementos genéticos en las cepas de *K. pneumoniae* fueron *wabG* (48.57%), *uge* (80%), *ycfM* (57.14%), codificando capsula, lipoproteína y proteína de membrana externa respectivamente. Estas tasas son consistentes con estudios previos reportando que aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* fueron productores de estos factores de virulencia, pero la frecuencia de *wabG* y *ycfM* fue menor a la descrita por Candan *et al.*, 2015.

Los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* expresan 2 tipos de adhesinas fimbriales; fimbrias tipo 1 y tipo 3 (Candan *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2008). Mientras que las fimbrias tipo 1, codificadas por *fimH*, juegan un papel importante en las infecciones de tracto urinario, las fimbrias de tipo 3, codificadas por *mrkD*, promueven el desarrollo de biofilm. En este estudio, las adhesinas fimbriales totales (*mrkD* y *kpn*) fueron detectadas en el 97.14% de los aislamientos productores de carbapenemasas.

Los sideróforos codificados por *entB*, *iutA* y *iroN* son proteínas fijadoras de hierro, y además juegan un rol como promotores de la formación de biofilm (Candan *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2008). Detectamos sideróforos (*entB* y *iroN*) en el 33 aislamientos (94.28%). Ningún aislamiento demostró la presencia del gen *iutA*, este sideróforo representa un marcador de aislamientos asociados a clones hipervirulentos (De Laveleye *et al.*, 2017).

Los factores de virulencia y la resistencia antibiótica juegan un papel importante en la patogénesis bacteriana. Numerosos estudios han demostrado que los factores de virulencia estarían asociados con la resistencia antibiótica en bacterias patógenas (Brisse *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2008), sin embargo, en el estudio realizado por Candan *et al.*, 2015, no hay correlación significativa entre los factores de virulencia, resistencia a carbapenemes y tipos de infección, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio.

El rol de los elementos genéticos móviles, en la ecología de los genes de resistencia a los antimicrobianos con especial énfasis en plásmidos, y la capacidad de algunos genes de virulencia de insertarse en los mismos ha generado preocupación sanitaria. Kopotsa *et al.*, 2019 realizaron una revisión evaluando carbapenemasas y BLEE asociadas a diferentes tipos de plásmidos de incompatibilidad, siendo los del grupo IncL/M capaces de transportar genes de la familia *bla* como *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}. La evaluación de la capacidad conjugativa se realizó en 35 cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2. El 91,42% de los aislamientos fue positivo al ensayo de conjugación siendo todos los transconjugantes positivos al tipo IncL/M. La producción de carbapenemasas ha sido descrita en múltiples tipos de plásmidos de incompatibilidad, siendo el más prevalente en *Enterobacterales* el IncF, y en menor medida otros como IncN, IncX, IncA/C, IncL/M, IncR, IncP, IncH, IncI y IncW (Kopotsa *et al.*, 2019).

Los plásmidos de incompatibilidad de tipo IncL/M se encuentran asociados comúnmente a serin-β-lactamasas como KPC, CTX-M y TEM y Oxacilinasas como OXA-48; aunque también son capaces de incorporar a su estructura genes de resistencia a otros antimicrobianos como quinolonas fluoradas y aminoglucósidos (Bedenić *et al.*, 2018). En Argentina, los plásmidos del tipo de IncL/M se reportaron a nivel nacional (Gómez *et al.*, 2011), describiendo la emergencia y posterior diseminación de *K. pneumoniae* ST258 productora de KPC-2 asociada con plásmidos de incompatibilidad IncL/M. Posteriormente, Jure *et al.*, 2019 describió la circulación en Tucumán de diferentes clones de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 asociados con plásmidos del tipo IncL/M, ambos resultados coincidentes con los descriptos en este trabajo de Tesis Doctoral.

Los estudios orientados a evaluar la epidemiología molecular realizados en este estudio demostraron que los aislamientos de *K. aerogenes* productores de KPC-2 se encontraban en un contexto de brote intrahospitalario. En este evento, considerando las características de los pacientes, un elevado porcentaje tenía comorbilidades y factores de riesgo como hospitalización prolongada y uso previo de antibióticos de amplio espectro. El tiempo promedio de hospitalización fue de 16 días, con un rango de permanencia de 0 a 40 días, lo que explicaría la adquisición de estas superbacterias, principalmente en la UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) resultados coincidentes con reportes previos (Malek *et al.*, 2019; Cabral *et al.*, 2017; Hao *et al.*, 2019).

En el contexto del presente brote, los tratamientos antimicrobianos empíricos aplicados fueron erróneos por múltiples razones: multirresistencia de las cepas estudiadas, escaso conocimiento del brote, y limitada disponibilidad de opciones terapéuticas (Tigeciclina y Fosfomicina) en el hospital, resultados coincidentes con Hao *et al.*, 2019, quien también reporta tratamientos empíricos inapropiados y describe factores de riesgo como pacientes críticos con comorbilidades y uso prolongado de cefalosporinas y quinolonas fluoradas para el tratamiento.

Las infecciones más frecuentes asociadas a *K. aerogenes* fueron las de tracto urinario e infecciones de sitio quirúrgico (30%), se obtuvieron muestras de líquido abdominal solo en el 20%, de los pacientes, mientras que otros autores como Malek *et al.*, 2019 describen como muestras clínicas más frecuentes, respiratorias y de sangre.

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana confirmaron la resistencia a piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina y carbapenemes en todos los aislamientos. Hao *et al.*, 2019 han reportado tasas de resistencia similares a piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina y carbapenemes, y tasas superiores al 75% a aminoglucósidos como amikacina y gentamicina. A diferencia de Tavares *et al.*, 2015 que reportaron aproximadamente un 60% de aislamientos de *K. aerogenes* no susceptibles a tigeciclina, en nuestro estudio todos los aislamientos fueron sensibles a este antimicrobiano.

Entre los 14 aislamientos incluidos en el estudio, cuatro (28,6%) demostraron resistencia a colistina, valores similares a los reportados por Tavares *et al.*, 2015 mientras que Hao *et al.*, 2019 reportaron solo un aislamiento de *K. aerogenes* resistente a colistina. Desde que la colistina es considerada un antimicrobiano “de reserva”, la emergencia de cepas resistentes a esta molécula representa un llamado de atención. En

este trabajo realizamos el primer reporte de aislamientos de *K. aerogenes* resistentes simultáneamente a carbapenemes y colistina en nuestra región. Todos los aislamientos resistentes a colistina pertenecieron al clon predominante. Este es un hecho preocupante y justifica el uso más riguroso de este agente antimicrobiano.

Entre los aislamientos de *K. aerogenes* resistentes a carbapenemes, la resistencia mediada por producción de carbapenemasas y la combinación de mutaciones que afectan la permeabilidad de membrana con hiperproducción de AmpC han sido los mecanismos mayormente descriptos (Guh *et al.*, 2015).

En el estudio de los mecanismos de resistencia asociados a *K. aerogenes* resistentes a carbapenemes realizado por Szabó *et al.*, 2006, indicaron que las bombas de eflujo no están involucradas en dicho fenotipo de resistencia a pesar de un informe previo de su importante papel en la resistencia al carbapenemes y, además, la pérdida en el número o funcionalidad de las porinas probablemente no sea el principal mecanismo de resistencia en estos aislamientos. En Brasil, las enzimas KPC han sido reportadas en aislamientos clínicos de *Klebsiella aerogenes* y del complejo *Enterobacter cloacae* (Dallenne *et al.*, 2010) al igual que en nuestro estudio. Otros autores han reportado además genes asociados con la producción de otras carbapenemasas como *bla*_{KPC-3}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-6}, and *bla*_{NMC-A} (Lee *et al.*, 2015).

