



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Facultat de Ciències
Departament de Genètica i Microbiologia



Universitat Autònoma
de Barcelona

Epidemiologia de la carbapenemasa OXA-48 en aïllats de *Klebsiella pneumoniae* a Catalunya

Memòria presentada per a optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Marc Argente Viñals

Tesi doctoral dirigida pel Dr. Ferran Navarro i la Dra. Elisenda Miró
a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Barcelona, 2016

Marc Argente Viñals

Dr. Ferran Navarro Risueño

Dra. Elisenda Miró Cardona

Ferran Navarro Risueño, Professor Associat Mèdic del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i **Elisenda Miró Cardona** Doctora en Ciències Biològiques.

CERTIFIQUEN:

Que la present tesi titulada “**Epidemiologia de la carbapenemasa OXA-48 en aïllats de *Klebsiella pneumoniae* a Catalunya**” que presenta Marc Argente Viñals per a optar al grau acadèmic de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona ha estat realitzada sota la nostre direcció i compleix amb els requisits necessaris per a la seva tramitació i posterior defensa davant el tribunal corresponent.

I per a que així consti i per als efectes oportuns firmem aquest document a Barcelona, 22 d’Abril de 2016.

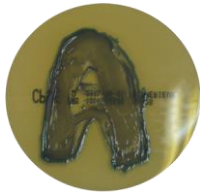
Dr. Ferran Navarro Risueño

Dra Elisenda Miró Cardona

Als Meus Pares,

“Do or do not. There is no try.”

Yoda



GRAÏMENTS

Ja farà quasi més de quatre anys que vaig començar amb la història de l'OXA-48 a Catalunya, amb la part experimental i sabia que arribaria un moment en el que tot hauria de ser plasmat i defensat, tot i això, és fàcil imaginar-se les coses i una altra cosa és fer-les realitat.

No m'agrada posar-me melancòlic ni res per l'estil, però, si m'obliga la situació, ho farem.

Mai podré agrair del tot a la meva família, sobretot a la meva mare i a la meva xicota, el suport, en tants diversos àmbits, que m'han donat en tot moment durant aquests tan llargs quatre anys de doctorat. Sense ells, i el seu suport, crec que potser m'haguessin mancat les forces necessàries per realitzar-lo. Així doncs, aquest treball és una porció seva. Tampoc vull descuidar als meus amics de la carrera, que tot i agafar diferents camins des de que ens van autodenominar biòlegs, han estat donant les seves opinions i els seus consells, i desitjo als que estan tancant també una etapa com la meva o l'han començat fa poc, que no s'arronsin i puguin assolir-la amb brillantor.

Vull agrair al Dr. Pere Coll, director del servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral; i als directores de la tesi Dr. Ferran Navarro i Dra. Elisenda Miró, que m'han anat perfilant el meu besant investigador amb els seus consells, la seva ajuda i la seva santa paciència.

També no vull oblidar-me de tots els companys del laboratori amb els que he estat treballant o he compartit estones, aquells que m'han ensenyat a fer hibridacions, conjugacions, etc (Manel i Laura), que han aguantat les meves bogeries i la meva alegria desmesurada (Marc, Judit, Lluís, Laia, Paula, Montse, Mar i Noe) i els que en tot moment han intentat instruir-me en aprendre patrons de sensibilitat i abreviatures d'antibiòtics (Bea, Elena i Alba). Ni tampoc vull oblidar-me de tota la gent del Servei de Micro que en algun moment han tingut que lidiar amb un servidor, i els hi vull agrair els seus consells o doctrines.

Aquest treball ha estat possible, sens dubte, gràcies a la col·laboració desinteressada de moltes persones pertanyents als diferents centres que han col·laborat en la recollida de casos. Es per això que vull mostrar la meva gratitud a tots ells: a l'Hospital Municipal de Badalona (A. Calderón), Hospital de Barcelona (SCIAS) (M. Sierra), Hospital de Calella (C. Gallés), Hospital General de Granollers (C. Martí), Hospital General de Catalunya a Sant Cugat del Vallès (M. Olsina), Hospital Creu Roja de L'Hospitalet (C. Alonso), Hospital Sant Joan de Déu a Manresa (M. Morta), Hospital de Martorell (A. Gasós), Hospital de Mataró (G. Sauca), Hospital General de Vic (A. Vilamala) i l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus (F. Ballester). De tots ells vull agrair especialment a Carmina Martí la seva disponibilitat a l'hora de recollir les dades i de coordinar l'estudi entre tots els centres.

També vull agrair al Prof. Alex Fiedrich i a la Dra. Silvia Garcia al permetre'ns desenvolupar la tècnica de seqüenciació massiva en el seu laboratori; i a la Dra. Elisenda Miró per portar-la a terme i compartir-la amb mi.

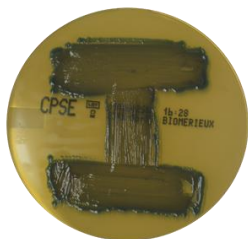
Per altra banda, vull mostrar el meu agraïment a la gent amb que he tingut el plaer de treballar fora de laboratori de Micro de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, que m'han permès

aprendre diferents punts de vista de la investigació i créixer personalment. Des de la bella Itàlia, Roma, fins a la “calorosa” Deutschland, Köln (Alessandra, Aurora e Daniela; Paul, Jenni und Esther), i aprendre a estimar la resignació quan les coses no surten perquè no hi són.

També vull agrair a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica per atorgar-me l’ajut que m’ha permès realitzar l’estada a fora.

Per últim vull mostrar gratitud a una persona a la que mai podré agrair en persona els seus esforços i les esperances posades en mi perquè sigui “un home de profit” i sigui feliç, al meu pare. Així doncs no vull decebre’t i estic en procés d’aconseguir aquesta fita, pas a pas i sent constant, costi el que costi.

Així doncs, només em queda per dir-vos.....Gràcies / Thanks / Grazie / Danke schön



Índex

0. Resum i Summary	1
1. Introducció	7
1.1. <i>Enterobacteriaceae: Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.2. Tractament de les infeccions causades per <i>Enterobacteriaceae</i>	12
1.3. Els betalactàmics	12
1.3.1. Estructura química i classificació dels betalactàmics	12
1.3.2. Mecanisme d'acció dels betalactàmics	14
1.3.3. Mecanismes de resistència als betalactàmics	16
1.3.3.1. Les betalactamases	17
1.3.3.2. Alteracions en la permeabilitat cel·lular	20
1.3.3.2.1. Les porines	20
1.3.3.2.2. Les bombes d'expulsió	22
1.4. Les quinolones	24
1.4.1. Estructura química i classificació de les quinolones	24
1.4.2. Mecanisme d'acció de les quinolones	26
1.4.3. Mecanismes de resistència a les quinolones	27
1.4.3.1. Alteracions de la diana	27
1.4.3.2. Alteracions de la permeabilitat cel·lular	27
1.4.3.3. Resistència mediada per plasmidis (PMQR)	29
1.5. Els aminoglicòsids	31
1.5.1. Estructura química i classificació dels aminoglicòsids	31
1.5.2. Mecanisme d'acció dels aminoglicòsids	35

1.5.3. Mecanisme de resistència als aminoglicòsids	35
1.5.3.1. Producció d'enzims que modifiquen als aminoglicòsids (AME)	36
1.5.3.2. Alteracions de la permeabilitat	37
1.5.3.3. Alteracions de la diana dels aminoglicòsids	38
1.6. Elements genètics implicats en la difusió de gens de resistència	38
1.7. Les carbapenemases	43
1.7.1. Les carbapenemases de la classe A i grup 2f	44
1.7.2. Les carbapenemases de la classe B i grup 3	44
1.7.3. Les carbapenemases de la classe D i grup 2df	45
1.7.4. Detecció fenotípica de les carbapenemases	47
1.8. La carbapenemasa OXA-48	53
1.8.1. L'entorn genètic del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	55
1.8.2. Els plasmidis portadors del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	55
1.8.3. L'epidemiologia de l'OXA-48	59
2. Objectius	65
3. Material i Mètodes	69
3.1. Característiques de l'estudi	71
3.2. Àmbit de l'estudi	72
3.3. Identificació dels aïllats clínics de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	72
3.4. Estudis de sensibilitat als antimicrobians	72
3.5. Test de Hodge modificat	73
3.6. Amplificació (PCR) i seqüenciació dels gens de resistència	74
3.7. Recollida de dades clíniques	74
3.8. Electroforesi en gels de camp pulsant (PFGE)	74
3.9. <i>MultiLocus Sequence Typing</i> (MLST)	75
3.10. Caracterització plasmídica	76

3.11.	Estudis de transferència plasmídica. Conjugació	78
3.12.	Caracterització de l'entorn genètic del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	78
3.13.	Estudis de la sobreexpressió de la bomba d'expulsió AcrAB	79
3.14.	Seqüenciació massiva (WGS)	80
4.	Resultats	87
4.1.	Detecció de les soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48	89
4.2.	Estudis de sensibilitat de les soques productores d'OXA-48	89
4.3.	Epidemiologia clínica	92
4.4.	Epidemiologia molecular: clonalitat (PFGE) i filogènia (MLST)	95
4.4.1.	Estudis de clonalitat (PFGE)	95
4.4.2.	Estudi de filogènia (MLST)	98
4.4.3.	Distribució temporal dels casos detectats	100
4.5.	Caracterització d'altres gens de resistència a banda de <i>bla</i> _{OXA-48}	103
4.5.1.	Betalactàmics	103
4.5.2.	Aminoglicòsids	103
4.5.3.	Quinolones	106
4.5.4.	Multiresistència en les soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48	106
4.6.	Caracterització dels plasmidis portadors del gen <i>bla</i> _{OXA-48} i dels altres gens <i>bla</i> identificats	109
4.7.	Entorn genètic del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	113
4.8.	<i>Core genome MultiLocus Sequence Typing</i> (cgMLST o MLST+)	114
4.9.	PlasmidFinder	116
4.10.	ResFinder	118
4.11.	Alteracions de la permeabilitat	122
4.12.	Estudi de les mutacions en les dianes d'acció de les quinolones (QRDR)	130
5.	Discussió	131
6.	Conclusions	147

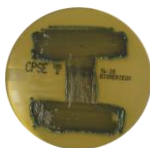
7. Referències	151
8. Annexos	187
8.1. Annex I	189
8.2. Annex II	190
8.3. Annex III	191
8.4. Annex IV	198
8.5. Annex V	201
8.6. Annex VI	205
8.7. Annex VII	207
8.8. Annex VIII	210
8.9. Annex IX	217



INDEX DE FIGURES

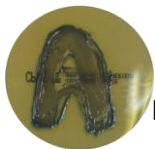
Figura 1. Esquema de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius.	11
Figura 2. Soca de <i>Klebsiella pneumoniae</i> crescuda en placa d'agar MacConkey (A) i en agar CPS (B).	11
Figura 3. Estructura química dels antibiòtics betalactàmics.	13
Figura 4. Síntesi del peptidoglicà.	15
Figura 5. Transpeptidació.	15
Figura 6. Mecanismes de resistència en bacteris gramnegatius.	16
Figura 7. Representació gràfica de la porina OmpF.	21
Figura 8. Esquema dels famílies de bombes d'expulsió.	23
Figura 9. Representació de l'estructura de la bomba AcrAB-TolC.	24
Figura 10. Representació de l'estructura química de les diferents generacions de quinolones.	25
Figura 11. Mecanisme d'acció de les quinolones.	27
Figura 12. Representació de l'operó <i>oqxAB</i> en el plasmidi pOLA52 i en el cromosoma de diferents soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
Figura 13. Mecanisme d'acció del Qnr.	30
Figura 14. Estructura química de la gentamicina i la kanamicina (A) i posicions on actuen alguns enzims modificadors d'aminoglicòsids (B).	32
Figura 15. Mecanisme d'acció dels aminoglicòsids.	35
Figura 16. Mecanismes de transferència horitzontal de material genètic.	39
Figura 17. La conjugació: Mecanisme de transferència horitzontal de material genètic.	40
Figura 18. Representació esquemàtica dels elements genètics mòbils.	41
Figura 19. Esquema d'un transposó conjugatiu (Tn916).	41
Figura 20. Esquema d'una illa de patogenicitat.	41
Figura 21. Esquema de la seqüència completa d'un plasmidi (pCTX-M3).	42
Figura 22. Dendrograma de les diferents OXA.	46
Figura 23. Esquema del Test de Hodge modificat (THM) i el test de Masuda (MAS).	49
Figura 24. Resultats del test Carba NP (1) i del Blue Carba (2).	50
Figura 25. Identificació fenotípica d' <i>Enterobacteriaceae</i> productores de carbapenemases.	51
Figura 26. Esquema de diferents entorns genètics de l'OXA-48 i algunes variants.	56
Figura 27. Representació gràfica dels plasmidis pKPoxa-48.	57
Figura 28. Seqüències completes de tres plasmidis Incl/M (pOXA-48, pNDM-KH, pCTX-M-3).	58
Figura 29. Representació de la progressió a Europa dels enterobacteris productors de la carbapenemasa OXA-48 al 2013(A) i entre el 2014 i el 2015 (B).	63
Figura 30. Esquema dels procediments realitzats en el nostre estudi.	71
Figura 31. Test de Hodge modificat.	73
Figura 32. Esquema del protocol de PFGE amb digestió amb l'enzim de restricció <i>Xba</i> I.	75
Figura 33. Esquema de la realització del Southern Blot.	77
Figura 34. Esquema de la realització de la conjugació bacteriana.	78
Figura 35. Esquema dels iniciadors emprats per a l'estudi dels entorns del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	79
Figura 36. Preparació llibreria genòmica (Nextera XT Sample Prep).	81
Figura 37. Esquema del protocol de treball de Nextera XT.	82
Figura 38. Dendrograma dels genomes de diferents <i>Klebsiella pneumoniae</i>	84

Figura 39. Origen de les mostres on s'han aïllat les soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48.	93
Figura 40. Percentatges de pacients que van rebre tractament antibiòtic.	94
Figura 41. Dendrograma de les 85 soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48.	96
Figura 42. Distribució dels diferents pulsotips (A) i subtipus (B) en els hospitals comarcals.	98
Figura 43. Distribució de les diferents ST en els hospitals on es van aïllar soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores de la carbapenemasa OXA-48.	99
Figura 44. Nombre de soques dels diferents pulsotips (subtipus) aïllades en els hospitals comarcals amb més incidència.	101
Figura 45. Nombre de soques de les diferents ST aïllades en els hospitals comarcals amb més prevalença.	102
Figura 46. Nombre de soques amb gens <i>bla</i> associats a <i>bla</i> _{OXA-48} .	104
Figura 47. Nombre de soques amb gens <i>bla</i> associats a <i>bla</i> _{OXA-48} dels diferents subpulsotips.	104
Figura 48. PFGE digerit amb l'endonucleasa S1 (A), hibridat amb la sonda del replicó IncL/M (B) i amb la sonda del gen <i>bla</i> _{OXA-48} (C).	111
Figura 49. Imatges del revelat de una membrana procedent d'un gel de PFGE digerit amb l'endonucleasa S1 (A), amb 11 soques de les diferents STs hibridades amb sonda del gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} (B) i sonda del replicó IncFIIK (C).	112
Figura 50. Esquema dels transposons Tn1999 (A) i Tn1999.2 (B).	113
Figura 51. Dendrograma de la relació filogenètica entre 37 soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48, obtingut per cgMLST.	115
Figura 52. Dendrograma dels diferents subpulsotips del pulsotip E.	115
Figura 53. Distribució temporal dels diferents subpulsotips del pulsotip E al llarg de l'estudi.	116
Figura 54. Dendrograma dels diferents subpulsotips del pulsotip E i la relació dels diferents plasmidis detectats.	117
Figura 55. Dendrograma dels diferents subpulsotips del pulsotip E i la relació amb els gens <i>bla</i> (A), els gens que codifiquen AME (B) i els gens que codifiquen altres resistències (C).	121
Figura 56. Determinació de la fluorescència relativa del bromur d'etidi en les soques: A, ST101 (A ₂ i A ₃); B, ST405 (E ₁); C, ST405 (E ₁₂); D, ST405 (E ₅).	124
Figura 57. Alineament de la seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de les soques CARB039, CARB077, CARB098 i CARB122 amb altres seqüències descrites.	129
Figura 58. Alineament de la seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de la soca CARB122 amb l'OmpK36 de soca KUN-2012-0129.	129



ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Enterobacteris més destacats en microbiologia clínica.	10
Taula 2. Classificació dels antibiòtics betalactàmics.	14
Taula 3. Classificació de les betalactamases.	18
Taula 4. Classificació de les quinolones.	26
Taula 5. Classificació dels aminoglicòsids segons l'estructura química.	33
Taula 6. Família de neomicina.	34
Taula 7. Famílies de la kanamicina i la gentamicina.	34
Taula 8. Enzims modificadors d'aminoglicòsids identificats en bacteris gramnegatius i els antibiòtics que modifiquen.	37
Taula 9. Perfils d'hidròlisi i inhibició de les carbapenemases.	45
Taula 10. OXAs amb activitat carbapenemàsica aïllades en <i>Acinetobacter</i>	47
Taula 11. Informació de les variants d'OXA-48.	54
Taula 12. Resistència a antibiòtics betalactàmics en soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48.	90
Taula 13. Percentatges de resistència a antibiòtics no betalactàmics.	91
Taula 14. Dades epidemiològiques dels pacients amb <i>Klebsiella pneumoniae</i> amb la carbapenemasa OXA-48.	92
Taula 15. Tipus i subtipus de PFGE de les soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48, i el seu origen.	97
Taula 16. Al·lels dels gens <i>housekeeping</i> de les soques seleccionades per l'estudi del MLST.	99
Taula 17. Fenotip de resistència a aminoglicòsids observat i el seu genotip de les 85 soques productores d'OXA-48.	105
Taula 18. Fenotip de resistència observat i gens plasmídics que intervenen en la resistència a quinolones (PMQR) en les 85 soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48.	106
Taula 19. Gens de resistència a betalactàmics, aminoglicòsids i quinolones presents en les 85 soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores de l'OXA-48.	107
Taula 20. Plasmidis presents en 37 soques productores d'OXA-48 amb diferents ST.	109
Taula 21. Plasmidis presents en un recull de soques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores d'OXA-48.	110
Taula 22. Freqüència de conjugació del plasmidi IncL portador de <i>bla</i> _{OXA-48}	112
Taula 23. Perfil plasmídic obtingut de la WGS de les 37 soques seleccionades.	117
Taula 24. Resultat de la ResFinder.	119
Taula 25. Discrepàncies entre els resultats dels WGS i els de PCR o hibridació.	121
Taula 26. Les CIM de les 37 soques seleccionades per a determinar el paper de les bombes d'expulsió AcrAB.	123
Taula 27. Resultats de la qRT-PCR.	124
Taula 28. Mutacions en Ompk36.	127
Taula 29. Mutacions en Ompk37.	128
Taula 30. Mutacions en les QRDR. Comparació de les seqüències aminoacídiques dels gens <i>gyrA</i> i <i>parC</i> de les soques de l'estudi amb les de la soca de referència ATCC 13883.	130



BREVIACIONS

3-AMA: àcid 3-amino-monobactàmic.

6-APA: àcid 6-aminopenicilanic.

AAC: N-acetiltransferases.

ABC: *ATP-binding cassette*.

ADN: àcid desoxiribonucleic.

ADNc: àcid desoxiribonucleic complementari.

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AME: *Aminoglycoside Modifying Enzyme*.

AmpC: betalactamasa de classe C.

AmpCp: AmpC plasmídica.

ANT: O-nucleotidiltransferases.

APH: O-fosfotransferases.

ARN: àcid ribonucleic.

ARNm: ARN missatger.

ARNr: ARN ribosomal.

ARNt: ARN de transferència.

ATM: *Amplicon Template Mix*.

BAL: rentat broncoalveolar.

BAS: aspirat broncoalveolar.

BLEA: betalactamasa d'espectre ampliat.

BrEt: bromur d'etidi.

CAN: *Clean Amplified NTA*.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*.

cgMLST: *core genome MultiLocus Sequence Typing*.

CHDL: *Carbapenem-Hydrolyzing class D betaLactamases*.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

CIM: concentració inhibitoria mínima.

CIM: *Carbapenem Inactivation Method*.

CS: *Constant Sequence*.

CSPD: Disodium 3-(4-metoxi-spiro{1,2-diox-etano-3,2-(5'-clor)tricycle[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)fenilfosfat.

DAL: *Diluted Amplified Library*.

dNTP: deoxinucleòtid..

DR: *Directed Repeat*..

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic.

EGM: elements genètics mòbils.

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

GES: *Guiana extended spectrum*.

GLcNAc o NAG: *N-acetil-D-glucosamina*.

GTA: *Gene Transfer Agent*.

HT1: *Hybridization buffer*.

IBC: *integron-borne cephalosporinase*.

ICE: *integrative conjugative element*.

IMI: *Imipenem-hydrolyzing β -lactamase*.

Inc: Incompatibilitat.

IS: *Insertion Sequence*.

IRL: *Inverted Repeat Left*.

IRR: *Inverted Repeat Right*.

ITR: *Inverted Repeat*.

ITU: infeccions del tracte urinari.

KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenamase*.

LB: Luria Bertani.

LNA1: *Library Normalization Additives 1*..

LNB 1: *Library Normalization Beads 1*.

LNP: *Library Normalization Plate*.

LNS1: *Library Normalization Storage 1*.

LNW1: *Library Normalization Wash 1*.

LPS: lipopolisacàrid.

MAS: Test de Masuda.

MATE: *Multidrug And Toxic-compound Extrusion.*

MBL: Metal-lobetalactamasa.

MFS: *Major Facilitator Superfamily.*

MLST: *MultiLocus Sequence Typing.*

MPOC: malaltia pulmonar obstructiva crònica.

MurNAc o NAM: N-àcid acetilmurínic.

NDM-1: *Nova Delhi metallobetalactamase.*

NGS: *New Generation Sequencing.*

NMC: *Not metalloenzyme carbapenemase.*

NPM: *Nextera PCR Master mix.*

NT: *Neutralize Tagment buffer.*

NTA: *Nextera XT Tagment amplicon Plate.*

OMP: *Outer membrane proteins.*

ORF: *Open Reading Frames.*

oriT: origen de transferència.

oriV : origen de replicació.

OXA: oxacil·linasa.

PAL: *Pooled Amplified Library.*

PBP: *Peniciline Binding Protein.*

PBRT: *PCR-Based Replicon typing.*

PCR: *Polymerase Chain Reaction.*

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis.*

PMQR: *Plasmid Mediated Quinolone Resistant.*

PRP: *Pentapeptide Repeated Protein.*

QRDR: *Quinolone Resistant Determinant Region.*

qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.*

RND: *Resistance Nodulation Division.*

RSB: tampó de resuspensió.

RLT: *RNeasy Lysis Buffer*.

RT: retrotranscripció.

SDS: *Sodium DodecylSulfate*.

SLV: *Single Locus Variant*.

SME-1: *Serratia marcescens* enzyme.

SMR: *Small Multidrug Resistance*.

SSC: *Saline-Sodium Citrate*.

ST: *Sequence Type*.

TBE: *Tris-Borate-EDTA*.

TD: *Tagment DNA buffer*.

TE: Tris-EDTA.

THM: Test de Hodge modificat.

Tn: tranposó.

UVA: *UltraViolet light type A*.

VP: Voges-Proskauer.

WGS: *Whole Genome Sequencing*.



BREVIACIONS

D'ANTIBIÒTICS

A: amicacina.

AMP: ampil·lina.

AMC: amoxicil·lina/àc. clavulànic.

ATM: aztreonam.

CA: àcid clavulànic.

CAZ: ceftazidima.

CEF: cefalotina.

CIP: ciprofloxacina.

CLR: cloranfenicol.

COL: colistina.

CRO: ceftriaxona.

CXM: cefuroxima.

CTX: cefotaxima.

D: dibecamicina.

DAP: daptomicina.

ERT: ertapenem.

FEP: cefepime.

FOS: fosfomicina.

FOX: cefoxitina.

G: gentamicina.

K: kanamicina.

L: lividomicina.

LVX: levofloxacina.

LZD: linezolid.

MER: meropenem.

MNO: minocilina.

MTZ: metronidazol.

NAL: àcid nalidíxic.

NIT: nitrofurantoina.

Nm: neomicina.

Nt: netilmicina.

P: paromicina.

PIP: piperacil·lina.

R: ribostamicina.

S: sisomicina.

Spt: espectinomicina.

Str: estreptomicina.

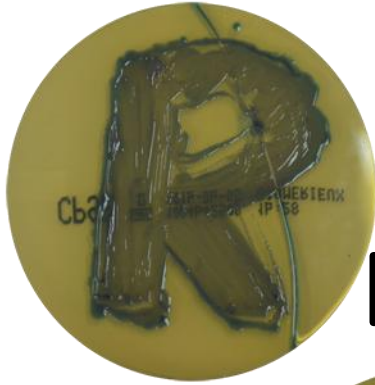
SXT: cotrimoxazol.

T: tobramicina.

TAZ: tazobactam.

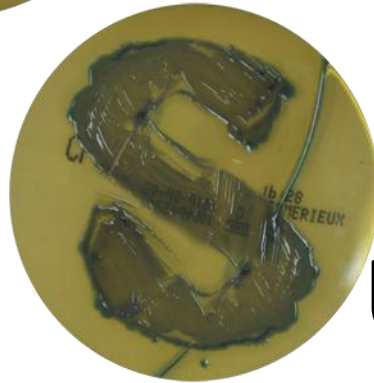
TGC: tigeciclina.

TZP: piperacil·lina/tazobactam



RESUM

&



SUMMARY



ESUM

La carbapenemasa OXA-48 esta àmpliament estesa arreu del món i principalment en *Enterobacteriaceae*. A Catalunya, *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 es va detectar per primer cop al 2009, i des d'aleshores semblava observar-se un cert increment. L'observació d'aquest increment per part de diferents hospitals fou la raó per a iniciar aquest estudi multicèntric que inclou 11 hospitals comarcals i l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i que té com a principal objectiu la caracterització, tant a nivell epidemiològic com molecular, de les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 aïllades al llarg del 2012. En l'estudi es van incloure totes aquelles soques de *K. pneumoniae* que presentaven un fenotip de resistència als antibiòtics betalactàmics diferent al patró natural esperat. A les soques seleccionades se'ls hi va realitzar el test de Hodge modificat (THM) per poder evidenciar la presència de qualsevol enzim amb activitat enfront els carbapenèmics.

D'un total de 3.901 soques de *K. pneumoniae* aïllades, 171 (4,4%) van ser positives per al THM. Per PCR es van confirmar com a portadores de l'OXA-48 85 soques (49,7%).

El vuitanta nou percent de les 85 soques productores de l'OXA-48 coexpressaven la BLEA CTX-M-15, acompanyada o no d'OXA-1 i/o TEM-1. Es va estudiar la clonalitat d'aquestes 85 soques per macrorestricció genòmica (PFGE) i *MultiLocus Sequencing Type* (MLST). Per PFGE es varen observar cinc clones: A, B, C, D i E; que es van correlacionar perfectament amb les cinc seqüència tipus trobades: ST101, ST17, ST1233, ST14 i ST405. La ST1233 va ser descrita per primer cop en aquest estudi.

El gen *bla*_{OXA-48} es trobat situat en un plasmidi conjugatiu del grup d'incompatibilitat IncI, (62 Kb aprox) i localitzat majoritàriament en Tn1999.2 (91,7%). Es va descartar que la resta de betalactamases trobades estiguessin en aquest plasmidi.

De les 85 soques productores d'OXA-48, 75 (88,23%) tenien el gen *qnrB*. També es varen estudiar els gens implicats en la resistència enzimàtica als aminoglicòsids. De les 85 soques estudiades, 82 es mostraren resistents a algun dels aminoglicòsids estudiats, El fenotip majoritari, va ser la resistència a kanamicina, tobramicina i gentamicina (KTG) i s'explica per la presència dels gens *aac(3')-IIa* (KTGN) i *aac(6)-Ib* (KTAN).

Es van observar que soques genèticament relacionades (igual PFGE, ST i presència dels mateixos gens de resistència) presentaven nivells de resistència diferents. Aquestes diferències no es varen poder associar a l'activació de bombes d'expulsió AcrAB ni alteracions de les porines estudiades.

Els resultats obtinguts per les tècniques clàssiques (PCR, Seqüenciació, PFGE i MLST) van ser comparats en 37 soques amb la nova tècnica de la seqüenciació massiva del genoma microbià (*Whole Genome Sequencing*: WGS) i el cgMLST (*core genome MultiLocus Sequence Typing*). Es resultats mostraren una bona correlació entre PFGE-MLST i cgMLST. A l'introduir les seqüències obtingudes pel WGS als webs PlasmidFinder i al ResFinder, vàrem poder identificar plasmidis recentment tipificats i la presència d'altres gens de resistència, com: *strA/strB*, *oqxA/oqxB*, *drfA*, *sul2*, *fosA*, *catB3*, *tet(A)* i *tet(D)*.

Amb les seqüències obtingudes per WGS també es va obtenir les seqüències de les dianes d'acció de les quinolones, els QRDR. Només es varen detectar alteracions en les tres soques del ST101.

En conclusió, l'increment de la prevalença de *K. pneumoniae* portadora d'OXA-48 a Catalunya es deu a la presència en tots els hospitals on s'han aïllat aquestes soques de l'expansió de les clones ST405 i ST101. No havent-hi trobat diferències en l'entorn genètic del gen que és el mateix que s'ha anat a descriuint arreu. Per altra banda, podem afirmar que la WGS és una bona eina per a la descripció epidemiològica i molecular de brots produïts per a soques multiresistents.



Summary

The OXA-48 carbapenemase is widely spread around the world and found mainly in *Enterobacteriaceae*. In Catalonia, OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* was first detected in 2009, since then, a growing prevalence has been observed in different hospitals, which prompted the aim of this multicenter study, which includes 11 regional hospitals and the Hospital de Santa Creu i Sant Pau, is the characterization, both epidemiological and molecular, of OXA-48-producing *K. pneumoniae* strains isolated throughout 2012. The study included all *K. pneumoniae* strains with an unusual pattern of resistance to beta-lactam antibiotics. Selected strains underwent a modified Hodge test (MHT) to detect any enzyme activity against carbapenemics.

A total of 3,901 *K. pneumoniae* strains, 171 MHT-positive strains (4.4%) were selected. PCR confirmed that 85 strains carried OXA-48 (49.7%).

Eighty nine percent of the 85 OXA-48-producing strains coexpressed the ESBL CTX-M-15, with or without beta-lactamases OXA-1 and TEM-1. The clonality of these 85 OXA-48-producing strains was studied by macrorestriction analysis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). Five clones were observed by PFGE: A, B, C, D and E. These five clones were perfectly correlated with the five sequence types found, ST101, ST171, ST1233, ST14 and ST405. ST1233 is described for the first time in this study.

The *bla*_{OXA-48} gene was found in a conjugative plasmid of incompatibility group IncI (aprox. 62 Kb) and located in Tn1999.2 (91.7%). The other beta-lactamase genes of these strains were not found in this plasmid.

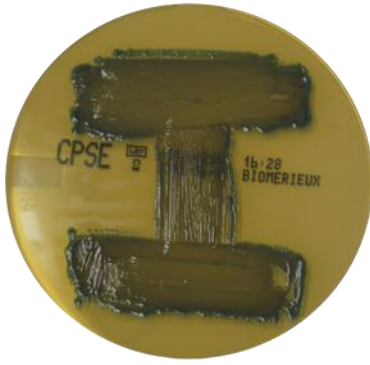
Of the 85 OXA-48-producing strains, 75 (88.23%) harboured the *qnrB* gene. Genes involved in enzyme-mediated resistance against aminoglycosides were also studied. Of the 85 OXA-48-producing strains, 82 showed resistance to some of the aminoglycosides studied. The major phenotype showed resistance to kanamycin, gentamicin and tobramycin (KTG), and it was explained by the presence of *aac(3')-IIa* (KTGN) and *aac(6')-Ib* (KTAN) genes.

We observed that genetically related strains (that is, closely related PFGE, identical ST and the presence of the same resistance genes) showed different levels of resistance. These differences couldn't be due to alterations in the expression of the efflux pump AcrAB or in porins.

Results obtained by classical techniques (PCR, sequencing, PFGE and MLST) in 37 strains selected were compared with those of the new techniques of massive sequencing of microbial genomes (Whole Genome Sequencing: WGS) and cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing). A good correlation was found between PFGE-MLST and cgMLST, and four strains were identical by cgMLST but not by PFGE. After uploading the sequences obtained by WGS to the PlasmidFinder and ResFinder online search tools, we were able to identify recently classified plasmids and determine the presence of other resistance genes, such as: *strA* / *strB*, *oqxA* / *oqxB*, *drfA*, *sul2*, *fosA*, *catB3*, *tet(A)* and *tet(D)*. The use of WGS allowed us to obtain sequences of the targets of the quinolones, the QRDR.

Surprisingly, only alterations described as responsible for this resistance were detected in all three ST101 strains.

In conclusion, the increase in the prevalence of OXA-48-carrying *K. pneumoniae* in Catalonia is due to the expansion of the ST405 and ST101 clones in all hospitals where strains were isolated. No differences in the genetic background of the *bla*_{OXA-48} gene were found, as reported elsewhere. Moreover, WGS was found to be a useful tool for the molecular and epidemiological analysis of outbreaks caused by multidrug-resistant strains.



INTRODUCCIÓ

1.1. *Enterobacteriaceae: Klebsiella pneumoniae*

El nom *Enterobacteriaceae*, va ser donat pel microbiòleg Otto Rahn, al 1937, a un conjunt de bacteris gramnegatius que en la seva majoria es trobaven dins la flora intestinal i que compartien certes similituds morfològiques i bioquímiques¹⁻⁴.

Avui en dia aquest terme fa referència a un grup molt ampli i divers de bacils gramnegatius, amb més de 50 gèneres cultivables i més d'un centenar d'espècies descrites, i diversos gèneres endosimbionts o paràsits d'insectes i plantes, alguns dels quals no són cultivables en medis convencionals. Els gèneres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* i *Yersinia*, són coneguts en el món de la microbiologia clínica com a habituals patògens humans (Taula 1). Aquesta família és la única representativa en l'ordre dels *Enterobacteriales* de la classe dels *Gammaproteobacteris* i del phylum dels *Proteobacteris* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy i www.bacterio.net). La seva classificació s'ha realitzat a partir de la característiques bioquímiques (estudis del seu metabolisme), la seva estructura antigènica o mitjançant tècniques moleculars (estudis ARNr 16S).

Els enterobacteris són bacils gramnegatius de 1 a 5 µm de grandària, aerobis i anaerobis facultatius, no esporulats, que fermenten carbohidrats (p.e. glucosa) per la via àcid-mixta o del butanodiol per obtenir àcid làctic i altres productes, i la gran majoria pot reduir el nitrat a nitrit. Són catalasa positius i oxidasa negatius, exceptuant *Plesiomonas shigelloides*^{3,5,6}. Clínicament creixen en medis de cultiu usuals, així com en medis que contenen citrat sòdic o sals biliars, com el medi de MacConkey que s'utilitza per seleccionar els bacteris d'aquesta família en mostres polimicrobianes. Generalment són mòbils degut a la presència de flagels peritrics envoltant tota la cèl·lula, exceptuant alguns gèneres immòbils com *Klebsiella* i *Shigella*. Moltes espècies, a més dels flagels produeixen fimbries o pili, càpsules o ambdues coses, que molt cops són importants factors de virulència. Les fimbries o pili estan presents en quasi totes les espècies i són responsables de la fixació de les cèl·lules bacterianes a altres bacteris, a les cèl·lules de l'hoste o actuant com a receptor de bacteriòfags. La majoria dels enterobacteris són acapsulars, sense càpsula, exceptuant el gènere *Klebsiella* i algunes soques d'*Escherichia coli*, les càpsules són de composició polisacàrida i poden tenir una estructura laxa o rígida.

Els enterobacteris tenen una estructura típica dels bacils gramnegatius, és a dir, tenen la pared cel·lular embolcallant la membrana interna o citosòlica (Figura 1). Aquesta pared cel·lular està composta per una fina capa de peptidoglicà que es troba recoberta per una membrana externa.

La membrana externa està formada per⁷:

1. Les proteïnes de membrana i els canals protèics (porines) que permeten el pas selectiu de substàncies hidrofíliques.
2. Lipopolisacàrids (LPS, amb 3 regions: el Lípid A, el nucli del polisacàrid i l'antigen O).
3. Les lipoproteïnes o proteïnes de Braun, implicades en la unió de la membrana externa i el peptidoglicà.

4. Els fosfolípids que confereixen rigidesa i permeabilitat a la membrana.

El peptidoglicà, que és un heteropolímer unit covalentment, s'estén per la part exterior de la membrana interna. Les seves funcions principals són les de mantenir la forma cel·lular i conferir rigidesa al microorganisme, oferir protecció enfront a condicions ambientals adverses, mantenir la pressió osmòtica per a evitar la lisi cel·lular i constituir una barrera impermeable a molècules no lipofíliques, carregades i de gran mida. Gràcies a ell i al comportament que pren davant la tinció de Gram, és d'on deriva el nom de gramnegatiu. En la tinció de Gram, el cristall violeta tenyeix el peptidoglicà. Al ser aquesta capa més gruixuda en els bacteris grampositius, aquests queden tenyits de blau, mentre que els bacteris gramnegatius per la decoloració amb alcohol-acetona perden aquesta coloració i es tenyeixen de color rosat gràcies a la tinció per contrast (safranina o fucsina).

Taula 1. Enterobacteris més destacats en microbiologia clínica.

Gènere	Espècie	Patologia
Patògens		
Salmonella	<i>S. enterica</i>	Enteritis
	Serotips: Enteritidis, Typhimurium i altres.	
	Serotips: Typhi, Paratyphi A, B, C.	Febre tifoidea i paratifoidea
Shigella	<i>S. dysenteriae, S. sonnei, S. flexneri, S. boydii</i>	Enteritis
Yersinia	<i>Y. pestis</i>	Peste
	<i>Y. enterocolítica</i>	Enteritis
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Adenitis mesentèrica
Klebsiella	<i>K. granulomatis</i>	Granuloma inguinal
	<i>K. rhinoscleromatis</i>	Rinoscleroma
	<i>K. ozenae</i>	Ocena
Escherichia	<i>E. coli</i> (determinats serotips)	Enteritis
Començals		Infeccions oportunistes
Escherichia	<i>E. coli</i>	
Klebsiella	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca</i>	
Enterobacter	<i>E. cloacae, E. aerogenes</i>	
Serratia	<i>S. marcescens</i>	
Proteus	<i>P. vulgaris, P. mirabilis</i>	
Morganella	<i>M. morganii</i>	
Providencia	<i>P. stuartii</i>	
Citrobacter	<i>C. freundii, C. koseri</i>	

La membrana citosòlica és composta per proteïnes i fosfolípids (bicapa lipídica). Les seves funcions són la permeabilitat selectiva i transport de soluts (la major part de les molècules que la travessen no ho fan de forma passiva), la fosforilació oxidativa en els organismes aeròbics, l'alliberament d'enzims hidrolítics i el reciclatge de receptors.

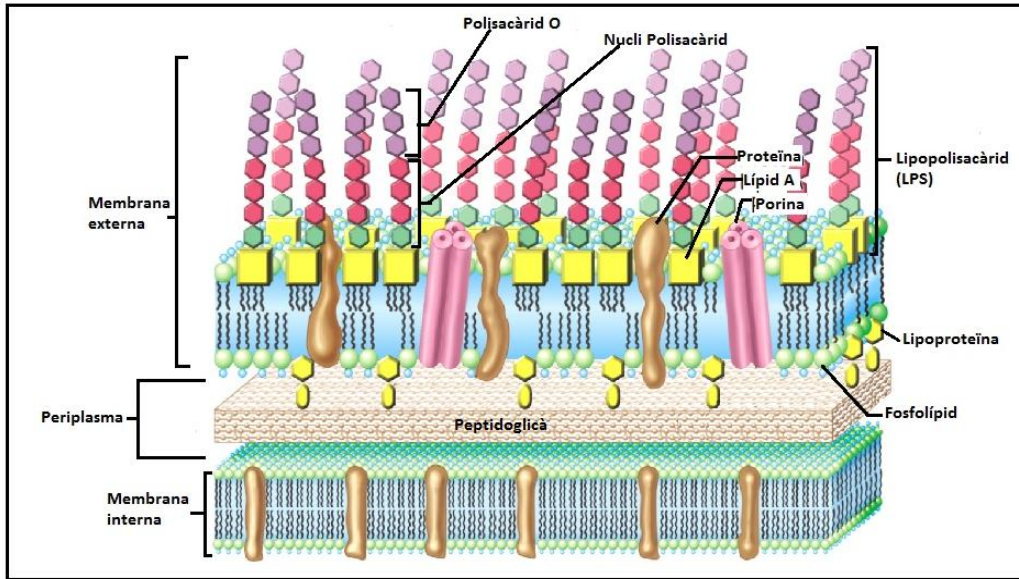


Figura 1. Esquema de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius. On s'observa la membrana externa (composta per fosfolípids, lipoproteïnes, proteïnes transmembranals, porines, lipopolisàcrids), la capa de peptidoglicà en el periplasma i la membrana interna.