En este estudio, las principales BLEE caracterizadas en el 100% de los aislamientos fueron CTX-M-15 y SHV-2, datos que difieren de otros publicados en nuestro país, que reportan CTX-M-2 como el subtipo más común asociado a *Enterobacterales* aislados de pacientes hospitalizados (Karlowsky *et al.*, 2020), Lee *et al.*, 2016), por otra parte, nuestros datos coinciden con datos reportados por Castanheira *et al.*, 2021.

Los niveles de resistencia observados entre los aislamientos productores de carbapenemasas de *K. pneumoniae* y *K. aerogenes* fueron similares, con la excepción de que los aislamientos de *K. aerogenes* fueron menos susceptibles a la polimixinas, un antimicrobiano utilizado ampliamente en el tratamiento de infecciones por microorganismos productores de carbapenemasas.

Las enterobacterias con resistencia extrema o superbacterias tienen una extraordinaria capacidad de diseminación a nivel global, la OMS considera necesario

llevar a cabo estrategias específicas de vigilancia y control de los clones de alto riesgo involucrados en la transferencia horizontal (OMS 2017).

El interés de la vigilancia específica cobra aún más fuerza con la reciente introducción de nuevas alternativas terapéuticas, como ceftazidima-avibactam, Imipenem-relebactam y ceftolozano-tazobactam, cuya actividad frente a las cepas MDR/XDR ha resultado prometedora.

El estudio exhaustivo del escenario epidemiológico asociado a bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes desarrollado en esta tesis doctoral, constituyó la base para plantear y desarrollar la última etapa de este trabajo de investigación aplicada con transferencia al medio; es así que se logró optimizar las estrategias de vigilancia y control en una institución de salud. La planificación y ejecución del programa de vigilancia estuvo dirigido a conseguir un conocimiento precoz, holístico, integrador y de alta calidad de la situación y evolución de la resistencia antimicrobiana dentro de la UCI, como sugiere Oteo-Iglesias 2019.

Los resultados del protocolo piloto de vigilancia activa permitieron determinar la magnitud del problema respecto de la incidencia de colonización por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes (BGNCr) en pacientes hospitalizados en UCI y las carencias en la ejecución de un programa de control de infecciones adecuado en el nosocomio. A partir de los resultados de los cultivos de vigilancia activa y la epidemiología molecular, se implementaron medidas de contingencia para controlar la diseminación de estos microorganismos y, finalmente, se demostró una disminución en la incidencia de colonización, resultados coincidentes con Landman *et al.*, 2012.

La emergencia y diseminación de BGN productores de carbapenemasas, como paradigma actual de la resistencia extrema y de la panresistencia a los antibióticos en el ámbito sanitario, es una grave amenaza para la salud de los pacientes y para la salud pública.

El máximo impacto de esta problemática se debe a la diseminación de cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 y otros BGN, como *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, productoras de OXA-48-like y VIM-1, respectivamente. La capacidad de estas cepas para extenderse de forma rápida y eficaz hace necesaria la existencia de sistemas de alerta precoz interconectados, que nos permitan detectarlas inmediatamente y conocer su epidemiología (Miriagou *et al.*, 2010; Wernli *et al.*, 2011). Numerosos autores

consideran que la aplicación de medidas de control de la infección es clave para el control de la diseminación de microorganismos multirresistentes (Cantón y Bryan, 2012; Carmeli *et al.*, 2010) y requiere de un abordaje multidisciplinar, que incluya aspectos relacionados con la vigilancia (detección precoz del caso índice y detección activa de la colonización en pacientes). Además, la implementación de precauciones estándar y de contacto, incluso de medidas de cohorting si fuera necesario, además de la limpieza y desinfección ambiental permiten controlar efectivamente la diseminación de mecanismos de resistencia y salvaguardar los antimicrobianos disponibles (Cantón y Bryan, 2012; Carmeli *et al.*, 2010). Estos procedimientos coinciden con los implementados en este estudio, en el cual utilizamos un sistema de alerta precoz para detectar inmediatamente los pacientes colonizados con estos patógenos, ejecutar un aislamiento de cohorte en la UCI y aplicar los protocolos establecidos en el PCI.

En un estudio realizado en Nueva York en el que se comparaban las prácticas de control de infecciones entre 9 hospitales vecinos, se evidenció que los hospitales que llevaban a cabo cultivos de vigilancia activa tuvieron más éxito en la disminución de la tasa de adquisición de bacilos Gram negativos productores de KPC (Landman *et al.*, 2012) y reducciones en la estancia hospitalaria promedio de los pacientes internados. Por otro lado, (Thatrimontrichai *et al.*, 2020) y (Lledo *et al.*, 2009) aseguran que la detección de portadores de BGNCR es beneficiosa en el control y la reducción de casos de infecciones asociadas, tanto en brotes como en situaciones no epidémicas, impulsando de este modo a la vigilancia activa de pacientes críticos cuando sea posible. La implementación de programas de optimización del uso de antimicrobianos es otra de las medidas que puede ayudar a limitar la selección de cepas productoras de carbapenemasas (Chen *et al.*, 2021; Rodríguez-Baño *et al.*, 2011). Con nuestro protocolo, los resultados obtenidos demostraron que las medidas adoptadas durante el estudio, en un período acotado, en conjunto con la ejecución del Programa de Uso Racional de Antimicrobianos (PROA) y la vigilancia microbiológica sistemática de los pacientes permitieron reducir significativamente la colonización global dentro de la UCI1, del 16,92% al 9,67% ($\chi^2 = 0,014$).

Luego de implementar un programa multidisciplinario de vigilancia epidemiológica, Hayden *et al.*, 2015, demostraron una reducción significativa de los casos de colonización por *Enterobacterales* productores de KPC (50%) y de la frecuencia

de infecciones asociadas a estos microorganismos (30%) en pacientes pertenecientes a un hospital de estancia prolongada; dicho estudio no incorporó un programa de uso racional de los antimicrobianos o, al menos, no se hace referencia a esto.

Algunos trabajos realizados en grupos poblacionales de riesgo, como pacientes internados y neonatos, señalan que el tiempo de hospitalización es una variable asociada al riesgo de colonización por BGNCR (Chen *et al.*, 2021; Rodríguez-Baño *et al.*, 2011; Schwaber *et al.*, 2008). En este sentido, Lin *et al.*, 2013, aseguran que la colonización en centros sanitarios donde la internación es prolongada es cercana al 30%, contra un 3% en los centros con internaciones breves. Si bien nuestro estudio se desarrolló solo en una UCI y el número de pacientes estudiados es una limitante, el protocolo implementado en cada etapa durante 9 semanas nos permitió observar diferentes tiempos de colonización en los pacientes admitidos. Santolin *et al.*, 2017 consideran que la omisión del cultivo de vigilancia realizado a las 48-72 h de la admisión en la unidad incrementaría el número de pacientes colonizados por la rápida diseminación horizontal de los BGNCR; en nuestro trabajo, solo 2 pacientes (uno correspondiente a cada etapa muestral) positivizaron sus cultivos tras 48 hs de permanencia en el servicio.

El estudio de epidemiología molecular muestra diferentes patrones de diseminación de BGNCR en la UCI. Por una parte, la emergencia y diseminación de *K. pneumoniae* se produce a expensas de diversos clones, mayoritariamente portadores de KPC-2 asociada con BLEE del tipo SHV-2 y CTX-M-15, lo que agrava el problema, por presentar múltiples resistencias a otros grupos de antimicrobianos. En nuestro hospital, esta epidemiología fue descrita anteriormente por el grupo de trabajo (Jure *et al.*, 2019; Vargas *et al.*, 2019), por lo cual nuestros resultados confirman que, si bien no existe la persistencia de un clon particular, el clon ST17 nuevamente se comporta como uno de los prevalentes en la región. En cuanto a la distribución geográfica, ST17 también fue descrito por Argente *et al.*, 2019, en España, asociado a la producción de OXA-48, y por Andrade *et al.*, 2018, en Brasil; dicho clon fue asociado a KPC-2 y no fue reportado en estudios epidemiológicos recientes realizados en Argentina por Cejas *et al.*, 2019. En la base de datos del Instituto Pasteur (bigsd.bpasteur.fr) se encuentran registrados 103 aislamientos de *K. pneumoniae* ST17 procedentes de muestras de sangre, materia fecal, esputo, orina, abscesos y respiratorias, de pacientes colonizados e infectados. En cuanto

al tipo capsular, en este trabajo no se detectaron los tipos capsulares ensayados (K1 y K2), previamente descritos en nuestra región por nuestro equipo de trabajo (Vargas *et al.*, 2019), donde informamos un aislamiento ST17 asociado al tipo capsular K2; estos resultados difieren de los de Martin *et al.*, 2016, quienes reportan ST17/ K23, y de los de Andrade *et al.*, 2018, quienes describen ST17/ K112.