Klebsiella pneumoniae és l'espècie amb major rellevància clínica dins el gènere *Klebsiella*. El gènere va ser anomenat així en honor a Edwin Klebs, un microbiòleg alemany de finals del segle XIX. El bacil també va ser descrit per Carl Friedländer, i durant molts anys va ser conegut com el bacil de Friedländer⁸. Freqüentment es troba causant infeccions nosocomials: infeccions del tracte urinari (ITU), pneumònies, sèpsies, infeccions de teixits tous i infeccions de ferida quirúrgica. Són especialment sensibles els pacients ingressats en unitats de cures intensives, noutats, i pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), amb diabetis mellitus o alcohòlics^{3,8}.

Al créixer en agar MacConkey es pot observar la seva capacitat d'assimilar i fermentar la lactosa on les colònies són de color rosat clar. En els medis cromogènics (per exemple el medi CPS de BioMérieux) tenen un color verd-blau (Figura 2) degut a l'activitat de la β -glucosidasa i l'absència d'activitat β -glucuronidasa. *K. pneumoniae* no és mòbil, no produeix indol, no té activitat d'ornitina descarboxilasa, i si té capacitat per desaminar o descarboxilar la lisina. No produeix sulfur d'hidrogen i si produeix acetoina a partir de l'àcid pirúvic en la degradació de la glucosa (test de Voges-Proskauer (VP) positiu). Tanmateix, fermenta la lactosa, la sucrosa, el D-manitol, el dulcitol, l'arabinosa, i el sorbitol entre altres sucres⁸.

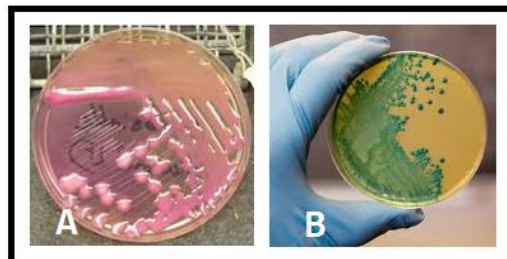


Figura 2. Soca de *Klebsiella pneumoniae* crescuda en placa d'agar Mac Conkey (A) i en agar CPS (B).

K. pneumoniae presenta resistència natural a certs betalactàmics, com aminopenicil·lines (ampicil·lina) i carboxipenicil·lines (ticarcil·lina), sensibilitat reduïda o intermitja a ureidopenicil·lines (piperacil·lina), mantenint-se sensibles a cefalosporines, monobactàmics (aztreonam), carbapenèmics (imipenem) i a les associacions amb inhibidors de betalactamasa (amoxicil·lina-àcid clavulànic). Aquesta resistència intrínseca a alguns betalactàmics és deguda a la producció d'una betalactamasa cromosòmica de classe A, amb activitat penicilinasas (SHV-1 o altres relacionades)⁹. Totes les soques de *K. pneumoniae* que no hagin adquirit cap mecanisme de resistència es mostren sensibles a quinolones, aminoglicòsids o cotrimoxazol, entre d'altres.

1.2. Tractament de les infeccions causades per *Enterobacteriaceae*

El tractament de primera elecció de les infeccions causades per enterobacteris són els antibiòtics betalactàmics, tot i que degut a l'augment de l'aparició i la prevalença de diferents mecanismes de resistència enfront aquest antibiòtics, com les betalactamases, també es tracten amb altres antibiòtics com les quinolones o cotrimoxazol o fosfomicina¹⁰.

Actualment s'estan describint soques amb un perfil de multiresistència que inclou els aminoglicòsids, les fluoroquinolones i el cotrimoxazol, circumstància que restringeix les seves possibilitats terapèutiques. Aquest fet és degut a que en molts dels casos, els determinants genètics que codifiquen aquestes resistències són presents en el mateix element genètic mòbil (plasmidis, transposons i integrons). En aquests elements doncs, és relativament freqüent la presència a l'hora de gens de resistència a aminoglicòsids (codifiquen els enzims modificants de aminoglicòsids o les metilases) o trimetoprin (*dhr*, codifiquen les dihidrofolat reductases) i la seva inherent relació amb gens *sul*, de resistència a sulfamides. També poden presentar gens de resistència a quinolones com els *qnr*, l'*aac(6')-Ib-cr* i *qepA*. Com a opcions alternatives per al tractament d'aquests enterobacteris multiresistents s'ha suggerit la tigeciclina, la colistina, la fosfomicina o la nitrofurantoïna, sobretot en el cas de les infeccions urinàries. En qualsevol cas el tractament es veurà supeditat als resultats de l'antibiograma¹⁰.

1.3. Els betalactàmics

Actualment, malgrat l'increment de la resistència, els **antibiòtics betalactàmics** constitueixen el principal tractament d'elecció per a les infeccions per enterobacteris donat el seu ampli espectre d'acció, eficàcia i baixa toxicitat^{11,12}.

1.3.1. Estructura química i classificació dels betalactàmics

En la seva estructura molecular els antibiòtics betalactàmics contenen un anell betalactàmic, el qual pot estar unit a un anell secundari (Figura 3).

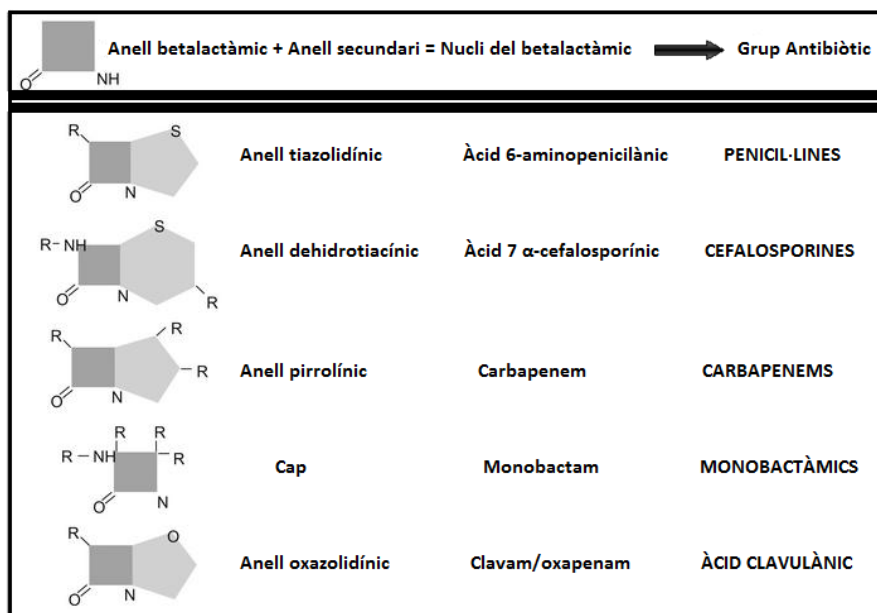


Figura 3. Estructura química dels antibiòtics betalactàmics (<http://zl.elsevier.es/imatges/28/28v27n02/grande/28v27n02-13133636fig03.jpg>)

Dependent de la naturalesa dels radicals presents en el nucli del betalactàmic, trobem una àmplia gamma d'antibiòtics betalactàmics (Taula 2)^{13,14}:

- **Les penicil·lines:** contenen dues estructures cícliques, l'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA), compost d'un anell betalactàmic i un anell de tiazolidina. Una cadena lateral en la posició 6 de l'anell betalactàmic varia entre les diferents penicil·lines i defineix les seves propietats.
- **Les cefalosporines:** són compostos semisintètics derivats de la cefalosporina C. Dins d'aquest grup es troben les cefamicines, els carbacefems i els oxacefems. Estan compostes per un nucli cefem, producte de la fusió d'un anell betalactàmic amb un anell de dehidrotiacínic. Les substitucions en la posició 3 i 7 a les cadenes laterals determinen les diferents propietats i la farmacocinètica. La seva classificació en generacions està basada en el moment de desenvolupament i en l'espectre d'activitat que presenta.
- **Els carbapenèmics:** tenen una estructura bàsica que es compon d'un anell betalactàmic unit a un anell de pirrolidina. Aquestes modificacions, les cadenes laterals i la seva posició espacial augmenta la seva afinitat per les proteïnes d'unió a penicil·lina (PBP). Són els betalactàmics de més ampli espectre.
- **Els monobactàmics:** són molècules monocícliques, derivades de l'àcid 3-amino-monobactàmic (3-AMA), on el nitrogen de l'anell de betalactàmic s'uneix a un radical sulfònic. L'anell betalactàmic no està vinculat a un altre anell secundari. L'aztreonam és l'únic exemple de monobactam utilitzat en l'àmbit clínic.

- **Els inhibidors de la betalactamasa:** s'utilitzen en combinació amb penicil·lines per tal de restablir la funció dels antibiòtics betalactàmics en bacteris productors de betalactamases. Hi ha tres grups diferents: l'àcid clavulànic, el sulbactam i el tazobactam. L'àtom de sulfur en l'anell de tiazolidina de l'àcid clavulànic està substituït per un d'oxigen i, en el cas de sulbactam i tazobactam, tenen una oxidació en el grup sulfur. L'avibactam és un nou inhibidor de les betalactamases amb un espectre d'activitat que inclou betalactamases de les classes A, C i D¹⁵.

Taula 2. Classificació dels antibiòtics betalactàmics.

Classe	Grup	Antibiòtic
Penicil·lines	Penicil·lines naturals	Penicil·lina G, Penicil·lina V
	Aminopenicil·lines	Ampicil·lina, Amoxicil·lina
	Ureidopenicil·lines	Azlocil·lina, Mezlocil·lina, Piperacil·lina
	Carboxipenicil·lines	Carbenicil·lina, Ticarcil·lina
	Isoxazolilpenicil·lines	Oxacil·lina, Cloxal·lina
Cefalosporines	Cefalosporines 1 ^a generació	Cefazolina, Cefalotina, Cefradina, Cefadroxil, Cefalexina
	Cefalosporines 2 ^a generació	Cefamandol, Cefuroxima, Cefaclor, Cefonicid
	Cefalosporines 3 ^a generació	Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefixima, Cefoperazona
	Cefalosporines 4 ^a generació	Cefepime, Cefpiroma
	Cefalosporines 5 ^a generació	Ceftobiprole, Ceftarolina
	Cefamicines	Cefoxitina, Cefmetazol, Cefotetàn
Monobactàmics		Aztreonam
Carbapenèmics		Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem
Inhibidors de betalactamases		Àcid clavulànic, Sulbactam, Tazobactam, Avibactam*
*Inhibidor de betalactamases sense estructura betalactàmica .		

1.3.2. Mecanisme d'acció dels betalactàmics

Els antibiòtics betalactàmics tenen acció bactericida, ja que actuen inhibint la síntesi de la capa del peptidoglicà de la paret cel·lular bacteriana i això comporta l'autòlisi de la cèl·lula bacteriana. La capa de peptidoglicà és important per a la integritat estructural de la paret cel·lular, especialment en organismes grampositius on és el component exterior i primari de la paret.

La síntesi de peptidoglicà (Figura 4) es pot dividir en 3 etapes: en la primera i la segona, els precursors del peptidoglicà es sintetitzen en el citoplasma i són transportats a l'espai periplasmàtic a través de la membrana citoplasmàtica, en forma de GLcNAc-MurNAc-pentapèptid (**GLcNAc**: N-acetil-β-D-glucosamina, **MurNAc**: N-acilmurínic). En la tercera etapa esdevé l'acoblament i el creixement del peptidoglicà. En l'última etapa es produeix la polimerització de diverses unitats disacàrides mitjançant una reacció de transglucosidació. El GLcNAc-MurNAc-pentapèptid s'uneix al peptidoglicà, mitjançant les transglucosidases, per enllaços β(1→4); formant un polímer que és una cadena lineal del peptidoglicà sense entrecreuar¹⁶.

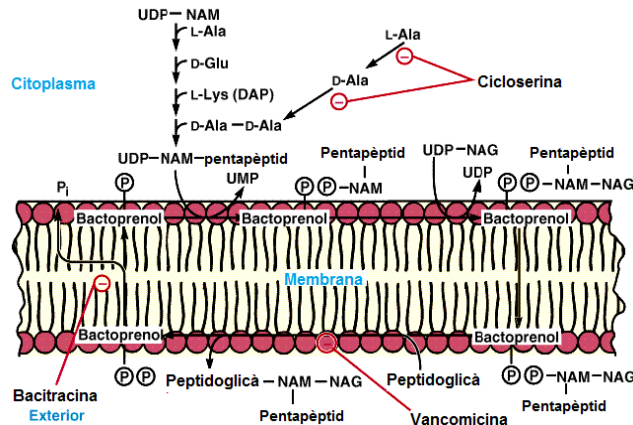


Figura 4. Síntesi del peptidoglicà¹⁷. S'observen els monosacàrids (NAM, N-acilmuràmic i NAG, N-acetil-β-D-glucosamina) que després constituiran la unitat disacàridica repetitiva de l'esquelet del peptidoglicà, que un cop unida a l'uridín difosfat (UDP) s'activen. A continuació es produeix l'addició seqüencial i ordenada de diferents aminoàcids (L-Ala, D-Glu, L-Lys, D-Ala-D-Ala), donant lloc a la síntesi d'un pentapèptid. Llavors el UDP-NAM-pentapèptid és transferit a l'undecaprenil-fosfat (un transportador de membrana, Lip-P) gràcies a l'acció d'una transferasa específica. Un cop està el NAM-pentapèptid unit a l'undecaprenil, una transferasa transfereix la NAG des de l'UDP-NAG, i es genera l'enllaç β(1 a 4) entre NAG i NAM. Obtenint: Lip-P-P-NAM(pentapèptid)-NAG. Es detallen alguns dels antibiòtics que actuen a nivell de la síntesi del peptidoglicà, com és el cas de la vancomicina, la cicloserina o la bacitracina.

Aquest polímer reacciona amb un peptidoglicà acceptor, per transpeptidació (Figura 5). Això genera un enllaç peptídic entre el grup diamino del peptidoglicà acceptor i el grup carboxil de la D-alanina subterminal del peptidoglicà nou, alliberant la D-alanina terminal que serà eliminada per uns enzims anomenats D-D-carboxipeptidases.

El pas final de transpeptidació en la síntesi del peptidoglicà es veu facilitat per les transpeptidasses PBP (proteïnes d'unió a penicil·lina), les quals tenen una afinitat variable per a la unió de penicil·lines o altres antibiòtics betalactàmics.

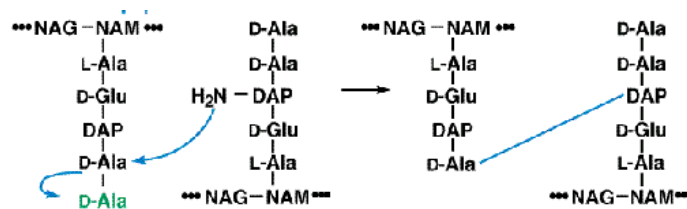


Figura 5. Transpeptidació¹⁷. La cadena recent sintetitzada del peptidoglicà reacciona amb un peptidoglicà acceptor pre-existent. En aquesta reacció es veuen implicats el grup C = O de la D-Ala del peptidoglicà naixent i el grup -NH₂ lliure del diaminoàcid del peptidoglicà acceptor (o de l'últim aminoàcid del pont peptídic).

Els antibiòtics betalactàmics són anàlegs a la D-alanyl-D-alanina (residus aminoàcídics terminals en el precursor GLcNAc/MurNAc de la capa de peptidoglicà naixent) fet que facilita la seva unió al lloc actiu de la PBP. El nucli betalactàmic de la molècula s'uneix irreversiblement al residu Ser403 del centre actiu de la PBP. Aquesta inhibició irreversible de les PBP evita la transpeptidació final de la capa de peptidoglicà naixent, interrompent la síntesi de la paret cel·lular. La inhibició de la transpeptidació causa una acumulació de precursors de peptidoglicà, els quals produeixen una activació d'enzims com hidrolases i autolisines que digereixen, més encara, el romanent de peptidoglicà en el bacteri.

1.3.3. Mecanismes de resistència als betalactàmics

Davant de l'aparició i l'ús dels antibacterians, els bacteris han desenvolupat un seguit de **mecanismes de resistència** enfront ells^{18,19} (Figura 6). El principal mecanisme de resistència en enterobacteris però, és la producció d'enzims inactivants. El mecanisme enzimàtic porta en molts casos associat d'altres mecanismes com aquells implicats en la disminució de la concentració intracel·lular de l'antibiòtic, tant degut a alteracions de la permeabilitat com degut a la sobreexpressió de bombes d'expulsió actives.

Per altra banda, encara que de manera anecdòtica, comentar que en enterobacteris s'ha descrit també resistència degut a alteracions de la diana (les PBP). Les alteracions de la diana són canvis estructurals en les PBP, degut a mutacions o a incorporacions d'ADN exogen, que poden conduir a una pèrdua substancial d'afinitat entre aquestes proteïnes i els betalactàmics, i a la reducció de l'activitat antimicrobiana d'aquests últims. Les modificacions no impedeixen a aquestes dianes seguir realitzant la seva funció fisiològica en el bacteri. Aquest tipus de mecanisme de resistència és més freqüent en bacteris grampositius (p.e. *Staphylococcus aureus*). En *K. pneumoniae* no s'han descrit.

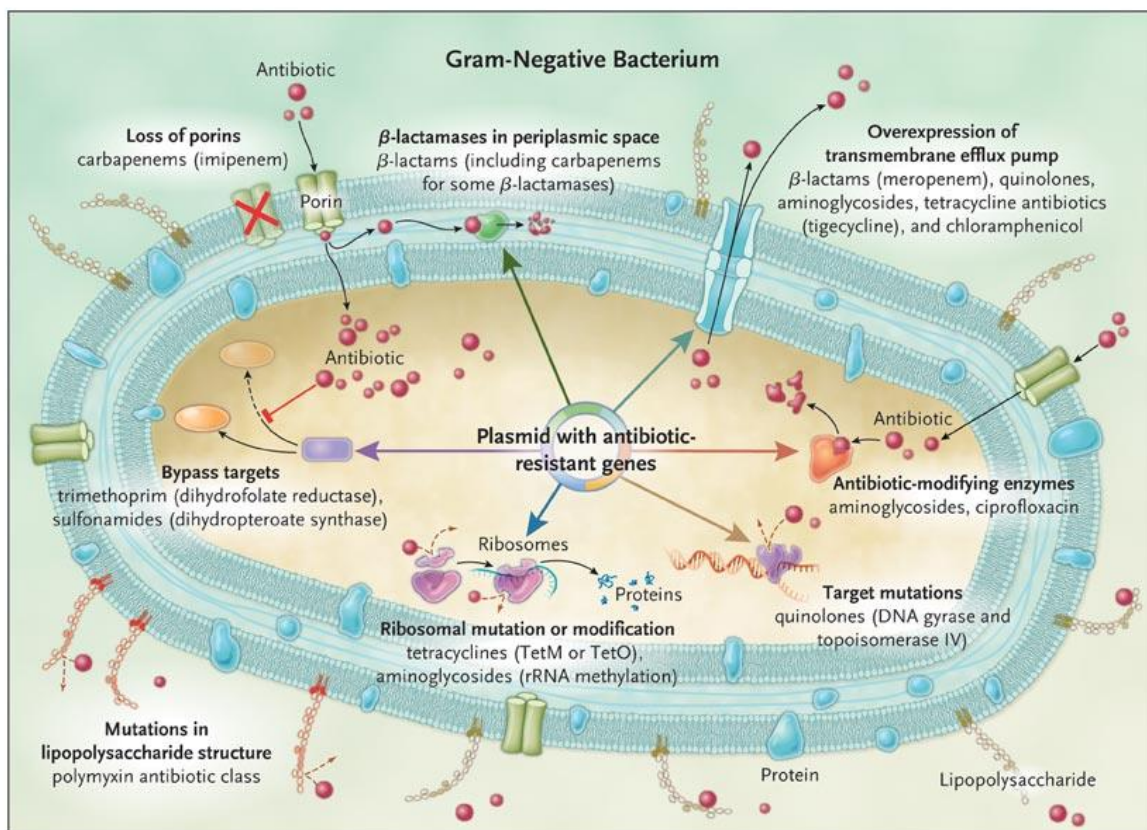


Figura 6. Mecanismes de resistència en bacteris gramnegatiu²⁰. Pèrdua de porines, producció de betalactamases en l'espai periplasmàtic, sobreexpressió de bombes d'expulsió transmembranals, enzims modificadors dels antibiòtics, mutacions de les dianes, modificació/mutació dels ribosomes, mutacions del LPS i modificació del metabolisme de les dianes.

1.3.3.1. Les betalactamases

Els enzims **inactivants dels betalactàmics** reben el nom genèric de betalactamases.

Les betalactamases, s'han convertit en el mecanisme de resistència més comú als betalactàmics en els bacteris gramnegatius i en la família *Enterobacteriaceae*^{21,22}. Les betalactamases actuen hidrolitzant l'enllaç amida de l'anell betalactàmic. Això provoca que l'antibiòtic perdi la capacitat d'unir-se a les PBP, i per tant, la d'inhibir la síntesi del peptidoglicà.

Les betalactamases estan codificades pels gens *bla*, i es poden expressar de forma constitutiva o induïble. Aquests gens *bla* poden estar codificats en el cromosoma o en elements genètics mòbils (plasmidis, transposons, integrons, etc.). Les betalactamases, en bacteris gramnegatius s'excreten a l'espai periplasmàtic, on hidrolitzen el betalactàmic impedint que aquest inactivi a les PBP. També es troben en bacteris grampositius però en menor freqüència.

L'origen de les betalactamases sembla que està en diferents espècies de microorganismes on desenvolupaven un paper en el metabolisme de la paret cel·lular bacteriana, tal com s'evidencia pel fet que l'expressió induïble de les betalactamases de classe C està íntimament lligada a la d'enzims de reciclatge del peptidoglicà. El seu paper en la protecció contra els antibiòtics betalactàmics d'ús clínic podria, per tant, ser gratuït; però, és en aquest paper on ara tenen la major importància clínica i es troben sota una gran pressió de selecció²¹.

A partir de la introducció en l'àmbit clínic dels antibiòtics betalactàmics hi va haver una diferenciació i diversificació de les betalactamases, obtenint un augment en el nombre d'aquets enzims. Actualment hi ha més de 1.300 betalactamases identificades (www.lahey.org/studies/).

Des de la seva aparició, les betalactamases s'han estat classificant segons el perfil de substrat o les propietats bioquímiques, i s'han anomenat seguint diferents formats segons el lloc on s'han descobert, el nom del pacient, el nom de la soca bacteriana on s'ha descobert, etc.^{22,23,24} (www.lahey.org/studies/). En l'actualitat, però, s'ha arribat a un consens basat en dos criteris:

- Les seves característiques funcionals enzimàtiques: classificació Bush-Jacoby-Medeiros^{25,26,27}.
- La seva estructura primària: classificació d'Ambler²⁸.

La classificació més simple és la basada en les seves característiques estructurals i que agrupa les betalactamases en 4 classes moleculars (A, B, C i D). Malgrat això, la classificació funcional resulta més pràctica, donat que permet establir una relació entre els enzims i les diferents resistències als antibiòtics betalactàmics (Taula 3).

Taula 3. Classificació de les betalactamases.

Grup Bush-Jacoby (2009)	Classe molecular (subclasses)	Substrat	Inhibició per CA/ EDTA	Característiques	Enzims representatius
1	C	Cefalosporines	-/-	Major hidròlisis de cefalosporines (inclòs cefamicines) que de benzilpenicil·lina.	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, MIR-1, FOX-1
1e	C	Cefalosporines	-/-	Augment de la hidròlisis de ceftazidima i a vegades d'altres oximinobetalactàmics	GC1, CMY-37
2a	A	Penicil·lines	+/-	Major hidròlisis de la benzilpenicil·lina que de cefalosporines	PC1
2b	A	Penicil·lines i cefalosporines de 1 ^a i 2 ^a generació	+/-	Similar hidròlisis i de benzilpenicil·lina i cefalosporines	TEM-1, TEM-2, SHV-1.
2be	A	Cefalosporines d'ampli espectre i monobactàmics	+/-	Hidròlisi incrementada de oximinobetalactàmics	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1.
2br	A	Penicil·lines	-/-	Resistència al àcid clavulànic, sulbactam i tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporines d'ampli espectre, monobactàmics	-/-	Hidròlisi incrementada d'oximinobetalactàmics i resistència a inhibidors	TEM-50
2c	A	Carbenicil·lina	+/-	Hidròlisi incrementada de la carbenicil·lina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicil·lina, cefepime	+/-	Hidròliss incrementada de la carbenicil·lina i cefepime	RTG-4
2d	D	Cloxacil·lina	Variable/-	Hidròlisi incrementada de cloxacil·lina o oxacil·lina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporines d'ampli espectre	Variable/-	Hidròlisi incrementada de cloxacil·lina u oxacil·lina i oximinobetalactàmics	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenèmics	Variable/-	Hidròlisi incrementada de cloxacil·lina o oxacil·lina i carbapenèmics	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporines d'ampli espectre	+/-	Hidrolitza cefalosporines, inhibida per àc. clavulànic no per aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenèmics	Variable/-	Hidròlisi incrementada de carbapenèmics, oximinobetalactàmics i cefamicines	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1)	Carbapenèmics	-/+	Hidròlisi d'ampli espectre (inclòs carbapenèmics i no monobactàmics)	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, NDM
3a	B(B3)	Carbapenèmics	-/+	Hidròlisi d'ampli espectre (inclòs carbapenèmics i no monobactàmics)	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B(B2)	Carbapenèmics	-/+	Hidròlisi preferencial de carbapenèmics	CphA, Afh-1

Grup 1: Les betalactamases de classe C (AmpC), també anomenades cefamicinases, tenen un residu de serina en el seu centre actiu, i normalment es troben codificades en el cromosoma de moltes *Enterobacteriaceae* i altres microorganismes. Són resistents a l'àcid clavulànic i mostren més afinitat a les cefalosporines que a les benzilpenicil·lines. Engloba les betalactamases de la classe molecular C d'Amblar.

Grup 2: Aquest grup engloba les betalactamases de classe molecular A i D, i és el grup més gran. Aquestes també presenten un residu de serina al centre actiu.

- **Subgrup 2a:** petit grup betalactamases d'ampli espectre que hidrolitzen només les benzilpenicil·lines. Són inhibides per l'àcid clavulànic i el tazobactam. Aquests enzims són de la classe molecular A.
- **Subgrup 2b:** hidrolitzen fàcilment penicil·lines i cefalosporines de primera generació i són inhibides per l'àcid clavulànic i el tazobactam. Inclouen els enzims TEM-1, TEM-2, i SHV-1.
 - **Subgrup 2be:** inclouen les betalactamases d'espectre ampliat (BLEA), algunes són derivades de TEM-1, TEM-2 o SHV-1. No només hidrolitzen les penicil·lines i les cefalosporines, sinó també els oximinobetalactàmics i monobactàmics (cefotaxima, ceftazidima i aztreonam). Són sensibles a l'àcid clavulànic. Les principals famílies són TEM, SHV i CTX-M. Aquests enzims són de la classe molecular A.
 - **Subgrup 2br:** són enzims d'ampli espectre derivats de les betalactamases tipus TEM i SHV, es caracteritzen per ser resistents a l'àcid clavulànic. Aquests enzims són de la classe molecular A.
- **Subgrup 2c:** inclou les carbenicil·linases, CARB o PSE, que hidrolitzen preferentment carbenicil·lina i ticarcil·lina. Són generalment inhibides per l'àcid clavulànic i el tazobactam. Aquests enzims són de la classe molecular A.
 - **Subgrup 2ce:** inclueix la carbenicil·linasa d'ampli espectre RTG-4 (CARB-10), que presenta activitat, a més, enfront cefepime. Aquests enzims són de la classe molecular A.
- **Subgrup 2d:** també s'anomenen oxacil·linases (OXA) per la seva capacitat d'hidrolitzar cloxacil·lina i oxacil·lina. Són resistents a l'àcid clavulànic però inhibides pel clorur sòdic (NaCl). Aquests enzims són de la classe molecular D.
 - **Subgrup 2de:** enzims que hidrolitzen cloxacil·lina o oxacil·lina, i a més presenten activitat enfront els oximinobetalactàmics, però segueixen sent sensibles als carbapenèmics. Són derivats d'OXA-10. Aquests enzims són de la classe molecular D.
 - **Subgrup 2df:** són resistents a l'àcid clavulànic i hidrolitzen carbapenèmics. Freqüentment es troben en el cromosoma d'*A. baumannii*, encara que també s'han trobat en *Enterobacteriaceae* (OXA-23, OXA-48). Tenen una alta activitat hidrolítica contra benzilpenicil·lina i oxacil·lina, i baixa activitat carbapenemàsica, encara que són més actius enfront imipenem que meropenem. Aquests enzims són de la classe molecular D.
- **Subgrup 2e:** aquest subgrup de cefalosporinases tenen la capacitat d'hidrolitzar cefalosporines d'ampli espectre i ser inhibides per l'àcid clavulànic o el tazobactam. Es poden diferenciar de les AmpC per la seva baixa afinitat a l'aztreonam. Un exemple és la CepA. Aquests enzims són de la classe molecular A.
- **Subgrup 2f:** són enzims amb activitat carbapenemàsica. Són inhibides per l'àcid clavulànic i tazobactam, i mostren una major activitat hidrolítica enfront l'aztreonam que enfront les

cefalosporines d'ampli espectre. Les principals famílies de betalactamases cromosòmiques d'aquest grup són KPC, SME, IMI-1 i NMC-1^{29,30}. Aquests enzims són de la classe molecular A.

Grup 3: Són les anomenades metal·lobetalactamases (MBL) que pertanyen a la classe molecular B. Estructuralment són diferents de la resta degut a que necessiten un ió de zinc en el seu centre actiu. Hidrolitzen tots els betalactàmics, amb excepció dels monobactàmics, i no són inhibides per l'àcid clavulànic o tazobactam però si pels quelants d'ions metàl·lics com l'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA). Les principals famílies presents en enterobacteris són els IMP, VIM i NDM. Els gens que les codifiquen estan freqüentment situats en elements mòbils³¹.

1.3.3.2. Alteracions en la permeabilitat cel·lular.

Un altre mecanisme de resistència és el d'impedir que l'antibiòtic arribi a la seva diana, i una manera de fer-ho és alterant el pas de substàncies a través de la membrana cel·lular. Aquestes alteracions es deuen fonamentalment a dos processos, disminució de les proteïnes de la membrana externa (OMP), anomenades porines, que fan disminuir l'entrada de l'antibiòtic, i l'activació de bombes d'expulsió que activen la sortida de l'antibiòtic fora la cèl·lula. En ambdós casos aquests mecanismes confereixen una resistència de baix nivell i que pot afectar a diferents famílies d'antimicrobians a l'hora.

1.3.3.2.1. Les porines

Les porines són proteïnes de la membrana externa (*Outer membrane proteins*: OMP) dels bacteris gramnegatius que formen canals que permeten l'entrada de diferents nutrients. Aquestes "vies d'accés" són utilitzades sovint pels antibacterians per accedir a l'interior de la cèl·lula. Per això, l'alteració d'aquestes proteïnes transmembranals (bé en nombre, bé en estructura), o la desaparició d'alguna, evita l'entrada dins la cèl·lula de dites substàncies i origina soques resistents a l'antimicrobià³²⁻³⁶.

Podem trobar dos tipus de porines: les no específiques, que permeten la difusió de molècules polars petites, com per exemple OmpK36; i les específiques, que faciliten la difusió de substrats específics, com per exemple LamB. Les principals porines descrites en *K. pneumoniae* i que s'han relacionat amb la resistència a determinats antibiòtics són l'OmpK36 i OmpK35, tot i que també s'han descrit altres com LamB, PhoE, OmpK37 i OmpK26 que també hi podrien jugar algun paper.

OmpK26: és homòloga a la NanC d'*E. coli*. Presenta una estructura típica de barril β amb 5 girs periplàsmics curts i 6 *loops* extracel·lulars de mida variable. Està involucrada en el transport d'oligosacàrids àcids. Es creu que la seva expressió és un mecanisme essencial per a compensar la pèrdua de l'OmpK36. I s'ha vist que la seva sobreexpressió està correlacionada amb la resistència a carbapenèmics³⁷.

OmpK35: és l'homòloga a l'OmpF d' *E. coli*. Presenta una estructura típica de 16 làmines β , amb 8 girs periplàsmics curts i 8 *loops* extracel·lulars amb una mida variable (Figura 7). Permet una penetració eficient de la cefoxitina i carbapenèmics, però existeix certa controvèrsia amb el rol que té amb la resta de les cefalosporines. Té un paper més important en la modificació de la sensibilitat a

antimicrobians que l'OmpK36, tal i com es va observar en l'estudi de Doménech-Sánchez, *et al.* al 2003 amb una soca mutant de *K. pneumoniae*³⁵.

La pèrdua d'OmpK35, per disruptions provocades per: mutacions puntuals que originen una terminació primerenca de la traducció, per codons stop prematurs³⁸⁻⁴¹, o insercions de diferents seqüències d'inserció^{33,38,42-44} conjuntament amb alteracions de l'OmpK36, confereix resistència a cefalosporines i carbapenèmics (a ertapenem sobretot), particularment en soques que sobreexpressen o adquireixen algun tipus de betalactamases^{33,37,39,45-47}.

OmpK36: és l'homòloga a l'OmpC d'*E. coli*. La seva estructura tridimensional consta d'un barril de 16 làmines β , amb llargs *loops* en un extrem i que es tornen curts en l'altre. Tant aquesta com l'OmpK35 faciliten la difusió d'una extensa varietat de molècules, entre elles hi han nutrients i antimicrobians. En soques productores de BLEA, la seva pèrdua provoca l'aparició de la resistència a cefoxitina i l'augment de la resistència a cefalosporines de tercera i quarta generació. En soques que han adquirit una betalactamasa tipus AmpC, l'alteració de l'OmpK36 disminueix la sensibilitat als carbapenèmics, arribant inclús a fer-la resistent. Finalment, en soques amb alteracions en les topoisomerases i/o amb sobreexpressió de les bombes d'expulsió, alteracions en OmpK36 provoquen un augment en la resistència a fluoroquinolones^{32,34,36,39,43,48,49}. Algunes de les alteracions que provoquen la pèrdua d'aquesta porina provoquen una terminació primerenca de la traducció (codons stop prematurs)^{38,39}. La mutació Gly135Asp, la delecció entre les posicions aminoacídiques 84 i 87 d'asparagina-asparagina-treonina àcid glutàmic (NNTE)^{38,45,48}, les insercions de seqüències d'inserció com IS1, IS4, IS903^{34,38,43} o per l'inserció d'un codó que altera la pauta de lectura de la porina, en poden ser exemples.

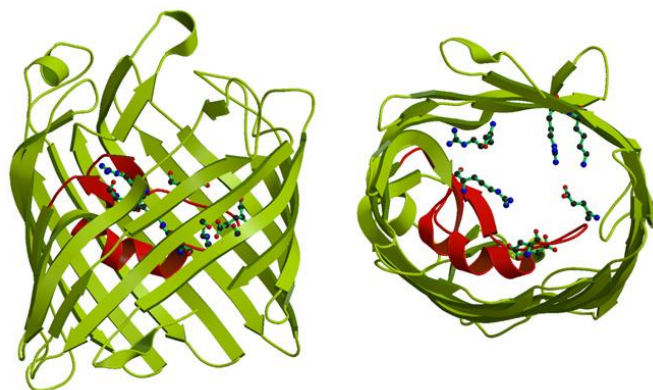


Figura 7. Representació gràfica de la porina OmpF⁵⁰. S'observa la seva estructura de 16 làmines β (verd), amb 8 girs perioplasmics curts i 8 loops extracel·lulars (verd i vermell); també s'observen molècules en l'interior, poliamines (p.e. espermina).

OmpK37: és l'homòloga a l'OmpN d'*E. coli*. La seva estructura tridimensional consta d'un barril amb 16 làmines β , 8 girs perioplasmics curts i 8 loops extracel·lulars altament variables. L'entrada de compostos a través d'aquesta porina és més restrictiva en comparació amb l'OmpK36 i l'OmpK35. La proteïna OmpN, és una porina quiescent, això significa que normalment no s'expressa sinó que aquesta està estimulada per certes condicions, entre elles la de pressió antibiòtica. Tot i això el paper d'aquesta porina no s'ha vist que sigui determinant pel que fa a la resistència a antibiòtics^{33,51,52}.

PhoE: és un porina regulada per fosfat i sembla que està involucrada a promoure l'entrada a la cèl·lula de substrats amb càrrega negativa. Es va suggerir a partir de l'estudi de Van Der Ley *et al.* al 1986⁵³, que el polipèptid (PhoE) travessa diverses vegades la membrana externa en una estructura de barril de làmines β , exposant vuit àrees a la superfície cel·lular, les quals estan separades per aproximadament 40 residus. L'interior de la porina conté un nombre d'aminoàcids carregats positivament orientats cap l'interior que afavoreixen la penetració de molècules carregades negativament com el fosfat inorgànic. En absència d'OmpK35 i OmpK36, s'ha observat la sobreexpressió d'aquesta porina, i s'ha observat que pot servir com a important via d'entrada de carbapenèmics a la cèl·lula³³.

LamB: és una maltoporina, pel fet que es requereix per al creixement en concentracions limitants de maltosa. La seva estructura tridimensional consta de 3 subunitats, cada una de les quals és un barril amb 18 làmines β , amb girs periplàsmics curts i loops extracel·lulars altament variables⁵⁴. S'ha observat que es sobreexpressa en absència d'OmpK35 i OmpK36, esdevenint la porina majoritària. En el cas que no s'expressi no s'han observat canvis significatius, tot i que hi ha modestes disminucions en les CIM a ceftazidima, cefepime, cefotaxima, tobramicina, amicacina i levofloxacina. S'ha vist que en casos on hi ha l'absència de OmpK36 i LamB hi ha un augment en les CIM a cefepime, piperacil·lina-tazobactam, cefotaxima, imipenem, meropenem i ertapenem; deixant veure com LamB pot contribuir a la penetració d'aquests compostos⁴⁷.

1.3.3.3.2. Les bombes d'expulsió

Les bombes d'expulsió són complexes protèics transportadors implicats en l'extrusió de components tòxics (incloses totes les classes d'antibiòtics clínicament rellevants) de l'interior a l'exterior cel·lular. Aquestes proteïnes o complexos protèics es troben presents en procariotes (bacteris grampositius i gramnegatius) i en eucariotes. Poden ser específiques de substrat o transportar un ampli rang de compostos estructuralment no relacionats⁵⁵. Al 1980 van ser descrites com a mecanisme de resistència a antimicrobians⁵⁶⁻⁵⁸.

Les bombes d'expulsió activa, es classifiquen en diferents famílies que difereixen en el mode d'obtenir energia, en la seva organització estructural i els substrats que poden eliminar. Hi han cinc famílies de bombes d'expulsió activa associades amb multiresistència a antimicrobians (Figura 8): ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), MATE (*multidrug and toxic-compound extrusion*), SMR (*small multidrug resistance*) i RND (*resistance nodulation division*). Un microorganisme pot expressar bombes d'expulsió de més d'una família i/o més d'un tipus de bomba de la mateixa família. A excepció de la superfamília de RND que només es troben presents en bacteris gramnegatius, les altres quatre famílies (MFS, ABC, SMR i MAT) estan àmpliament distribuïdes en bacteris tant grampositius com gramnegatius⁵⁸⁻⁶⁰.

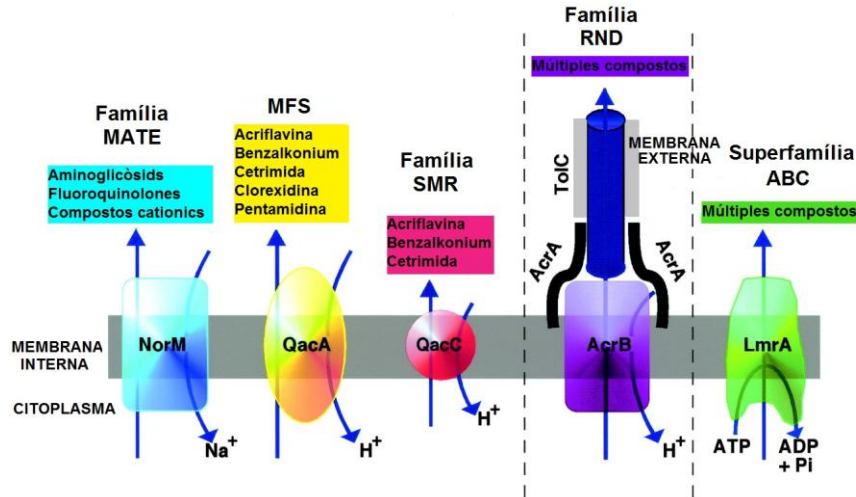


Figura 8. Esquema de les diferents famílies de bombes d'expulsió activa⁶¹

Depenent de les classes específiques a què pertanyen, les bombes d'expulsió són d'un sol component transportador o d'un sistema de múltiples components que contenen no només un transportador de membrana interna, sinó també un canal a la membrana externa i una proteïna periplasmàtica (que funciona com un adaptador) com ara les bombes d'expulsió tipus RND.

Dins dels transportadors pertanyents a la família RND, la bomba d'expulsió **AcrAB-TolC** d'*E. coli* i de *K. pneumoniae* és una de les més estudiades. La seva implicació en multiresistència ha estat àmpliament demostrada dins de la família *Enterobacteriaceae*. Confereix resistència a una àmplia varietat de compostos tòxics, aquests inclouen colorants catiónics com la acriflavina, cristall violeta, bromur d'etidi i rodamina 6G; antibiòtics com les penicil·lines, cefalosporines, fluoroquinolones, macròlids, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, àcid fusídric, oxazolidinones i rifampicina; detergents com el triton X-100, SDS (*sodium dodecylsulfate*), àcids biliars i fins i tot simples solvents orgànics com pentà o ciclohexà. En *K. pneumoniae* s'ha vist que la seva sobreexpressió dóna lloc a una disminució de la sensibilitat del bacteri enfront dels betalactàmics^{62,63} (principalment cefoxitina), quinolones, cloranfenicol, tigeciclina, tetraciclina i rifampicina⁶⁴⁻⁶⁸. Aquest sistema d'expulsió està format per tres proteïnes: una proteïna transportadora, AcrB, localitzada a la membrana interna (citoplasmàtica) del bacteri; una proteïna accessòria, AcrA (pertanyent a la família MFP, proteïnes de fusió a membrana), localitzada en l'espai periplasmàtic, i una proteïna de membrana externa la TolC (pertanyent a la família OMF, factor de membrana externa), que està localitzada a la membrana externa del bacteri (és el canal a través de la membrana externa) (Figura 9). Es creu que l'AcrB captura el substrat des de la bicapa lipídica o des del citoplasma i el transporta al medi extracel·lular a través de TolC. La cooperació entre AcrB i TolC està intervinguda per la proteïna adaptadora periplasmàtica AcrA⁶⁹⁻⁷⁵.

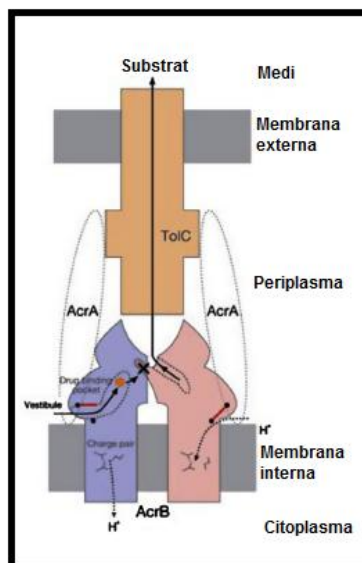


Figura 9. Representació de l'estructura de la bomba AcrAB-TolC⁷⁶. Veiem la disposició dels tres components de la bomba: AcrB, AcrA i TolC.

Les dades disponibles actualment, a partir d'assajos amb mutants obtinguts al laboratori, indiquen que les bombes AcrAB-TolC s'expressen sovint sota un control transcripcional precís i elaborat. Aquesta bomba es troba codificada per l'operó *acrRAB* situat en el cromosoma bacterià de *K. pneumoniae*. En aquest operó, el gen *acrR* actua com a repressor de AcrAB. A més, però, d'aquesta regulació, existeixen reguladors globals, com els de la família de reguladors AraC, MarA, SoxS, Rob, RamA i RarA. RamA és un regulador positiu de la bomba d'expulsió AcrAB, i s'ha observat que quan hi ha una sobreexpressió d'aquest regulador la sensibilitat a tigeiclina disminueix^{33,64,65,67,77-79}.

1.4. Les quinolones

1.4.1. Estructura química i classificació de les quinolones

Les quinolones són un grup d'agents antimicrobians amb un nucli 4-quinolona que es va descobrir per casualitat com a subproducte de la síntesi de la cloroquina. L'àcid nalidíxic; malgrat que en la seva versió tècnica no és una quinolona, sinó una naftiridona, la seva estructura d'anell amb un nucli 1,8-naftiridona té dos àtoms d'hidrogen, i en canvi les quinolones només tenen un àtom d'hidrogen. L'àcid nalidíxic, va ser àmpliament utilitzat pel tractament d'infeccions del tracte urinari per bacteris gramnegatius des del 1960. Amb les modificacions químiques del nucli 4-quinolona es van obtenir les quinolones de primera generació: àcid pipemídic, àcid oxolínic i cinoxacina, però aquests fàrmacs van ser limitats degut a la seva baixa cinètica en teixits i sèrum i reduït espectre d'acció. Les modificacions en les posicions C6 o C7 del nucli 4-quinolona, com ara l'addició d'un àtom de fluor en la posició C6, va augmentar significativament l'eficàcia i la penetrància^{80,81,13,82-85}. De fet, l'addició d'un àtom de fluor en C6 i d'altres modificacions en la estructura bàsica de les quinolones van donar com a resultat la primera generació de fluoroquinolones, com la norfloxacina, que és eficaç contra els bacteris grampositius aerobis, però va romandre ineficaç contra microorganismes anaeròbis. La Química Farmacèutica Bayer va desenvolupar aleshores un programa d'investigació enfocat a observar els efectes dels petits canvis en l'estructura de la norfloxacina. Al 1983 van

publicar dades de resultats *in vitro* de la ciprofloxacina, una fluoroquinolona que es diferencia de la norfloxacina per la presència d'un sol àtom de carboni. Aquest petit canvi va originar un augment de dues a deu vegades de la potència enfront els bacteris gramnegatius. Així doncs a partir de la creació de la norfloxacina, posteriorment es van desenvolupar quinolones de tercera i quarta generació, ampliant el seu espectre d'acció incloent microorganismes anaeròbics (Figura 10)^{86,87}.

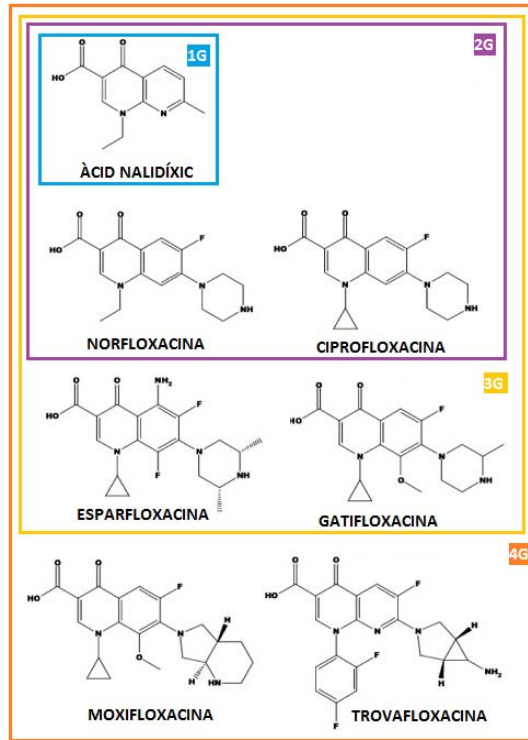


Figura 10. Representació de l'estructura química de les diferents generacions de quinolones.

Les quinolones estan classificades en quatre grups (Taula 4), denominats generacions, en funció de la seva estructura química i la seva activitat enfront els bacteris.

- Les quinolones de primera generació són: la cinoxacina, l'àcid oxolínic i l'àcid nalidíxic, actius enfront els bacteris gramnegatius (excepte *Pseudomonas* spp.) i es solen utilitzar en casos d'infeccions del tracte urinari.
- Les quinolones de segona generació són: la norfloxacina, la lomefloxacina, l'enoxacina, l'ofloxacina i la ciprofloxacina. L'espectre d'acció és enfront bacteris gramnegatius (incloent *Pseudomonas* spp.) i alguns bacteris grampositius. Es solen utilitzar per tractar infeccions del tracte urinari (complicades i no complicades), pielonefritis, malalties de transmissió sexual, prostatitis i infeccions de la pell i dels teixits tous.
- Les quinolones de tercera generació són la levofloxacina, la esparfloxacina i la gatifloxacina. El seu espectre d'acció és enfront els mateixos bacteris que les quinolones de segona generació, tot i que en el cas dels bacteris grampositius també inclou a *S. pneumoniae*. Es solen utilitzar per tractar bronquitis cròniques i pneumònia adquirida en la comunitat.

- Les quinolones de quarta generació són la trovafloxacin i la moxifloxacin. El seu espectre d'acció és enfront els mateixos bacteris que les quinolones de tercera generació, tot i que tenen un espectre més ampli també al incloure els anaerobis. Es solen utilitzar per tractar infeccions on es sospita la presència d'aquests

Taula 4. Classificació de les quinolones⁸³.

Primera generació	Àcid Nalidixic, Cinoxacin, Àcid Oxolínic.
Segona generació	Norfloxacin, Ciprofloxacina ^a , Lomefloxacina, Ofloxacin, enoxacin.
Tercera generació^b	Esparfloxacin, Gatifloxacin, Grepafloxacin. Levofloxacin.
Quarta generació^c	Trovafloxacin, Moxifloxacin.

^a Més potents enfront *P. aeruginosa*.

^b Més potents enfront *S. pneumoniae* i microorganismes anaeròbics

^c Molt més potent enfront *S. pneumoniae* i microorganismes anaeròbics.

1.4.2. Mecanisme d'acció de les quinolones

Les dianes de les quinolones són els enzims bacterians ADN-girasa i la topoisomerasa IV, que són essencials per al creixement cel·lular i la proliferació.

L'ADN-girasa i la topoisomerasa IV són enzims tetramèrics. L'ADN-girasa està formada per dues subunitats GyrA i dues GyrB, mentre que la topoisomerasa IV comprèn dues subunitats ParC i dues ParE. L'ADN-girasa regula el superenrotllament de l'ADN i alleuja l'estrès topològic resultant de transcripció i replicació al llarg de l'ADN bacterià. La topoisomerasa IV és un enzim que desenrotlla l'ADN bacterià replicat.

En els microorganismes grampositius, les quinolones tenen com a preferència de diana la topoisomerasa IV, essent al contrari, en el cas dels bacteris gramnegatius on la diana preferent és l'ADN-girasa^{13,80-85,88}.

La funció inhibidora de les quinolones s'inicia mitjançant la unió als complexos que es formen entre l'ADN i l'ADN-girasa i la topoisomerasa IV, provocant un canvi conformacional en l'enzim i la posterior escissió de l'ADN bacterià (Figura 11). És important destacar que les quinolones no només indueixen talls en l'ADN genòmic bacterià sinó també prevenen la relligació, perpetuant així l'acció inhibidora. La inhibició té lloc més ràpidament en l'ADN-girasa que en la topoisomerasa IV, perquè el primer es troba en la forquilla de replicació i aquest últim es troba darrere de la forquilla de replicació. El dany a l'ADN inicia la via apoptòtica, mort cel·lular, i altes dosis de fluoroquinolona també poden interrompre el complex ADN-girasa^{81,89}.

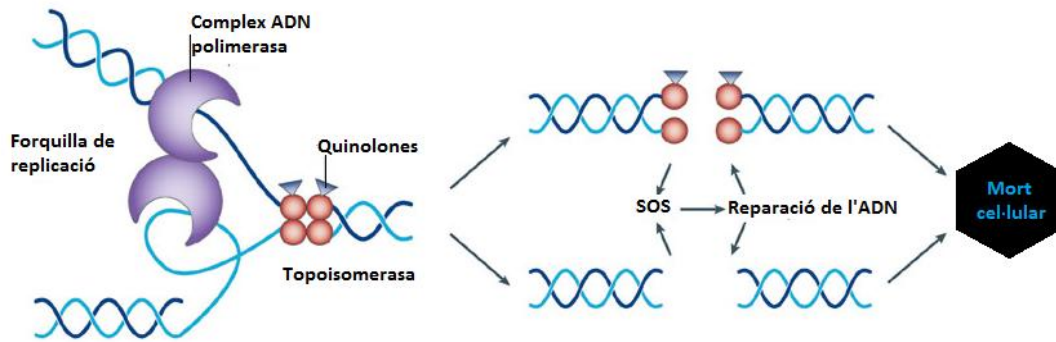


Figura 11. Mecanisme d'acció de les quinolones⁹⁰. Es detalla la interferència de les quinolones en el procés de l'ADN topoisomerasa que afecta a la viabilitat de la cèl·lula, això provoca la formació de trencaments de la doble cadena d'ADN i la mort cel·lular, ja sigui en una síntesi de proteïnes dependent o independent.

1.4.3. Mecanismes de resistència a les quinolones

Hi ha quatre mecanismes coneguts de resistència a quinolones que treballen discretament o en combinació i confereixen diferents graus de resistència que van des de la sensibilitat reduïda (no sempre es detecten per mitjà de proves de sensibilitat antimicrobiana) a resistència clínicament rellevant.

1.4.3.1. Alteracions de la diana

Les mutacions puntuals cromosòmiques en els gens que codifiquen l'ADN-girasa i la topoisomerasa IV són els principals mecanismes de resistència a quinolones i els que confereixen una resistència d'alt nivell, clínicament rellevant^{81,91-94}. En els bacteris gramnegatius, la diana principal de les quinolones és la subunitat *gyrA* de l'ADN-girasa. Les mutacions puntuals s'observen sobretot dins d'un domini altament conservat de l'extrem N-terminal del *gyrA*, conegut com la regió que determina la resistència a quinolones (QRDR, de l'anglès *quinolone resistant determinant region*) i que està pròxima a la regió d'unió entre l'ADN i el centre actiu de l'ADN-girasa (tirosina-122). Les mutacions puntuals més freqüents en *K. pneumoniae* s'han produït en la QRDR de *gyrA*: Ser83Try, Ser83Ile, Ser83Phe, Asp87Gli, Asp87Ala i/o Asp87Asg^{88,89,91,95-102}; essent menys freqüents les descrites en *gyrB*: Ser259Ala, Ser367Tre^{91,95}.

Les mutacions puntuals en els gens de la regió QRDR de la subunitat de la topoisomerasa IV han estat descrites bàsicament en el gen *parC*^{94,101,103-105}: Ser80Ile, Ser80Arg i Glu84Gli^{89,91,96-100,103,106,107}. En el gen *parE* encara no s'ha descrit cap soca de *K. pneumoniae* mutant.

1.4.3.2. Alteracions de la permeabilitat cel·lular

Els bacteris gramnegatius poden regular la permeabilitat de la membrana mitjançant l'alteració dels nivells de les porinas de la membrana externa tal com he citat en l'apartat 1.3.3.2.

En el cas de les quinolones i en *K. pneumoniae*, s'ha observat diferents mecanismes: la pèrdua per la porina OmpK36³⁵, la sobreexpressió de la bomba AcrAB-TolC, l'adquisició de la bomba OqxAB i la presència de la bomba d'expulsió QepA.

La sobreexpressió de la bomba AcrAB-TolC només és capaç de produir un baix nivell de resistència, i arribar a ser clínicament rellevant només quan es combinen amb mutacions en les topoisomereses o amb alteracions de la membrana^{62,80,108}.

La bomba d'expulsió OqxAB pertany a la família RND. Confereix resistència a múltiples compostos: clorexidina, triclosan i bromur d'etidi; i diferents famílies d'antimicrobians com quinolones (àc. nalidíxic, norfloxacina, ciprofloxacina), cloranfenicol, trimetoprim, tetraciclina. Va ser una de les primeres bombes d'expulsió de la família RND vehiculada per plasmidis descrita. Fou descrita al 2004 a Dinamarca en una soca d'*E. coli* aïllada d'una mostra porcina. Es va trobar codificada per l'operó *oqxAB*, que estava localitzada en un plasmidi conjugatiu de 5,2 Kb (pOLA52)¹⁰⁹. En el plasmidi l'operó es trobà en un element genètic mòbil, el transposó Tn6010, flanquejat per dues seqüències d'inserció, IS26¹¹⁰. Posteriorment es va observar que els 5,1 Kb d'ADN que contenen els gens *oqxA* i *oqxB* eren completament idèntics a altres segments del genoma de diferents soques de *K. pneumoniae*, però es desconeix el perquè no es troba present en totes les soques de *K. pneumoniae* (Figura 12).

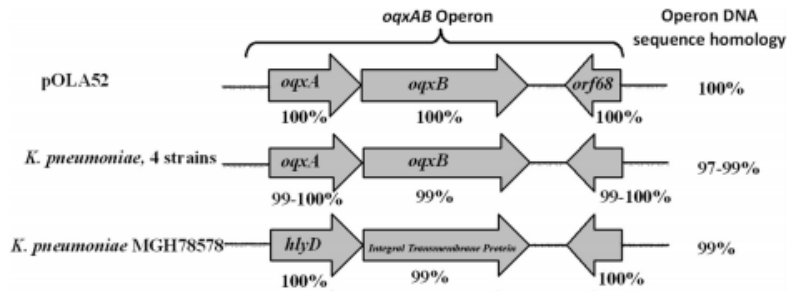


Figura 12. Representació de l'operó *oqxAB* en el plasmidi pOLA52 i en el cromosoma de diferents soques de *Klebsiella pneumoniae*¹¹¹.

Veleba *et al.*⁶⁴ van descriure dos gens que flanquejaven l'operó *oqxAB* en el cromosoma de *K. pneumoniae* MGH78578: *rara*, que codifica per un activador transcripcional tipus AraC, i *oqxR*, que codifica un repressor transcripcional tipus GntR.

Per últim comentar la bomba d'expulsió QepA de la família MFS. Fou descrita al 2002 en el plasmidi pHPA present en una soca d'*E. coli* aïllada d'una mostra d'orina al Japó¹¹². Aquesta soca mostrava un perfil de resistència múltiple: als aminoglicòsids, fluoroquinolones i betalactàmics d'ampli espectre i el plasmidi que vehiculava, el pHPA, contenia a part del gen *qepA*, la metilasa *rmtB* i *bla*_{TEM-1}. La *qepA* codifica una proteïna de 511 aminoàcids. Quan s'ha clonat i expressat en transconjugants d'*E. coli* s'han observat augments en les CIM a l'àcid nalidíxic, ciprofloxacina, norfloxacina, de 2, 32, i 64 vegades més, respectivament. Un modest augment de dues vegades es va observar a l'eritromicina, acriflavina, i bromur d'etidi, mentre que altres classes d'antibiòtics es van mantenir sense canvis. S'han descrit dues variants: la QepA (renombrada com QepA1) i la QepA2¹¹³, ambdues amb un fenotip similar. El gen *qepA1* està flanquejat per dues còpies de la IS26 i, sembla associat amb el gen

rmtB, que codifica una metilasa ribosomal que confereix resistència a aminoglicòsids; *qepA2* està flanquejat per la *ISCR3C* i el gen *rmtB* no es va trobar.

1.4.3.3. Resistència mediada per plasmidis (PMQR)

L'aparició de soques que presentaven una resistència feble a les quinolones i que no tenien modificada les topoisomerases va fer pensar que hi havia d'altres mecanismes de resistència implicats, els gens *qnr* (quinolone resistance) que es troben localitzats en plasmidis. D'aquí el nom de PMQR (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*).

Un *qnr* és un gen d'origen natural que codifica una proteïna pentapéptida repetida (*pentapeptide repeated protein*: PRP), definida per una repetició en tàndem de cinc aminoàcids amb un motiu semiconservat [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr, o Arg] [Gly]. En la majoria dels casos, la funció natural d'aquestes proteïnes és desconeguda^{114,115}. Enguany hi ha descrits els QnrA, QnrB, QnrC, QnrD i QnrS¹¹⁶⁻¹²⁵.

És important assenyalar que els gens *qnr* codificats per plasmidis no confereixen resistència franca a quinolones per si mateixos, sinó que disminueixen lleugerament la sensibilitat a les quinolones i faciliten la selecció de bacteris amb un nivell de resistència superior.

QnrA: Es va descobrir al 1994 mentre s'estudiava el plasmidi pMG252, que codificava la betalactamasa tipus AmpC, FOX-5, d'una soca de *K. pneumoniae* multiresistent, aïllada d'una mostra orinària d'un pacient d'Alabama^{102,126}. Aquest plasmidi, de 56 Kb, tenia una àmplia gamma d'hostes que incloïa altres membres de la família *Enterobacteriaceae* i *P. aeruginosa*, i contenia el gen *qnrA1*, que codifica una proteïna de 218 aminoàcids (657 pb), de les quals posteriorment s'ha descrit diferents variants (QnrA2-QnrA7). S'ha associat a BLEA (SHV-2/7/12/93, CTX-M-1/9/14/15/24, VEB-1, PER-1), cefalosporinases plasmídiques (FOX-5 i CMY-2) i a carbapenemases de classe A i B (IMP-4 i KPC-3)^{123,127-129}.

QnrS: Al 2003, una clona de *Shigella flexneri* 2b va provocar un brot d'enterocolitis al Japó. Una de les vuit soques d'aquest clon era resistent a les fluoroquinolones. La soca tenia un únic plasmidi conjugatiu que transferia aquesta resistència. Mitjançant clonació es va identificar un marc de lectura obert que codificava una proteïna de 218 aminoàcids de la família de pentapéptids repetits. Aquesta proteïna compartia una identitat d'aminoàcids del 59% amb QnrA1 i va ser nomenat QnrS1. En l'actualitat hi ha descrites diverses variants (QnrS2-QnrS4). S'ha associat a BLEA (TEM-52, SHV-2/5/12, CTX-M-1/9/14/15/24) i a carbapenemases de classe A i B (IMP-8 i VIM-1)¹³⁰⁻¹³².

QnrB: Mentre s'estudiaven soques de *K. pneumoniae* provinents de l'Índia (algunes portadores de *qnrA*), Jacoby *et al.*¹¹⁸ van observar que soques negatives per *qnrA* eren capaces de transferir resistència de baix nivell a quinolones. El gen responsable d'aquest fenotip es trobava codificat per 214 aminoàcids i se'l va anomenar *qnrB1*. Aquesta proteïna tenia un 43% i un 44% d'identitat aminoacídica amb QnrA i QnrS, respectivament. En l'actualitat, el nombre de variants de *qnrB* és més gran que el de *qnrA* i *qnrS* (QnrB1-QnrB24) (<http://www.lahey.org/qnrStudies>). S'ha associat a BLEA (TEM-52, SHV-12/30, CTX-M-3/12/14/15/24, VEB-1), cefalosporinases plasmídiques (FOX-5 i CMY-2) i a carbapenemases de classe A i B (IMP-8, KPC-2 i KPC-3)^{118,130,131,133}.

QnrC: Es va descriure en una soca clínica de *Proteus mirabilis*, de Shangai (Xina), que transferia resistència de baix nivell a quinolones, es va descriure el plasmidi pHS9, que portava un gen de 666 pb que es va anomenar *qnrC1*. Aquest gen codifica una proteïna de 221 aminoàcids. QnrC comparteix 64%, 41%, 59%, i 43% d'identitat aminoacídica amb QnrA1, QnrB1, QnrS1, i QnrD, respectivament¹³⁴.

QnrD: De quatre aïllaments de *Salmonella enterica* amb sensibilitat reduïda a la ciprofloxacina obtinguts a partir d'éssers humans de la província xinesa de Henan, es va aïllar un plasmidi d'aproximadament 4,3 kb, el qual, al transferir-se a *E. coli*, conferia un augment de 32 vegades la CIM de la ciprofloxacina. El plasmidi codifica un pentapèptid repetit de 214 aminoàcids, anomenat com QnrD. El gen *qnrD* va mostrar una similitud del 48% al *qnrA1*, del 61% amb *qnrB1*, i 32% amb *qnrS*¹³⁵.

Un cop descoberta la proteïna Qnr en el plasmidi pMG252¹²⁶ es va estudiar la seva interacció amb les quinolones i les dianes d'aquestes (l'ADN-girasa i la topoisomerasa IV) mitjançant estudis de mobilitat electroforètica¹²⁹. Aquest treball va permetre observar, *in vitro*, que la proteïna Qnr protegia a l'ADN-girasa d'*E. coli* de la inhibició de la ciprofloxacina. Aquesta protecció és proporcional a la concentració de Qnr, i inversament proporcional a la concentració de ciprofloxacina¹³⁶. També la topoisomerasa IV sembla que és protegida per els Qnr¹³⁷.

El mecanisme d'acció de Qnr, basat en la protecció de l'ADN-girasa i la topoisomerasa IV, s'ha estudiat detalladament en el cas concret del gen *qnrA1*. De la resta de proteïnes Qnr es creu que el mecanisme d'acció és semblant tot i la manca d'estudis en detall¹³⁶. Tal i com s'espera de la seva estructura de pentapèptids repetits, QnrA no sembla produir un canvi en l'acumulació intracel·lular de quinolones, ni causar la seva inactivació¹³⁸. L'efecte directe de QnrA sobre la inhibició de l'activitat de l'ADN-girasa per les quinolones, es va estudiar utilitzant un assaig de superenrotllament de l'ADN¹³⁶. En aquest assaig es va demostrar que la inhibició de l'ADN-girasa mediada pel superenrotllament de l'ADN produït per la ciprofloxacina era revertida de manera dosi dependent per la proteïna QnrA purificada¹³⁰. Així doncs el Qnr s'uneix a l'ADN-girasa i a la topoisomerasa IV, les qual ja estan unides a l'ADN, formant un complex Qnr-ADN-girasa/topoisomerasa IV-ADN, impedit la unió de les quinolones i les fluoroquinolones, i així permetent la replicació de l'ADN (Figura 13).

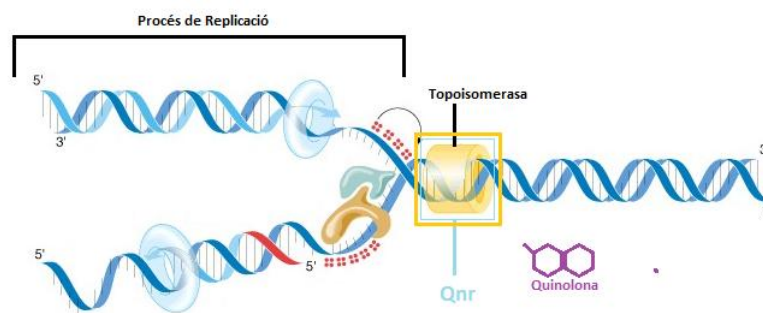


Figura 13. Mecanisme d'acció del Qnr. El Qnr protegeix la topoisomerasa de l'acció de les quinolones (http://www.bio.miami.edu/dana/250/25008_4.html).

D'altra banda, un aspecte important per al nivell d'activitat de les proteïnes Qnr sembla ser el nivell d'expressió i les mutacions en la seqüència aminoacídica tant de la pròpia proteïna com de les seqüències promotores¹³⁹⁻¹⁴¹. Es creu que l'acumulació de canvis podria originar en un futur, que aquestes proteïnes per si soles generessin resistència enfront les quinolones i les fluoroquinolones¹⁴².

Degut al creixent nombre de variants del gens *qnr* reconeguts en els últims anys, es va proposar utilitzar la base de dades establerta en <http://www.lahey.org/qnrStudies>, on s'han d'introduir els nous al·lels identificats. S'ha acordat que la numeració dels gens de la família *qnrB* s'ha de definir tenint en compte la segona iniciació ATG (codó comú en totes les variants), perquè alguns al·lels *qnrB* tenen dos codons d'iniciació potencials. En conseqüència, les proteïnes QnrB tenen 214 aminoàcids¹³³.

L'àmplia distribució geogràfica i les espècies amb gens *qnr* suggereix que han estat presents des de fa algun temps. Diferents estudi suggereixen que els bacteris gramnegatius aquàtics com *Vibrionaceae* i *Shewanellaceae* poden servir com a reservori de gens *qnr*. El gen *qnrA* es creu que es va originar en *Shewanella algae*¹²⁹, un microorganisme aquàtic (marí i aigua dolça). També s'han identificat proteïnes similars als Qnr en bacteris de la família *Vibrionaceae*. *Vibrio splendidus* presenta els gens *qnrVS1* i *qnrVS2*, i podrien ser l'origen dels *qnr* concretament del *qnrS*, amb qui comparteixen 40-67% homologia.

1.5. Els aminoglicòsids

1.5.1. Estructura química i classificació dels aminoglicòsids

Al 1943 es va descobrir l'estreptomina, derivada de *Streptomyces griseus*, va ser el primer medicament eficaç contra la tuberculosi. Des de llavors es van aïllar altres aminoglicòsids produïts per diferents Actinomicets. Al 1963 es va aïllar de *Micromonospora* la gentamicina; i això va constituir un avanç significatiu en el tractament de la infeccions per bacteris gramnegatius. Posteriorment es van sintetitzar aminoglicòsids semisintètics (p.e. dibecacina i amicacina) per modificació de compostos naturals, per ampliar el seu espectre d'acció, la seva potència, reduir la seva nefrotoxicitat, i evadir els mecanismes de resistència. A l'actualitat la família dels aminoglicòsids inclou un gran nombre de compostos. No obstant això, el nombre de mecanismes de resistència desenvolupats pels microorganismes s'ha incrementat en paral·lel amb el nombre de fàrmacs disponibles i la freqüència del seu ús^{3,143,144}.

Els aminoglicòsids són una família complexa de compostos caracteritzats per tenir un nucli aminociclitol (estreptamina, 2-desoxiestreptamina, o estreptidina) unit a sucres amino a través d'enllaços glicosídics, així doncs la seva denominació correcta seria la d'aminoglicòsids aminociclitols, malgrat a la pràctica solament s'utilitza el primer nom per designar a aquest grup d'antibiòtics. Depenent de si el nucli aminociclitol sigui l'estreptidina o la desoxiestreptidina, es classifiquen en dos grans grups (Taula 5). El primer inclou solament l'estreptomina i el segon és més ampli, incluint la majoria de compostos utilitzats en la clínica actual.

A més, hi han altres compostos que també formen part d'aquesta família, com l'espectinomicina, que el seu nucli aminociclitol no està unit a sucres amino.

Els aminoglicòsids s'utilitzen bàsicament per tractar infeccions causades per bacils gramnegatius, estafilococs i altres bacteris grampositius. No obstant això, quan s'utilitzen contra grampositius, els aminoglicòsids es recomanen combinar-los amb altres antibiòtics com ara betalactàmics o vancomicina amb la qual cosa hi ha un efecte sinèrgic probablement a causa d'una absorció millorada. A causa de la naturalesa del mecanisme de penetració dels aminoglicòsids, que requereix

la participació de sistemes enzimàtics del metabolisme aerobi, els bacteris anaerobis són intrínsecament resistents ¹⁴³⁻¹⁴⁶.

Les famílies dels aminoglicòsids 2-DOS es diferencien entre sí per els aminosucre units al aminociclitol (Taula 6 i 7, Figura 14).

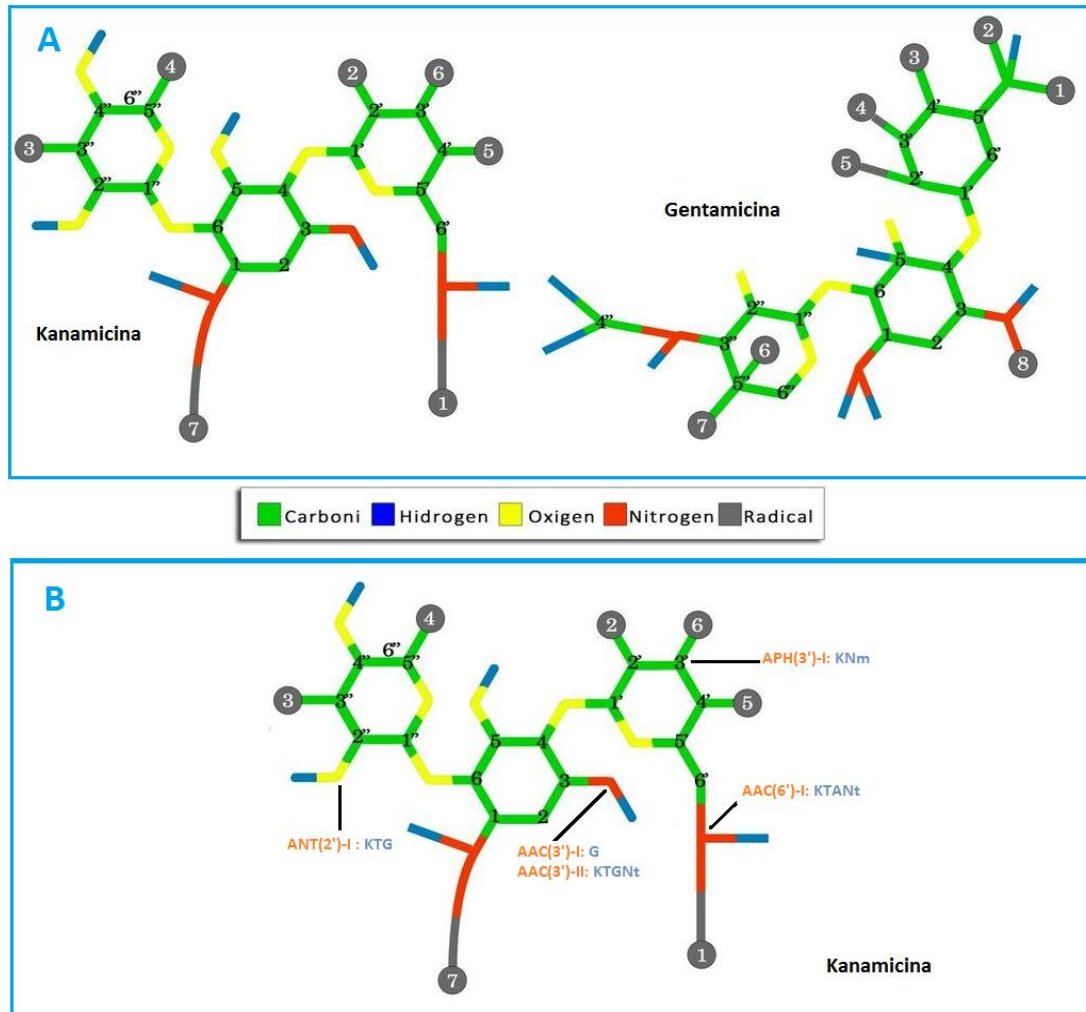


Figura 14. Estructura química de la gentamicina i la kanamicina (A) i posicions on actuen alguns enzims modificadors d'aminoglicòsids (B).

Taula 5. Classificació dels aminoglicòsids segons l'estructura química.

Estructura heterocíclica	Aglicona	Canvis*	Família	Antibiòtic	
Aminociclitol	-	-	-	Espectinomicina	
Aminoglicòsid	Estreptidina	-	-	Estreptomicina	
amb aminociclitol	2-DOS	4	-	Apramicina	
		4,5	Neomicines I	Ribostamicina	
				Butirosina A	
				Butirosina B	
		Neomicines II	Neomicina B		
			Neomicina C		
			Lividomicina A		
			Lividomicina B		
			Paromomicina		
		4,6	Kanamicines	Kanamicina A	
				Kanamicina B	
				Kanamicina C	
				Tobramicina	
				Dibekacina	
				Amikacina	
				Gentamicines	Gentamicina A
					Gentamicina B
					Gentamicina C1
					Gentamicina C1a
		Gentamicina C2			
Netilmicina					
Sisomicina					

*Canvis: posició dels canvis en la desoxiestreptamina

Taula 6. Família de neomicina.

Aminoglicòsids	Grup	R1	R2	R3	R4
Ribostamicina	I	H	OH	H	-
Butirosina A	I	OH	H	-CO(CHOH)-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	-
Butirosina B	I	OH	OH	-CO(CHOH)-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	
Neomicina B	II	NH ₂	CH ₂ NH ₂	H	H
Neomicina C	II	NH ₂	H	CH ₂ NH ₂	H
Paromomicina	II	OH	CH ₂ NH ₂	H	H
Lividomicina A	II	OH	CH ₂ NH ₂	H	Manosa
Lividomicina B	II	OH	CH ₂ NH ₂	H	H

R: radical

Taula 7. Famílies de la kanamicina i la gentamicina.

Aminoglicòsids	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Kanamicina A	NH ₂	OH	NH ₂	CH ₂ OH	OH	OH	H	
Kanamicina B	NH ₂	NH ₂	NH ₂	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH
Kanamicina C	OH	NH ₂	NH ₂	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH
Dibekacina	NH ₂	H	H	CH ₂ OH	OH	H	H	OH
Amikacina	OH	OH	OH	CH ₂ OH	OH	OH	NH-CO-CO ₂ -CH ₂ -NH ₂	OH
Tobramicina	NH ₂	H	OH	CH ₂ OH	OH	H	H	OH
Gentamicina A	H	OH	OH	OH	NH ₂	H	OH	H
Gentamicina B	H	NH ₂	H	OH	OH	OH	CH ₃	H
Gentamicina C ₁	H	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Gentamicina C _{1a}	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Gentamicina C ₂	CH ₃	NH-CH ₃	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Sisomicina	CH ₃		H	H	NH ₂	OH	CH ₃	HCH ₂ -CH ₃
Netilmicina			H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H

R: radical

1.5.2. Mecanisme d'acció dels aminoglicòsids

Els aminoglicòsids són molècules carregades positivament, això els permet concentrar-se al voltant del bacteri per l'atracció de les càrregues negatives que aporten els grups fosfats dels fosfolípids de la membrana externa dels bacteris gramnegatius o els àcids teiòics units al peptidoglicà dels grampositius. En conseqüència, desplacen els ions de magnesi i calci que s'enllacen a les molècules de lipopolisacàrids adjacents; aquest procés desestructura la membrana externa i permet el pas dels aminoglicòsids. Un cop passat fàcilment el peptidoglicà, tornen a concentrar-se al voltant de la membrana citoplasmàtica. La difusió a través d'aquesta membrana succeeix en dues fases: una inicial lenta i una altra, posterior, ràpida; ambdues dependents de l'energia generada pel transport d'electrons que implica la participació de sistemes enzimàtics del metabolisme aerobi, que crea un gradient elèctric a banda i banda de la membrana. Un cop els aminoglicòsids han començat a actuar sobre la seva diana, els ribosomes, comencen a produir-se molts errors en la lectura de l'ARNm, que donaran com a resultat proteïnes anòmales que s'uniran a la membrana, deteriorant la seva integritat i accelerant la difusió de més molècules d'aminoglicòsid (fase ràpida). En conseqüència, una gran quantitat d'aminoglicòsids arriba als ribosomes, que arriben a bloquejar-se, i aturen irreversiblement la síntesi de proteïnes.

En el ribosoma, els aminoglicòsids tenen la seva acció principalment en la subunitat 30S, on s'uneixen a diferents proteïnes i l'ARNr 16S. Bloquegen l'activitat normal del complex d'iniciació, impedit l'inici de la síntesi i provocant també una lectura errònia de l'ARNm (Figura 15).

Els aminoglicòsids tenen un efecte bactericida dependent de la seva concentració i posseeixen un important efecte postantibiòtic, és a dir que una breu exposició del bacteri a aquests compostos indueix una supressió del seu creixement, tot i que l'antimicrobià no aconsegueixi concentracions que matin al microorganisme. Són actius enfront un ampli nombre d'espècies bacterianes, especialment enfront microorganismes gramnegatius aerobis.

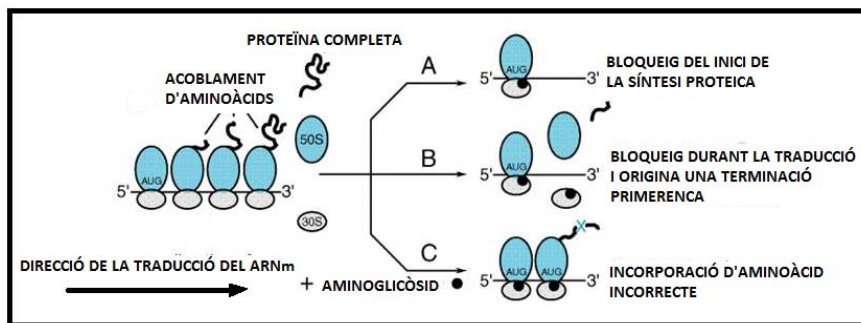


Figura 15. Mecanisme d'acció dels aminoglicòsids. Bloqueig de l'inici de la síntesi proteica (A), Bloqueig de la transducció provocant una terminació primerenca (B), Incorporació d'un aminoàcid incorrecte; degut a l'unió a la subunitat 30S de l'ARNr de l'aminoglicòsid (C).

1.5.3. Mecanismes de resistència als aminoglicòsids

La resistència als aminoglicòsids pot ser natural o adquirida. Una forma de resistència natural és la que es presenta en bacteris anaerobis estrictes, ja que l'entrada dels aminoglicòsids a la cèl·lula és un

procés actiu que necessita oxigen. També s'observa que els bacteris facultatius són molt més resistents quan proliferen en mitjans anaerobis.

La resistència adquirida d'un bacteri als aminoglicòsids pot ser deguda a tres mecanismes diferents: la disminució de l'acumulació intracel·lular de l'antibiòtic, alteracions de la diana i la presència d'enzims que modifiquen els aminoglicòsids.