Es importante recalcar que en el período 2, la población policlonal de *K. pneumoniae* descrita previamente en este hospital se ve sustituida por la presencia de un único clon, ST353. Analizando el perfil de sensibilidad, el corto período en el que fueron obtenidas estas cepas, los perfiles de restricción y secuenciotipos idénticos, asumimos que nos encontrábamos epidemiológicamente en una situación de brote por un secuenciotipo no descrito antes en nuestra región y asociado a serin-carbapenemasas del tipo KPC-2 y BLEE SHV-2 y CTX-M-15. Este secuenciotipo también fue reportado por Thomas *et al.*, 2013, quienes describen un brote por *K. pneumoniae* ST353, coproductora de enzimas tipo OXA-48 y SHV, en pacientes colonizados.

En cuanto a la virulencia de las cepas de *K. pneumoniae* colonizantes, demostramos la ausencia de genes asociados a hipervirulencia (*rmpA*, *iutA*) y a elementos fimbriales tipo 3 (genes *mrk*) y la presencia de genes *entB* y *kpn*, ambos ampliamente distribuidos en el género *Klebsiella*. Solo los aislamientos pertenecientes a los secuenciotipos ST13 y ST86 estuvieron asociados al serogrupo capsular K2.

Los aislamientos de *A. baumannii* fueron mayoritariamente productores de metalo- β -lactamasas IMP-1. El análisis de PFGE individualizó 6 pulsotipos agrupados en 3 clusters, con lo que podríamos asumir que la diseminación en la UCI fue clonal, en concordancia con otros estudios que demuestran la clonalidad de estas cepas (Rodríguez *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

La vigilancia y control de la diseminación de bacilos Gram negativos con mecanismos de resistencia a los antimicrobianos representa un desafío multifactorial que implica la adopción de medidas de control preventivas destinadas a restringir la circulación de clones exitosos multirresistentes y potencialmente virulentos, y además detectar la emergencia de nuevos clones.

Este es el primer estudio de caracterización de factores de virulencia en múltiples clones de *K. pneumoniae* hipermucoviscosas productoras de KPC-2 en nuestra región, estos hallazgos indicarían que no existe una correlación significativa entre la asociación de factores de virulencia, resistencia a carbapenemes, tipos de infección y tipo clonal en las cepas estudiadas. Además, la existencia de múltiples clones de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 en un corto periodo de tiempo y la elevada incidencia observada, contribuyen a explicar la gran diversidad genética y el alto poder de diseminación de enzimas KPC, lo que implica un verdadero problema de salud pública. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral constituyen la base científica para continuar la vigilancia molecular de estos microorganismos y los mecanismos de resistencia ya evaluados, como así también profundizar en otros mecanismos asociados a la resistencia antimicrobiana frente a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas fluoradas o polimixinas.

Logramos evidenciar la capacidad de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC de transferir por conjugación el gen *bla*_{KPC-2}, y caracterizar el plásmido de incompatibilidad (IncL/M) implicado en su diseminación y persistencia. Es necesario continuar con los estudios de caracterización sobre las cepas transconjugantes para evaluar la coexistencia del gen *bla*_{KPC-2} y genes responsables de la producción de BLEE.

En el transcurso de la Tesis Doctoral, *K. pneumoniae* ST258 productor de KPC descrito como predominante de Argentina sólo fue recuperado de un paciente (registros de infección urinaria y tratamiento exitoso con amicacina), mientras que otros clones como ST25 y ST17 ambos productores de KPC-2 y considerados clones emergentes, fueron más prevalentes. Estos datos refuerzan la necesidad de mantener

la vigilancia molecular de los principales clones circulantes para profundizar en el conocimiento de su comportamiento y continuar con la caracterización molecular de los mismos.

Evaluamos las características clínicas, epidemiológicas y moleculares asociadas a un brote por *K. aerogenes* resistentes a carbapenemes. Si bien este microorganismo es un agente implicado frecuentemente en infecciones nosocomiales, es escasa la información publicada. Los pacientes de los cuales se aislaron estas cepas tuvieron una mayor mortalidad atribuible a infecciones por el mismo en comparación con otras enterobacterias carbapenem resistentes recuperadas en el mismo periodo de estudio.

Este trabajo de Tesis Doctoral constituye un gran avance en la articulación entre la ciencia y el sector sanitario público, los resultados obtenidos permitieron determinar la diseminación de carbapenemasas dentro de un nosocomio, y desarrollar posteriormente una metodología eficaz para controlarlas.

Desarrollar un protocolo multidisciplinario de vigilancia adaptado a una UCI permitió evaluar el impacto en la incidencia de colonización por BGNCR y demostrar que el cultivo de vigilancia activa en unidades de alto riesgo reduce significativamente la colonización de los pacientes por estos microorganismos; por lo tanto, el cumplimiento riguroso de medidas de control de infecciones y de un protocolo de uso racional de antimicrobianos monitorizado, son necesarios en entornos de alto riesgo para prevenir brotes o infecciones invasivas por BGNCR. Fue posible detectar nuevos clones de *K. pneumoniae* asociados a la producción de KPC-2 y BLEE, como así también detectar otras carbapenemasas subestimadas como la familia OXA-48-like y metalo- β -lactamasas que no habían sido reportadas previamente en la región, como IMP-1.

En el contexto del programa de vigilancia activa determinamos su eficiencia al obtener una reducción significativa de pacientes colonizados, en conjunto con una disminución de la diversidad de clones de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas. Logramos identificar pacientes colonizados por más de un microorganismo productor del mismo tipo de carbapenemasas e implementar medidas de contención frente a la detección precoz de los mismos.

Los resultados y conclusiones de esta Tesis ponen de manifiesto el complejo panorama de los bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas y la

diseminación eficaz de estas enzimas en un hospital regional de tercer nivel. Su detección, caracterización, seguimiento continuo y análisis a diferentes niveles constituye, tal y como señalan los diferentes planes de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos, un pilar esencial para asegurar su contención.

PROYECCIONES

8. PROYECCIONES

El grupo de investigación considera importante continuar trabajando de manera conjunta entre los diferentes sectores de la provincia, ciencia, sector privado y entes reguladores, con el fin de vigilar la circulación de bacterias multirresistentes en nuestra provincia.

Optimizar el protocolo de vigilancia desarrollado con el fin de incorporar al mismo la investigación de otras bacterias multirresistentes en pacientes hospitalizados.

Investigar la presencia de mecanismos de resistencia de interés clínico y epidemiológico que afecten otros grupos de antimicrobianos como quinolonas, polimixinas y aminoglucósidos.

Evaluar la patogenicidad de clones emergentes mediante secuenciación de genoma completo y la correlación de factores de virulencia con la patogenicidad en modelos *in vivo* utilizando animales de experimentación.

Profundizar la caracterización molecular de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, implicados en la diseminación y persistencia de carbapenemasas.

Contribuir a la creación de un laboratorio certificado bajo la norma IRAM-ISO 9001:2015 en el cual se realicen metodologías validadas por normativas internacionales utilizadas para la caracterización de microorganismos multirresistentes en el contexto de “una salud”.

Continuar trabajando en conjunto con organismos públicos, privados e instituciones sanitarias para promover la prevención y el control de la resistencia bacteriana en nuestra region.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams MD, Pasteran F, Traglia GM, Martinez J, Huang F, Liu C, Fernandez JS, Lopez C, Gonzalez LJ, Alborno E, Corso A, Vila AJ, Bonomo RA, Ramirez MS. (2020). Distinct Mechanisms of Dissemination of NDM-1 Metallo- β -Lactamase in *Acinetobacter* Species in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 21;64(5):e00324-20. doi: 10.1128/AAC.00324-20. PMID: 32122888; PMCID: PMC7179578.
- Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 66:5575–99. doi:10.1099/ijsem.0.001485.
- Aguirre-Quiñonero A, Martínez- Martínez L. (2017). Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *Journal of Infection and Chemotherapy*; 23:1–11. doi:10.1016/j.jiac.2016.09.008.
- Akova M, Daikos GL, Tzouveleakis L, Carmeli Y. (2012). Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase producing Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*; 18:439–48. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03823.x.
- Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. (2015). Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *Euro surveillance*; 20:30062. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062.
- Alós JL. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 33:692–9. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004.
- Ambler RP. (1980). The Structure of betalactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*; 289:321–31. doi:10.1098/rstb.1980.0049.
- Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. (2011). Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*; 55(7):3579-83. doi: 10.1128/AAC.01783-10. PMID: 21576442; PMCID: PMC3122403.
- Andrade LN, Novais Â, Stegani LMM, Ferreira JC, Rodrigues C, Darini ALC, Peixe L. (2018). Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 91(2):164-168. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007. PMID: 29459053.
- Argente M, Miró E, Martí C, Vilamala A, Alonso-Tarrés C, Ballester F, Calderón A, Gallés C, Gasós A, Mirelis B, Morta M, Olsina M, Sauca G, Sierra M, Rivera A, Navarro F. (2019). Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella*

- pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 37(2):82-88. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2018.02.003. PMID: 29631930.
- Aurilio C, Sansone P, Barbarisi M, Pota V, Giaccari LG, Coppolino F, Barbarisi A, Passavanti MB, Pace MC. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics (Basel)*; 11(3):421. doi: 10.3390/antibiotics11030421. PMID: 35326884; PMCID: PMC8944602.
- Bartal C, Rolston KVI, Neshier L. (2022). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Colonization, Infection and Current Treatment Options. *Infect Dis Ther*. doi: 10.1007/s40121-022-00597-w. Epub ahead of print. PMID: 35175509.
- Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, Zujčić Atalić V, Bogdan M, Bubonja-Šonje M, Tomić-Paradžik M, Tot T, Lukić-Grlić A, Drenjančević D, Varda-Brkić D, Bandić-Pavlović D, Mihaljević S, Zarfel G, Gužvinac M, Conzemius R, Barišić I, Tambić-Andrašević A. (2018). Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol*; 67(8):1031-1041. doi: 10.1099/jmm.0.000777. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29927373.
- Berrazeg, M., Diene, S., Medjahed, L., Parola, P., Drissi, M., Raoult, D., & Rolain, J. (2014). New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 19(20), 20809. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.20.20809>
- Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Jones, L., Delannoy-Vieillard, A. S., Garin, B., Le Hello, S., Arlet, G., Nicolas-Chanoine, M. H., Decré, D., & Brisse, S. (2014). Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerging infectious diseases*, 20(11), 1812–1820. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>
- Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 44, 100640. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- Bowers, J. R., Kitchel, B., Driebe, E. M., MacCannell, D. R., Roe, C., Lemmer, D., de Man, T., Rasheed, J. K., Engelthaler, D. M., Keim, P., & Limbago, B. M. (2015). Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PloS one*, 10(7), e0133727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133727>
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., & Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PloS one*, 4(3), e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>

- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(2), e00047-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Bush K. (2015). A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International journal of antimicrobial agents*, 46(5), 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.011>
- Cabral, A. B., Maciel, M., Barros, J. F., Antunes, M. M., Barbosa de Castro, C., & Lopes, A. (2017). Clonal spread and accumulation of β -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Journal of medical microbiology*, 66(1), 70–77. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000398>
- Candan, E. D., & Aksöz, N. (2015). *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta biochimica Polonica*, 62(4), 867–874. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148
- Cantón, R., & Bryan, J. (2012). Global antimicrobial resistance: from surveillance to stewardship. Part 1: surveillance and risk factors for resistance. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(11), 1269–1271. <https://doi.org/10.1586/eri.12.120>
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in microbiology*, 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carmeli, Y., Akova, M., Cornaglia, G., Daikos, G. L., Garau, J., Harbarth, S., Rossolini, G. M., Souli, M., & Giamarellou, H. (2010). Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 102–111. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03115.x>
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mathai, D., Bell, J. M., Jones, R. N., & Mendes, R. E. (2011). Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 1274–1278. <https://doi.org/10.1128/AAC.01497-10>
- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp.

- phenotypes?. *Virulence*, 8(7), 1111–1123.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>
- CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017. <http://www.cdc.gov/PULSENET/protocols.htm>
- Cejas, D., Elena, A., Guevara Nuñez, D., Sevillano Platero, P., De Paulis, A., Magariños, F., Alfonso, C., Berger, M. A., Fernández-Canigia, L., Gutkind, G., & Radice, M. (2019). Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *Journal of global antimicrobial resistance*, 18, 238–242.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.005>
- Charlson, M. E., Charlson, R. E., Peterson, J. C., Marinopoulos, S. S., Briggs, W. M., & Hollenberg, J. P. (2008). The Charlson comorbidity index is adapted to predict costs of chronic disease in primary care patients. *Journal of clinical epidemiology*, 61(12), 1234–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2008.01.006>
- Chen, H. Y., Jean, S. S., Lee, Y. L., Lu, M. C., Ko, W. C., Liu, P. Y., & Hsueh, P. R. (2021). Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* in Long-Term Care Facilities: A Global and Narrative Review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 601968.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.601968>
- Chen, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in microbiology*, 22(12), 686–696.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>
- Chen, L., Mathema, B., Pitout, J. D., DeLeo, F. R., & Kreiswirth, B. N. (2014). Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. *mBio*, 5(3), e01355-14.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01355-14>
- Cheng, D. L., Liu, Y. C., Yen, M. Y., Liu, C. Y., & Wang, R. S. (1991). Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Archives of internal medicine*, 151(8), 1557–1559.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Four Informational Supplement. CLSI Document M100. <http://clsi.org/m100>
- Córdova, E., Lespada, M. I., Gómez, N., Pasterán, F., Oviedo, V., & Rodríguez-Ismael, C. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina [Clinical and epidemiological study of an outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in Buenos Aires, Argentina]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30(7), 376–379. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.12.003>
- Dabos, L., Oueslati, S., Bernabeu, S., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2022). To Be or Not to Be an OXA-48 Carbapenemase. *Microorganisms*, 10(2), 258.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020258>
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-

- lactamases in *Enterobacteriaceae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 490–495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.
- Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2015). Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6, 392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
- De Belder, D., Faccone, D., Tijet, N., Melano, R. G., Rapoport, M., Petroni, A., Lucero, C., Pasteran, F., Corso, A., & Gomez, S. A. (2017). Novel class 1 Integrons and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 54, 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.019>.
- De Laveleye, M., Huang, T. D., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Sacré, P., Noel, A., Glupczynski, Y., & multicenter study group (2017). Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(1), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2782-x>
- De Oliveira, D., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- Decré, D., Verdet, C., Emirian, A., Le Gourrierec, T., Petit, J. C., Offenstadt, G., Maury, E., Brisse, S., & Arlet, G. (2011). Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *Journal of clinical microbiology*, 49(8), 3012–3014. <https://doi.org/10.1128/JCM.00676-11>
- Deleo, F. R., Chen, L., Porcella, S. F., Martens, C. A., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., Chavda, K. D., Jacobs, M. R., Mathema, B., Olsen, R. J., Bonomo, R. A., Musser, J. M., & Kreiswirth, B. N. (2014). Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), 4988–4993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321364111>
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., & Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4178–4182. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>
- Endimiani, A., Depasquale, J. M., Forero, S., Perez, F., Hujer, A. M., Roberts-Pollack, D., Fiorella, P. D., Pickens, N., Kitchel, B., Casiano-Colón, A. E., Tenover, F. C., & Bonomo, R. A. (2009). Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(5), 1102–1110. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp327>
- ENVIN - HELICS. Available from: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/>