1.5.3.1. Producció d'enzims que modifiquen els aminoglicòsids (AME)

És el mecanisme de resistència més rellevant, clínicament parlant, i el més freqüent. La modificació d'un aminoglicòsid per part d'aquests enzims provoca que la fixació de l'aminoglicòsid a l'ARNr 16S es vegi afectada i d'aquesta manera perdi la seva activitat, encara que pot donar-se el cas que un antibiòtic modificat conservi la seva activitat, com succeeix amb la 6'-N-acetil-neomicina. Es creu que els AME deriven dels organismes que produeixen aminoglicòsids, o de mutació de gens que codifiquen enzims relacionats amb la respiració cel·lular. Els gens que codifiquen els AME solen trobar-se en plasmidis i transposons^{147,148}. Els AME són produïts de manera constitutiva, el seu pes molecular ronda els 23.000-63.000 Da, i necessiten la presència de cations divalents per actuar. Solen conferir resistència d'alt nivell, encara que això depèn de múltiples factors com el microorganisme en qüestió, la soca individual, el nivell d'enzim produït i la seva activitat catalítica.

A data d'avui hi ha més de 50 tipus diferents d'AME, que es poden agrupar en tres famílies segons la reacció que catalitzen:

- N-acetiltransferases (AAC): catalitzen una acetil·lació, transferint un grup acetat des de l'acetil-coenzimA a un grup amino de l'aminoglicòsid.
- O-fosfotransferases (APH): catalitzen una fosforilació, transferint un grup fosfat des d'un ATP a un grup hidroxil de l'aminoglicòsid.
- O-nucleotidiltransferases (ANT): catalitzen una nucleotidil·lació, això és, la transferència d'un nucleòtid monofosfat des d'un nucleòtid trifosfat a un grup hidroxil de l'aminoglicòsid.

Cada un d'aquests grups (AAC, APH i ANT) té diferents classes, segons el lloc de modificació de l'aminoglicòsid, representat per un nombre aràbic entre parèntesis; diferents tipus, segons el perfil de resistència que genera, representat a continuació per un nombre romà, i finalment, si el perfil de resistència és el mateix, però tenen alguna diferència genètica, s'agrega una lletra minúscula. Així, per exemple, l'AAC(6')-Ib catalitzarà l'acetilació en la posició 6' de l'aminoglicòsid, i donarà el perfil I, això és resistència a kanamicina, tobramicina, amicacina i netilmicina, existint tres seqüències distintes a, b i c^{147,149,150}.

La distribució dels AME varia tant geogràfica com temporalment. Depen de la teràpia antimicrobiana que s'usi, doncs juga un paper decisiu tant en l'adquisició i disseminació de resistència, com dels gèneres bacterians als quals afecten. A la taula 8 es pot veure els AME que s'ha identificat en els bacteris gramnegatius i els aminoglicòsids als quals confereixen resistència.

Taula 8. Enzims modificadors d'aminoglicòsids identificats en bacteris gramnegatius i els antibiòtics que modifiquen.

AME	Aminoglicòsid que modifiquen
ANT(2')-I	G, T, K, S i D
ANT(3')-Ia	Str i Spt
ACC(6')-I	T, A, K, Nt, S i D
AAC(3')-Ia/-Ib	G i S
AAC(3')-IIa	G, T, K, Nt, S i D
AAC(1)	L, P i R
AAC(2')-Ia	G, T, K, Nm i D
APH(3')-I	K, Nm, L, P i R
APH(3')-Ia/-Ib	Str
APH(3')-VII	K i Nm

G: gentamicina, T: tobramicina, A: amicacina, K: kanamicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, Str: estreptomina, Spt: espectinomicina, L: lividomicina, P: paromomicina, R: ribostamicina, S: sisomicina, D: dibecamicina.

Dins dels AME hi ha l'AAC(6')-Ib-cr, que redueix l'activitat tant dels aminoglicòsids (kanamicina, tobramicina i amicacina) com de les fluoroquinolones (ciprofloxacina i norfloxacina)¹⁵¹. Aquest enzim té dos canvis d'aminoàcids, Trp102Arg i Asp179Tyr, tots dos necessaris per a la N-acetilació de l'amino nitrogen d'un grup piperazinil. La ciprofloxacina i la norfloxacina són les úniques fluoroquinolones inhibides per AAC(6')-Ib-cr, ja que són els únics compostos amb un grup piperazinil no substituït. Malgrat les dianes limitades d'AAC(6')-Ib-cr, aquest enzim juga un paper important en la resistència a fluoroquinolones per diverses raons. En primer lloc, AAC(6')-Ib-cr és comú en aïllaments clínics dels bacteris gramnegatius¹²³, incloent el 51% de les soques clíniques d'*E. coli* resistent a ciprofloxacina recollides a la Xina¹⁵¹. En segon lloc, tot i que el grau de resistència conferida per AAC(6')-Ib-cr és baix, quan *qnr* i *aac(6')-Ib-cr* són presents en la mateixa cèl·lula, el nivell de resistència arriba a tenir significació clínica¹⁵¹. En tercer lloc, la presència de *aac(6')-Ib-cr* dona lloc a un augment substancial en la selecció de mutants cromosòmics originats per l'exposició a la ciprofloxacina^{116,122,152,153}.

1.5.3.2. Alteracions de la permeabilitat

La resistència als aminoglicòsids pot ser degut a alteracions en la permeabilitat de la membrana a l'hora de la penetració de l'antibiòtic a la cèl·lula o a la presència de bombes d'expulsió activa o alteracions en els transportadors que desplacen l'antibiòtic pel periplasma. A vegades la disminució de la permeabilitat es reflecteix en una resistència de components de la cadena respiratòria que afecten al creixement bacterià. En *K. pneumoniae* no està estudiat, però sí en *E. coli*.

Un dels mecanismes descrits és un canvi en l'embolcall cel·lular que pot permetre nivells considerables de resistència a aminoglicòsids en aïllats d'*E. coli*. En dos estudis s'ha observat que la proteïna fixadora d'oligopéptids, OppA, que és el component periplasmàtic d'un sistema de permeabilitat d'oligopéptids, pot actuar com transportador d'aminoglicòsids, i que una disminució en la seva expressió confereix resistència a aminoglicòsids com la kanamicina, la neomicina, la sisomicina, la gentamicina o la tobramicina^{154,155}.

Un altre mecanisme que s'ha descrit que comporta a una disminució de l'acumulació intracel·lular de l'antibiòtic són les bombes d'expulsió tipus RND, com l'AcrD d'*E. coli*. Les AcrD tenen per substrats a compostos hidrofílics, com els aminoglicòsids, encara que també uns pocs compostos amfifílics, com el dodecil sulfat sòdic, el desoxicolato i la novobiocina. Aquestes bombes exporten l'antibiòtic una vegada que aquest es troba dins del bacteri. Aquests mecanismes confereixen un tipus de resistència creuada a tots els aminoglicòsids. Aquesta resistència és de baix nivell de forma natural, llevat que una mutació provoqui la seva sobreexpressió.

1.5.3.3. Alteracions de la diana dels aminoglicòsids

Les alteracions de la diana poden ser degudes a mutacions puntuals o a metilacions de l'ARN. Les mutacions puntuals ribosomals no afecten tots els bacteris per igual. La diferència depèn bàsicament de les còpies de l'operó ARN ribosomal que hi hagi en cada espècie, en el cas de *K. pneumoniae* té 7 còpies. Tot i que es desconeix en *K. pneumoniae* l'abast de les còpies del operó mutades, en *E. coli* es sap que tenint el mateix nombre de còpies d'aquest operó que *K. pneumoniae*, és a dir, 7 còpies, s'ha reportat que la resistència s'observa quan més del 50% dels ribosomes estan afectats; tot i que la probabilitat que esdevinguin aquestes mutacions és baixa.

La metilació de l'ARN 16S en posició G1405 es deu a la presència d'alguns dels següents gens: *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*, *armA* i *rmtH*. El primer va ser descrit originàriament a França en *K. pneumoniae* BM4536 en el plasmidi pIP1204 del grup d'incompatibilitat IncL/M en el transposó compost Tn1548, capaç de replicar en enterobacteris i que a més confereix resistència a cefalosporines de 3^a generació per la presència del gen que codifica la betalactamasa d'espectre ampliat, CTX-M-3. La metilació G1405 confereix resistència d'alt nivell als aminoglicòsids 4,6-2-DOS (kanamicina, amicacina, tobramicina, gentamicina, netilmicina), però no afecta els 4,5-2-DOS (neomicina)¹⁵⁶.

Els gens estructurals de les metilases sovint es troben en plasmidis autotransferibles i es troben associats amb gens de betalactamases d'espectre ampliat, majoritàriament *bla*_{CTX-M}. Al seqüenciar l'entorn genètic d'*armA*, es va veure que aquest gen es localitza en un transposó, Tn1548, que facilita la difusió aquesta resistència¹⁵⁷. La difusió d'*armA* en diverses espècies d'enterobacteris s'ha documentat en diversos països europeus, així com en el Sud-est d'Àsia. Altres metilases d'ARNr 16S, com *rmtA*, *rmtB*, etc, s'han detectat en *S. marcescens*, *P. mirabilis*, i altres enterobacteris; convertint-se en un problema epidemiològic de resistència¹⁵⁸⁻¹⁶³.

1.6. Elements genètics implicats en la difusió dels gens de resistència als antimicrobians.

Els microorganismes evolucionen variant les seves característiques genotípiques i fenotípiques. Aquest fet pot succeir de manera natural, espontània, on a partir d'una mutació puntual sorgeixen cèl·lules filles amb una dotació genètica diferent a la dels seus progenitors. És el que es coneix com a **transferència gènica vertical**. Diferenciant-la de la **transferència horitzontal**, on el microorganisme adquireix ADN exogen provinent de microorganismes de la mateixa espècie o no.

Les mutacions puntuals poden esdevenir per múltiples causes, exposició a agents químics o físics que alterin l'estructura de l'ADN o provoquen una activació dels sistemes de resposta SOS, però totes

radiquen en un conseqüència clau: errors en la replicació de l'ADN, fenomen que pot ocórrer amb una freqüència de 10^{-8} - 10^{-7} per divisió cel·lular. Si el gen mutat li proporciona algun avantatge adaptatiu al bacteri, aquest serà seleccionat i serà transmès a la descendència per **transferència vertical** durant la replicació bacteriana.

La **transferència horitzontal**¹⁶⁴ consisteix en l'adquisició de material genètic (ADN) exogen procedent d'altres microorganismes (p.e. l'adquisició de gens de resistència entre enterobacteris de diferent gènere). Els principals, però no únics, mecanismes de transferència horitzontal bacteriana són: la transformació, la transducció i la conjugació¹⁶⁵.

- La **transformació** es produeix gràcies a la captació d'ADN del medi ambient per cèl·lules bacterianes competents, que posteriorment integraran aquest ADN en el seu cromosoma bacterià¹⁶⁶⁻¹⁷⁰(Figura 16A).
- La **transducció** permet la transferència d'ADN entre bacteris mitjançant els bacteriòfags. Durant el cicle lític, hi ha fragments d'ADN de la cèl·lula hoste que s'encapsiden i són partícules virals. Aquestes un cop alliberades al medi ambient poden infectar a un altre cèl·lula bacteriana i incorporar l'ADN de la cèl·lula inicial en el cromosoma d'aquesta^{167,171-174} (Figura 16B).
- La **conjugació** consisteix en la transferència de plasmidis d'una cèl·lula donadora a una cèl·lula receptora a través d'un contacte directe, mitjançant estructures especialitzades com els pili¹⁷⁵⁻¹⁸¹(Figura 17).

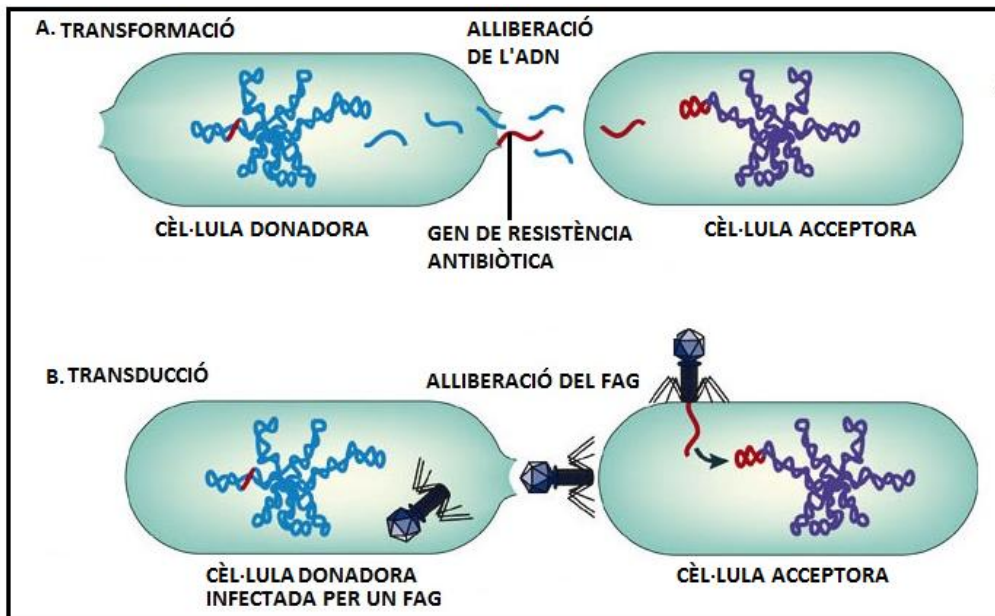


Figura 16. Mecanismes de transferència horitzontal de material genètic. la transformació (A) i la transducció (B).

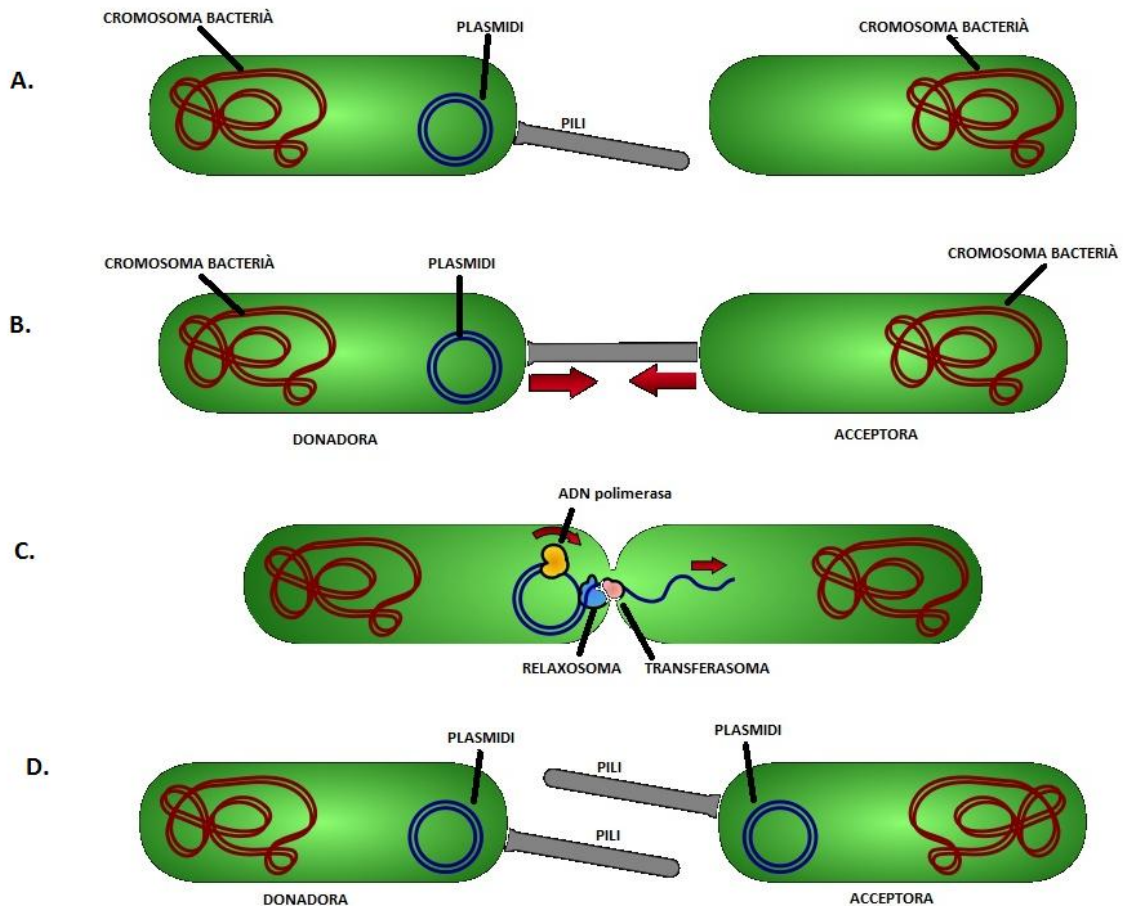


Figura 17. La conjugació: Mecanisme de transferència horitzontal de material genètic. On s'observa l'aproximació dels bacteris mitjançant el pili conjugatiu (A), la formació del porus (B), la replicació i traspàs del plasmidi (C) i el desparellament (D).

A més dels tres mecanismes citats anteriorment, també cal citar els elements genètics mòbils (EGM), que són fragments d'ADN que codifiquen per gens (p.e. de resistència, etc) i enzims responsables de la transferència de l'ADN que els permeten desplaçar-se, permeten l'intercanvi de gens entre diferents bacteris. Es troben representats per: seqüències d'inserció, transposons, integrons, illes de patogenicitats, plasmidis i agents de transferència genètica¹⁸²⁻¹⁸⁷ (Figura 18).

- Les **seqüències d'inserció (IS)** són els elements de transposició més senzills, que codifiquen una transposasa (*tnpA*) que està flanquejada per dues repeticions terminals invertides (ITR / *Inverted repeat - IR*)^{188,189}.
- El **transposó simple**, és similar a una IS, però a més de les ITR i la transposasa conté un o més gens, que poden codificar per resistència a algun antibiòtic¹⁹⁰⁻¹⁹².
- El **transposó complex** conté una seqüència d'inserció a cada extrem, en ordre directe o invers, i una regió central amb la transposasa. A la zona central del transposó és on es poden situar els gens de resistència a antibiòtics donant-lis avantatge selectiva¹⁷.
- Els **integrons**, són sistemes de captura de gens que utilitzen un lloc específic de recombinació. Tenen un sistema de recombinació que està format per el gen *intI* (que codifica per un enzim de recombinació anomenat integrasa) i una regió *attI* (lloc de recombinació on s'incorporen els gens). Aquest gens que s'incorporen s'anomenen **cassets genètics**, i tenen un regió *attC* que

recombina amb l'*attI* per incorporar-se a l'integró. Els cassets són l'element mòbil de l'integró. Aquesta capacitat d'afegir cassets gènics (ja siguin gens de resistència a antibiòtics o altres) és la que caracteritza als integrons¹⁹²⁻¹⁹⁷. L'estructura més freqüent d'un integró és: dues regions no variables terminals (anomenades seqüències constants, CS) i una regió central altament variable (en l'extrem 5' es troba el *intl*, el lloc d'inserció del casset, l'*attI*, i el promotor, P_{ant}, per a l'expressió dels gens integrats).

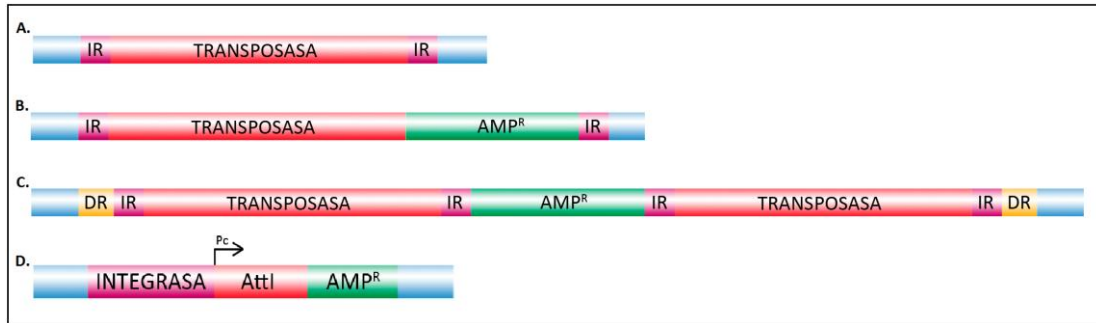


Figura 18. Representació esquemàtica dels elements genètics mòbils. Seqüència d'inserció (A), Transposó simple (B), Transposó complex (C) i Integró (D). IR: *Inverted repeat* (repeticions terminals invertides), AMP^R: Gen de resistència a ampicil·lina, DR: *Directed repeat*.

- Els **elements conjugatius integratius** (ICE) o també coneguts amb el nom de **transposons conjugatius**¹⁹⁸⁻²⁰⁰, es caracteritzen per tenir un origen de transferència i els gens necessaris pel realitzar la conjugació, això li permet transposar-se d'un lloc a un altre del genoma bacterià i autotransferir-se de forma semblant a l'utilitzada pels plasmidis. Aquests elements no contenen un origen de replicació propi que els hi permeti replicar-se autònomament. Els ICE són un grup bastant heterogeni, amb diferents propietats i una ampli rang d'hostes. És freqüent que continguin gens que codifiquen resistència a antibiòtics, localitzats en regions "calentes" o *hotspots* (regions variables, altament recombinatives que permeten la captura d'aquest gens). Però també, hi ha alguns que no contenen la regió de conjugació, i que es mobilitzen mitjançant d'altres ICE conjugatius co-residents o mitjançant plasmidis conjugatius^{190,201,202}.



Figura 19. Esquema d'un transposó conjugatiu (Tn916)²⁰³. Orf: *Open Reading Frame*, oriT: origen de transferència, tet(M): Gen de resistència a la tetraciclina, int: integrasa. En colors mostren les funcions: blau (transferència), vermell (gens accessoris: gens de resistència, etc.), verd (regulació transcripcional) i gris (recombinació).

- Les **illes de patogenicitat** (PAI), están constituïdes per fragments d'ADN grans (10-100 Kb) que contenen gens de virulència o de resistència, així com integrases, transposases i IS per a la integració i excisió cromosòmica. En general, es troben al costat dels gens que codifiquen ARNt i flanquejades per *direct repeat*, i el seu contingut de G+C difereix de la del genoma^{204,205}.



Figura 20. Esquema d'una illa de patogenicitat. DR: *Directed repeat*, AMP^R: Gen de resistència a ampicil·lina, RIF^R: Gen de resistència a rifampicina, TET^R: Gen de resistència a tetraciclina; i IS: Seqüència d'inserció.

- Els **plasmidis**, presents en la majoria d'espècies bacterianes, són fragments extracromosòmics circulars d'ADN, amb cadena doble i superenrotllats negativament, de mida variable i amb la capacitat d'autoreplicar-se en una cèl·lula hoste¹⁸². El plasmidis codifiquen tres grups de gens: (1) els gens implicats en la replicació i en el manteniment, tots ells localitzats en una regió anomenada replicó. El replicó conté un origen de replicació (*oriV*), els gens *cop/inc* encarregats del número de còpies, el gen que codifica la proteïna Rep que controla la replicació i el gens de partició. (2) els gens que codifiquen caràcters fenotípics (p.e. factors de virulència o enzims que confereixen resistència a antibiòtics)¹⁹². (3) Els gens que codifiquen les estructures conjugatives (Figura 21)^{167,206}. Si contenen un origen de transferència (*oriT*) i gens que codifiquen estructures necessàries per la seva conjugació, s'anomenen plasmidis conjugatius; si solament contenen l'origen de transferència i cap gen de transferència, s'anomenen plasmidis mobilitzables, degut a que poden fer ús de les funcions de transferència d'altres plasmidis conjugatius per a transferir-se.

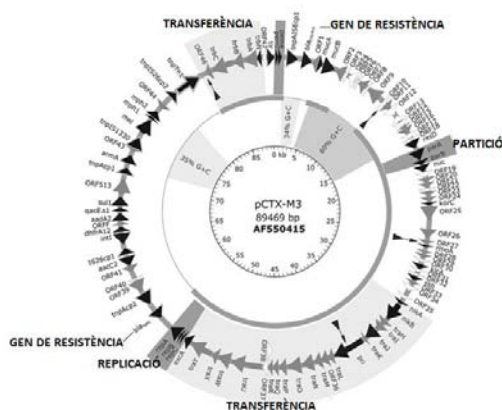


Figura 21. Esquema de la seqüència completa d'un plasmidi (pCTX-M3). On s'observen les regions que codifiquen els gens que participen en la transferència (*trb* i *tra*), en la partició (*par*), en la replicació (*rep*) del plasmidi i gens de resistència a betalactamases (TEM-1 i CTX-M-3).

Tots els plasmidis tenen la regió *mob* que codifica una relaxasa, enzim que reconeix l'*oriT*, durant la conjugació. La relaxasa fa un tall a una de les cadenes d'ADN dels plasmidi i es queda unida de forma covalent. Aleshores amb l'ajut del sistema de secreció tipus IV (T4SS), codificat per els gens *tra* i *trb*, transporta el plasmidi al nou hoste.

Degut a la gran variabilitat i diversitat plasmídica, la seva classificació es va proposar que es bases en l'estabilitat del plasmidi durant la conjugació²⁰⁷. Aquesta estabilitat només és possible quan els plasmidis presents en una mateixa cèl·lula presenten sistemes de replicació diferents. Per tant, la classificació inicial es feu introduint el plasmidi a classificar en una cèl·lula portadora d'un plasmidi amb sistema de replicació conegut: si es mantenia estable és que no presentava el mateix replicó i per tant eren compatibles; si no es mantenia estable és que presentava el mateix replicó i per tant eren incompatibles. D'aquí que la classificació rebés el nom de "Classificació segons els Grups d'Incompatibilitat" (Inc). L'any 2014, en *Enterobacteriaceae*, la classificació comprenia 27 grups d'incompatibilitat²⁰⁸. Couturier *et al.* al 1988²⁰⁹ va proposar un esquema de tipificació basat en el Southern Blot, utilitzant com a sondes replicons clonats, però la seva baixa especificitat durant la hibridació amb la gran variabilitat plasmídica va donar resultats poc específics, com creuaments entre grups Inc relacionats. Al 2005, Carattoli *et al.*²¹⁰ van descriure una tècnica de tipificació basada en l'amplificació del replicó del plasmidi, la PBRT (PCR-Based replicon typing), en enterobacteris, això

va permetre la detecció dels següents grups Inc: HI1, HI2, I1/Y, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A7C, T, FIIs, K, B/O, F, ColE, R i U, essent la família IncF la més prevalent^{208,211-213}. Aquest sistema de tipificació per PCR a sofert posteriorment noves actualitzacions permetent la diferenciació dins un mateix grup d'incompatibilitat, com per exemple: IncFII a FIIK (en *Klebsiella* spp.), FIIS (en *Salmonella* spp.) i FIYY (en *Yersinia* spp.) dependent de l'espècie²¹⁴, o FIB a FIB(Kpn3), FIB(KpQIL), FIB(Mar) i FIB(S) o la diferenciació d'un grup en dos grups, p.e. IncL/M a IncL i IncM²¹⁵.

Al 2009, Garcillán-Barcia *et al.*²¹⁶ van proposar una nova classificació, basada en la tipificació de les relaxases, en concret de la regió *mob*. Segons les característiques genètiques i les propietats de les relaxases, els plasmidis es classifiquen en sis famílies: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P i MOB_Y. Aquesta classificació no només es centra en plasmidis presents en enterobacteris, sinó que engloba famílies altres grups de procarotes. A més també permet la classificació d'altres elements mòbils com les ICE que contenen relaxases.

- Finalment hi ha els **agents de transferència genètica** (GTA: *Gene transfer agent*) que mitjançant estructures fàgiques, movilitzen material genètic del cromosoma bacterià. Els GTA tenen certa semblança als bacteriòfags, malgrat tenir algunes diferències, com que la seqüència del cromosoma bacterià que empaqueta és a l'atzar. La gran majoria de partícules fàgiques contenen DNA bacterià i unes poques per atzar poden contenir gens del GTA. En aquest cas, rarament hi cap tot el DNA del GTA, contràriament al que succeeix amb una transducció mediada per fags. També cal esmentar que la producció d'un GTA no és degut prèviament a una infecció per fag, sinó, que els gens que produeixen l'estructura que empaqueta la seqüència gènica es troben en el cromosoma bacterià, sense l'intercessió de cap fag. Malgrat tot, tots els GTA coneguts tenen estructura molt semblant a la d'un fag, i es creu que són alliberats al ambient degut a cicles lítics en els cèl·lules productores²¹⁷.

1.7. Les carbapenemases.

A l'apartat 1.1 d'aquesta introducció he explicat quin paper juga *K. pneumoniae* en la clínica, en l'apartat 1.2 assenyalo els aspectes més importants del tractament que s'empra per a les infeccions produïdes per aquesta espècie i, en apartats posteriors, he anat desenvolupant les característiques dels antimicrobians implicats en aquest tractament, descrivint els respectius mecanismes d'acció i resistència. Tanmateix crec que, essent l'objectiu d'aquest treball la caracterització d'un mecanisme concret de resistència: la producció de la carbapenemasa OXA-48, és necessari explicar més detingudament aquest mecanisme. D'aquí que en aquest apartat explicaré en detall què són les carbapenemases i en el següent totes les característiques que es coneixen sobre la carbapenemasa OXA-48.

Les carbapenemases han adquirit gran rellevància clínica degut a que cada cop més s'utilitzen els carbapenèmics (p.e. imipenem, meropenem, ertapenem o doripenem) pel tractament de les infeccions per enterobacteris especialment quan hi ha una elevada probabilitat d'estar davant d'una infecció per bacteris multiresistents com els enterobacteris portadors de BLEA²¹⁸⁻²²². En tres de les

quatre classes moleculars d'Ambler (A, B, D) es troben enzims amb activitat enfront els carbapenèmics.

1.7.1. Les carbapenemases de la classe A i grup 2f

El perfil hidrolític d'aquestes carbapenemases és d'elevada afinitat als carbapenèmics, penicil·lines, i cefalosporines, però depèn de l'enzim (SME té poca o inexistent activitat hidrolítica a les cefalosporines de tercera i quarta generació o la KPC té activitat hidrolítica enfront totes les cefalosporines a excepció de las cefamicines i aztreonam que és menor)¹⁰ (Taula 4).

La primera en ser descoberta va ser la SME-1 (*Serratia marcescens* enzyme), a Anglaterra al 1982^{223,224}. A partir d'aquesta descoberta van anar apareixent altres com la NMC (*Not metalloenzyme carbapenemase*) o la IMI (*Imipenem-hydrolyzing β-lactamase*), que es van identificar en aïllats clínics poc freqüents d'*E. cloacae* als EUA, França i Argentina^{220,225-230}.

Les carbapenemases de classe A que han adquirit més rellevància clínica per la seva difusió són les que es troben codificades en plasmidis, com la KPC i la GES. La KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)^{52,231,232} és la més estesa. Es va identificar al 1996 als EUA; i tot i ser bastant rara en aquell país, a partir del 2005 es van identificar amb bastant freqüència en enterobacteris causants de brots, fins al punt que al 2012 més de 1.200 soques de *K. pneumoniae* productora de KPC havien estat aïllades d'hemocultius en un hospital universitari de New York^{52,220,233-235}. A nivell mundial està àmpliament difosa (França, Israel, Xina, Taiwan, Sud Amèrica, etc) i a Europa, el principal focus endèmic està localitzat a Grècia i el segon a Itàlia, malgrat veure's afectats altres països europeus com Escòcia, Alemanya, Bèlgica, Finlàndia, Països Escandinaus, Espanya o Suïssa²³⁶⁻²⁴⁰.

Les carbapenemases GES (*Guiana extended spectrum*) i IBC (*integron-borne cephalosporinase*) rarament s'han aïllat en enterobacteris, detectant-se per primer cop al 2000. Les carbapenemases GES són una variant de la BLEA GES¹⁰. La GES-1 es va detectar en una soca de *K. pneumoniae* aïllada a la Guaiana francesa²⁴¹⁻²⁴⁴ i la IBC-1 va ser aïllada d'un *E. cloacae* a Grècia. A partir d'aleshores, s'ha descrit en diferents zones del món (Grecia, França, Portugal, Sud Àfrica, Brasil, Argentina, Corea i Japó) però en soques de *Pseudomonas aeruginosa*²²⁰. El gen que codifica aquestes betalactamases es troben en un integró localitzat en diferents plasmidis²²⁰.

1.7.2. Les carbapenemases de la classe B i grup 3

Són les anomenades metal·lobetalactamases, i la més coneguda és la NDM-1 (*Nova Delhi metalloβ-lactamase*)²⁴⁵⁻²⁴⁸, tot i que hi ha altres famílies, com són: VIM, IMP, GIM, SIM i SPM²²⁰. La NDM-1 va ser descrita per primer cop el 2009 en un pacient suís procedent de l'Índia (de Nova Delhi) al que se li va aïllar una soca de *K. pneumoniae* de l'orina²⁴⁹. Posteriorment, es van identificar aquestes betalactamases en varies espècies d'enterobacteris: no solament en *Klebsiella*, sinó també en *E. coli*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, etc, i també en *A. baumannii* o *P. aeruginosa*²²⁰.

En països amb una gran relació amb l'Índia, a nivell de migració, s'han observat i identificat diversos focus de difusió d'aquestes betalactamases, com per exemple al Regne Unit²⁵⁰⁻²⁵². A França s'han identificat varies soques NDM-1 procedents de l'Índia, malgrat no representar un problema de salut pública^{246,253}. A Espanya s'han identificat soques portadores de VIM i de NDM, al 2012 la freqüència

de soques de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa VIM era del 19,7% i de la NDM de 4,7% segons el estudi multicèntric realitzat per Oteo *et al.* al 2012^{236,254}.

1.7.3. Les carbapenemases de la classe D i grup 2df

Les betalactamases de classe D, anomenades també oxacil·linases (OXA) es subdivideixen en varis grups²⁵⁵⁻²⁵⁷, els quals es diferencien pel patró de resistència als betalactàmics que confereixen, l'activitat hidrolítica enfront els betalactàmics, les seqüències aminoacídiques i l'entorn genètic on es localitza el gen *bla*_{OXA}. En la figura 22 es pot observar, a títol d'exemple, el dendrograma generat amb les diferents betalactamases de classe D descrites fins l'any 2010, en el que s'assenyalen les que presenten activitat enfront dels carbapenèmics.

Taula 9. Perfils d'hidròlisi i d'inhibició de les carbapenemases²⁵⁸.

Classe molecular	Grup funcional	Enzim	Perfil d'hidròlisi ^a				Perfil d'inhibidors ^b	
			Penicil·lines	Cefalosporines	Aztreonam	Carbapenèmics	EDTA	Àc. clavulànic
A	2f	NMC	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	±	-	+
B	3	IMP	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	-	±	-	±

^a +: forta hidròlisi (generalment amb un $k_{cat} > 2/s$), ±: débil hidròlisi (generalment amb un $k_{cat} 0,5-2/s$), -: hidròlisi no mesurable (generalment amb un $k_{cat} < 0,5/s$).

^b +: inhibició detectada, ±: inhibició variable, -: inhibició no detectada.

EDTA: àcid. ethylenediaminetetraacetic, NMC: *Not metalloenzyme carbapenemase*, SME: *Serratia marcescens enzyme*, KPC: *K. pneumoniae carbapenemases*, GES: *Guiana extended-spectrum*, VIM: *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamases*, GIM: *German imipenemase*, SPM: *Sao Paulo metallo-beta-lactamase*.²⁵⁸

*Kcat (constant catalítica: nombre de molècules substrat que l'enzim converteix en producte per unitat de temps)

Les OXA, amb capacitat d'hidrolitzar carbapenèmics (*carbapenem-hydrolyzing class D betalactamases*: CHDLs) hidrolitzen significativament les cefalosporines d'espectre ampliat. La majoria dels enzims s'han descrit en *Acinetobacter* spp. L'activitat hidrolítica que presenten de carbapenèmics és baixa. En general l'hidròlisi d'imipenem és lenta, però més ràpida que la del meropenem i els valors de Km (la constant de Michaelis-Menten: és la concentració de substrat necessària perquè l'enzim arribi a una velocitat mitjana-màxima.) amb imipenem indiquen que aquestes betalactamases tenen una aparent alta afinitat per aquest substrat. Aquestes propietats han provocat gran debats sobre el seu fenotip de resistència. Experiments amb *knockouts* d'*A. baumannii* amb OXA-40, OXA-58 o OXA-23 han demostrat que aquests enzims confereixen

resistència a carbapanèmics²⁵⁷. Tal i com ja s’ha citat, la majoria de les OXA s’han descrit en *Acinetobacter* spp. (Taula 10), a excepció de l’OXA-48, tot i que en el cas de l’OXA-23 també s’han descrit en *P. mirabilis*.

L’OXA-48 és la que s’ha descrit més freqüentment en enterobacteris i té activitat front penicil·lines i carbapenèmics, dèbil enfront cefalosporines d’espectre ampliat. Al ser una betalactamasa de classe D no és inhibida pels inhibidors de betalactamases. Donat que és el tema de la present tesi el descriu en més detall en el darrer apartat.

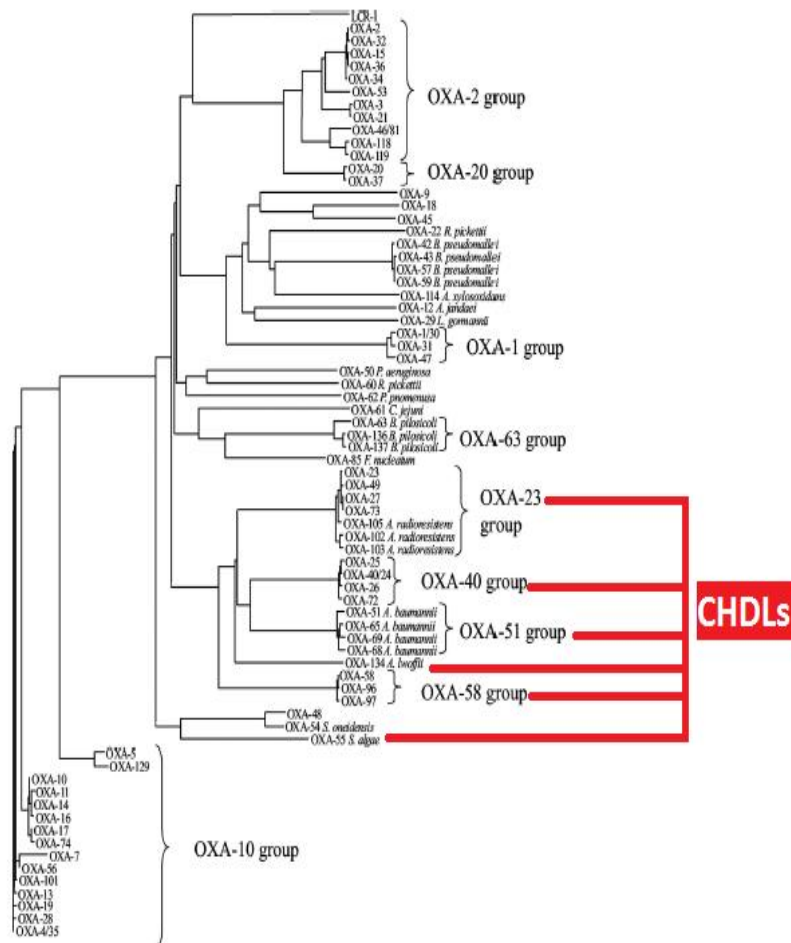


Figura 22. Dendrograma de les diferents OXA²⁵⁶. Estan marcades les OXA amb capacitat per hidrolitzar carbapenèmics (*carbapenem-hydrolyzing class D betalactamases*: CHDLs), excepte l’OXA-143, perquè no s’havia descobert encara

Taula 10. OXA amb activitat carbapenemàsica aïllades en *Acinetobacter*.

CHDL	Percentatge d'homologia amb altres OXA	Variants	Microorganismes on s'ha aïllat	Referències
OXA-23	36% (OXA-10)	OXA-27	<i>A. baumannii</i> <i>P. mirabilis</i>	259–261
OXA-40	36% (OXA-10) 61% (OXA-23)	OXA-25, OXA-26 i OXA-72.	<i>A. baumannii</i>	220,255,262,263
OXA-58	50%(OXA-23) 49% (OXA-40) 40%(OXA-10)	OXA-96, OXA-97 i OXA-164.	<i>A. baumannii</i>	264–267
OXA-143	88% (OXA-40) 63% (OXA-23) 52% (OXA-58)	-	<i>A. baumannii</i>	268
OXA-51	64% (OXA-40) 57% (OXA-23) 33% (OXA-10)	OXA-64, OXA-66, OXA-68, OXA-71, OXA-75, OXA-78 i OXA-92	<i>A. baumannii</i>	266,267,269,270
OXA-134a	63% (OXA-23) 58% (OXA-40) 57% (OXA-51) 53% (OXA-58)	OXA-186 i OXA-191	<i>A. lwoffii</i>	255,271

- Sense variants.

1.7.4. Detecció fenotípica de les carbapenemases

La detecció fenotípica de les carbapenemases en enterobacteris sovint és difícil. Això es deu a la varietat de perfils de resistència que es poden donar en funció de la carbapenemasa implicada, de l'espècie bacteriana i de la presència d'altres mecanismes de resistència. En l'estudi de la sensibilitat, doncs, es tenen en compte els següents aspectes com:

- El perfil d' hidròlisi de les diferents classes de carbapenemases.
- El perfil d'inhibició que confereixen els diferents inhibidors de betalactamases.
- L'epidemiologia local.
- L'identitat del microorganisme i la seva resistència natural.