- Falagas ME, Bliziotis IA, Michalopoulos A, Sermaides G, Papaioannou VE, Nikita D, Choulis N, Effect of a policy for restriction of selected classes of antibiotics on antimicrobial drug cost and resistance, *J. Chemother.* 19 (2) (2007) 178–184
- FAO (Food and Agriculture Organization). El plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2021-2025. 2021. doi:10.1016/j.eimc.2021.
- Fernando, S. A., Gray, T. J., & Gottlieb, T. (2017). Healthcare-acquired infections: prevention strategies. *Internal medicine journal*, 47(12), 1341–1351. <https://doi.org/10.1111/imj.13642>
- Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(5), 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>
- García-Betancur, J. C., Appel, T. M., Esparza, G., Gales, A. C., Levy-Hara, G., Cornistein, W., Vega, S., Nuñez, D., Cuellar, L., Bavestrello, L., Castañeda-Méndez, P. F., Villalobos-Vindas, J. M., & Villegas, M. V. (2021). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert review of anti-infective therapy*, 19(2), 197–213. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
- García-Salguero, C., Culebras, E., Alvarez-Buylla, A., Rodríguez-Avial, I., & Delgado-Iribarren, A. (2021). Utilidad de MALDI-TOF y REP-PCR frente a PFGE para el estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii* [Usefulness of MALDI-TOF and REP-PCR against PFGE for the epidemiological study of *Acinetobacter baumannii*]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 34(3), 207–213. <https://doi.org/10.37201/req/142.2020>
- Gijón, D., Curiao, T., Baquero, F., Coque, T. M., & Cantón, R. (2012). Fecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1558–1563. <https://doi.org/10.1128/JCM.00020-12>
- Girmenia, C., Serrao, A., & Canichella, M. (2016). Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 8(1), e2016032. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2016.032>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica [Betalactams in clinical practice]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 28(1), 1–9.
- Gomez, S. A., Pasteran, F. G., Faccone, D., Tijet, N., Rapoport, M., Lucero, C., Lastovetska, O., Albornoz, E., Galas, M., KPC Group, Melano, R. G., Corso, A., & Petroni, A. (2011). Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(10), 1520–1524. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x>
- Gona, F., Comandatore, F., Battaglia, S., Piazza, A., Trovato, A., Lorenzin, G., Cichero, P., Biancardi, A., Nizzero, P., Moro, M., & Cirillo, D. M. (2020). Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for *Klebsiella pneumoniae* cluster

- analysis. *Microbial genomics*, 6(4), e000347.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000347>
- Guh, A. Y., Bulens, S. N., Mu, Y., Jacob, J. T., Reno, J., Scott, J., Wilson, L. E., Vaeth, E., Lynfield, R., Shaw, K. M., Vagnone, P. M., Bamberg, W. M., Janelle, S. J., Dumyati, G., Concannon, C., Beldavs, Z., Cunningham, M., Cassidy, P. M., Phipps, E. C., Kenslow, N., ... Kallen, A. J. (2015). Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA*, 314(14), 1479–1487.
<https://doi.org/10.1001/jama.2015.12480>
- Gutiérrez Saborido D, Pérez Guerrero P, Ruiz Blasco E, Ríos Holgado I. Formas clínicas de infecciones por enterobacterias. *Medicine (Spain)* 2014;11:3283–90. doi:10.1016/S0304-5412(14)70769-3.
- Halary, S., Leigh, J. W., Cheaib, B., Lopez, P., & Baptiste, E. (2010). Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 127–132.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908978107>
- Han, H., Zhou, H., Li, H., Gao, Y., Lu, Z., Hu, K., & Xu, B. (2013). Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*, 10(7), 2720–2731.
<https://doi.org/10.3390/ijerph10072720>
- Hansen G. T. (2021). Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infectious diseases and therapy*, 10(1), 75–92.
<https://doi.org/10.1007/s40121-020-00395-2>
- Hao, M., Shen, Z., Ye, M., Hu, F., Xu, X., Yang, Y., Wu, S., Lin, D., Qin, X., & Wang, M. (2019). Outbreak Of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella aerogenes* Strains In A Tertiary Hospital In China. *Infection and drug resistance*, 12, 3283–3290. <https://doi.org/10.2147/IDR.S221279>
- Hao, Z., Duan, J., Liu, L., Shen, X., Yu, J., Guo, Y., Wang, L., & Yu, F. (2020). Prevalence of Community-Acquired, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Wenzhou, China. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 26(1), 21–27.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0096>
- Hartl, R., Widhalm, S., Kerschner, H., & Apfalter, P. (2013). Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(5), E230–E232. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12146>
- Hawser, S. P., Bouchillon, S. K., Hoban, D. J., Hackel, M., Johnson, J. L., & Badal, R. E. (2009). *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing KPC beta-lactamase in Israel, Puerto Rico, Colombia and Greece. *International journal of antimicrobial agents*, 34(4), 384–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.05.010>
- Hayden, M. K., Lin, M. Y., Lolans, K., Weiner, S., Blom, D., Moore, N. M., Fogg, L., Henry, D., Lyles, R., Thurlow, C., Sikka, M., Hines, D., Weinstein, R. A., & Centers for Disease

- Control and Prevention Epicenters Program (2015). Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(8), 1153–1161.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciu1173>
- Hernández García M, Cantón R, Ruiz Carbajosa P. (2018) Colonización por enterobacterias productoras de carbapenemasas durante el proyecto europeo R-GNOSIS: epidemiología, estructura poblacional y caracterización molecular. *Universidad Complutense de Madrid*
- Holden, V. I., & Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics : integrated biometal science*, 7(6), 986–995.
<https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Dao, T. T., Mensink, M., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574–E3581.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Horan, T. C., Andrus, M., & Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American journal of infection control*, 36(5), 309–332.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2008.03.002>
- Hospital Italiano de Buenos Aires. (2014). Vigilancia de Gérmenes multirresistentes: Enterococcus Resistente a la Vancomicina (EVR), *Klebsiella* productora de Carbapenemasa (KPC) y Gérmenes productores de metalobetalactamasa (MBL) en adultos.
https://www.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_archivos/74/documentos/74_vigilanciaMBL,KPCyEVR2016.pdf
- INEI. (2014). Servicio Antimicrobianos perteneciente al departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “DR. CARLOS G. MALBRAN”. Taller WHONET 2014 | antimicrobianos.com.arantimicrobianos.com.ar
- Instituto Pasteur. *Klebsiella pneumoniae*. <https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/>
- Josephine, H. R., Kumar, I., & Pratt, R. F. (2004). The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic beta-lactams. *Journal of the American Chemical Society*, 126(26), 8122–8123.
<https://doi.org/10.1021/ja048850s>
- Jure, M. A., Castillo, M. E., Musa, H. E., López, C. G., Cáceres, M. A., Mochi, S. D., Bousquet, A. A., Genel, N. A., Arlet, G. A., & Decré, D. C. (2019). Novel patterns in the molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tucumán, Argentina. *Journal of global antimicrobial resistance*, 19, 183–187.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.02.015>