El patró de sensibilitat d'una soca possiblement productora de carbapenemasa mostra una sensibilitat disminuïda o resistència a les cefalosporines d'ampli espectre i als carbapenèmics. És per

això que diferents societats han proposat punts de tall de sensibilitat als carbapenèmics per sospitar la possible presència d'una carbapenemases: halos d'inhibició ≤ 21 mm a l'ertapenem i al meropenem segons el *Clinical and Laboratory Standards Institut* (CLSI)^{272,273} o < 25 mm al meropenem i al ertapenem i < 23 mm al imipenem segons l'European Committé on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST)^{274,275}.

En el cas que s'utilitzin mètodes per a determinar els valors de CIM, el CLSI proposa valors de mínim 2 µg/ml al ertapenem i 2-4 µg/ml a l'imipenem i al meropenem. En canvi els punts de tall proposats per EUCAST són de $> 0,12$ mg/L al meropenem i al ertapenem i > 1 mg/L al imipenem.

El mètode de referència, no sempre a l'abast de tots els laboratoris de microbiologia, seria l'assaig espectrofotomètric, que determina el perfil d'hidròlisis als diferents antimicrobians per part d'un extracte cel·lular del bacteri problema. És per això que s'han descrit diferents mètodes biològics (bioassaigs) senzills que permeten la seva detecció¹⁰.

Davant la impossibilitat d'usar de manera rutinària l'espectrofotometria, diferents autors conjuntament amb la indústria, han descrit diferents metodologies. Entre aquestes destacaré el Test de Hodge modificat, el test Masuda i els mètodes colorimètrics.

El **test de Hodge modificat** (THM) (Figura 23), és una prova basada en la dissenyada inicialment per Gots *et al.* al 1945²⁷⁶ per detectar la producció de penicil·linasa a *Staphylococcus aureus*. Va ser recomanada per primera vegada pel CLSI l'any 2009 com a test fenotípic de confirmació de la producció de carbapenemases²⁷⁷. Té una elevada sensibilitat però no és útil per a la diferenciació dels diferents tipus de carbapenemases. Per a la detecció de les carbapenemases de classe A i B, les sensibilitats foren superiors al 90%, per exemple, en el cas de KPC en *K. pneumoniae*. En canvi per a la detecció de la NDM-1, en un inici, hi va haver problemes per falsos negatius^{278,279}, que es van resoldre en part amb l'addició de sulfat de zinc a la placa d'agar²⁸⁰. S'ha discutit quin és el carbapenèmic més adequat per al THM, recomanant la utilització de meropenem i ertapenem en detriment de l'imipenem^{10,277,281-283}. Malgrat la seva senzillesa, el THM té detractors per les discordances observades en algunes soques. S'han observat resultats de falsos negatius per la baixa expressió de la carbapenemasa, sobretot en soques amb metal·lobetalactamases i oxacil·linases. Els falsos negatius quan es tracta de les metal·lobetalactamases, es poden evitar afegint sulfat de zinc al medi per incrementar l'activitat de l'enzim. També s'han comunicat falsos positius o positius febles en soques productores de la betalactamasa d'espectre ampliat, CTX-M-15, i en soques hiperproductores d'AmpC¹⁰. Aquest fet es deu a que aquests enzims tenen afinitat per als carbapenèmics, encara que aquesta és molt baixa i només quan es troben en elevades concentracions poden hidrolitzar el carbapenem, essent l'afinitat major per a l'ertapenem que per a l'imipenem.

A més del Test de Hodge modificat, s'han proposat, encara que amb molt menys èxit, altres proves. Una d'elles és el **test de Masuda** (MAS)²⁸⁴, (Figura 23) que consisteixen en: una difusió amb discs utilitzant un microorganisme indicador sensible a carbapenèmics (p.e. *E. coli* ATCC 25922). Cal lisar el bacteri a estudiar i col·locar l'extracte obtingut en un disc de paper que se situa a l'extrem de l'halo d'inhibició de l'antibiòtic indicador (en aquest cas un carbapenèmic). Si el bacteri produeix carbapenemasa distorsionarà l'halo d'inhibició del carbapenèmic¹⁰.

Van der Zwaluw K. *et al.* al 2015²⁸⁵ va descriure una tècnica basada en l'inactivació d'un disc d'un antibiòtic carbapenèmic (el imipenem en el seu cas) en un cultiu líquid de la soca que productora de la carbapenemasa, que posteriorment es comprova al col·locar aquest disc en un cultiu d'una soca sensible als carbapenèmics (la *E. coli* ATCC 29522 en el seu cas) i observar si hi ha inhibició o creixement. Aquesta tècnica s'anomena CIM (*Carbapenem Inactivation Method*).

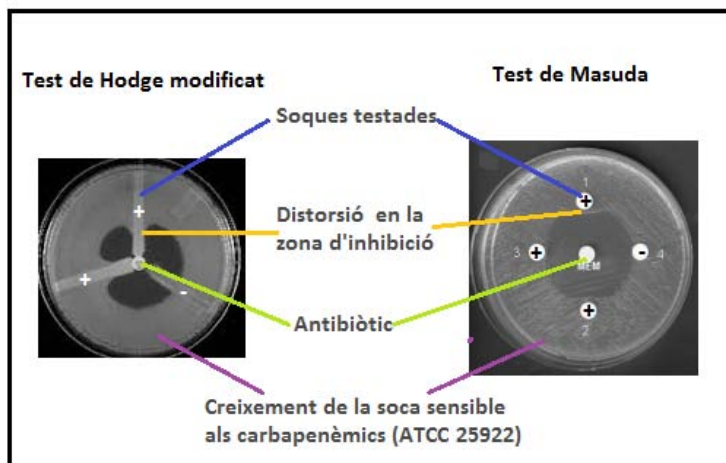


Figura 23. Esquema del Test de Hodge modificat (THM) i el test de Masuda (MAS). On el control negatiu del THM és la soca ATCC BAA1706 no productora de carbapenemases i en canvi en el MAS és només tampó fosfat.

Els darrers anys, s'han desenvolupat **tècniques colorimètriques** per facilitar una ràpida detecció de soques productores de carbapenemasa. L'any 2012 Nordmann. *et al.*²⁸⁶ presenten el test Carba NP, basat en els canvis colorimètrics deguts a la reacció de l'enzim amb un substrat (imipinem) que donen un canvi de pH en la solució que provoca la reacció del roig de fenol (Figura 24). S'han desenvolupat altres tècniques basades amb les reaccions d'aquest enzims amb substrats com són: Blue Carba²⁸⁷ o Rapid CARB Screen Kit 98021 (ROSCO Diagnostica A/S, Taastrup, Dinamarca.). Totes aquestes tècniques utilitzen com a substrat l'imipenem, i varien en la concentració d'aquest antibiòtic com el compost utilitzat com a indicador de canvis en el pH, essent el roig de fenol en el cas del Carba NP i de Rapid CARB Screen Kit 98021, i el blau de bromotimol en el Blue Carba (Figura 24). Això permet que davant la carència de poder determinar genòtipicament la presència d'una carbapenemasa i la identificació de la classe (depenent del temps de canvi de coloració. p.e. les KPC són les primeres en virar i observar el canvi colorimètric respectiu d'un canvi de pH), es pugui dir en un màxim de 2 hores si la soca produeix o no aquest tipus d'enzim.

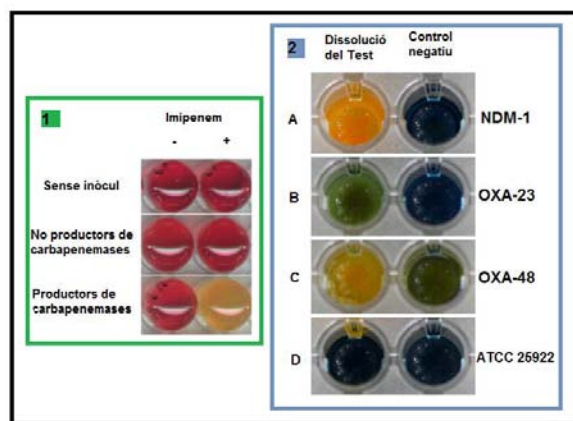


Figura 24. Resultats del test Carba NP²⁸⁶ (1) i del Blue Carba²⁸⁷ (2). En el Test Carba NP s'observa com els productors de carbapenemases canvien el color del medi de roig a groc, i en canvi el Blue Carba el medi és blau i vira a groc-verd quan hi ha carbapenemases.

També s'han descrit diferents medis selectius per a detectar enterobacteris portadors de carbapenemases a partir de mostres clíniques. Aquests medis estan especialment dissenyats per a detectar pacients o personal portador d'enterobacteris amb carbapenemases. La majoria d'aquests medis són cromogènics, entre ells els que es fan servir per a la detecció de BLEA i els que específicament s'han dissenyat per a la detecció de KPC. Els medis cromogènics per BLEA, p.e. el chromID[®] ESBL (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidr-esbl>), permeten detectar també microorganismes amb carbapenemases de les classes A i B, però no les soques que tenen OXA-48. No obstant això tenen l'inconvenient de ser poc específics, atès que en ells també creixen els microorganismes productors de BLEA. Aquest fet s'ha de tenir en compte en aquelles àrees geogràfiques en les que aquest tipus d'enzims és molt prevalent ja que poden emascarar la presència de microorganismes amb carbapenemases. Els medis cromogènics específics per carbapenemases com el CHROMagar[™] KPC (CHROMagar, Paris, França) tenen una elevada sensibilitat i especificitat per a la detecció de soques amb enzims tipus VIM i KPC directament de mostres rectals, si bé no discriminen el tipus de carbapenemasa.

Un cop confirmat que la soca problema produeix un enzim que inactiva els carbapenèmics cal diferenciar el tipus de carbapenemasa. Cal tenir present que algunes carbapenemases produeixen nivells baixos de resistència. S'han proposat diferents algorismes basats generalment en l'ús d'inhibidors de les betalactamases per determinar la classe de la carbapenemasa en qüestió (Figura 25).

En el cas de les metal·lobetalactamases s'utilitza el fet que no hidrolitzen l'aztreonam (i per tant apareixen sensibles en l'antibiograma) i la possible sinergia entre els carbapenèmics i EDTA o entre ceftazidima i EDTA per inferir la seva presència. No obstant això, sovint les soques amb metal·lobetalactamases també produeixen BLEA, sent resistents a aztreonam. S'han dissenyat proves d'aproximació de discos, discos de carbapenèmics combinats amb EDTA i tires de difusió en gradient (p.e. Etest) amb un carbapenèmic i EDTA per identificar fenotípicament aquests enzims. En alguns casos s'afegeix a més fenantrolina o es substitueix EDTA per compostos tiòlics com l'àcid mercaptopropiònic o l'àcid dipicolínic per millorar la sensibilitat de la prova^{10,283}.

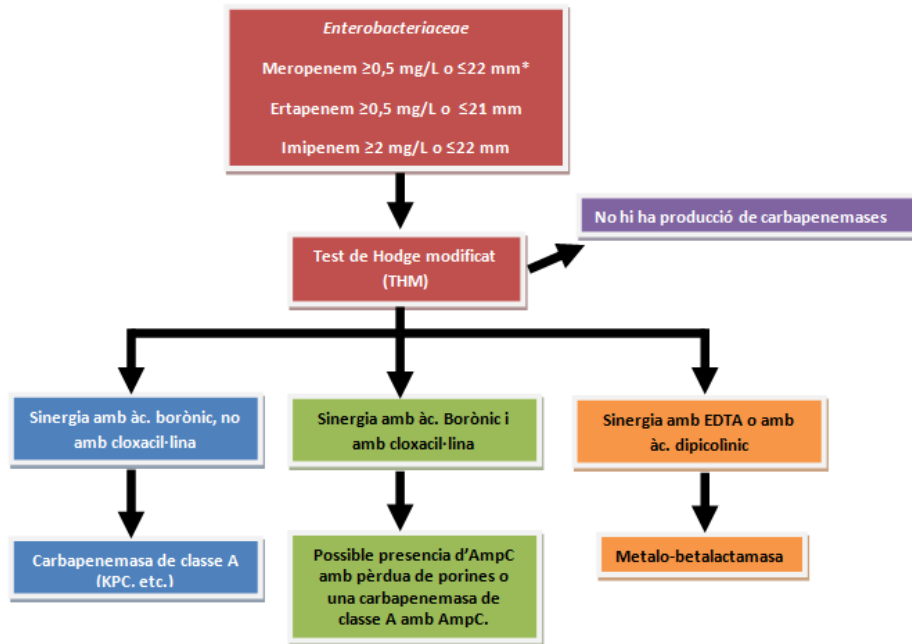


Figura 25. Identificació fenotípica d'*Enterobacteriaceae* productores de carbapenemases¹⁰. *Dades dels valors de la CIM i d'halos d'inhibició.

En el mètode d'aproximació de discos és important la distància entre els discos del carbapenèmic i l'inhibidor, sobretot en les soques amb baixa expressió de la carbapenemasa en las que els halos d'inhibició són amplis. Per aquest motiu existeixen mètodes que inclouen directament l'inhibidor en el mateix disc que el carbapenèmic i es compara l'halos d'inhibició resultant amb què es produeix amb el carbapenèmic sol. Aquest mateix principi s'utilitza amb les tires de Etest que en un extrem contenen imipenem i en l'altre imipenem amb EDTA. Per la diferència entre els valors de CIM o els mil·límetres dels halos d'inhibició de imipenem sense i amb inhibidor es pot inferir la presència de les carbapenemases^{10,246}.

Les soques productores de la betalactamasa KPC són resistents al aztreonam i no s'inhibeixen per l'EDTA però sí pel àcid borònic i "lleument" per l'àcid clavulànic. Per aquesta raó no es recomana utilitzar àcid clavulànic en soques que expressen aquest enzim. La utilització del àcid borònic té com inconvenient que és també un bon inhibidor de AmpC, circumstància que dificulta la detecció de les KPC quan a més hi ha AmpC (per exemple en *E. cloacae*). En aquest cas el CLSI proposa utilitzar simultàniament una prova de discos combinats amb cloxacil·lina per demostrar la presència d'aquestes betalactamases tipus AmpC²⁸⁸⁻²⁹³. La sinèrgia amb àcid borònic a les soques productores de KPC es pot demostrar amb els carbapenèmics i també amb cefalosporines d'ampli espectre, preferentment amb cefepime. S'han dissenyat proves que afegeixen àcid borònic directament als discs i que utilitzen 300 o 400 mg d'aquest compost, tot i que també s'ha proposat una concentració de 600 mg i comparar els halos d'inhibició amb els del carbapenèmic sense el àcid borònic. També es pot observar aquesta sinèrgia amb proves d'aproximació de discos. Com a substrat es recomana preferentment utilitzar meropenem o imipenem ja que amb ertapenem es pot observar falsos positius quan el microorganisme estudiat produeix AmpC, incloses les AmpC plasmídiques¹⁰.

Per a les carbapenemases de tipus OXA no és possible utilitzar un mètode fenotípic com el proposat amb les carbapenemases de classe A o B, ja que no existeixen inhibidors específics d'enzims de classe

D. Quan hi ha una alta sospita de la presència de l'OXA-48, la presència de CIM de temocilina > 32 mg/L o la resistència a piperacil·lina/tazobactam poden ajudar a diferenciar la producció d'aquesta carbapenemasa de les BLEA, tal com ho proposa l'EUCAST²⁷⁵; malgrat que potser hi hagin soques resistents a la piperacil·lina/tazobactam per la coproducció d'una BLEA i OXA-1^{294,295}. Tot i això, es recomana confirmar la presència d'aquests enzims per mitjà de mètodes moleculars.

Un dels problemes a què s'enfronta l'esquema proposat de diferenciació del tipus de carbapenemasa utilitzant diferents inhibidors, és el creixent augment de microorganismes que produeixen més d'un tipus de betalactamasa, incloses les soques productores de metal·lobetalactamases i carbapenemases de classe A; i fins i tot algunes simultàniament amb BLEA (majoritàriament CTX-M o SHV) i AmpCp (generalment de tipus CMY). Per a les soques d'*Enterobacteriaceae* que produeixen KPC i VIM simultàniament es recomana utilitzar en una mateixa placa una prova de discos combinats amb els dos inhibidors en discos independents i en el mateix disc. S'ha proposat també una prova similar per a les soques amb KPC que produeixin simultàniament una BLEA però en aquest cas s'utilitza àcid borònic i àcid clavulànic per separat i simultàniament en el mateix disc indicador amb cefalosporines.

Malgrat els diferents comitès internacionals com el CLSI i l'EUCAST han establert uns punts de tall per a determinar si un microorganisme és o no resistent als betalactàmics, en funció de la seva CIM o dels mm dels halos d'inhibició, hi ha certs dubtes sobre la utilització dels carbapenèmics per al tractament d'infeccions produïdes per bacteris portadors de carbapenemases, tot i que *in vitro* es classifiquin com a sensibles²⁹⁶.

El CLSI i EUCAST^{297,298} recomanen taxativament informar la sensibilitat als carbapenèmics en funció dels punts de tall de sensibilitat establerts, una mica inferiors en el cas del CLSI, sense modificar la interpretació malgrat es tingui constància de la presència d'una carbapenemasa. Així mateix, també es basa en el propi concepte del que representa un punt de tall; serveix per establir categories clíniques de tractament i no estan encaminats a la detecció de mecanismes de resistència. No obstant això, els nous punts de tall de carbapenèmics, sobretot en *Enterobacteriaceae*, estan molt propers als punts de tall de vigilància epidemiològica, circumstància que facilita la detecció fenotípica de les carbapenemases. Tot i això, donat que la informació clínica és encara molt escassa; l'expressió dels enzims és molt variable; algunes proves de sensibilitat presenten una baixa reproductibilitat, sobretot amb els mètodes automàtics; i que la freqüència d'aquestes carbapenemases és molt variable segons àrees geogràfiques; en molts laboratoris se segueixen recomanacions locals o criteris interpretatius que transformen la categoria sensible dels carbapenèmics a resistent quan s'identifica la presència d'una carbapenemasa o si més no es recomana no utilitzar cap carbapenèmic si hi ha alternatives, tal com es feia, i en alguns centres es segueix fent, amb les cefalosporines d'ampli espectre i les soques que presentaven BLEA amb anterioritat al canvi dels punts de tall¹⁰.

En el cas de les metal·lobetalactamases i atès que no hidrolitzen l'aztreonam s'ha suggerit aquest antibiòtic com a tractament d'elecció. No obstant això, en la pràctica no solen ser sensibles a causa de la producció simultània de BLEA o betalactamases plasmídiques de tipus AmpC, o en el cas de *Enterobacter* spp. o *P. aeruginosa* a la hiperproducció d'AmpC cromosòmica.

Un cas particular el constituïrien les carbapenemases de tipus OXA, essencialment l'OXA-48, ja que presenten una lleugera pèrdua de sensibilitat als carbapenèmics (suficient en molts casos perquè es

categoritzin com resistents) però que pel seu perfil hidrolític apareixen sensibles a les cefalosporines d'espectre ampliat, per la qual cosa seguint les directrius del CLSI s'han d'informar com a sensibles.

1.8. La carbapenemasa OXA-48.

La carbapenemasa OXA-48 va ser identificada per primer cop en una soca clínica de *K. pneumoniae* a Istanbul (Turquia) al 2001²⁹⁹, i posteriorment es va identificar en *E. coli* i *C. freundii* en el mateix país³⁰⁰. Després d'anys de descriure's només a Turquia o en pacients relacionats amb aquest país, l'OXA-48 ha estat descrita en molts països d'Europa, Orient Mitjà i Àfrica del Nord i, principalment, en aïllats de *K. pneumoniae*³⁰¹⁻³²⁷.

L'OXA-48 té activitat front penicil·lines i carbapenèmics (reduïda, malgrat que té una bona eficiència catalítica amb l'imipenem), dèbil enfront cefalosporines d'espectre ampliat (baixa afinitat per la cefotaxima i encara menor per a la ceftazidima i la cefepima). Al ser una betalactamasa de classe D no és inhibida pels inhibidors de betalactamases.

A partir de l'OXA-48, a dia d'avui s'han identificat 10 variants (Taula 11): OXA-48b, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247 i OXA-370. En l'annex I es pot observar el percentatge d'homologia de les variants amb l'OXA-48 i el resultat de l'alineament de totes elles, on és veu que el grau màxim d'homologia el té l'OXA-48B, amb el 100%, seguit de OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-245, OXA-370, OXA-199, amb un 99%, i les variants: OXA-181, OXA-163, OXA-232 són els que el tenen més dispar, amb un 98% d'homologia.

A quatre de les variants d'OXA-48: OXA-162, OXA-163, OXA-181, i OXA-232, se'ls han mesurat les propietats cinètiques i s'ha observat que l'OXA-163 sembla ser que hidrolitza poc els carbapenèmics; en canvi l'OXA-181 i l'OXA-232 tenen una activitat molt semblant a la de OXA-48, tot i que l'OXA-232 sembla que té una millor hidròlisi de les penicil·lines. Curiosament, malgrat la falta d'activitat enfront els carbapenèmics d'OXA-163, aquesta té capacitat per hidrolitzar ceftazidima i aztreonam, que no és detectable en OXA-48, i una major capacitat per hidrolitzar la cefotaxima i cefepime que OXA-48, fent que aquest enzim sigui més similar a una BLEA que no a una oxacil·linasa amb capacitat d'hidrolitzar carbapenèmics.

L'origen del gen *bla*_{OXA-48} és el gen *bla*_{OXA-54}, el qual està localitzat en el cromosoma de *Shewanella* spp. (microorganisme aquàtic) amb el que presenta una homologia del 92% en la seqüència aminoacídica³⁴⁴. Es creu que l'acció d'elements genètics mòbils va permetre la mobilització del gen i la transferència a altres microorganismes (enterobacteris) partint d'algunes de les espècies de *Shewanella* spp. (*S. oneidensis* i *S. xiamenensis*). Paral·lelament a aquesta mobilització, es van originar les variants cromosòmiques d'OXA-48, OXA-48b i OXA-199 en *S. xiamenensis*. En un ambient aquàtic al Marroc, es va descobrir una *Serratia marcescens* amb un plasmidi portador del gen, cosa que fa pensar que potser va participar com a reservori del plasmidi portador del gen i va permetre la transmissió a la resta d'enterobacteris que avui en dia coneixem que tenen aquest gen³⁴⁴⁻³⁴⁷.

Taula 11. Informació de les variants d'OXA-48.

Variant OXA-48	Diferències aminoacídiques	Localització	Entorn genètic	Microorganisme que el vehicula	Ref.
OXA-181 (JN205800)	Thr104Ala, Asn110Asp, Glu175Gln, Ser179Ala	Plasmídica (ColE, IncA/C, IncT)	Tn2013	<i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i>	278,302,3 16,328- 334
OXA-163 (HQ700343)	Delecció de: Arg214, Ile215, Glu216, Pro217. Ser220Asp	Plasmídica (no tipat per PBRT)	Upstream:ISEc14 Downstream: té IS4	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>	300,335,3 36
OXA-162 (ACZ73269)	Thr224Ala	Plasmídica (Incl/M)	Tn1999	<i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Raoultella</i> <i>ornithinolitica</i> , <i>K. pneumoniae</i>	312,337,3 38
OXA-204 (KP027886.1)	Gln98His, Thr99Arg	Plasmídica (IncA/C)	Tn2016	<i>K. pneumoniae</i>	339
OXA-232 (JX423831.1)	Thr104Ala, Asn110Asp, Glu175Gln, Ser179Ala, Arg222Ser	Plasmídica (no tipable)	Tn2016 (truncat)	<i>K. pneumoniae</i> i <i>E. coli</i>	340
OXA-244 (JX438000)	Arg222Gly	Desconeguda	Desconegut	<i>K. pneumoniae</i>	321
OXA-245 (JX438001)	Glu125Tyr	Plasmídica (Incl/M)	Tn1999	<i>K. pneumoniae</i>	321
OXA-247 (JX893517)	Tyr219Ser, Asp220Asn	Plasmídica (no tipable)	Upstream: IS4221 Downstream: IS4 (truncada)	<i>K. pneumoniae</i>	341
OXA-370 (KF900153.1)	Thr634Gly Cys635Ala	Plasmídica (del grup IncF)	Upstream: Tn3 Downstream: Tn4 (KJ488943.1)	<i>E. cloacae</i>	342 ^{a-}
OXA-199 (JN704570)	His37Tyr, Val44Ala, Asp153Gly	Cromosòmica	Downstream: ISShes2 (JN704570, JX644945)	<i>Shewanella</i> <i>xiamenensis</i>	343
OXA-48b (JX644945)	Cap diferència	Cromosòmica	Tn1999	<i>S. xiamenensis</i>	343

1.8.1. L'entorn genètic del gen *bla*_{OXA-48}

La difusió d'aquest enzim pot explicar-se pel fet que en l'entorn del gen *bla*_{OXA-48} s'han descrit dues seqüències d'insercions (IS1999) que defineixen el transposó Tn1999^{303,304,348-350}. El Tn1999 està format per dues seqüències d'inserció (IS1999) flanquejant el gen *bla*_{OXA-48}. Aquestes seqüències d'inserció són de la família IS4, les quals estan delimitades per seqüències de repetició invertida imperfectes curtes (*Inverted repeat*: IR), codifiquen una transposasa que es requereix per a la transposició i són capaces d'inserir-se en una molècula diana d'ADN, la qual cosa comporta una duplicació de diversos parells de bases (*directed repeat*: DR) en el lloc d'inserció. L'IS1999 codifica una transposasa putativa de 402 aminoàcids, que comparteix una homologia aminoacídica del 71% amb la de l'IS10, el membre de la família IS4 millor caracteritzat. IS1999 té una mida de 1328 pb, amb 21 pb d'IRs, i genera una duplicació de 9 pb en el lloc d'inserció³⁵⁰. En la seqüència de l'IS1999 *upstream* al gen *bla*_{OXA-48} es localitzen les seqüències promotores d'aquest gen, la -35 i -10. El Tn1999 es va inserir dins d'un gen *tir* (similar al responsable d'inhibir la transferència del plasmidi R100). Es va identificar una diana de duplicació de 9 pb (CGTTCAGCA) a cada extrem de Tn1999, i més avall del gen *bla*_{OXA-48} es va identificar el gen *lysR* que codifica per una proteïna reguladora de 304 aminoàcids (98% homologia a nivell aminoacídica amb la MR1 de *S. oneidensis*) amb la funció de regulador transcripcional^{18,343,350,351}, seguit d'un fragment truncat d'un gen que codifica per un acetil coenzimA carboxilasa (100% homologia a nivell aminoacídica amb la MR1 de *S. oneidensis*). El fet que la seva localització plasmídica sigui truncant el gen *tir* s'ha hipotetitzat que pot haver contribuït a una major difusió del plasmidi portador del gen que codifica l'OXA-48.

Les diferents variants d'OXA-48 presenten entorns genètics diferents al d'OXA-48 (Figura 26). Però el més estès és l'entorn de la variant del Transposó Tn1999, el Tn1999.2^{260,304,306,315,322,352-356}. Aquesta variant difereix del Tn1999 en la inserció de la IS1R, dins la seqüència de la IS1999 *upstream* al gen *bla*_{OXA-48}, truncant-la, tot i augmentar la plasticitat i la taxa de transposició que té aquest transposó^{354,355,357}.

1.8.2. Els plasmidis portadors del gen *bla*_{OXA-48}.

Els gens *bla*_{OXA-48} i els seus derivats han estat descrits en plasmidis amb diferent grup d'incompatibilitat (Taula 7).

A partir de la recuperació d'una soca de *K. pneumoniae* aïllada al 2011 a Istanbul es va identificar que el plasmidi portador del gen *bla*_{OXA-48} era un plasmidi IncL/M, d'aprox. 62 Kb, amb un contingut de GC del 52%, autotransferible i que no vehiculava cap altre gen de resistència addicional. Aquest plasmidi es va anomenar pOXA-48 (Nombre d'Accés al GenBank: JN626286). Els plasmidis IncL/M són molt comuns en *Enterobacteriaceae*, i tenen una ampla gamma d'hostes a part d'enterobacteris (sent identificats en *Erwinia* spp., *Ralstonia* spp. i *Pseudomonas* spp)^{348,359,360}.

Un cop identificat i caracteritzat el plasmidi pOXA-48 es van realitzar estudis moleculars dels aïllaments aconseguits dels diferents països on havia aparegut l'OXA-48 i en tots es va identificar el pOXA-48. Això va generar la idea de que la difusió d'OXA-48 es trobava relacionada amb la propagació d'un únic plasmidi entre diferents enterobacteris.

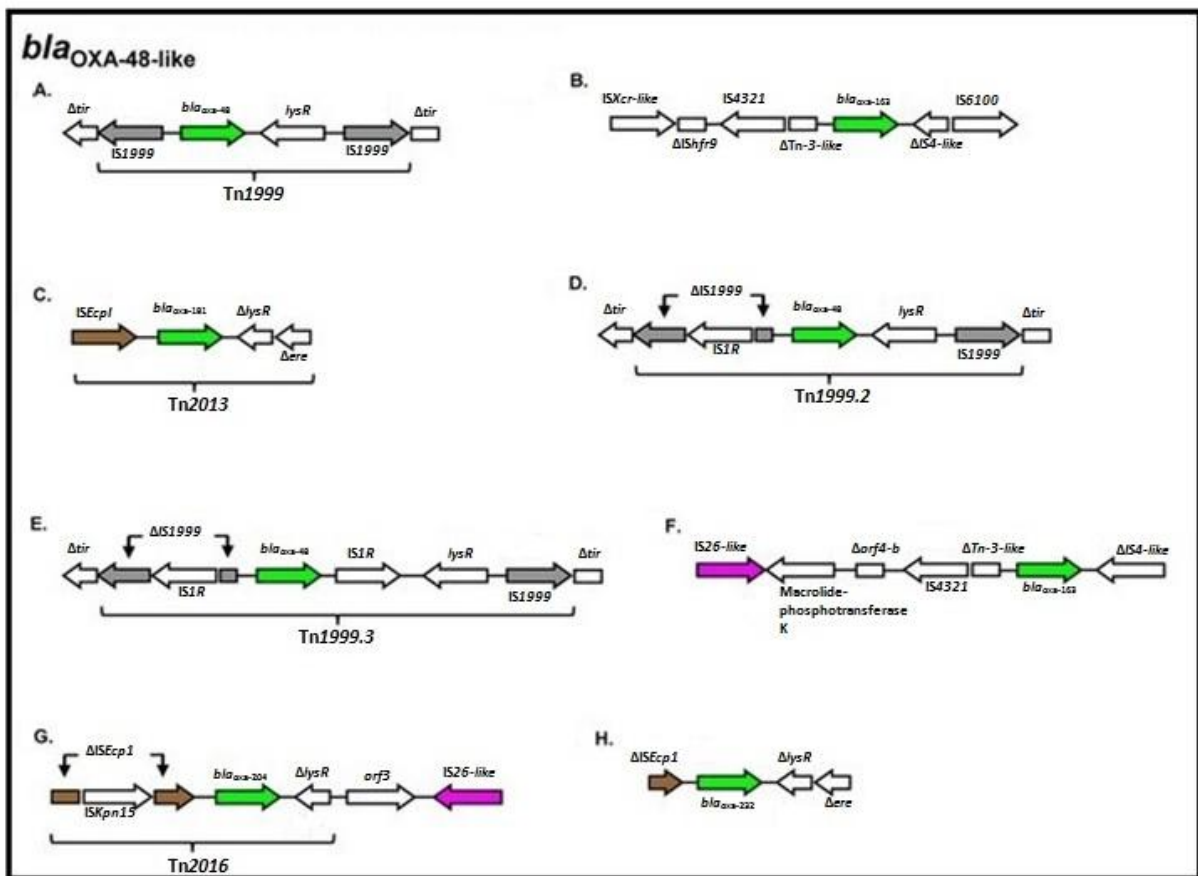


Figura 26. Esquema de diferents entorns genètics de l'OXA-48 i algunes variants²⁵⁵. El d'OXA-48 (Tn1999)³⁵⁰ (A), el d'OXA-163³³⁶ (B), el d'OXA-181 (Tn2013)³²⁹ (C), el d'OXA-48 (Tn1999.2)³⁵⁸ (D), el d'OXA-48 (Tn1999.3)³⁴⁹ (E), el d'OXA-163³³⁶ (F), el d'OXA-204 (Tn2016)³³⁹ (G) i el d'OXA-232³⁴⁰ (H).

Al 2010 es van aïllar 6 de soques d'enterobacteris (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *K. oxytoca* i *E. cloacae*) resistents a l'ertapenem en hospitals a França³⁶¹ i es va observar que totes tenien el gen *bla*_{OXA-48}. Mitjançant PCR, PFGE amb digestió per la endonucleasa S1 i posterior Southern Blot i seqüenciació es van identificar dos nous plasmidis portadors del gen *bla*_{OXA-48} (Figura 27):

-pKPoxa-48N1: és un plasmidi Incl de 62,583 pb (contingut de GC del 51,1%), bastant semblant al pCTX-M-3 (Nombre d'Accés al GenBank: NC_011641) i al pOXA-48 de *K. pneumoniae* (Nombre d'Accés al GenBank: JN626286) tant en l'organització dels gens com en la seqüència (98 i 99%). El gen *bla*_{OXA-48} és l'únic gen de resistència a antibiòtics present en pKPoxa-48N1. Les diferències significatives entre pKPoxa-48N1 i pCTX-M-3 van ser l'absència de dos elements de transposició: un transposó de tipus Tn2 que conté *bla*_{TEM-1} i *ISEcp1*, associat amb el gen *bla*_{CTX-M-3}, i la substitució de *ISEcp1-bla*_{CTX-M-3} per un transposó compost: Tn1999 (amb *bla*_{OXA-48}). En contrast amb pOXA-48, pKPoxa-48N1 conté una seqüència d'inserció: *ISIR*, inserit en la *IS1999* que es troba mes amunt (*upstream*) de *bla*_{OXA-48}, com s'observa en el transposó compost Tn1999.2.

-pKPoxa-48N2: és un plasmidi Incl de 167,194 pb (contingut de GC de 51%). La regió que conté el gen *bla*_{OXA-48} és idèntica a la del pKPoxa-48N1. No vehicula cap altre gen de resistència a antibiòtics. Quan es va descobrir es va observar que mostrava tres regions de 33,7, 35,7 i 35,2 Kb, exhibint un elevada

similitud (aprx. 98%) amb regions de mida similar del plasmidi pEC-IMP (318 kb; Nombre d'Accés al GenBank: NC_012555), que es troba en *E. cloacae*, i dos plasmidis, PC15-k (96 Kb; NC_015154) i pKP048 (151 Kb; Nombre d'Accés al GenBank: NC_014312), que es troba en *K. pneumoniae*. Les 62,2 kb de la regió que conté bla_{OXA-48} i els 33,7 Kb de la regió PEC-IMP es van inserir en la regió PC15-k com de 35,7 Kb. Així es va observar que el pKPoxa-48N2 és el resultat de múltiples reordenaments de diferents plasmidis de diferents espècies d'enterobacteris. Malgrat tot, aquest plasmidi només té el gen bla_{OXA-48} ; tot indicant que els gens de resistència que normalment alberguen els plasmidis PEC-IMP, PC15-k, i pKP048 es van perdre durant els esdeveniments que van portar a la selecció de pKPoxa-48N2. Curiosament, es va observar que en contrast amb pKPoxa-48N1, aquest plasmidi conté gens que anteriorment codificaven per el sistema de toxina-antitoxina RelE-StbE and RelB-DinJ, que es troben dins de la regió de 33,7 Kb pEC-IMP, i es creu que poden ser els responsables d'una major estabilitat de pKPoxa-48N2 en bacteris.

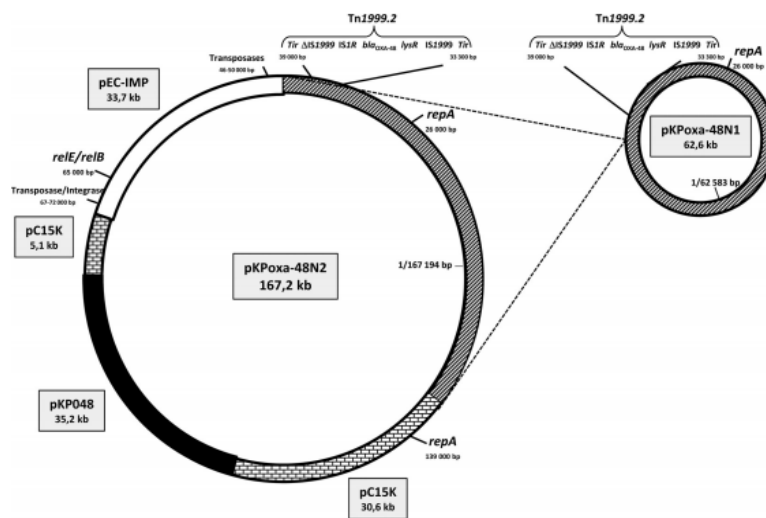


Figura 27. Representació gràfica dels plasmidis pKPoxa-48. Es pot apreciar la diferència de mida entre el pKPoxa-48N1 i el pKPoxa-48N2, deguda a pKPoxa-48N2 té parts d'altres plasmidis.

També s'han trobat altres plasmidis similars al pOXA-48, com és el cas del pJEG011 en *K. pneumoniae* a Austràlia (Nombre d'Accés al GenBank: NC_021078.1)³²⁵, el pKPN-EINr.7 (Nombre d'Accés al GenBank: KM406491)³⁵⁹, o el pE71T (Nombre d'Accés al GenBank: KC3351439)³⁵⁶ que estan en estudi.

Es van realitzar estudis *in silico* i es van comparar el pOXA-48 amb altres plasmidis IncL/M com el pNDM-HK (Nombre d'Accés al Genbank: HQ451074) o el pCTX-M-3 (Nombre d'Accès al GenBank: AF550415.2) i han obtingut que pOXA-48 té un homologia nucleotídica amb el pNDM-HK del 99% i amb el pCTX-M-3 del 97%. Una regió que difereix entre pOXA-48 i pCTX-M-3 és la que correspon al Tn1999. En el plasmidi pCTX-M-3 es va inserir el locus $ISEcp1-bla_{CTX-M-3}$ prop de la diana de Tn1999, això suggereix que aquest locus pugui ser simplement un "hot spot" per a l'integració d'ADN forani en el plasmidi IncL/M.

Una altre regió en que difereixen es situa entre el mòdul de replicació i el locus de transferència *trb*. En el plasmidi pCTX-M-3, aquesta regió (de 27 Kb) es compon d'una copia de Tn2 en la qual el transposó Tn1548 porta el gen que codifica per la metilasa *armA*, aquesta regió conté al menys 19

Els gens *excA* i *traY* codifiquen proteïnes que formen part de l'anomenat "sistema d'exclusió d'entrada" dels plasmidis conjugatius. Durant la conjugació bacteriana, es transfereix l'ADN plasmídica a una cèl·lula receptora a través del contacte de cèl·lula a cèl·lula. La transferència pot ser inhibida quan el donant i la cèl·lula receptora tenen plasmidis conjugatius estretament relacionats. La interacció de ExcA de la cèl·lula donadora amb el TraY de la cèl·lula receptora és un dels mecanismes que deteriora la conjugació i inhibeix la transferència d'ADN. Per tant, dues cèl·lules portadores de plasmidis amb diferents proteïnes ExcA i TraY han de poder conjuguar amb èxit. A més, TraX es creu que és la relaxasa del plasmidi i les seves seqüències d'ADN s'han utilitzat com marcador molecular per a la classificació plasmídica. Per tant, els plasmidis que mostren diferents gens *traX* s'han de classificar en diferents grups filogenètics.

Així, la classificació per grups d'incompatibilitat es va modificar. Donant lloc als plasmidis IncI (anteriorment esmentats com plasmidis amb diferències en aquest tres gens) i els plasmidis IncM (els plasmidis que s'havien pogut identificar per PBRT fins el moment).

1.8.3. L'epidemiologia de l'OXA-48

La primera soca de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 a Espanya, va ser identificada l'any 2009, en un estudi realitzat al Hospital Clínic de Barcelona per Cristina Pitart *et al.*³⁰⁸ d'un brot, comprés en dues parts entre l'abril del 2009 i el setembre de 2010, amb 20 afectats, un dels quals era portador i on el primer afectat procedia del Marroc. Totes les soques d'aquest brot pertanyien a la seqüència tipus ST101. Totes coexpressaven la betalactamasa d'espectre ampliat CTX-M-15 i totes tenien el gen *bla*_{OXA-48} localitzat en el Tn1999.2. La mortalitat va ser del 20%, l'origen de l'infecció predominant era del tracte urinari (45%) i el tractament era combinat (90%) on el antibiòtics més administrats van ser la tigeciclina (75%), l'amicacina (45%) i la fosfomicina (40%). Posteriorment, de l'abril del 2010 al desembre del 2011, a l'Hospital Universitario La Paz de Madrid es va realitzar un estudi de les soques aïllades de *K. pneumoniae* que eren portadores de la carbapenemasa OXA-48³⁰³, es van aïllar 173 soques en 70 pacients, nou dels quals eren portadors, es a dir, hi van haver 61 pacients infectats per soques de *K. pneumoniae* portadores d'OXA-48. Es van identificar vuit clons, dels quals el clon majoritari causant d'un 73% de les infeccions era el del ST405, clon que coexpressava altres gens de betalactamases: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-76} i *bla*_{CTX-M-15}, i l'entorn del gen *bla*_{OXA-48} era el Tn1999. Dels 61 pacients infectats, el 56,3% eren homes amb edat mitja de 74 anys i el 35,5% de les infeccions eren del tracte urinari (ITU). La mortalitat va ser del 43,5%. Els antibiòtics més actius enfront aquestes soques van ser: l'amicacina (on un 97,2% de les soques eren sensibles), colistina (on un 90,1% de les soques eren sensibles), tigeciclina (on un 73% de les soques eren sensibles) i la fosfomicina (on un 66,2% de les soques eren sensibles). Del gener del 2001 al maig del 2012 es van aïllar en 10 hospitals estatals 151 soques de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa OXA-48³²¹, de les quals es van seleccionar 21 soques representatives de diferents brots i infeccions en aquests hospitals. D'aquestes soques, 19 soques (90,5%) eren portadores del gen *bla*_{OXA-48}, una soca (4,7%) era portadora del gen *bla*_{OXA-244} i un altre soca (4,7%) del gen *bla*_{OXA-245}. Totes elles coexpressaven la betalactamasa d'espectre ampliat CTX-M-15. A part d'aquest gen es van detectar altres gens de resistència en els aïllats: *bla*_{OXA-1} (85,7%), *aac(3)-IIa* (85,7%), *bla*_{TEM-1} (61,9%), *aac(6')-Ib-cr* (61,9%), *qnrB* (61,9%); *dfrA14* (52,4%); *sul1*(23,8%), *dfrA12* (23,8%) i *bla*_{CMY-like} (4,8%). Es van identificar sis clons: set soques (33,3%) pertanyien al ST405, cinc soques (23,8%) pertanyien al ST663 (una variant del ST405), quatre soques (19%) pertanyien al ST16, tres soques (14,21%)

pertanyien al ST11, una soca (4,7%) pertanyia al ST437 i una altre soca (4,7%) al ST392, aquestes darreres dos soques eren les portadores dels gens *bla*_{OXA-244} i *bla*_{OXA-245}. Totes les soques, exceptuant les soques portadores dels *bla*_{OXA-244} i *bla*_{OXA-245}, que el tenien localitzats en el Tn1999, tenien el gen *bla*_{OXA-48} localitzant en un Tn1999.2. De les 21 soques seleccionades el 57,7% provenia de mostra urinaria, el 57,1% dels afectats eren dones i eren majors de 50 anys, exceptuant 14 afectats que eren majors de 64 anys. El 71,4% de les soques eren sensibles a la fosfomicina, un 85,7% a l'amicacina, un 90,5% a la tigeciclina i totes eren sensibles a la colistina. A Madrid en un hospital terciari entre els anys 2009 i 2014 es va identificar 58 soques productores de l'OXA-48 de 97 soques productores de carbapenemes. Pertanyien als ST11 (75%), ST15, ST405 i ST14. Eren soques sensibles a l'amicacina i la colistina. Les soques del ST11 es van considerar un brot. El 53,4% dels afectats eren homes, amb una mitja de 68 anys. El gen *bla*_{OXA-48} es va localitzar en un plasmidi IncL/M, en l'interior del Tn1999.2³⁶².

Fora d'Espanya, l'OXA-48 va ser identificat per primera cop l'any 2001 en una soca de *K. pneumoniae* al *Istanbul Faculty Hospital* de Turquia en un home de 54 anys afectat per una ITU, que havia rebut tractament previ amb meropenem i vancomicina. La soca pertanyia del ST14 i només era sensible a la ciprofloxacina, a més el gen *bla*_{OXA-48} es va identificar en un plasmidi IncL/M de 62 Kb i en l'interior del Tn1999²⁹⁹. Des de llavors, els bacteris que produeixen aquesta betalactamasa han estat causes importants de brots nosocomials en aquest país, i generant que actualment rebi la denominació de ser una betalactamasa endèmica en aquesta regió³⁶³.

El primer informe *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 fora de Turquia va ser a l'any 2007 a Bèlgica, en un pacient de 37 anys tractat per un limfoma al Hospital de St.Luc de Brussel·les. Inicialment no se'l va tractar per la *K. pneumoniae* fins que va desenvolupar una infecció sistèmica per aquest microorganisme, la soca en qüestió era sensible a les cefalosporines de tercera generació, als carbapenèmics (excepte l'ertapenem) i a la tigeciclina; i es desconeixia la seva ST. El gen *bla*_{OXA-48} es localitzava en el mateix plasmidi (IncL/M de ≈70 Kb) i el mateix transposó (Tn1999) que la soca aïllada a Turquia al 2001³⁶⁴. Posteriorment, en el mateix país, es va realitzar un estudi entre els anys 2010 i 2011 on van participar nou centres hospitalaris i només en quatre es van aïllar soques de *K. pneumoniae* productores de l'OXA-48. En total set soques aïllades, que pertanyien a diferents ST: ST17 (14,2%), ST392 (14,2%), ST405 (57,1%), excepte una que no es va determinar. El 85,7% de les soques eren sensibles al imipenem i al meropenem. Es van aïllar de set pacients, on el 71% eren homes amb una edat mitja de 65 anys, on el 42,8% de les soques eren d'origen nosocomial, i un 28,5% era comunitari. Aquestes soques tenien altres betalactamases associades: TEM-1 (85,7%), CTX-M-15 (85,7%), SHV-11 (42,85%) i SHV-76 (57,1%). El tractament que van rebre els afectats va ser: carbapenèmics combinats amb altres antibiòtics: amicacina o tigeciclina (28,5%), ciprofloxacina amb amicacina (14,2%), levofloxacina (14,2%) i nitrofurantoina (14,2%)³¹⁹.

A partir de l'aparició a Bèlgica, els casos esporàdics d'infeccions o causants de brots de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 van anar apareixent i es van detectar en diferents països europeus, sobretot propers al Mediterrani i a l'Àfrica, i posteriorment es va anar difonent a Amèrica i a Àsia.

A nivell europeu (Figura 29) des de l'aparició dels primers casos a Bèlgica a l'any 2007³⁶⁴, van anar apareixent nous casos a altres països europeus. Al Regne Unit es van fer dos estudis compresos entre

els anys 2007 i 2011^{304,320}. En els primer estudi, realitzat entre els anys 2007 i 2011, es va identificar 13 soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48, de diferents ST: ST143 (1 soca), ST353 (1 soca), ST432 (1 soca), ST101 (3 soques), ST383 (1 soca), ST14 (1 soca), ST858 (1 soca), ST17 (1 soca), ST152 (1 soca), ST37 (1 soca) i ST376 (1 soca). El 84,6% de les soques eren sensibles a la tigeciclina i 38,4% a la gentamicina. Aquestes soques tenien altres betalactamases associades: TEM-1 (61,53%), CTX-M-1 (61,53%), CTX-M-9 (7,7%), SHV-tipus (100%), OXA-1 (61,53%), OXA-9 (7,7%). El gen *bla*_{OXA-48} es va localitzar en 12 soques (92,3%) en un plasmidi IncL/M de 62 Kb i en una soca (7,7%) en un plasmidi IncL/M de 140 Kb: Pel que fa a l'entorn genètic de *bla*_{OXA-48} es va veure que 11 soques (84,65%) tenien el Tn1999.2 i dues soques (15,38%) el Tn1999. En l'altre estudi, realitzat entre el 2008 i el 2010, es van identificar 13 soques, nou soques (69,23%) de les quals eren de la ST353 i eren sensibles a l'amicacina, la gentamicina i la ceftazidima i eren portadores de altres betalactamases associades: TEM i SHV. Les altres dues soques (15,38%) eren de la ST15, eren sensibles a la gentamicina i a l'amicacina i eren portadores de les betalactamases OXA i CTX-M. Totes les soques tenien el gen *bla*_{OXA-48} en un plasmidi IncL/M de 62 Kb i en el Tn1999.

A Alemanya es va realitzar un estudi entre els anys 2008 i 2010, on van participar cinc centres hospitalaris, on només es van aïllar quatre soques en dos hospitals, tres d'aquestes soques es van caracteritzar com a brot en un dels centres i l'altre soca era un cas esporàdic. Totes aquestes soques tenien altres betalactamases associades: TEM-1, CTX-M-15, OXA-9, SHV-11. El gen *bla*_{OXA-48} es va localitzar en un plasmidi IncL/M de 62 Kb i en el Tn1999³⁶⁵.

A Finlàndia es va realitzar un estudi entre els anys 2008 i 2011, on es van aïllar dues soques de dos ST diferents: ST13 i ST15 al 2011. Totes eren sensibles al meropenem i a l'imipenem. Només la soca del ST15 tenia a més de l'OXA-48 la betalactamasa TEM-1. Els afectats eren homes de 87 i 40 anys, un dels quals havia estat recentment a Tailàndia, l'altre era un portador fecal³⁶⁶.

A França hi va haver un brot a l'any 2010 en l'UCI del Villeneuve-Saint-Georges Hospital, on es van aïllar 17 soques de 10 pacients, dels quals cinc rebien tractament amb carbapenèmics (4 d'ells amb combinació amb colistina o amicacina) i un rebia tractament combinat: ceftazidima, colistina i ciprofloxacina. Totes aquestes soques eren de la ST395 i totes eren sensibles al meropenem, doripenem, colistina, tigeciclina i amicacina. El gen *bla*_{OXA-48} es va localitzar en un plasmidi de 70 Kb³⁰⁵.

A Holanda es va realitzar un estudi entre els anys 2009 i 2011, on es van identificar 99 pacients amb soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 on es van aïllar 64 soques que a més eren portadores de la betalactamasa CTX-M-15 i 52 soques que només tenien l'OXA-48. De les 64 soques que a més eren portadores de la betalactamasa CTX-M-15, el 95% eren sensibles a l'amicacina. Les 52 soques restants eren sensibles a l'amicacina (98%), gentamicina (87%) i cefotaxima (90%)³²⁶. Al març de l'any 2010 a Amsterdam es va identificar un cas esporàdic d'un pacient de 63 anys que havia estat transferit des d'un hospital de Nova Delhi (Índia). La soca que es va aïllar era sensible a la tigeciclina i a la colistina, i a part de l'OXA-48 era portadora de la betalactamasa CTX-M-15³¹⁷.

A Romania es va realitzar un estudi entre els anys 2010 i 2012 en el Targus Muses Hospital, i es van aïllar tres soques productores de l'OXA-48 i de la CTX-M-15 de la ST101, totes eren sensibles a la colistina i a l'amicacina³¹⁶.

A Eslovènia, al novembre de l'any 2011, es va aïllar una soca d'un pacient procedent del Líban, que era sensible a l'amicacina, cotrimoxazol i a la colistina³¹³.

A Itàlia es va identificar un cas esporàdic al setembre de l'any 2011, en un pacient de 33 anys procedent del Líban. La soca que es va aïllar era de la ST101, sensible a la tigeciclina. Les betalactamases associades a l'OXA-48 eren l'OXA-1, TEM-1 i SHV-11. El gen *bla*_{OXA-48} es localitzà en un plasmidi IncL/M i en el Tn1999.2³¹⁵.

A Grècia, entre l'any 2011 i el 2012, es va descriure un brot de 13 soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48, CTX-M-15 i OXA-1, es van aïllar en nou pacients majoritàriament dones (55,5%) i una edat mitja de 67 anys, i havien rebut tractament combinat d'imipenem amb tigeciclina i colistina (33,3%), tigeciclina (11,1%), amicacina (11,1%) i amicacina amb tigeciclina (11,1%). Les soques pertanyien a la ST11 i eren sensibles a la tigeciclina, colistina i amicacina. El gen *bla*_{OXA-48} es localitzava en un plasmidi IncL/M i en el Tn1999³²³.

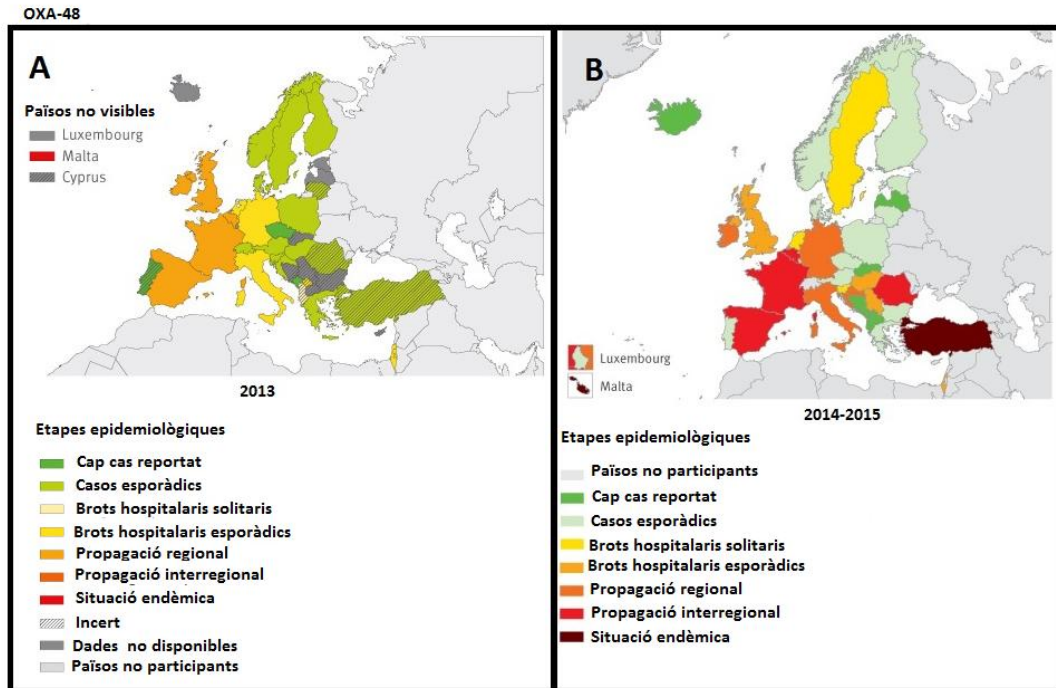
A Irlanda es va descriure cinc soques entre març i juny del 2011 en un hospital terciari de referència, aïllades de cinc pacients on únicament tres havien rebut tractament amb gentamicina amb piperacilina/tazobactam, piperacilina/tazobactam i tigeciclina. Aquestes cinc soques eren sensibles a la colistina (100%), tigeciclina (60%), amicacina (40%) i ciprofloxacina (20%)³⁶⁷. Posteriorment en un estudi realitzat entre els anys 2011 i 2012 en el *St. Vincent's University Hospital*, es va identificar 16 soques en *K. pneumoniae*, on el 100% eren sensibles a la colistina, l'amicacina i la gentamicina, 75% eren sensibles a la fosfomicina, 62,5% eren sensibles a la tigeciclina i 18,7% eren sensibles al trimetoprim. D'aquestes soques el 25% pertanyien a la ST13 i el 75% a la ST221³⁰⁹.

A Suïssa es va identificar una soca de aïllada d'un pacient de 54 anys al desembre del 2013 que s'havia transferit d'un hospital de Belgrat al *Bern University Hospital*. La soca era sensible a la colistina, tigeciclina i a la fosfomicina. Era portadora de les betalactamases CTX-M-15 i CMY-16. El gen *bla*_{OXA-48} es localitzava en un plasmidi IncL/M en l'interior del Tn1999.2³⁶⁸.

Des d'un punt de vista mundial, excloent Europa, des de l'aparició a Turquia al 2007 es van anar documentant casos de soques portadores d'OXA-48.

A Senegal entre els anys 2008 i 2009 es van identificar 8 soques³⁶⁹. A Egipte entre els anys 2009 i 2010 es va aïllar una soca en el Hospital del Cairo, d'un pacient malalt de càncer. Era una soca sensible al meropenem i el gen *bla*_{OXA-48} es trobava en un plasmidi IncL/M de 62 Kb, en l'interior del Tn1999.2³⁷⁰.

A Tunísia, entre els anys 2009 i els 2010, de 153 soques de *K. pneumoniae*, es van identificar 21 soques productores de l'OXA-48. Aquestes soques pertanyien a quatre clons identificats per PFGE. Aquestes soques tenien altres betalactamases associades: CTX-M-14 i CMY-4 (66,6%), CTX-M-14, CMY-4, TEM-1 (19%), CTX-M-14 i OXA-1 (4,76%), CTX-M-15 i CMY-4 (4,76%). El gen *bla*_{OXA-48} es trobava en un plasmidi IncA/C de 70 Kb, en l'interior del Tn1999. Posteriorment, a l'any 2012, es va aïllar una soca d'un pacient de 73 anys procedent del Líban. La soca pertanyia a la ST11 i era sensible a la gentamicina, l'amicacina, la netilmicina, la fosfomicina, la colistina i la tigeciclina. Aquesta soca a més era portadora d'una altre carbapenemasa, la NDM-1. El gen *bla*_{OXA-48} es trobava vehiculat en plasmidi IncL/M i el gen *bla*_{NDM-1} en un IncN^{371,372}.



<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20525>

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21300>

Figura 29. Representació de la progressió a Europa dels enterobacteris productors de la carbapenemasa OXA-48 al 2013(A) i entre el 2014 i el 2015 (B) Observem la progressió cap la zona Nord d'Europa, com la situació endèmica a Turquia (país d'origen) i l'augment en països com és el cas d'Espanya, França.

Al Sultanat d'Oman entre els anys 2010 i 2011 es va identificar dues soques, de les ST753 i ST754, que a més tenien altres betalactamases associades, en el cas de la soca de la ST753 la TEM-1, i en el cas de la ST754 la TEM-1, OXA-1 i CTX-M-14. El gen *bla*_{OXA-48} es trobava en un plasmidi IncL/M de 62 Kb, en l'interior del Tn1999³²⁸.

A Kuwait es va identificar una soca a l'any 2011, era una soca pertanyent a la ST743 i sensible a les cefalosporines d'espectre ampliat, a les quinolones i als aminoglicòsids. La soca a més tenia la betalactamasa SHV-28 associada. El gen *bla*_{OXA-48} es trobava en un plasmidi IncL/M de 62 Kb, en l'interior del Tn1999³⁷³.

A Algèria es va aïllar una soca d'un pacient de 18 mesos d'edat amb leucèmia. La soca pertanyia a la ST307 i era sensible al cotrimoxazol, als aminoglicòsids, el cloranfenicol, la colistina i la tigeciclina. El plasmidi que vehiculava el gen *bla*_{OXA-48} era d'una mida de 70 Kb. Posteriorment, al any 2014, es va declarar un brot a l'UCI del *University Hospital Benahib* a Constantin (Algèria); on es van veure afectats tres pacients. La soca que es va aïllar dels pacients era de la ST1853 (una *Single Locus Variant* (SLV) de la ST13) i tenia altres betalactamases associades: CTX-M-15 i SHV-11. El gen *bla*_{OXA-48} es va situar en un plasmidi IncL/M de 62 Kb. El tractament rebut va variar un cop es va identificar aquesta soca, inicialment era amb imipenem (en 2 dels pacients) i posteriorment es va canviar per un tractament combinat d'amicacina amb colistina^{374,375}.

Al Marroc, concretament al *Ibu Roch University Hospital* de Casablanca, a l'any 2011, de 166 soques de *K. pneumoniae* es van identificar nou que eren productores de l'OXA-48. Els aïllats, pertanyien a quatre clons diferents i tenien altres betalactamases associades: CTX-M-15(77,7%), TEM-1(77,7%),

SHV-1(88,8%), OXA-1(55,5%) i SHV-28(11,1%). El gen *bla*_{OXA-48} es trobava en un plasmidi IncL/M de 62 Kb, en l'interior del Tn1999. Posteriorment a l'any 2012 es va identificar en un cas esporàdic, un pacient de 49 anys. Era una soca sensible a l'amicacina, la colistina i la fosfomicina. Aquesta soca era portadora de 3 carbapenemes: OXA-48, NDM-1 i VIM-1. I a més tenia altres betalactamases associades: CTX-M-15, TEM-1, SHV-1 i OXA-1^{376,377}.

A l'Arabia Saudi (Riyah), a l'any 2011, es van identificar 47 soques productores de l'OXA-48. El 25% eren colonitzacions (origen rectal). El 95,7% eren sensibles a l'amicacina, el 70,2% al cotrimoxazol i el 68% a la gentamicina. A més tenien altres betalactamases associades: CTX-M-15(63,8%), TEM-1(34%) i SHV-tipus(68%)³⁷⁸.

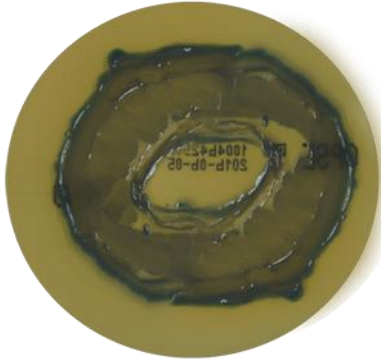
A Sud-Àfrica (Johannesbrug), entre els anys 2011 i 2012, es van identificar quatre soques en quatre pacients, 50% homes i amb una edat mitja de 33 anys. El primer cas procedia d'Egipte. El 50% rebien tractament antibiòtic combinat: colistina amb un altre antibiòtic (meropenem o tigeciclina). A més tenien altres betalactamases associades: CTX-M-15(100%), TEM-1(75%) i SHV-1 (100%)³⁷⁹.

Als EUA es va identificar el primer cas a l'any 2012, en una dona de 55 anys que havia estat transferida des de un hospital de Riyadh (Aràbia Saudi) amb cirrosi i hepatitis C. La soca pertanyia a la ST199, i tenia altres betalactamases associades: CTX-M-9, TEM i SHV-tipus. El gen *bla*_{OXA-48} es va localitzar en un plasmidi IncL/M³⁸⁰.

Al Japó es va identificar a l'any 2012 en un pacient provinent del Sudest asiàtic de 60 anys. A més tenia una altra betalactamasa associada: CTX-M-1³⁸¹.

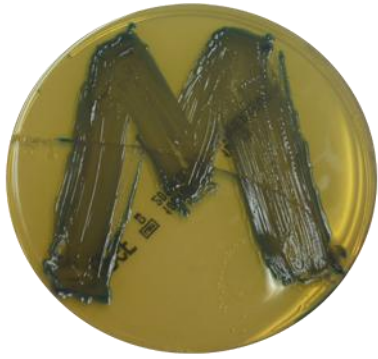
A Israel (Jerusalem) a l'any 2012 es van proclamar un brot en l'UCI de neonats del *Makassed Hospital* i es van aïllar 29 soques. Pertanyien a la ST39 i tenien altres betalactamases associades: CTX-M-15, TEM-1 i SHV-1. El gen *bla*_{OXA-48} es va localitzar en un plasmidi IncL/M³⁸².

Així doncs podem observar com de manera progressiva des de l'any 2001 la carbapenemasa OXA-48, especialment produïda per la *K. pneumoniae* ha anat difont-se i extenent-se per tot el món.



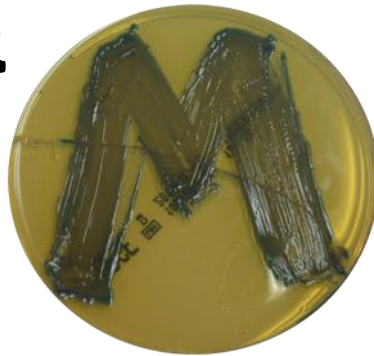
OBJECTIUS

- Determinar el percentatge de soques de *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 en 12 hospitals de Catalunya.
- Descriure l'epidemiologia i filogènia de les soques de *Klebsiella pneumoniae* productora d'OXA-48 a Catalunya.
- Determinar els elements genètics mòbils implicats en la possible difusió de la betalactamasa OXA-48 i les betalactamases associades a aquesta carbapenemasa.
- Determinar els mecanismes de resistència a quinolones i aminoglicòsids presents en les soques de *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48.
- Avaluat la presència d'altres mecanismes de resistència que expliquin les diferències en la sensibilitat als betalactàmics en soques portadores dels mateixos gens *bla*.
- Avaluat l'ús de la seqüenciació massiva en la caracterització de soques multiresistents tan a nivell epidemiològic com de mecanismes de resistència.



ATERIAL

&



ÈTODES

3.1 Característiques de l'estudi

Els protocols i mètodes utilitzats en aquest estudi estan detallats en els annexos. En aquest apartat he volgut redactar el quan i el perquè he utilitzat aquests mètodes.

Per a realitzar aquest estudi es va comptar amb la col·laboració de 12 hospitals de Catalunya que atenen una població global de 5.000.000 d'habitants. Cada centre participant va seleccionar les soques de *K. pneumoniae*. Les soques seleccionades havien de presentar un patró de sensibilitat als antibiòtics betalactàmics diferent al natural per poder estar segurs que incloïem totes les soques portadores de la betalactamasa OXA-48, objectiu d'estudi del present treball (Figura 30). A les soques seleccionades se'ls hi va realitzar el Test de Hodge modificat (THM) per poder evidenciar la presència de qualsevol enzim amb activitat enfront els carbapenèmics. Aquelles soques amb el resultat del THM positiu o positiu feble, es va determinar la presència del gen *bla*_{OXA-48} mitjançant PCR. La col·lecció de soques es va arxivar a -20 °C i a -80 °C per als posteriors estudis.

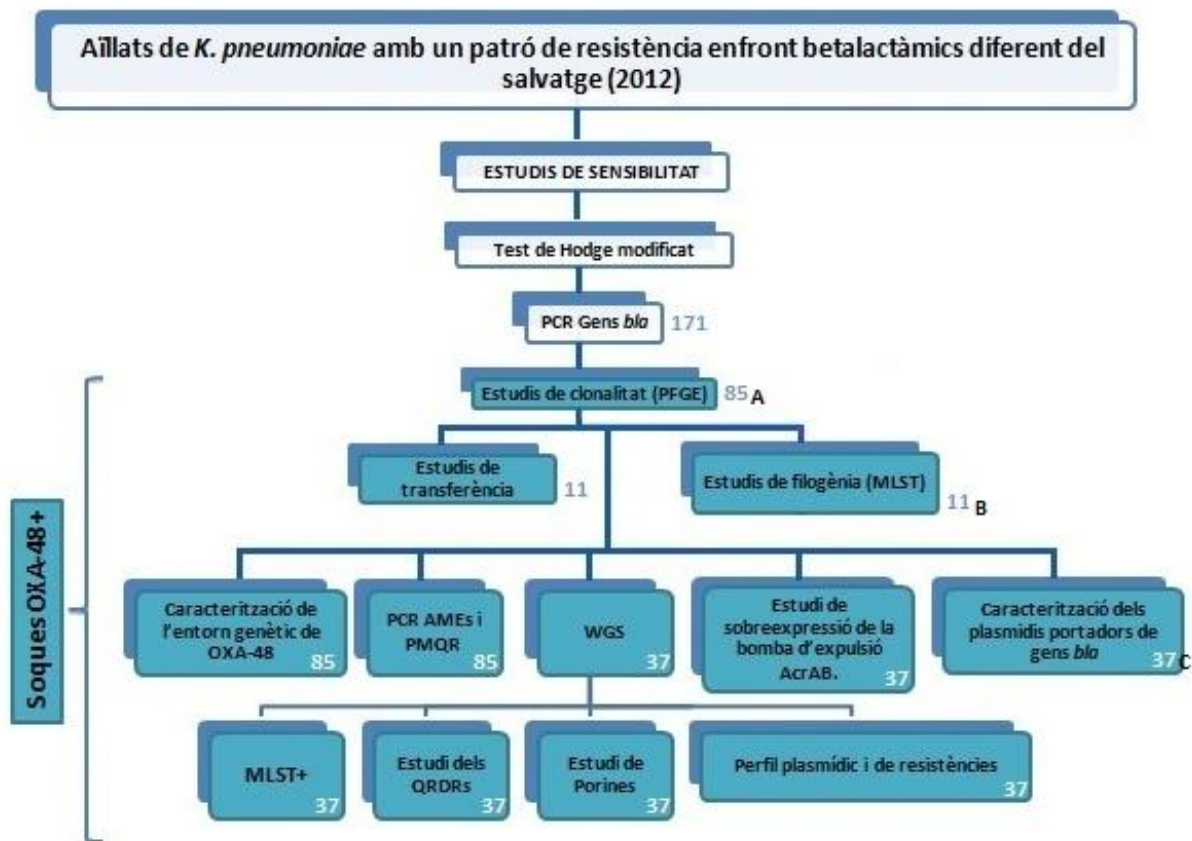


Figura 30. Esquema dels procediments realitzats en el nostre estudi. Soques productores de la carbapenemasa OXA-48 (A), Soques seleccionades en funció del pulsotip i subtipus observats en el PFGE (B), Soques seleccionades en funció del subtipus i del patró de sensibilitat (C).

Posteriorment es va procedir a realitzar, en les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48, estudis epidemiològics i filogenètics, mitjançant PFGE, MLST i MLST+, per tal de descriure la possible difusió d'un clona. També, es van caracteritzar els diferents mecanismes de resistència a d'altres famílies d'antimicrobians no betalactàmics, com els aminoglicòsids i les quinolones, donat que en general les soques productores d'OXA-48 presenten multiresistència a diferents antimicrobians.

Per altra banda, s'han estudiat els elements genètics responsables de la possible difusió horitzontal del gen de l'OXA-48 en *K. pneumoniae*, caracteritzant-se els plasmidis responsables de la difusió del gen *bla*_{OXA-48}, així com el seu entorn.

3.2. Àmbit de l'estudi

Tal com s'ha comentat, per a realitzar aquest estudi es va comptar amb la col·laboració d'11 hospitals Comarcals de Catalunya: Hospital Municipal de Badalona (HMB), Hospital de Barcelona (HB), Hospital de Calella (HC), Hospital General de Granollers (HGG), Hospital General de Catalunya a Sant Cugat del Vallès (HGC), Hospital General de L'Hospitalet (HGH), Hospital Sant Joan de Déu a Manresa (HSJDD), Hospital de Martorell (HMML), Hospital de Mataró (HM), Hospital General de Vic (HGV) i l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus (HUSJR).

La població que atenen aquests 11 hospitals, més la que atén l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, sumen aproximadament 5.000.000 d'habitants. Cadascun d'aquests centres es va encarregar de la recollida de les soques així com de les dades clínico-epidemiològiques dels pacients. Les soques de *K. pneumoniae* que s'inclogueren a l'estudi foren aquelles que presentaren un fenotip de sensibilitat als betalactàmics diferent al natural o salvatge. És a dir, es varen incloure totes les soques que presentaren resistència a d'altres betalactàmics a més de l'ampicil·lina. La recollida de les soques es va realitzar de gener a desembre del 2012.

3.3. Identificació dels aïllats clínics de *Klebsiella pneumoniae*

La identificació bacteriana es va realitzar a cadascun dels diferents laboratoris participants mitjançant proves metabòliques (manual i/o comercialitzada i automatitzada).

A les proves manuals es van testar les següents característiques fisico-químiques: fermentació de la glucosa (amb o sense producció de gas), fermentació de la lactosa, producció d'àcid sulfhídric, test de Voges-Proskauer, creixement en citrat de Simmons, producció de DNasa, ús de la descarboxilasa (lisina i ornitina), producció d'indol a partir del triptòfan i producció de fenilalanina desaminasa. Per a la realització i interpretació d'aquestes proves es va seguir la metodologia prèviament descrita³.

Els sistemes comercialitzats comptaven amb el seu suport informàtic que permet una lectura automatitzada. Els que es van utilitzar van ser el Vitek 2 (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Montana; EEUU) i el MicroScan (Dade Behring MicroScan, West Sacramento, CA, EEUU).

3.4. Estudis de sensibilitat als antimicrobians

Els estudis de sensibilitat es van realitzar en dues fases. En la primera fase s'avaluaren les dades de sensibilitat als betalactàmics. Es feu a totes les soques aïllades durant el període d'estudi i s'inclogué dins la rutina de cada laboratori. Els diferents hospitals comarcals ho feren mitjançant els dos mètodes automatitzats citats anteriorment, mentre que a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) utilitzarem el mètode de disc-difusió amb lectura automatitzada pel sistema SirScan (i2a, Perols Cedex, France).

La segona fase, es feu només en les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 per tal d'estudiar la resistència a les altres famílies d'antimicrobians no betalactàmics. En aquesta fase s'utilitzà només la tècnica de disc-difusió.

El mètode de disc-difusió es realitzà seguint el protocol descrit pel CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) en plaques d'agar Mueller Hinton (bioMérieux España S.A., Madrid, Espanya)^{272,273} i amb pastilles d'antimicrobians Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica S/A, Taastrup, Denmark). S'estudià la sensibilitat als següents antimicrobians: ampicil·lina (10 µg), piperacil·lina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), amoxicil·lina-àcid clavulànic (20+10 µg), piperacil·lina-tazobactam (100+10 µg), àcid nalidíxic (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), sulfonamides (240 µg), trimetoprim (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25+23,75 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), tobramicina (10 µg), amicacina (30 µg), netilmicina (10 µg), neomicina (10 µg) i estreptomicina (10 µg). Transcorregudes entre 18 i 24 hores d'incubació a 37 °C es van llegir pel mètode automatitzat i es varen interpretar els halos d'inhibició seguint els criteris del CLSI^{272,273}, excepte per a la neomicina on no hi ha establert cap punt de tall estandarditzat.

3.5. Test de Hodge modificat

Els aïllats de *K. pneumoniae* amb un fenotip de sensibilitat als betalactàmics diferent al natural o salvatge se'ls hi feu el **Test de Hodge modificat** seguint el protocol del *Center of disease control and prevention*³⁸³ (Annex II).

Amb aquest test es posa en evidència la producció de carbapenemases que hidrolitzen l'antibiòtic carbapenèmic, al permetre el creixement de la soca indicadora d'*E. coli* sensible als carbapenèmics (Figura 31).

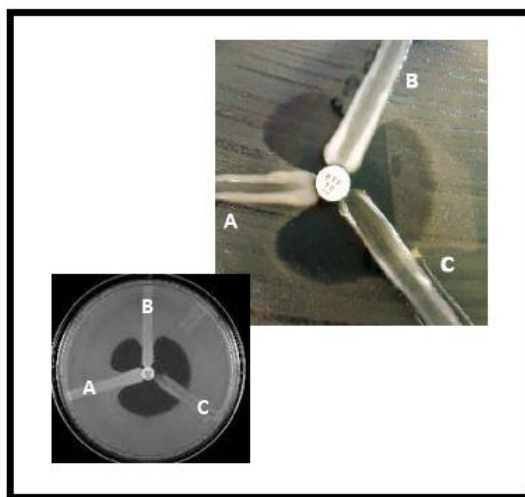


Figura 31. Test de Hodge modificat. Control positiu, *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 productora de la carbapenemasa KPC (A), Aïllat clínic amb resultat positiu (B) i Control negatiu, *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706 (C).

3.6. Amplificació (PCR) i seqüenciació dels gens de resistència

El protocol i detall de la tècnica es pot trobar en l'annex III.

En el total de soques positives pel THM es determinà per PCR:

- La presència de la carbapenemasa OXA-48. En aquelles soques que no amplificaren per a *bla*_{OXA-48} es descartà la presència d'altres carbapenemases conegudes: *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SME}, *bla*_{NMC}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMI}, i *bla*_{GES}.

- La presència de les següents betalactamases per explicar tant el patró de resistència a betalactàmics observat, com per explicar quins enzims donaven un fals positiu en el THM:

- Betalactamases d'ampli espectre i d'espectre ampliat (BLEA): *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}.
- Betalactamases tipus AmpC: *bla*_{ACC}, *bla*_{CIT}, *bla*_{DHA}, *bla*_{EBC}, *bla*_{FOX}, i *bla*_{MOX}.

En el total de soques portadores de *bla*_{OXA-48} es va estudiar per PCR:

- Els determinants plasmídics de resistència a quinolones (PMQR): *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* i *qepA*.
- Gens de resistència a aminoglicòsids: *ant(2')-Ia*, *aac(3')-IIa*, *aac(6')-IId*, *aac(3')-IVa*, *aac(2')-Ia*, *aac(3')-Ia*, *aac(3')-Ib*, *ant(4'')-IIa*, *aac(6')-Ia*, *aac(6')-Ib* i *aac(6')-Ic*.

3.7. Recollida de dades clíniques

Un cop havíem detectat la presència de la carbapenemasa OXA-48 en una soca, l'hospital on s'havia aïllat la soca productora s'encarregà de recollir les següents dades epidemiològiques: centre hospitalari, identificació de la soca, data d'aïllament, sexe del pacient, edat del pacient, tipus de mostra, diagnòstic, tractament previ i tractament específic per a la infecció per a *K. pneumoniae*.

El present estudi va ser avaluat pel Comitè d'Investigació Clínica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IIBSP-OXA-2013-1).

3.8. Electroforesi en gels de camp polsant (PFGE)

La tècnica utilitzada per a estudiar la relació epidemiològica a nivell molecular entre les 85 soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 va ser la macroresticció genòmica i separació de fragments per electroforesi en gel de camp pulsant (*Pulsed field gel electrophoresis*: PFGE).

La metodologia emprada està detallada a l'annex IV i representada esquemàticament a la figura 32.

Aquesta tècnica permet establir relacions epidemiològiques entre els aïllats i d'aquesta manera poder determinar si procedeixen d'un ancestre comú o no^{233,303,384,385}. Per a determinar la relació epidemiològica entre soques s'utilitzen els criteris definits per Tenover *et al.* (1995)³⁸⁵. Aquests criteris permeten distingir quatre categories a partir del nombre de diferències de fragments comparant amb la soca del brot: idèntiques (cap diferència); estretament relacionades (de 2 a 3 diferències); possiblement relacionades (de 4 a 6 diferències) i no relacionades (7 o més diferències).

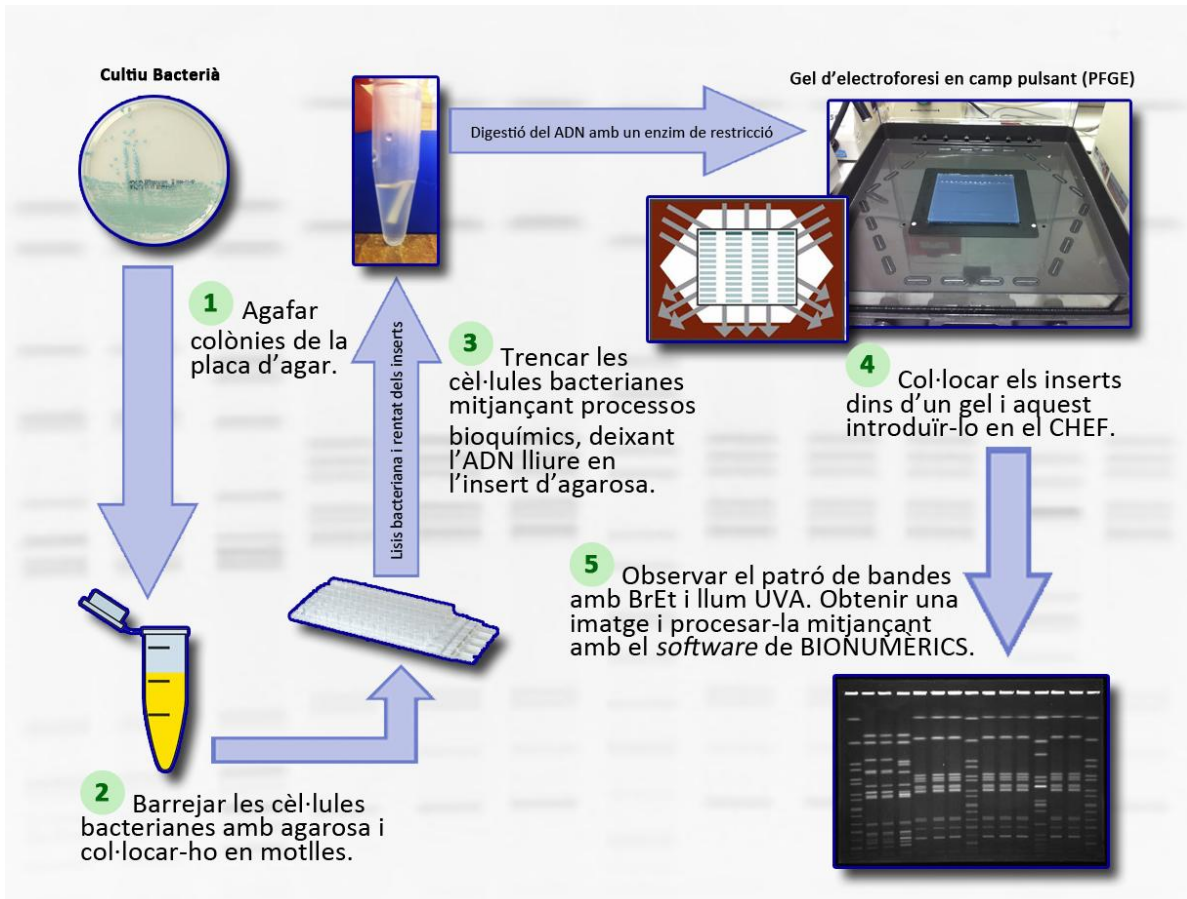


Figura 32. Esquema del protocol de PFGE amb digestió amb l'enzim de restricció *XbaI*.