- Kaase, M., Schimanski, S., Schiller, R., Beyreiß, B., Thürmer, A., Steinmann, J., Kempf, V. A., Hess, C., Sobottka, I., Fenner, I., Ziesing, S., Burckhardt, I., von Müller, L., Hamprecht, A., Tammer, I., Wantia, N., Becker, K., Holzmann, T., Furitsch, M., Volmer, G., ... Gatermann, S. G. (2016). Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 306(6), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.009>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karampatakis, T., Tsergouli, K., Iosifidis, E., Antachopoulos, C., Karapanagiotou, A., Karyoti, A., Gritsi-Gerogianni, N., Tsakris, A., & Roilides, E. (2018). Impact of active surveillance and infection control measures on carbapenem-resistant Gram-negative bacterial colonization and infections in intensive care. *The Journal of hospital infection*, 99(4), 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.05.010>
- Karlowsky, J. A., Lob, S. H., DeRyke, C. A., Siddiqui, F., Young, K., Motyl, M. R., & Sahm, D. F. (2022). Prevalence of ESBL non-CRE *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among clinical isolates collected by the SMART global surveillance programme from 2015 to 2019. *International journal of antimicrobial agents*, 59(3), 106535. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106535>
- Kopotsa, K., Osei Sekyere, J., & Mbelle, N. M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1457(1), 61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>
- Krapp, F., Morris, A. R., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2017). Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. *Scientific reports*, 7(1), 13533. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13524-8>
- Ku, Y. H., Chuang, Y. C., Chen, C. C., Lee, M. F., Yang, Y. C., Tang, H. J., & Yu, W. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: *Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance*. *Scientific reports*, 7(1), 6634. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06878-6>
- Lam, M., Wyres, K. L., Judd, L. M., Wick, R. R., Jenney, A., Brisse, S., & Holt, K. E. (2018). Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome medicine*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0587-5>
- Landman, D., Babu, E., Shah, N., Kelly, P., Olawole, O., Bäcker, M., Bratu, S., & Quale, J. (2012). Transmission of carbapenem-resistant pathogens in New York City hospitals: progress and frustration. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(6), 1427–1431. <https://doi.org/10.1093/jac/dks063>
- Laurettil, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(7), 1584–1590. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584>

- Lavigne, J. P., Cuzon, G., Combescure, C., Bourg, G., Sotto, A., & Nordmann, P. (2013). Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. *PloS one*, 8(7), e67847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067847>
- Lee, C. H., Liu, J. W., Su, L. H., Chien, C. C., Li, C. C., & Yang, K. D. (2010). Hypermucoviscosity associated with *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive syndrome: a prospective cross-sectional study in Taiwan. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14(8), e688–e692. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.01.007>
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in microbiology*, 7, 895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Lee, H. J., Choi, J. K., Cho, S. Y., Kim, S. H., Park, S. H., Choi, S. M., Lee, D. G., Choi, J. H., & Yoo, J. H. (2016). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Prevalence and Risk Factors in a Single Community-Based Hospital in Korea. *Infection & chemotherapy*, 48(3), 166–173. <https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.3.166>
- Lee, K., Kim, C. K., Yong, D., Jeong, S. H., Yum, J. H., Seo, Y. H., Docquier, J. D., & Chong, Y. (2010). Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of microbiological methods*, 83(2), 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.010>
- Lee, Y., Kim, B. S., Chun, J., Yong, J. H., Lee, Y. S., Yoo, J. S., Yong, D., Hong, S. G., D'Souza, R., Thomson, K. S., Lee, K., & Chong, Y. (2014). Clonality and Resistome analysis of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in Korea using whole genome sequencing. *BioMed research international*, 2014, 352862. <https://doi.org/10.1155/2014/352862>
- Li, W., Sun, G., Yu, Y., Li, N., Chen, M., Jin, R., Jiao, Y., & Wu, H. (2014). Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(2), 225–232. <https://doi.org/10.1093/cid/cit675>
- Liao, C. H., Huang, Y. T., Chang, C. Y., Hsu, H. S., & Hsueh, P. R. (2014). Capsular serotypes and multilocus sequence types of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with different types of infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(3), 365–369. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1964-z>
- Lin, J. C., Koh, T. H., Lee, N., Fung, C. P., Chang, F. Y., Tsai, Y. K., Ip, M., & Siu, L. K. (2014). Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut pathogens*, 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-21>
- Lin, M. Y., Lyles-Banks, R. D., Lolans, K., Hines, D. W., Spear, J. B., Petrak, R., Trick, W. E., Weinstein, R. A., Hayden, M. K., & Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program (2013). The importance of long-term acute care hospitals in the

- regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 57(9), 1246–1252.
<https://doi.org/10.1093/cid/cit500>
- Lledo W, Hernández M, López E, Molinari OL, Soto RQ, Hernández E, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 58(10), 256–260.
- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl_1), S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
- López-Pueyo, M. J., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., & Garnacho-Montero, J. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos [Antibiotic multiresistance in critical care units]. *Medicina intensiva*, 35(1), 41–53.
<https://doi.org/10.1016/j.medin.2010.07.011>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malek, A., McGlynn, K., Taffner, S., Fine, L., Tesini, B., Wang, J., Mostafa, H., Petry, S., Perkins, A., Graman, P., Hardy, D., & Pecora, N. (2019). Next-Generation-Sequencing-Based Hospital Outbreak Investigation Yields Insight into *Klebsiella aerogenes* Population Structure and Determinants of Carbapenem Resistance and Pathogenicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(6), e02577-18.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02577-18>
- Mansour, H., Ouweini, A., Chahine, E. B., & Karaoui, L. R. (2021). Imipenem/cilastatin/relebactam: A new carbapenem β -lactamase inhibitor combination. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 78(8), 674–683.
<https://doi.org/10.1093/ajhp/zxab012>.
- Martin, R. M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., Malani, P. N., Rao, K., & Bachman, M. A. (2016). Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*, 1(5), e00261-16.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00261-16>
- Martínez-Martínez L. (2008). Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14 Suppl 1, 82–89. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x>
- Martino, F., Tijet, N., Melano, R., Petroni, A., Heinz, E., De Belder, D., Faccone, D., Rapoport, M., Biondi, E., Rodrigo, V., Vazquez, M., Pasteran, F., Thomson, N. R.,

- Corso, A., & Gomez, S. A. (2019). Isolation of five Enterobacteriaceae species harbouring blaNDM-1 and mcr-1 plasmids from a single paediatric patient. *PloS one*, 14(10), e0224937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224937>
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>.
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. G., Gniadkowski, M., Malamou-Lada, E., Martinez-Martinez, L., Navarro, F., Nordmann, P., Peixe, L., Pournaras, S., Rossolini, G. M., Tsakris, A., Vatopoulos, A., & Cantón, R. (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 112–122. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x>
- Monstein, H. J., Ostholm-Balkhed, A., Nilsson, M. V., Nilsson, M., Dornbusch, K., & Nilsson, L. E. (2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(12), 1400–1408. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x>
- Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G., & Gales, A. C. (2009). First report of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(1), 333–334. <https://doi.org/10.1128/AAC.00736-08>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M. K., Kumarasamy, K., Livermore, D. M., Maya, J. J., Nordmann, P., Patel, J. B., Paterson, D. L., Pitout, J., Villegas, M. V., Wang, H., Woodford, N., ... Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(9), 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
- Naas, T., & Nordmann, P. (1994). Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from Enterobacter cloacae and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7693–7697. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7693>
- Nastro, M., Monge, R., Zintgraff, J., Vaulet, L. G., Boutureira, M., Famiglietti, A., & Rodriguez, C. H. (2013). First nosocomial outbreak of VIM-16-producing Serratia marcescens in Argentina. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(7), 617–619. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03978.x>

- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos [Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(7), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Navarro-San Francisco, C., Mora-Rillo, M., Romero-Gómez, M. P., Moreno-Ramos, F., Rico-Nieto, A., Ruiz-Carrascoso, G., Gómez-Gil, R., Arribas-López, J. R., Mingorance, J., & Paño-Pardo, J. R. (2013). Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a major clinical challenge. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19(2), E72–E79. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12091>
- Navon-Venezia, S., Leavitt, A., Schwaber, M. J., Rasheed, J. K., Srinivasan, A., Patel, J. B., Carmeli, Y., & Israeli KPC Kpn Study Group (2009). First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 818–820. <https://doi.org/10.1128/AAC.00987-08>
- Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet. Infectious diseases*, 9(4), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. *Trends in molecular medicine*, 18(5), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, 17(10), 1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 21-22, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017). Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017). Guidelines for the Prevention and Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Health Care Facilities. PMID: 29630191.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. doi:ISBN 978 92 4 350976 1.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2020). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>.
- OMS. Antimicrobial Surveillance Program SENTRY, World Health Organization. (2014). www.who.int.

- Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., & Kato, N. (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(1), 71–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.71>
- Oteo-Iglesias J. (2019). Active surveillance of antimicrobial resistance. Vigilancia activa de la resistencia a antibióticos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (English ed.), 37 Suppl 1, 26–31. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30179-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30179-X)
- Palacios-Baena, Z. R., Oteo, J., Conejo, C., Larrosa, M. N., Bou, G., Fernández-Martínez, M., González-López, J. J., Pintado, V., Martínez-Martínez, L., Merino, M., Pomar, V., Mora-Rillo, M., Rivera, M. A., Oliver, A., Ruiz-Carrascoso, G., Ruiz-Garbajosa, P., Zamorano, L., Bautista, V., Ortega, A., Morales, I., ... GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI Group for CPE (2016). Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *The Journal of infection*, 72(2), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.10.008>
- Paño Pardo, J. R., Serrano Villar, S., Ramos Ramos, J. C., & Pintado, V. (2014). Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32 Suppl 4, 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70173-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70173-9)
- Pasteran, F., Meo, A., Gomez, S., Derdoy, L., Albronz, E., Faccone, D., Guerriero, L., Archuby, D., Tarzia, A., López, M., & Corso, A. (2014). Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4), 344–345. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.07.003>
- Pasteran, F. G., Otaegui, L., Guerriero, L., Radice, G., Maggiora, R., Rapoport, M., Faccone, D., Di Martino, A., & Galas, M. (2008). *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerging infectious diseases*, 14(7), 1178–1180. <https://doi.org/10.3201/eid1407.070826>
- Patel, G., Huprikar, S., Factor, S. H., Jenkins, S. G., & Calfee, D. P. (2008). Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection control and hospital epidemiology*, 29(12), 1099–1106. <https://doi.org/10.1086/592412>
- Pérez Guerrero P, Galán Sánchez F, Gutiérrez Saborido D, Guerrero Lozano I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine* (Spain); 11:3276–82. doi:10.1016/S0304-5412(14)70768-1.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 5873–5884. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 5403–5407. <https://doi.org/10.1128/AAC.00585-11>

- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 15–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>
- Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D., & Nordmann, P. (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(4), 891–897. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.891-897.2000>
- Potron, A., Nordmann, P., Lafeuille, E., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., & Poirel, L. (2011). Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(10), 4896–4899. <https://doi.org/10.1128/AAC.00481-11>
- Prabaker, K., Lin, M. Y., McNally, M., Cherabuddi, K., Ahmed, S., Norris, A., Lolans, K., Odeh, R., Chundi, V., Weinstein, R. A., Hayden, M. K., & Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention Epicenters Program (2012). Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a multihospital study. *Infection control and hospital epidemiology*, 33(12), 1193–1199. <https://doi.org/10.1086/668435>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G. M., Samuelsen, Ø., Seifert, H., Woodford, N., Nordmann, P., & European Network on Carbapenemases (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(5), 413–431. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>
- Rasmussen, B. A., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O'Gara, C., & Medeiros, A. A. (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(9), 2080–2086. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.9.2080>
- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(3), 470–482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- Rastegar, S., Moradi, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Ali Golabi, D., & Hosseini-Nave, H. (2019). Virulence Factors, Capsular Serotypes and Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and Classical *Klebsiella pneumoniae* in Southeast Iran. *Infection & chemotherapy*, 10.3947/ic.2019.0027. Advance online publication. <https://doi.org/10.3947/ic.2019.0027>
- Rice L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>

- Rodgers, D., Pasteran, F., Calderon, M., Jaber, S., Traglia, G. M., Alborno, E., Corso, A., Vila, A. J., Bonomo, R. A., Adams, M. D., & Ramírez, M. S. (2020). Characterisation of ST25 NDM-1-producing *Acinetobacter* spp. strains leading the increase in NDM-1 emergence in Argentina. *Journal of global antimicrobial resistance*, 23, 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.015>
- H Rodríguez, C., Nastro, M., A Flores, S., Rodríguez, M., Spinozzi, M., Bruni, G., L López, A., David, V., S Aiassa, M., A Marqués, I., R Navarro, O., Paniccia, L., Famiglietti, A., & Grupo colaborativo *Acinetobacter* Argentina (2019). Epidemiología molecular de aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenems en Argentina [Molecular epidemiology of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Argentina]. *Revista Argentina de microbiología*, 51(3), 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.004>
- Rodríguez, C. H., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Revista Argentina de microbiología*, 50(3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.006>
- Rodríguez, M. M., Power, P., Radice, M., Vay, C., Famiglietti, A., Galleni, M., Ayala, J. A., & Gutkind, G. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(12), 4895–4897. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4895-4897.2004>
- Rodríguez, M. M., Power, P., Sader, H., Galleni, M., & Gutkind, G. (2010). Novel chromosome-encoded CTX-M-78 beta-lactamase from a *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(7), 3070–3071. <https://doi.org/10.1128/AAC.01615-09>
- Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo J, Alvarez-Rocha L, Asensio A, Calbo E, Cercenado E, Grupo de Estudio de la Infección Hospitalaria-Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; Sociedad Española de Medicina Preventiva. (2011). Salud Pública e Higiene Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC SEFH y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 30 22e1-22.e23
- Rozwandowicz, M., Hordijk, J., Bossers, A., Zomer, A. L., Wagenaar, J. A., Mevius, D. J., & Brouwer, M. (2020). Incompatibility and phylogenetic relationship of I-complex plasmids. *Plasmid*, 109, 102502. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2020.102502>
- Ruiz-Garbajosa, P., Hernández-García, M., Beatobe, L., Tato, M., Méndez, M. I., Grandal, M., Aranzabal, L., Alonso, S., López, M. Á., Astray, J., & Cantón, R. (2016). A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(2), 348–352. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv355>
- Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., Consigny, P. H., El Mnai, A., Boussadia, Y., Goujon, C., Ralaimazava, P., Campa, P., Girard, P. M., Wyplosz, B., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Le Loup, G., Pialoux, G., Perrier, M., Wieder, I., Moussa, N., Esposito-Farèse, M., Hoffmann, I., ... Matheron, S. (2015). High Rate of Acquisition but Short

- Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 61(4), 593–600. <https://doi.org/10.1093/cid/civ333>
- Russo, T. A., Olson, R., Fang, C. T., Stoesser, N., Miller, M., MacDonald, U., Hutson, A., Barker, J. H., La Hoz, R. M., & Johnson, J. R. (2018). Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, 56(9), e00776-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
- Santolin C, Sesma AC, Llansa MA, Pintado S, Gigela Masso M, Mangiaterra SM. (2017). Colonización rectal por bacilos gram negativos multirresistentes: importancia de la detección precoz durante la hospitalización. *Acta bioquím. clín. latinoam.* Dez; 51(4): 675-680. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572017000400014&lng=pt.
- Reichard, U., Rettkowski, R., & Scheithauer, S. (2016). Multiresistente Erreger - Prävention und Diagnostik. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* : *A/NS*, 51(2), 112–120. <https://doi.org/10.1055/s-0041-103142>
- Schwaber, M. J., Klarfeld-Lidji, S., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Leavitt, A., & Carmeli, Y. (2008). Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(3), 1028–1033. <https://doi.org/10.1128/AAC.01020-07>
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., & Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *Journal of clinical microbiology*, 34(12), 2909–2913. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.12.2909-2913.1996>
- Servicio Antimicrobianos perteneciente al departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “DR. CARLOS G. MALBRAN”. <http://antimicrobianos.com.ar/category/resistencia/whonet/analisis-de-ram/>
- Siu, L. K., Yeh, K. M., Lin, J. C., Fung, C. P., & Chang, F. Y. (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet. Infectious diseases*, 12(11), 881–887. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70205-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70205-0)
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>
- Stietz, M. S., Ramírez, M. S., Vilacoba, E., Merkier, A. K., Limansky, A. S., Centrón, D., & Catalano, M. (2013). *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 14, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.020>

- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Peirano, G., Anson, L. W., Pankhurst, L., Sebra, R., Phan, H., Kasarskis, A., Mathers, A. J., Peto, T., Bradford, P., Motyl, M. R., Walker, A. S., Crook, D. W., & Pitout, J. D. (2017). Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 7(1), 5917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06256-2>
- Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity*, 77(11), 5016–5024. <https://doi.org/10.1128/IAI.00585-09>
- Suárez C, Gudíol F. (2009). Antibióticos betalactámicos [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Feb;27(2):116-29. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001. Epub 2009 Feb 15. PMID: 19254642.
- Swaminathan, M., Sharma, S., Poliansky Blash, S., Patel, G., Banach, D. B., Phillips, M., LaBombardi, V., Anderson, K. F., Kitchel, B., Srinivasan, A., & Calfee, D. P. (2013). Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the setting of endemicity. *Infection control and hospital epidemiology*, 34(8), 809–817. <https://doi.org/10.1086/671270>
- Szabó, D., Silveira, F., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., Hujer, K. M., Marsh, J. W., Bethel, C. R., Doi, Y., Deeley, K., & Paterson, D. L. (2006). Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2833–2835. <https://doi.org/10.1128/AAC.01591-05>
- Tamma, P. D., & Simner, P. J. (2018). Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 56(11), e01140-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>
- Tängdén, T., & Giske, C. G. (2015). Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of internal medicine*, 277(5), 501–512. <https://doi.org/10.1111/joim.12342>
- Tavares, C. P., Pereira, P. S., Marques, E., Faria, C., Jr, de Souza, M., de Almeida, R., Alves, C., Asensi, M. D., & Carvalho-Assef, A. P. (2015). Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 82(4), 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.002>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Thatrimontrichai, A., & Apisarnthanarak, A. (2020). Active surveillance culture program in asymptomatic patients as a strategy to control multidrug-resistant gram-negative organisms: What should be considered?. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 119(11), 1581–1585. <https://doi.org/10.1016/j.ifma.2019.08.015>

- Thomas, C. P., Moore, L. S., Elamin, N., Doumith, M., Zhang, J., Maharjan, S., Warner, M., Perry, C., Turton, J. F., Johnstone, C., Jepson, A., Duncan, N. D., Holmes, A. H., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2013). Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *International journal of antimicrobial agents*, 42(6), 531–536.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.020>
- Tiri, B., Sensi, E., Marsiliani, V., Cantarini, M., Priante, G., Vernelli, C., Martella, L. A., Costantini, M., Mariottini, A., Andreani, P., Bruzzone, P., Suadoni, F., Francucci, M., Ciocchi, R., & Cappanera, S. (2020). Antimicrobial Stewardship Program, COVID-19, and Infection Control: Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Colonization in ICU COVID-19 Patients. What Did Not Work?. *Journal of clinical medicine*, 9(9), 2744. <https://doi.org/10.3390/jcm9092744>
- Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 682–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
- Vargas, J. M., Moreno Mochi, M. P., López, C. G., Alarcón, J. A., Acosta, N., Soria, K., Nuñez, J. M., Villafañe, S., Ramacciotti, J., Del Campo, R., & Jure, M. A. (2021). Impacto de un programa de vigilancia activa y medidas de control de infecciones sobre la incidencia de bacilos gram negativos resistentes a carbapenems en una unidad de cuidados intensivos [Impact of an active surveillance program and infection control measures on the incidence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in an intensive care unit]. *Revista Argentina de microbiología*, S0325-7541(21)00051-1. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.03.003>
- Vargas, J. M., Moreno Mochi, M. P., Nuñez, J. M., Cáceres, M., Mochi, S., Del Campo Moreno, R., & Jure, M. A. (2019). Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*, 5(6), e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
- Villa, L., & Carattoli, A. (2020). Plasmid Typing and Classification. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2075, 309–321. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_22
- Villa, L., Capone, A., Fortini, D., Dolejska, M., Rodríguez, I., Taglietti, F., De Paolis, P., Petrosillo, N., & Carattoli, A. (2013). Reversion to susceptibility of a carbapenem-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(11), 2482–2486.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt235>
- Vourli, S., Giakkoupi, P., Miriagou, V., Tzelepi, E., Vatopoulos, A. C., & Tzouvelekis, L. S. (2004). Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS microbiology letters*, 234(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.028>
- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for

- human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet. Infectious diseases*, 11(5), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(1), 147–151. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147>
- Wernli, D., Haustein, T., Conly, J., Carmeli, Y., Kickbusch, I., & Harbarth, S. (2011). A call for action: the application of The International Health Regulations to the global threat of antimicrobial resistance. *PLoS medicine*, 8(4), e1001022. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001022>
- Wiener-Well, Y., Rudensky, B., Yinnon, A. M., Kopuit, P., Schlesinger, Y., Broide, E., Lachish, T., & Raveh, D. (2010). Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *The Journal of hospital infection*, 74(4), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.07.022>
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology*, 8(5), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>
- Woerther, P. L., Burdet, C., Chachaty, E., & Andremont, A. (2013). Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 744–758. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13>
- Wyres, K. L., Lam, M., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature reviews. Microbiology*, 18(6), 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Froumine, R., Tokolyi, A., Gorrie, C. L., Lam, M., Duchêne, S., Jenney, A., & Holt, K. E. (2019). Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS genetics*, 15(4), e1008114. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008114>
- Yang, Y. J., Wu, P. J., & Livermore, D. M. (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(5), 755–758. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.755>
- Yao, B., Xiao, X., Wang, F., Zhou, L., Zhang, X., & Zhang, J. (2015). Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 37, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.023>
- Yeh, K. M., Kurup, A., Siu, L. K., Koh, Y. L., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, T. L., Chang, F. Y., & Koh, T. H. (2007). Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *Journal of clinical microbiology*, 45(2), 466–471. <https://doi.org/10.1128/JCM.01150-06>

- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Class D β -lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(4), 836–864. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa513>
- Yu, W. L., Ko, W. C., Cheng, K. C., Lee, C. C., Lai, C. C., & Chuang, Y. C. (2008). Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 62(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>
- Zaragoza, R., Vidal-Cortés, P., Aguilar, G., Borges, M., Diaz, E., Ferrer, R., Maseda, E., Nieto, M., Nuvials, F. X., Ramirez, P., Rodriguez, A., Soriano, C., Veganzones, J., & Martín-Loeches, I. (2020). Update of the treatment of nosocomial pneumonia in the ICU. *Critical care (London, England)*, 24(1), 383. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03091-2>
- Zhang, A. R., Wang, Q., Zhou, C. E., Zhang, J. G., Wang, X. J., Zhao, J. K., Lu, B. H., Yang, C. X., Gu, L., Ma, L. Y., Su, J. R., Cao, B., & Wang, H. (2021). *Zhonghua yi xue za zhi*, 101(21), 1572–1582. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112137-20201224-03455>
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2011). Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future microbiology*, 6(3), 317–333. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.13>
- Zheng, B., Dai, Y., Liu, Y., Shi, W., Dai, E., Han, Y., Zheng, D., Yu, Y., & Li, M. (2017). Molecular Epidemiology and Risk Factors of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Eastern China. *Frontiers in microbiology*, 8, 1061. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01061>