La comparació dels patrons de bandes es va realitzar mitjançant el software BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bèlgica). La relació es va calcular mitjançant el mètode UPGMA, on la semblança entre bandes es va determinar utilitzant el coeficient de Dice (S_D) amb un valor d'optimització del 2% i un de tolerància de l'1%.

3.9. MultiLocus Sequence Typing (MLST)

L'anàlisi filogenètica es va realitzar per la tècnica del MLST (*MultiLocus Sequence Typing*)^{386,387}. Aquesta tècnica, en el cas de *K. pneumoniae*, es basa en l'estudi de les regions internes de 7 gens conservats (*housekeeping*): *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* i *tonB*^{386,387}. El protocol de la tècnica i l'obtenció de la seqüència tipus (ST) estan accessibles a la web de MLST de l'Institut Pasteur a Paris, França (<http://bigsdbs.web.pasteur.fr/Klebsiella/Klebsiella.html>). La tècnica del MLST consta d'una amplificació per PCR (iniciadors establerts per la base de dades del MLST) per amplificar la regió interna de cada un dels 7 gens *housekeeping*. Posteriorment es purifiquen els amplificats, es quantifica el DNA purificat, i es seqüència. Les seqüències obtingudes s'introdueixen a la base de dades citada en el paràgraf anterior, des d'on et defineixen el número de seqüència tipus (ST) obtingut.

Els iniciadors utilitzats, les condicions d'amplificació es detallen en l'annex III. Per a la seqüenciació dels productes de PCR, es realitza utilitzant els mateixos iniciadors que per a la PCR de MLST, excepte en el producte de l'amplificació dels gens *infB* i *pgi* (Annex III). Un cop revisades totes les seqüències,

aquestes s'introdueixen a la web del MLST (http://bigsdbsdb.web.pasteur.fr/perl/bigsdbsdb/bigsdbsdb.pl?db=pubmlst_Klebsiella_seqdef_public) per ser comparades amb la base de dades a (http://bigsdbsdb.web.pasteur.fr/perl/bigsdbsdb/bigsdbsdb.pl?db=pubmlst_Klebsiella_seqdef_public&page=batchSequenceQuery) i obtenir l'al·lel al qual corresponen.

Un cop obtingut els 7 al·lells dels 7 gens podem determinar La ST. Si es donés el cas que hi ha alguna seqüència que dona un al·lel que no està inclòs en cap ST de la base de dades, s'envia un correu electrònic amb la informació de la soca i les seqüències de tots els gens a KlebsiellaMLST@pasteur.fr.

3.10. Caracterització plasmídica

La caracterització plasmídica es basa en la determinació del grup d'incompatibilitat del plasmidi i la determinació de la seva mida.

A. Detecció dels grups d'incompatibilitat (Inc) dels plasmidis presents a les soques:

Els grups Inc dels plasmidis trobats en les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 es van determinar mitjançant la tipificació del replicó per PCR, la PBRT (*Plasmid based Replicon Typing*)^{208,210-212}. Aquesta tècnica permet identificar de forma específica els 23 grups Incs descrits fins el moment.

La PBRT consisteix en 5 PCR múltiples on en cada una s'identifiquen 3 grups Inc ((1)HI1, I1, HI2, (2) X, L/M, N, (3) FIA, FIB, N, (4) P, Y, FIC i (5) A/C, T, FIIs), i 6 PCR simples (K, B/O, F, U, R, Cole). La manera com es feren les PCR es pot consultar a l'annex III.

Tanmateix, Poirel *et al.*³⁴⁸ van descriure que el gen *bla*_{OXA-48} es trobava en plasmidis del grup d'incompatibilitat IncL/M però amb variacions en la seqüència nucleotídica del gen *excA*, just on hi ha localitzat l'iniciador *forward* que s'usa en la PBRT per amplificar la regió *rep* dels plasmidis L/M. Per això es va dissenyar un nou iniciador *forward* en una regió més conservada (Annex III). Posteriorment, vàrem aplicar els nous iniciadors descrits per Carattoli *et al.*³⁵⁹ quan va optimitzar la tècnica de PBRT per tal de diferenciar entre els plasmidis IncL i IncM.

B. Determinació del plasmidi portador del gen *bla*_{OXA-48} (PFGE-S1)

Per a poder determinar quin es el plasmidi que porta el gen, s'utilitza la matriu d'un gel d'agarosa amb una electroforesi en camp pulsant (PFGE). Tanmateix, com que els plasmidis es presenten com a ADN circular superenrotllat i, per tant, es desplacen més lentament que el marcador de pes molecular, és necessari utilitzar l'endonucleasa S1 per a la seva linealització (PFGE-S1) i determinació del tamany.

La metodologia emprada per als estudis de linealització de l'ADN plasmídica i separació per PFGE estan detallats en l'annex IV.

Els gels de PFGE-S1 són transferits a una membrana de nylon per mitjà de la tècnica de Southern Blot que posteriorment serà hibridada amb sondes marcades tant dels gens de resistència com dels grups

d'incompatibilitat. El protocol en detall està descrit en l'annex V i representada esquemàticament a la Figura 33.

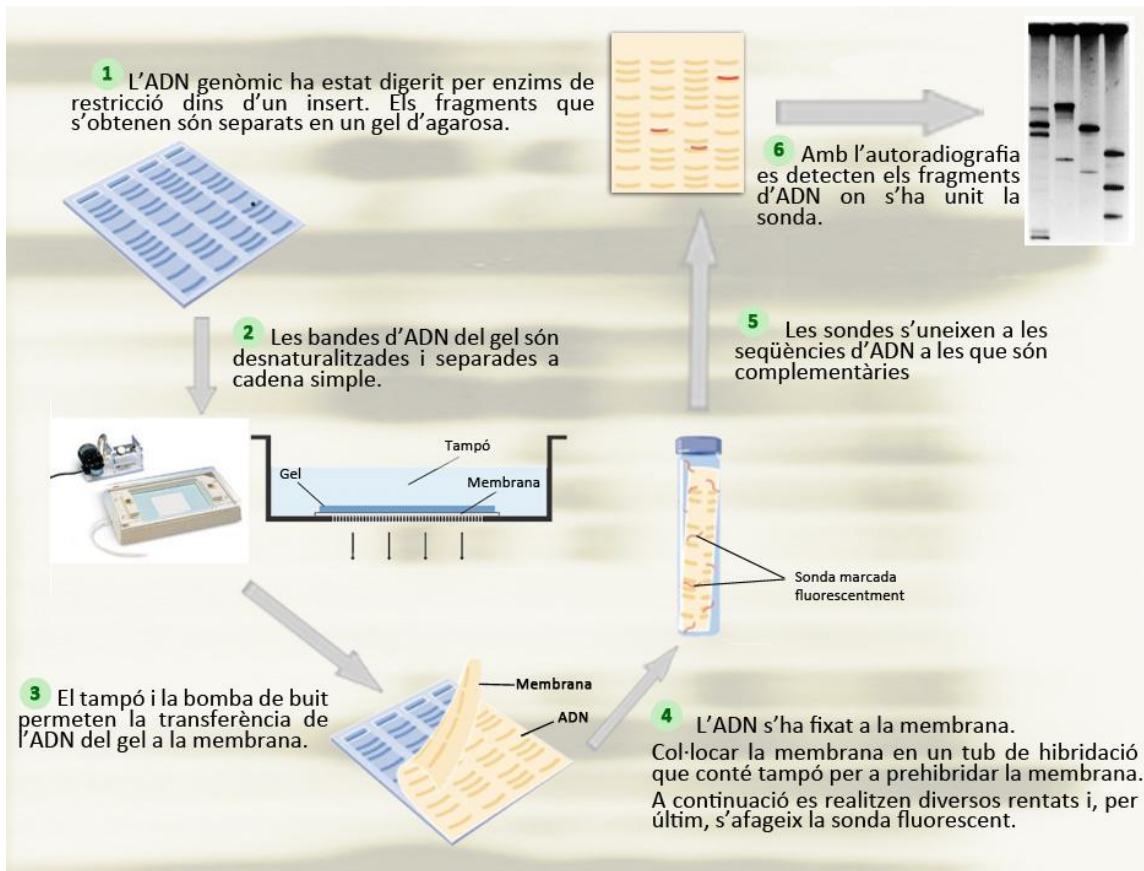


Figura 33. Esquema de la realització del Southern Blot.

3.11. Estudis de transferència plasmídica. Conjugació.

L'objectiu d'aquest estudi era determinar la transferibilitat dels plasmidis portadors de l'OXA-48. Per a l'estudi s'agafaren 11 soques representatives de cada pulsotip.

La metodologia emprada per als estudis de transferència plasmídica estan detallats en l'annex VI i representats esquemàticament a la figura 34.

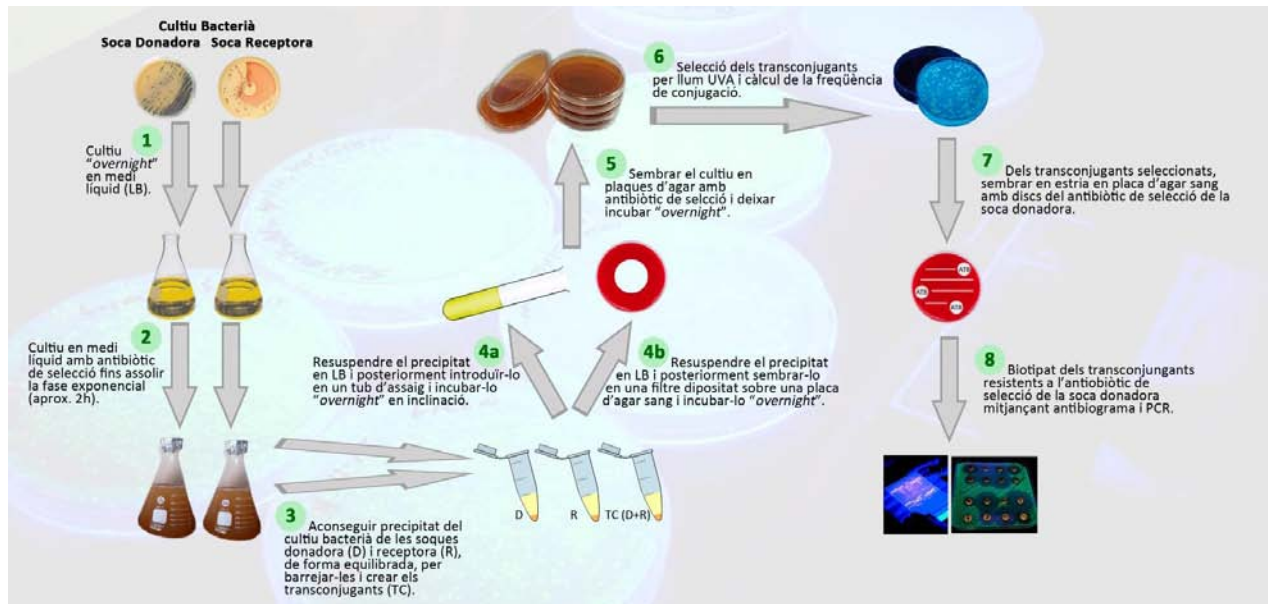


Figura 34. Esquema de la realització de la conjugació bacteriana.

3.12. Caracterització de l'entorn genètic del gen *bla*_{OXA-48}

Per a determinar si el gen *bla*_{OXA-48} es trobava en el Tn1999 o en el Tn1999.2 es van realitzar diferents PCR en les 85 soques portadores del gen. Per a la seva realització es van utilitzar iniciadors ja descrits en la bibliografia (Figura 35)^{349,350,354}.

El protocol complet està descrit en l'annex III.

A partir dels resultats de PCR es van seleccionar soques en funció del subtipus i es van seqüenciar els productes de PCR (Annex III). La seqüència nucleotídica dels entorns es va introduir a la base de dades del Genbank (Nombre d'Accés del Genbank: KT265173, KT265174, KT265175, KT265176, KT265177, KT265178, KT265179, KT265180, KT265181, KT265182, KT265183).

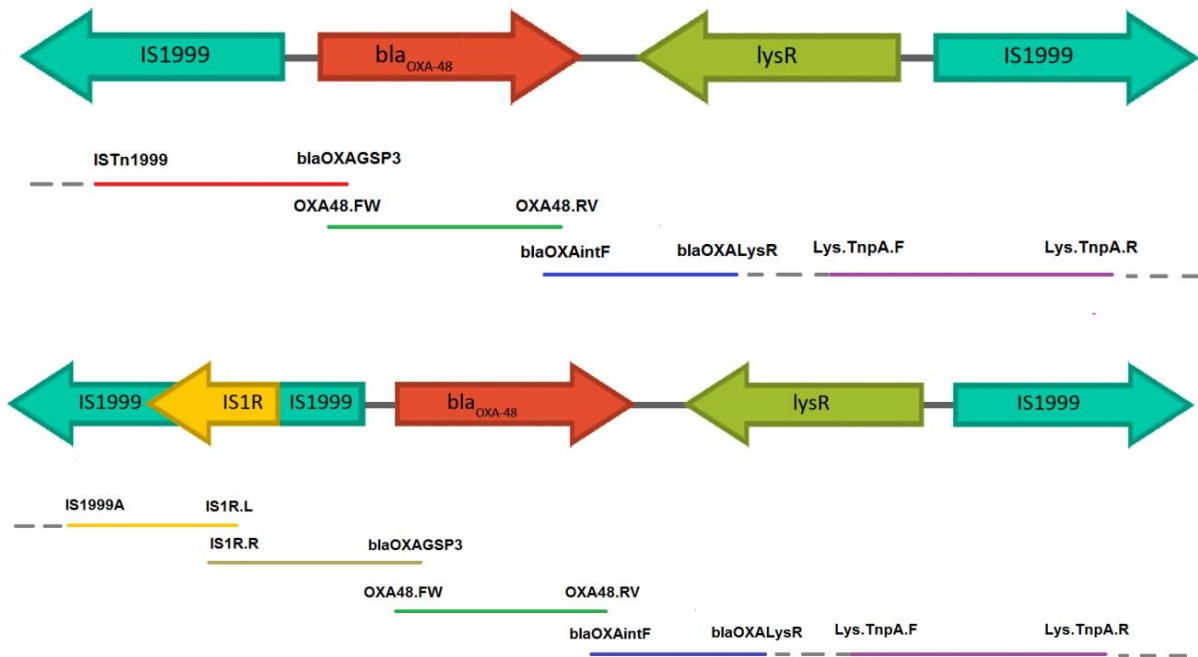


Figura 35. Esquema dels iniciadors emprats per a l'estudi dels entorns del gen *bla*_{OXA-48} (Annex III)^{348,350,354}. L'única diferència entre Tn1999 i Tn1999.2 és la inserció de la seqüència d'inserció *IS1R* en l'extrem 5' de la *IS1999* en el Tn1999.2. En aquest punt és on van variar els iniciadors, la resta eren els mateixos per als dos entorns.

3.13. Estudis de sobreexpressió de la bomba d'expulsió AcrAB

Com a conseqüència que diferents soques de *K. pneumoniae* amb la mateixa ST i el mateix subtipus de PFGE, presentaren diferents patrons de sensibilitat enfront els betalactàmics, tot i presentar els mateixos gens *bla*, es va decidir estudiar altres mecanismes de resistència no enzimàtics, que podrien explicar aquesta diferència. El més descrit és l'alteració en l'expressió de les bombes d'expulsió, en concret la bomba AcrAB.

La bomba d'expulsió AcrAB té afinitat per certs compostos^{62,388}, com els antibiòtics betalactàmics, la tigeiciclina o el bromur d'Etidi (BrEt). El BrEt és una substància que quan s'intercala entre dues cadenes d'ADN i és estimulada amb la llum ultraviolada produeix fluorescència. Utilitzant aquesta propietat es va voler observar si entre aquestes soques amb un mateix ST i/o subpulstotip, però amb diferent perfil de resistència, hi havia diferències en l'accumulació del BrEt. La presència de la sobreexpressió de la bomba d'expulsió AcrAB es demostraria determinant si hi havia una major expulsió d'aquest compost a l'exterior de la cèl·lula bacteriana.

Els detalls de la metodologia emprada es poden trobar en l'annex VII.

Per altra banda, en dues soques es va quantificar l'expressió del gen estructural *acrB* (que codifica la subunitat AcrB de la bomba d'expulsió AcrAB) mitjançant la tècnica de qRT-PCR (Annex VII). És una tècnica que es basa en la quantificació relativa de l'expressió del gen a estudiar en relació a l'expressió d'un gen conservat (*housekeeping*). En aquest cas el gen *housekeeping* escollit va ser el

gen *gapA* (que codifica l'enzim gliceraldehid-3-fosfat)³⁸⁹. En aquesta tècnica es treballa amb l'ADN complementari(ADNc) obtingut per retrotranscripció (RT) de l'ARN missatger. A partir del ADNc férem una PCR en temps real utilitzant com a fluoròfor el SYBR-Green.

3.14. Seqüenciació massiva (WGS)

Les tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS) estan provocant una revolució en l'estudi de l'epidemiologia molecular bacteriana, ja que és possible la seqüenciació de tot el genoma (*Whole Genome Sequencing* - WGS) d'un elevat nombre de soques, en un únic instrument de seqüenciació i en pocs dies. La WGS presenta dues avantatges: és útil en la descripció i resolució de brots locals (podent substituir la tècnica del camp pulsant), així com pot descriure els esdeveniments evolutius (cgMLST o MLST+) substituint el clàssic MLST. Permet a més, descriure quins factors de virulència, gens de resistència a antibiòtics o plasmidis ja descrits estan presents.

En funció dels resultats previs obtinguts mitjançant PFGE, MLST i perfil de resistències es van seleccionar 37 soques, representatives de la ST101 (subpulsotip A₁, A₂ i A₃, n = 3), ST17 (B, n = 1), ST1233 (C, n =1), ST14 (D, n = 1) i ST405 (E₁ a E₁₈, n = 31).

Per a l'obtenció del cgMLST hem fet la seqüenciació massiva (WGS) amb Mi Seq (Illumina) i l'anàlisi de la qualitat de les seqüències amb BaseSpace i CLC Genomics Workbench. Un cop obtingudes i analitzades les seqüències s'introduïren al software SeqSphere+ (<http://www.ridom.de/seqsphere/>) qui ens confeccionà els resultats del cgMLST. Aquesta part de l'estudi va ser realitzada a la University Medical Center Groningen (UMCG) sota la direcció del Prof. Alex Friederich, amb la col·laboració de la Dra. Elisenda Miró.

A. Seqüenciació massiva (WGS)

Per a la tècnica del *Whole-genome sequencing* cal l'extracció d'ADN, preparació d'una llibreria genòmica i posterior amplificació dels fragments, la seqüenciació pròpiament dita i, finalment l'anàlisi i neteja de les seqüències obtingudes per a l'acoblament.

Obtenció de l'ADN

Es va realitzar mitjançant el kit Ultraclean Microbia DNA Isolation (Mo-Bio Laboratories Inc#12224-250) a partir d'un cultiu de nit en medi líquid de LB a 37 °C. La quantificació de l'ADN es va realitzar amb el kit Qubit® dsDNA BR Assay (Life Technologies) utilitzant el fluoròmetre Qubit®(Life Technologies). Sent 20 µg /µl la concentració mínima d'ADN necessària per a la seqüenciació. .

La metodologia emprada tant per a l'extracció d'ADN, com per a la preparació de la llibreria genòmica estan detallats en l'annex VIII.

Preparació de la llibreria genòmica

Les llibreries genòmiques de les 37 soques es van obtenir mitjançant el kit Nextera XT Sample Prep (Illumina, San Diego, USA). Aquest mètode es basa en l'ús d'una tècnica enzimàtica, la tagmentació, que evita el trencament físic de l'ADN genòmic, utilitzant un transposoma que simultàniament fragmenta i etiqueta (mitjançant els índexs) els extrems dels fragments, resultant fragments de mida coneguda (Figura 36). És el que es coneix amb el nom de *paired-end*. Aquest entallat facilita als softwares el posterior anàlisi de les seqüències essent més senzill d'ordenar-les (fer-ne l'acoblament).

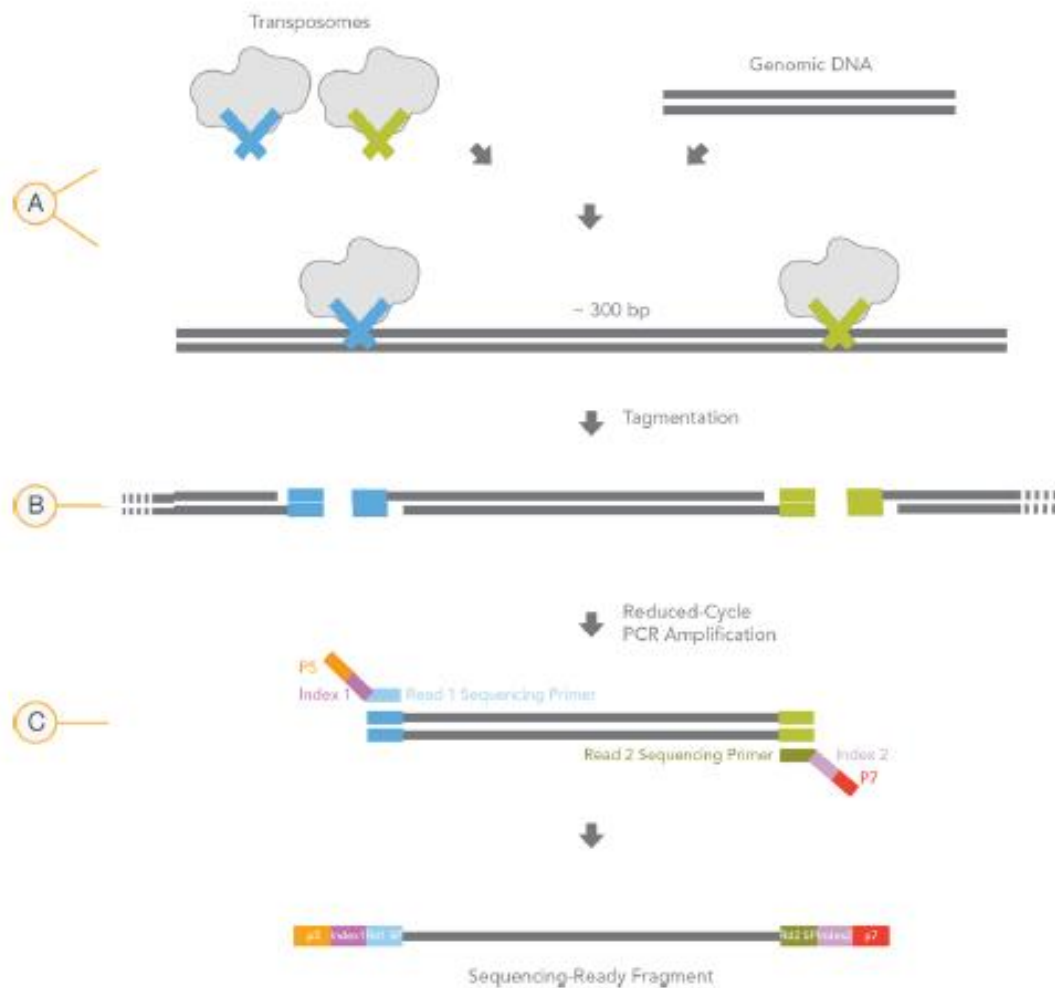


Figura 36. Preparació llibreria genòmica (Nextera XT Sample Prep). Nextera XT transposoma amb els adaptadors que es combinen amb l'ADN (A), Tagmentació dels fragment i addició d'adaptadors (B), PCR de cicles limitats per afegir seqüències d'iniciadors de seqüència i seqüències índex (C).

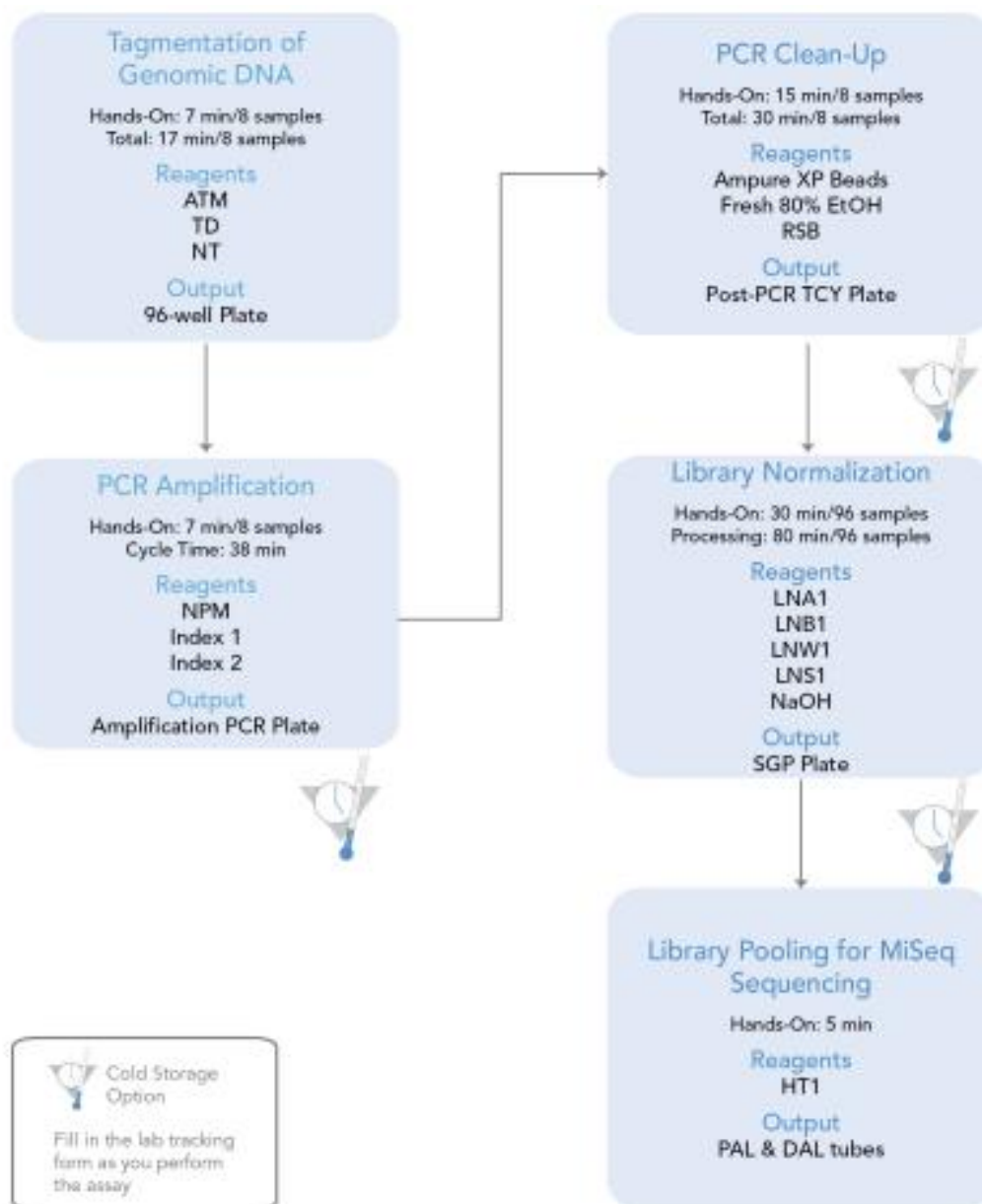


Figura 37. Esquema del protocol de treball de Nextera XT. Tagmentació, PCR index, PCR cleanup, Normalització de la llibreria i el Pooling.

1. Tagmentació: Durant aquesta etapa, l'ADN és tagmentat (etiquetat i fragmentat) pel transposoma de Nextera XT. El transposoma Nextera XT fragmenta simultàniament l'ADN i li afegeix seqüències adaptadores als extrems, el que permet l'amplificació per PCR en els passos subsegüents (Figura 37).
2. PCR Index: En aquest pas, l'ADN tagmentat s'amplifica a través d'un programa de PCR de cicle limitat. En la PCR s'afegeix índex 1 (i7) i l'índex 2 (i5). És fonamental utilitzar la quantitat total d'ADN recomanada i no afegir cicles addicionals a la PCR per assegurar biblioteques que produeixin uns resultats de la seqüenciació d'alta qualitat. La combinació dels iniciadors específics i7 i i5 per a cada mostra es determina durant la configuració de l'experiment amb el gestor d'experiment de Illumina.

3. PCR *cleanup*: Aquest pas utilitza perles de AMPure XP per purificar l'ADN de la llibreria genòmica amplificada, seleccionant els fragments de la mida desitjada i eliminant fragments de menor tamany.
4. Normalització de les llibreries: Ens assegurem que cada llibreria de cada mostra té la mateixa quantitat i qualitat.
5. *Library pool*: Des de les diferents llibreries obtingudes se'n crea una d'única que serà la que es carregarà en el seqüenciador.

Seqüenciació massiva

Les reaccions de seqüenciació es van dur a terme mitjançant el seqüenciador Illumina MiSeq, usant el kit de reactius MiSeq (Illumina, San Diego, USA).

Acoblament

El resultat de la seqüenciació es van netejar, utilitzant el software BaseSpace (Illumina, San Diego, USA). Amb aquest software s'ordenen les seqüències per mostra, és a dir, s'ajunten totes les seqüències amb el mateix índex.

A més, amb el software BaseSpace es pot analitzar la qualitat de les seqüències (BaseSpace User Guide, Illumina) mitjançant els "Workflow Graphs". En el nostre cas varem exigir un *low percentage* (percentatge de fases, prefases i *mismatch*) menors al 0,3%, un *high percentage* (alineaments) superior al 98% i un *QC score* (qualitat de lectura de cada una de les bases) d'aproximadament 40%.

Per altra banda, amb el BaseSpace tenim la possibilitat de descarregar les dades com un paquet, de manera individual, o com un grup d'arxius FASTQ. L'arxiu FASTQ és un arxiu de format de text utilitzat per representar seqüències. Cada registre té de quatre línies: un identificador, la seqüència, +, i les puntuacions de qualitat. D'aquesta manera si es vol treballar amb qualsevol altra software no només tenim la seqüència lineal sinó també la qualitat de les seqüències.

Un cop acceptada la qualitat de les seqüències, procedirem a l'acoblament de les seqüències utilitzant el software de CLC Genomics Workbench ([Http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/](http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/)).

Per això cal prèviament passar les seqüències de format FASTQ a FASTA (Annex VIII).

- 1) A partir de les seqüències FASTA, es fa el *trimming* que consisteixen descartar aquelles seqüències que no tinguin una mida mínima de 150 bases (recordem que és la mida mínima dels fragments que es creen en les llibreries obtingudes amb Nextera XT) i acceptar aquelles seqüències amb un màxim de dues ambigüitats. Un cop feta la selecció, el software acobla les seqüències.

B. cgMLST o MLST+

La relació filogenètica entre les soques a partir de la WGS s'establí amb el software SeqSphere+ (RIDOM GmbH). Aquest software s'ha dissenyat per a la investigació i la vigilància de brots a partir de les dades obtingudes amb les tècniques de seqüenciament de nova generació (NGS) perquè inclou totes les eines que es necessiten per a fer la tipificació bacteriana.

Per a establir el cgMLST entre les 37 soques de *K. pneumoniae* seleccionades vàrem seguir els següents passos:

1. Escollir una soca de referència. Es pot fer utilitzant la base de dades de seqüències genòmiques (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/) (Figura 38) o fent un estudi preliminar amb soques pròpies. En aquest estudi s'utilitzà com a genoma de referència la soca de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. L'elecció de la soca *K. pneumoniae* NTUH-K2044 és fruit d'estudis anteriors realitzats pel Prof. Alex Friederich (UMCG Groningen) que conclouen que el genoma d'aquesta soca és el més consensuat respecte un nombre considerable de *K. pneumoniae* estudiades. A més, era el genoma que més gens tenia nomenats, és a dir que a part de conèixer la seqüència del gen es coneix la seva funció.

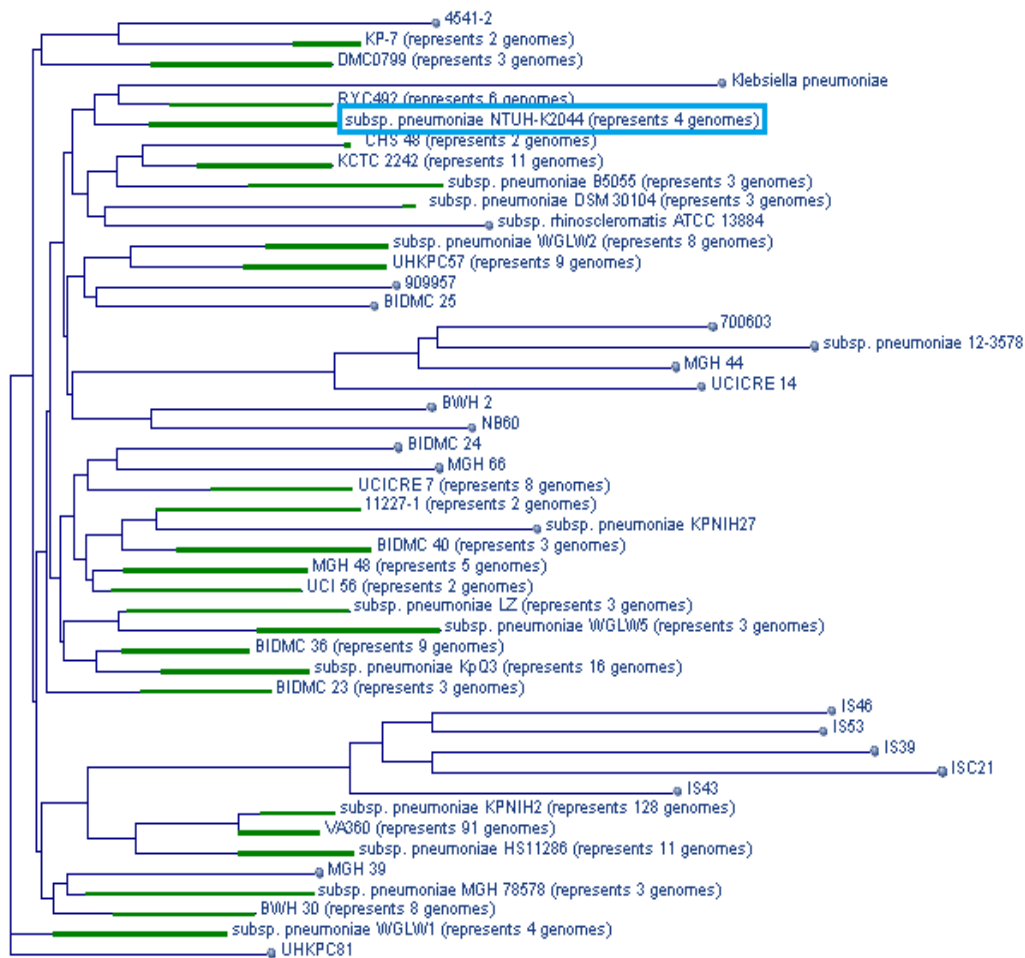


Figura 38. Dendrograma dels genomes de diferents *Klebsiella pneumoniae*. La NTUH-K2044 està remarcada.

2. Comparar les nostres seqüències amb la de referència. De la matriu de comparacions resultant per a establir la relació filogenètica varem eliminar:
 - a. Aquelles seqüències on no s'havia trobat cap gen en comú.
 - b. Aquelles seqüències on no hi havia seqüència consens.
 - c. Aquelles seqüències idèntiques.

C. Center for genomic Epidemiology

Al Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>) hi han una sèrie d'eines, de les quals es van utilitzar les següents:

1. PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>): Aquesta eina es basa en una base de dades de replicons de plasmidis destinats a la identificació dels plasmidis en les seqüències de tot el genomes d'espècies d'*Enterobacteriaceae*, utilitzant des de *direct high-throughput raw reads*, contigs acoblats i seqüències Sanger acoblades, és a dir, diferents resultats de seqüenciació de diferents formes de seqüenciació. El PlasmidFinder no només proporciona la detecció de replicons en els WGS sinó també assigna els plasmidis en estudi de llinatges que es remunten a la informació al coneixement existent sobre els grups Inc i suggereix possibles plasmidis de referència per a cada llinatge^{215,390}.
2. ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>): Aquesta eina es basa en una base de dades de gens de resistència (aminoglicòsids, betalactàmics, colistina, fosfomicina, àc. fusídic, macròlids-lincosamides, nitroimidazol, oxazolidona, phenicol, fluoroquinolones, rifampicina, sulfonamina, tetraciclina, trimetoprim i glicopeptids), mutacions que causen resistència (p.e. mutacions en gens *housekeeping*), de tots els gens descrits. No és únicament per *Enterobacteriaceae*. Se li pot introduir seqüències curtes com un genoma complet o parcial pre-acoblat. ResFinder dona l'opció d'executar l'entrada davant d'una o diverses classes d'antimicrobians de forma simultània, i utilitza BLAST per identificar els gens de resistència adquirits. És possible buscar gens amb una homologia desitjada (80-100%)³⁹¹.

Les seqüències acoblades es van introduir en aquestes dues eines i es va obtenir un perfil de plasmidis identificats i de gens de resistència, amb un percentatge d'homologia respecte la seqüència introduïda.

Tal com havia descrit Carattoli *et al.* al 2015³⁵⁹, les diferències en les seqüències dels gens *excA*, *traX* i *traY*, permetien diferenciar entre plasmidis IncL i IncM; per aquesta raó es van cercar aquestes seqüències en les 37 soques a les que se'ls havia realitzat la seqüenciació massiva, utilitzant com a referència les seqüències del plasmidi pOXA-48 (JN626286) i es van comparar per a determinar quin plasmidi era el portador del gen *bla*_{OXA-48}.

D. Estudi de les porines i de les topoisomerases de *K. pneumoniae*

Una de les possibles causes que poden explicar els diferents patrons de sensibilitat als antibiòtics betalactàmics de soques d'un mateix ST i amb els mateixos gens *bla* és la presència d'alteracions en la permeabilitat o mutacions en les topoisomerases. Aprofitant la WGS es va buscar si hi havia alguna alteració en els gens *ompK36*, *ompK35*, *ompK37*, *ompK26*, *lamB* i *phoE* que pogués explicar la discrepància.

Es van cercar les seqüències de les *ompK26*, *ompK35*, *ompK36*, *ompK37*, *lamB* i *phoE* de la soca de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (KN046818.1) (soca sensible utilitzada en varis estudis per comparar perfil de porines) i la soca *K. pneumoniae* MGH78578 (CP000647.1) (soca que no produeix *OmpK35*).

Obtingudes les seqüències que utilitzaríem de referència, es va procedir a introduir-les en el CLC Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/>) fent un BLAST d'aquestes seqüències de referència amb les de seqüències completes de les 37 soques d'estudi.

Un cop obtingudes les seqüències nucleotídiques de les 37 soques identificades com homòlogues de les seqüències de les soques control, es van alinear mitjançant el software de MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) per observar els canvis nucleotídics que podrien ocasionar canvis en la seqüència aminoacídica. La seqüència aminoacídica es va obtenir amb el software Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Els canvis observats en les seqüències es van analitzar introduïnt-les en el nBLAST i pBLAST, respectivament. Quan l'alineament no fou possible, i en el cas concret de la *OmpK36*³⁸, es descartà la presència dins del gen de la porina d'una seqüència d'inserció per mitjà del IsFinder (www-is.biotoul.fr), comparant-ho també amb les seqüències d'altres soques utilitzades en estudis semblants, com : *K. pneumoniae* NTUH-K2044, HS0824168 (JX310550/AFR33746.1), HS092187 (JX310552/AFR33748.1), HS08763 (JX310557/AFR33753.1), HS062105 (JX291114/AFV34540.1).

El mateix procediment es va utilitzar per a determinar si les soques eren resistents a quinolones per mutacions en els gens cromosòmics de l'ADN-girasa i la topoisomerasa. Per això es van cercar les seqüències nucleotídiques de *gyrA*, *parC*, *gyrB* i *parE* de la soca de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (KN046818.1).



RESULTATS

4.1. Detecció de les soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48.

Entre gener i desembre de 2012, es van aïllar un total de 3.901 soques de *K. pneumoniae* provinents d'11 hospitals comarcals de Catalunya i de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

D'aquestes 3.901 soques, a aquelles que presentaven un fenotip de sensibilitat als antibiòtics betalactàmics diferent al patró natural esperat, és a dir, que eren resistents a d'altres betalactàmics a més de l'ampicil·lina, se'ls hi va realitzar el test de Hodge modificat (THM). Cent setanta-una soques (4,4%) van ser positives, incloent-hi tant les que mostraren un creixement clar al voltant de l'estria com les que el mostraren un creixement feble.

A les 171 soques amb el THM positiu o positiu feble es determinà la presència de carbapenemases mitjançant PCR. Vuitanta-cinc soques (49,7%) presentaren el gen *bla*_{OXA-48}, no trobant-se en les 86 soques restants, cap dels gens de carbapenemases estudiats.

Les 85 soques portadores del gen *bla*_{OXA-48} van ser aïllades en 8 dels 12 hospitals participants, no aïllant-se cap soca en l'Hospital Municipal de Badalona (HMB), Hospital de Barcelona (HB), Hospital de Martorell (HMLL) i l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus (HUSJR).

En les 86 soques (50,3%) que no presentaven el gen *bla*_{OXA-48} ni cap altra carbapenemasa es va voler determinar quin mecanisme enzimàtic explicava la resistència als betalactàmics. Els resultats de la PCR varen mostrar que 61 soques (71%) presentaven una betalactamasa adquirida tipus AmpC (AmpCp) (80,3% DHA, 11,4% ACC i 8,2% CMY.), 35 soques (40,6%) presentaven una BLEA (94,3% CTX-M-1 tipus i 5,7% CTX-M-9 tipus). Hi havia 14 soques (16,3%) que coexpressaven BLEA i AmpCp, de les quals 12 soques (85,7%) coexpressaven una BLEA CTX-M-1 tipus i una AmpCp (75% DHA, 16,6% ACC i 8,3% CMY) i 2 soques (13,3%) coexpressaven una BLEA CTX-M-9 tipus i una DHA tipus. N'hi havia 4 soques que no presentaven AmpCp ni BLEA (CTX-M-tipus o TEM) i presentaven un patró de resistència enfront les penicil·lines, cefalosporina de primer generació (cefalotina) i de segona generació (cefuroxima) que es podria explicar per la presència de la carbapenemasa OXA-48, tot i que no es va detectar. A partir d'aquest moment aquestes 86 soques restaren fora de l'estudi.

4.2. Estudis de sensibilitat de les soques productores d'OXA-48

Els resultats dels estudis de sensibilitat a antibiòtics betalactàmics de les 85 soques amb la carbapenemasa OXA-48 es mostren en la taula 12. Més d'un 80% de les 85 soques amb OXA-48 eren multiresistents a les penicil·lines, cefalosporines i l'aztreonam. La sensibilitat als carbapenèmics era heterogènia, un 95,3% eren resistents a l'ertapenem (rang: 9-21 mm) i només un 23,5% a l'imipenem (rang: 9-22 mm). Els betalactàmics que es varen mostrar més actius *in vitro*, a part de l'imipenem, foren la cefoxitina amb 28,2% de les soques sensibles i la cefepime amb un 42,5% de soques.

El patró de sensibilitat esperat per a *K. pneumoniae* productora d'OXA-48 hauria de ser de resistència a les penicil·lines (ampicil·lina, piperacil·lina), als inhibidors de betalactamases combinats amb penicil·lines (amoxicil·lina/àcid clavulànic, piperacil·lina/tazobactam), a les cefalosporines de primera

(cefalotina) i segona generació (cefuroxima), i lleument als carbapenèmics (sobretot a l'ertapenem). En el nostre estudi, de les 85 soques només tres (3,5%) mostraren aquest patró, que foren les úniques que només presentaven l'OXA-48 i la penicil·linasa SHV cromosòmica natural de *K. pneumoniae* (SHV-1, SHV-11 o SHV-42).

Taula 12. Resistència a antibiòtics betalactàmics en soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48.

Antibiòtic	Percentatge resistència (R+)*	Rang halos d'inhibició (mm)
AMP	100	9-13
PIP	100	9-15
AMC	100	9-16
TZP	95,2	9-17
CEF	97,6	9-17
FOX	28,2	9-17
CXM	94,1	9-18
CTX	90,5	9-25
CAZ	82,3	9-20
ATM	87	9-19
FEP	42,5	9-18
ERT	95,3	9-21
IMP	23,5	9-22

AMP (ampicil·lina), AMC (amoxicil·lina/àcid clavulànic), PIP (piperacil·lina), TZP (piperacil·lina/tazobactam), CEF (cefalotina), FOX (cefotaxima), CXM (cefuroxima), CTX (cefotaxima), CAZ (ceftazidima), ATM (aztreonam), FEP (cefepime), ERT (ertapenem), IMP (imipenem).

*(R+) En el percentatge estan incloses les soques resistents i aquelles amb sensibilitat intermèdia²⁷³.

Les 82 soques restants (96,5%) presentaven patró de sensibilitat diferent degut a la presència d'altres mecanismes de resistència als betalactàmics. D'aquestes 82 soques, 76 (92,3%) presentaven un patró de sensibilitat que feia pensar en que l'OXA-48 es co-expressava amb una BLEA. En el patró de resistència es podia observar la presència de sinèrgia entre les diferents cefalosporines de tercera generació i l'aztreonam, amb l'amoxicil·lina-àcid clavulànic. A més, eren resistents a cefotaxima i presentaven sensibilitat reduïda als carbapenèmics (ertapenem i imipenem). Les 6 soques (7,3%) restants presentaven un patró de sensibilitat compatible amb la producció d'una betalactamasa d'ampli espectre (TEM-1) o oxacil·linasa (OXA-1), degut a que només eren resistents a les penicil·lines i alguna soca a cefalosporines de primera generació i a l'ertapenem.

Les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 també van mostrar ser soques multiresistents. De les 85 soques de l'estudi, 73 (85,8%) eren resistents a l'àc. nalidíxic, 71 (83,5%) a la ciprofloxacina i 76 (89,4%) al cotrimoxazol. També es va observar un elevat percentatge de soques resistents a aminoglicòsids: 77 soques (90,5%) eren resistents a la kanamicina i tobramicina, 72 (84,7%) a la gentamicina, 17 (20%) a la netilmicina i 7 soques (8%) resistents a l'amicacina. A més, tal i com s'ha mencionat en l'apartat de material i mètodes, tot i no tenir cap punt de tall estandarditzat, pel que es refereix a la neomicina, en el nostre estudi quatre soques (4,7%) tenien un halo de 9 mm (diàmetre del disc: 5 mm), amb la qual cosa varem considerar aquestes soques com a resistents. De les 85 soques estudiades només 4 es mostraren sensibles a tots els aminoglicòsids avaluats. Les altres 81 soques presentaven fenotips de resistència diversos (Taula 13).

Taula 13. Percentatges de resistència a antibiòtics no betalactàmics

Antibiòtic	Percentatge de resistents	Rang d'halos (mm)
K	90,5	9-19
G	84,7	9-24
T	90,5	9-12
A	8,3	12-26
Nt	20	9-20
Nm	4,7	9
NAL	85,8	9-18
CIP	83,5	9-20
SXT	89,4	9-28

K (kanamicina), G (gentamicina), T (tobramicina), A (amicacina), Nt (netilmicina), Nm (neomicina), NAL (àc. nalidíxic), CIP (ciprofloxacina), SXT (cotrimoxazol).

4.3. Epidemiologia clínica

La recollida de les dades clíniques dels 85 pacients portadors de *K. pneumoniae* productora d'OXA-48 va mostrar que els pacients tenien una edat mitjana de 76 anys (rang: 26-98 anys) i que el 61% eren dones (Taula 14).

Taula 14. Dades epidemiològiques dels pacients amb *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48

Nº de pacients	85
Gènere	
Nº d'homes/dones(%)	33/52 (39/61)
Edat	
Promig de l'edat (rang)	76 (26-98)
Promig de l'edat Home/Dona	72/79
Nº Home/Dona per sobre els 65 anys(%)	20/46 (60/88)
Origen, n(%)	
Nosocomial	41 (48,2)
Comunitari,	14(16,4)
Relacionat amb l'assistència	30(35,3)
Tractament antibiòtic previ, n(%)	
Si/No	50/13(59/15)
Desconegut	22 (26)
Tractament específic per <i>K. pneumoniae</i>, n(%)	
Si/No	55/16 (65/19)
Desconegut	14 (16)
Evolució n(%)	
Altres	81 (95,3)
Exitus	4 (4,7)

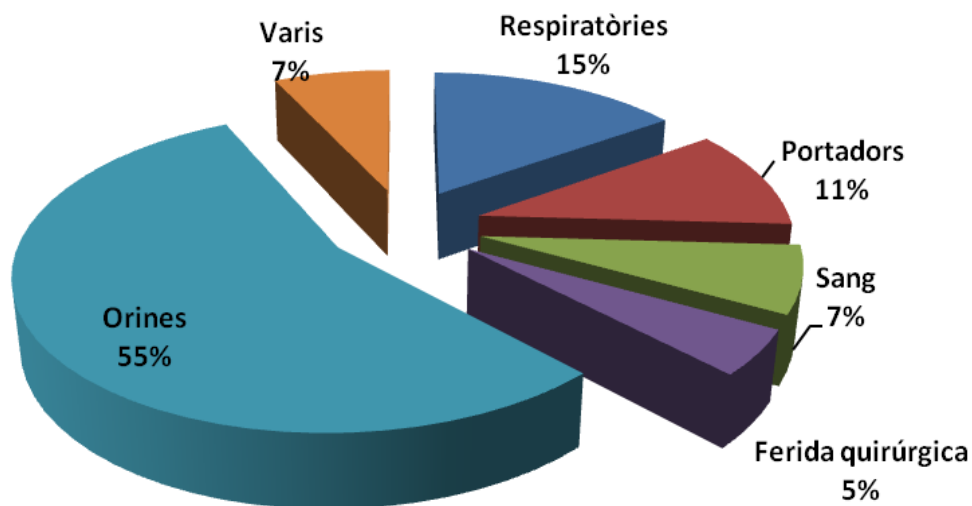


Figura 39. Origen de les mostres on s'han aïllat les soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48.

Les 85 soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 es varen aïllar de diferents mostres clíniques (Figura 39): 47 (55%) d'orines, 13 (15%) de mostres respiratòries (BAL: rentat broncoalverolar i BAS: aspirat broncoalveolar), 6 (7%) de sang, 4 (5%) de ferides quirúrgiques, 9 (11%) de controls de portadors (femtes) i 6 (7%) d'altres (nafra, bilis, exsudat vaginal, líquid peritoneal, etc).

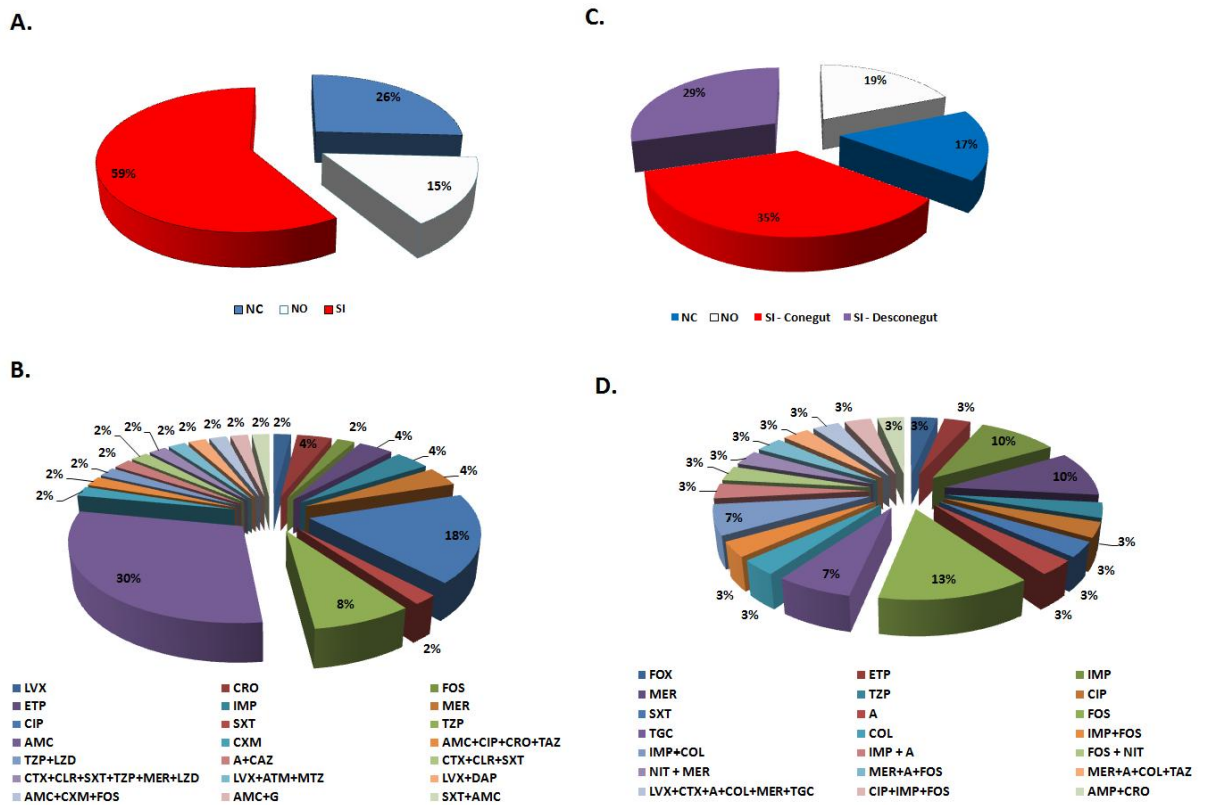
Cinquanta (59%) dels pacients portadors de *K.pneumoniae* amb OXA-48 varen prendre antibiòtics durant els dies previs a l'aïllament de la soca (Taula 14 i Figura 40). Els antibiòtics que majoritàriament varen prendre foren: amoxicil·lina/àcid clavulànic en 15 pacients (30%), ciprofloxacina en 9 pacients (18%), carbapenèmics (meropenem, ertapenem i imipenem) en 6 pacients (12%), piperacil·lina-tazobactam en 4 pacients (8%), ceftriaxona en 2 pacients (4%), cefuroxima en un pacient (2%), cotrimoxazol en un pacient (2%), fosfomicina en un pacient (2%), levofloxacina en un pacient (2%), i 10 pacients (20%) van rebre diferents teràpies combinades: amoxicil·lina-àc. clavulànic i gentamicina en un pacient (2%), amoxicil·lina-àcid clavulànic amb cefuroxima i fosfomicina en un pacient (2%), cotrimoxazol amb amicacina en un pacient (2%), levofloxacina amb daptomicina en un pacient (2%), levofloxacina amb aztreonam i metronidazol en un pacient (2%), cefotaxima amb claritromicina, cotrimoxazol, piperacil·lina-tazobactam, meropenem i linezolid en un pacient (2%), amicacina amb ceftazidima en un pacient (2%), claritromicina amb cefotaxima i cotrimoxazol en un pacient (2%), piperacil·lina-tazobactam amb linezolid en un pacient (2%), amicacina amb ciprofloxacina, ceftriaxona i tazobactam en un pacient (2%). En 22 (26%) dels pacients no es va poder recollir aquesta dada i 13 pacients (15%) no varen prendre antibiòtics durant els dies previs a l'aïllament de la soca.

Malauradament no disposem de les dades respecte al tractament empíric administrat en el moment de la sospita de la infecció.

Finalment, només 30 (35,3%) dels 85 pacients portadors de *K. pneumoniae* amb OXA-48 varen rebre tractament enfront aquest microorganisme un cop documentada la infecció (Taula 14 i Figura 40). Vint-i-cinc malalts (29,4%) havien rebut tractament però es desconeix, degut a que no es va poder

recollir aquesta dada. Els tractaments rebuts foren: fosfomicina en quatre malalts (13%), carbapenèmics en set malalts (10% meropenem i imipenem i 3% ertapenem), tigeciclina en dos malalts (7%) i, cotrimoxazol en un malalt (3%), ciprofloxacina en un malalt (3%), colistina en un malalt (3%), piperacil·lina-tazobactam en un malalt (3%), amicacina en un malalt (3%), cefoxitina en un malalt (3%). En el cas de deu malalts (33%) foren teràpies combinades: imipenem amb colistina en dos malalts (6%), meropenem i amicacina, colistina i tazobactam en un malalt (3%), levofloxacina amb cefotaxima, meropenem, amicacina, colistina i tigeciclina en un malalt (3%), ciprofloxacina amb imipenem i fosfomicina en un malalt (3%), imipenem amb fosfomicina en un malalt (3%), ampicil·lina amb ceftriaxona en un malalt (3%), meropenem amb amicacina i fosfomicina en un malalt (3%), imipenem amb amicacina en un malalt (3%), fosfomicina amb nitrofurantoïna en un malalt (3%) i nitrofurantoïna amb meropenem en un malalt (3%). En 14 malalts (16%) no es va poder recollir aquesta dada i 16 (19%) no havien rebut tractament, en aquest últim grup, dels malalts no tractats, hi trobem 6 colonitzacions.

En l'evolució clínica d'aquests pacients hi ha hagut quatre èxits (Taula 14) tots tractats amb carbapenèmics: un amb imipenem, dos amb imipenem i colistina, i l'altre amb meropenem, amicacina, colistina i tazobactam.



NO (no va rebre tractament), NC (no consta que rebés tractament), SI (si va rebre tractament)
 A (amicacina), AMC (amoxicil·lina/àcid clavulànic), ATM (aztreonam), CAZ (cefazidima), CIP (ciprofloxacina), CLR (cloranfenicol), COL (colistina), CRO (ceftriaxona), CTX (cefotaxima), CXM (cefuroxima), DAP (daptomicina), FOS (fosfomicina), FOX (cefoxitina), G (gentamicina), IMP (imipenem), LVX (levofloxacina), LZD (linezolid), MER (meropenem), NIT (nitrofurantoïna), TGC (tigeciclina), SXT(cotrimoxazol), TAZ (tazobactam), TAZP (piperacil·lina/tazobactam).

Figura 40. Percentatges de pacients que van rebre tractament antibiòtic (A), els antibiòtics prescrits (B), Percentatge de pacients que van rebre tractament dirigit enfront *K. pneumoniae* (C), i els antibiòtics que en aquest cas van rebre(D).

Cal destacar que el 48,2% dels casos eren d'origen nosocomial, un 35,3% estaven relacionats amb l'assistència socio sanitària i la resta eren d'origen comunitari (16,4%).

4.4. Epidemiologia molecular: clonalitat (PFGE) i filogènia (MLST)

4.4.1. Estudi de la clonalitat (PFGE)

L'anàlisi de la clonalitat de les 85 soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 es feu per macrorestricció genòmica i electroforesi en camp pulsant (PFGE) observant cinc pulsotips ben definits (Figura 41) que compartien una homologia del 76%: A (16/85; 18,8%), B (1/85; 1,1%), C (1/85; 1,1%), D (1/85; 1,1%) i E (66/85; 77,6%). Els pulsotips A i E tenien subtipus: A (A₁₋₃) i E (E₁₋₁₈).

Pulsotips:

- A: De les 16 soques del pulsotip A, cinc procedien del HGV sent totes del subtipus A₁, 10 del HGH (un d'A₁ i nou d'A₂) i un del HM del subtipus A₃. S'observà que els subtipus A₁ i A₂ estaven estretament relacionats ja que només diferien entre elles per dues bandes; en canvi l'A₃ era un clon possiblement relacionat amb aquests dos, ja que mostrava 6 bandes de diferència. Les cinc soques del subtipus A₁ de l'HGV s'aïllaren de pacients relacionats amb centres socio sanitàris, mentre que la soca A₁ procedent del HGH era d'un pacient ingressat. Dels nou aïllaments del subtipus A₂ de l'HGH, set s'aïllaren en malalts ingressats i en pacients relacionats amb centres socio sanitàris. La soca del subtipus A₃ del HM s'aïllà en un pacient ingressat (Taula 15).
- B,C i D: Els pulsotips B, C i D incloïen només una soca. Les soques provenien de l'HGG, HM i HGV, respectivament. I foren aïllades de pacients relacionats amb centres socio sanitàris.
- E: Les 66 soques del pulsotip E, presentava 18 subtipus, sent els subtipus E₅ (n = 30), E₁ (n = 11) i E₁₂ (n = 5) els més freqüents. Els altres subtipus presentaven tres casos o menys cada un (Taula 15). El subtipus E₅ es va aïllar en cinc del vuit hospitals on es van aïllar soques de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa OXA-48 (62,5%). El 63,3% dels malalts eren pacients ingressats, el 26,6% estaven relacionats amb centres socio sanitàris i un 10% eren pacients d'origen comunitari. El subtipus E₁, s'ha aïllat en tres hospitals diferents on un 27,3% dels pacients eren d'origen comunitari, un 27,3% estaven relacionats amb centres socio sanitàris i un 45,4% eren pacients ingressats.

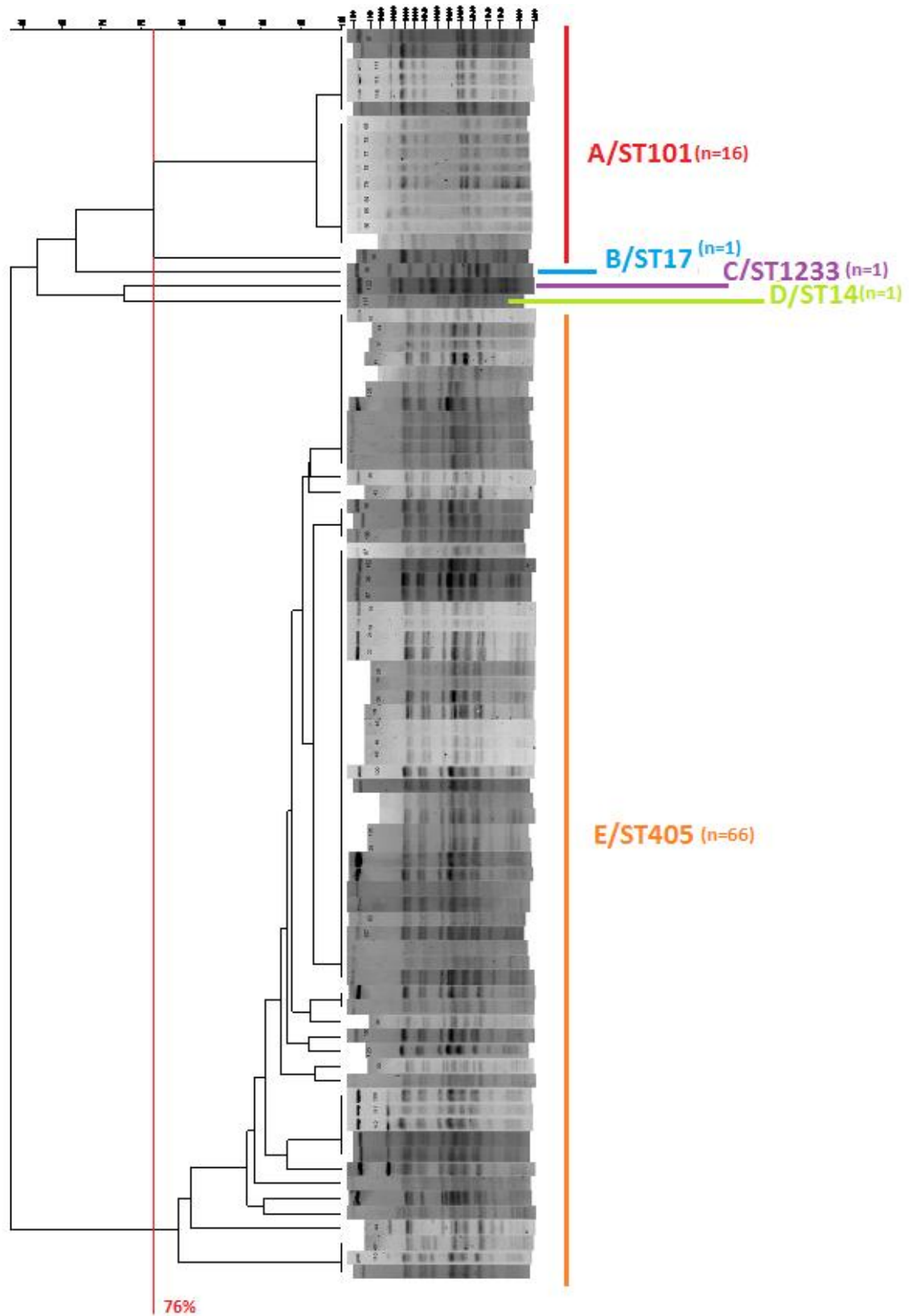


Figura 41. Dendrograma de les 85 soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48. S'observa la correlació entre els pulsotips amb els posteriors resultats MLST, i la homologia compartida entre els diferents pulsotips (76%).

Taula 15. Pulsotips de les soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48, i el seu origen.

Subtipus	Nº de soques	Hospital (nombre i origen)
A ₁	6	HGV (5 RAS), HGH (1 NOS)
A ₂	9	HGH (7 NOS, 1 RAS, 1 COM)
A ₃	1	HM (1 NOS)
B	1	HGG (1 RAS)
C	1	HM (1 RAS)
D	1	HGV (1 RAS)
E ₁	11	HGV (2 NOS, 2 COM, 3 RAS), HSJDD (1 NOS, 1 COM), HGG (2 NOS)
E ₂	1	HGG (1 NOS)
E ₃	1	HGV (1 COM)
E ₄	3	HGG (1 RAS, 1 NOS), HGV (1 NOS)
E ₅	30	HSJDD (3 COM, 1 NOS), HSCSP (1 NOS), HGG (15 NOS, 4 RAS), HGV (4 RAS, 1 NOS), HGC (1 NOS)
E ₆	2	HSJDD (1 COM), HSCSP (1 RA)
E ₇	1	HGV (1 RAS)
E ₈	1	HC (1 RAS)
E ₉	1	HC (1 RAS)
E ₁₀	1	HGV (1 COM)
E ₁₁	1	HSCSP (1 NOS)
E ₁₂	5	HGV (2 RAS, 1 NOS), HSJDD (1 COM, 1 NOS)
E ₁₃	1	HSJDD (1 NOS)
E ₁₄	1	HGV (1 COM)
E ₁₅	1	HC (1 RAS)
E ₁₆	1	HSCSP (1 NOS)
E ₁₇	1	HGV (1 RAS)
E ₁₈	3	HGV (1 RAS, 2 COM)

RAS (relacionats amb centres socio-sanitaris), COM (adquirida a la comunitat) i NOS (nosocomial).

Hospital de Calella (HC), Hospital General de Granollers (HGG), Hospital General de Catalunya a Sant Cugat del Vallès (HGC), Hospital General de L'Hospitalet (HGH), Hospital Sant Joan de Déu a Manresa (HSJDD), Hospital de Mataró (HM) i Hospital General de Vic (HGV).

Es pot observar com el pulsotip E era el més estès, ja que es va trobar en sis dels vuit (75%) hospitals on es van aïllar soques de *K. pneumoniae* productores de l'OXA-48. D'aquests sis hospitals, en quatre (HC, HGC, HSCSP i HSJDD) el pulsotip E va ser l'únic pulsotip aïllat.

L'altre pulsotip que es va aïllar amb més freqüència va ser l'A, que es va aïllar en tres dels vuit (37,5%) hospitals. Els pulsotips minoritaris: B, C i D s'observaren en hospitals diferents, convivint amb el pulsotip A i/o E, i la seva aparició va ser puntual (Taula 15 i Figura 42).

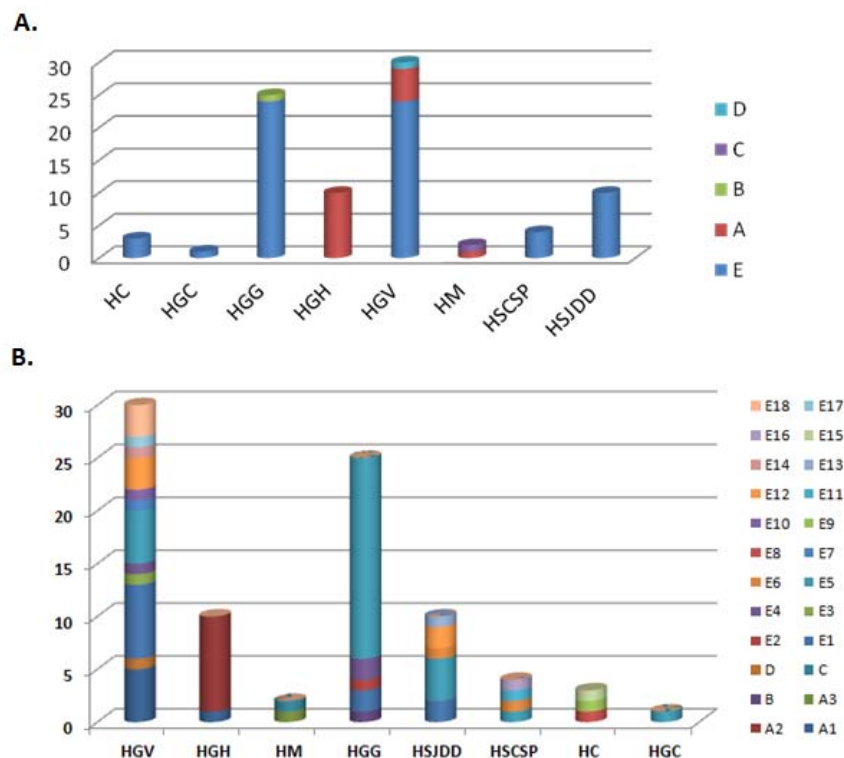


Figura 42. Distribució dels diferents pulsotips (A) i subtipus (B) en els hospitals comarcals. HC (Hospital de Calella), HGC (Hospital General de Catalunya), HGG (Hospital General de Granollers), HGH (Hospital General de l'Hospitalet), HGV (Hospital General de Vic), HM (Hospital de Mataró), HSCSP (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) i HSJDD (Hospital Sant Joan de Déu de Manresa). S'observa com en sis d'aquests hospitals es va aïllar el pulsotip E, en tres hospitals es va aïllar el pulsotip A i els altres pulsotips minoritaris es van aïllar en hospitals on hi havia el pulsotip A i/o E.

4.4.2. Estudi de filogènia (MLST)

Es va determinar la seqüència tipus d'11 soques representatives dels diferents pulsotips, subtipus i patrons de sensibilitat. S'escolliren tres soques del pulsotip A (una soca de subtipus A₁, una del subtipus A₂ i una del subtipus A₃), les soques dels pulsotips B, C i D, i 5 soques del pulsotip E (una soca del subtipus E₅, una del E₁₂, una del E₁₅, una del E₁₇ i una del E₁₈). La selecció d'aquestes soques va ser en funció del patró de sensibilitat i en el cas dels pulsotip E, es van escollir tant del subtipus majoritaris com dels minoritaris.

Les soques del pulsotip A (A₁ a A₃) pertanyien a la seqüència tipus ST101, el pulsotip B a la ST 17, el pulsotip C a la ST1233, el pulsotip D a la ST14 i els diferents subtipus E a ST405 (Taula 16). De les 11 soques seleccionades, doncs, es va observar que les soques pertanyents a un mateix pulsotip presentaven la mateixa dotació al·lèlica per als 7 gens *housekeeping*, és a dir, vàrem observar una perfecte correlació entre el MLST i el PFGE.

En aquest estudi es va descriure com a nova seqüència tipus, la ST1233 que és una variant de la ST540, diferenciant-se per un sol locus, el gen *gapA*. La soca de *K. pneumoniae* ST1233 es va aïllar de la mostra urinària d'un pacient de 70 anys amb una infecció del tracte urinari (ITU) a l'Hospital de Mataró. Com que la soca es va aïllar abans de les 48 hores d'ingrés, l'origen de la soca es va

considerar relacionat amb l'assistència socio sanitària. Aquest pacient havia rebut prèviament fluoroquinolones (ciprofloxacina) per a tractar la ITU.

Pel fet que diferents subtipus d'un mateix pulsotip pertanyien a la mateixa ST, es va arribar a la conclusió que la resta de soques d'aquells pulsotips pertanyien al mateix ST (Figura 41 i 43).

Taula 16. Al·lels dels gens *housekeeping* de les soques seleccionades per l'estudi del MLST.

Pulsotip	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	ST*
A ₁	2	6	1	5	4	1	6	101
A ₂	2	6	1	5	4	1	6	101
A ₃	2	6	1	5	4	1	6	101
B	2	1	1	1	4	4	4	17
C	1	1	71	1	3	3	18	1233
D	1	6	1	1	1	1	1	14
E ₅	2	1	62	3	10	4	110	405
E ₁₂	2	1	62	3	10	4	110	405
E ₁₅	2	1	62	3	10	4	110	405
E ₁₇	2	1	62	3	10	4	110	405
E ₁₈	2	1	62	3	10	4	110	405

*ST (seqüència tipus)

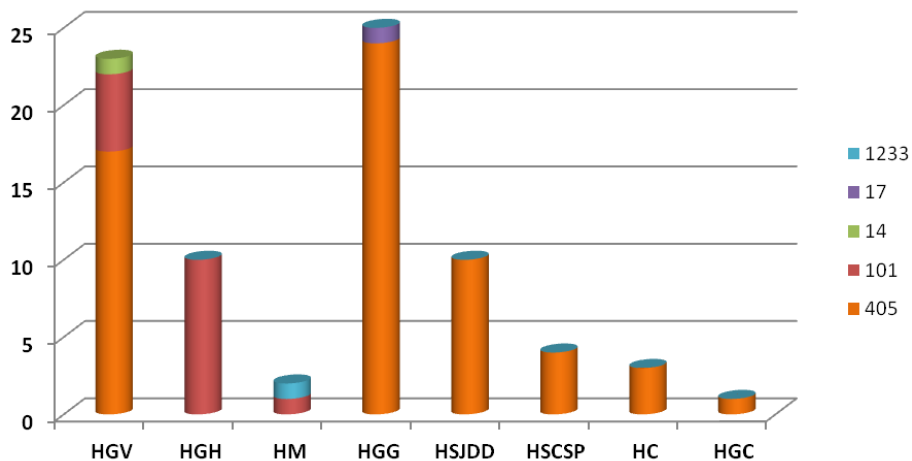


Figura 43. Distribució de les diferents ST en els hospitals on es van aïllar soques de *Klebsiella pneumoniae* productores de la carbapenemasa OXA-48.

4.4.3. Distribució temporal dels casos detectats.

A l'estudiar la distribució temporal dels casos, s'observà que alguns hospitals detectaren casos al llarg de tot el període d'estudi mentre que en d'altres s'observà una certa acumulació en períodes concrets. Als hospitals de Calella(HC), General de Catalunya (HGC), de Mataró (HM) i al nostre (HSCSP) només es varen aïllar casos puntuals, destacant que la soca amb la nova seqüència tipus, la ST1233, provenia de l'Hospitatl de Mataró. Al HC hi van haver tres casos repartits entre els mesos de gener, setembre i octubre que corresponien a soques de la ST405 i dels subtipus E₈, E₉ i E₁₅, al HGC hi va haver un sol cas al febrer, de la ST405 i subtipus E₅, al HM hi van haver dos casos, el de la ST1233 al gener amb el pulsotip C i el del juliol, de la ST101 i subtipus A₃, i, finalment, al HSCSP van haver quatre casos, del juliol a l'octubre (un per mes), de la ST405 i del subtipus E₅, E₆, E₁₁, E₁₆; però només tres d'aquests casos eren d'origen nosocomial i no estaven relacionats entre ells, degut a que els pacients es trobaven ingressats en diferents serveis de l'hospital.

A part, en un parell d'hospitals el nombre de casos fou lleugerament més elevat, 10 casos, i en ambdós centres concentrats en un període de temps (Figura 44 i 45). A l'Hospital de Sant Joan de Deu de Manresa (HSJDD) es van aïllar entre els mesos de maig i desembre, un per mes, exceptuant el mes de juliol que no n'hi va haver cap, a l'agost que n'hi hagueren dos i al novembre tres. Tots els casos pertanyien a la ST405 i al pulsotip E (E₁, E₅, E₆, E₁₂, E₁₃). A l'Hospital General de l'Hospitalet (HGH), els 10 casos eren de la ST101, i excepte un cas, tots eren del subtipus A₂. A més varen aïllar-se, una al mes de gener i la resta entre els mesos d'abril i agost, essent en el mes de juliol el punt més àlgid, amb quatre casos (Figures 44 i 45). En aquest cas és probable que la soca s'establís endèmicament causant petits brots.

Finalment destacarem els dos hospitals amb el nombre més elevat de casos, l'Hospital General de Granollers (HGG) i l'Hospital General de Vic (HGV), amb 25 i 30 casos, respectivament. De l'HGG cal destacar que es van anar aïllant els casos al llarg de tot l'any,excepte al gener, essent el subtipus E₅ el més present, excepte al juny i juliol que es varen aïllar dos casos dels subtipus E₁. Per tant, podem parlar d'una certa endemicitat (Figures 44 i 45). Fou en aquest hospital on s'aïllà la soca de la ST17. Al HGV també es varen anar aïllant diferents casos al llarg de l'any, però en aquest cas el punt àlgid fou durant els mesos de gener i febrer. És en aquest hospital on s'hi descriu la major diversitat de subtipus E (amb 10 subtipus: E₁, E₃, E₄, E₅, E₇, E₁₀, E₁₂, E₁₄, E₁₇ i E₁₈), essent els predominant l'E₁ (29%) i l'E₅(20%). Curiosament també, aquest fou l'únic centre, a més del HGH, on s'aïllaren soques de la ST101. Les soques amb la ST101 van aparèixer als mesos de juliol, agost, octubre i desembre, amb un total de cinc casos procedents d'un centre residencial de la tercera edat. Finalment, la soca amb la ST14 fou aïllada al octubre.

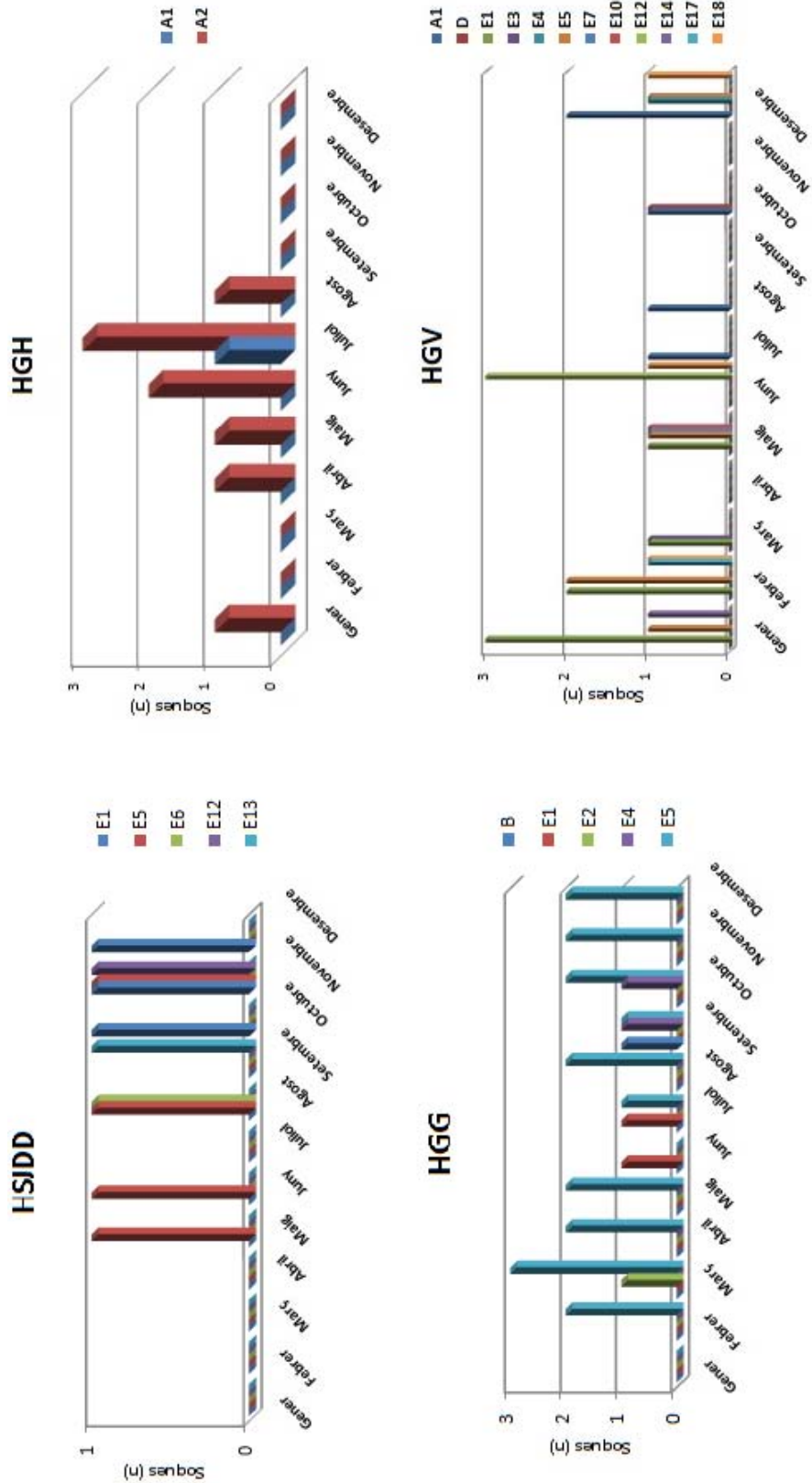


Figura 44. Nombre de soques dels diferents pulsotips (subtipus) aïllades en els hospitals comarcals amb més incidència.

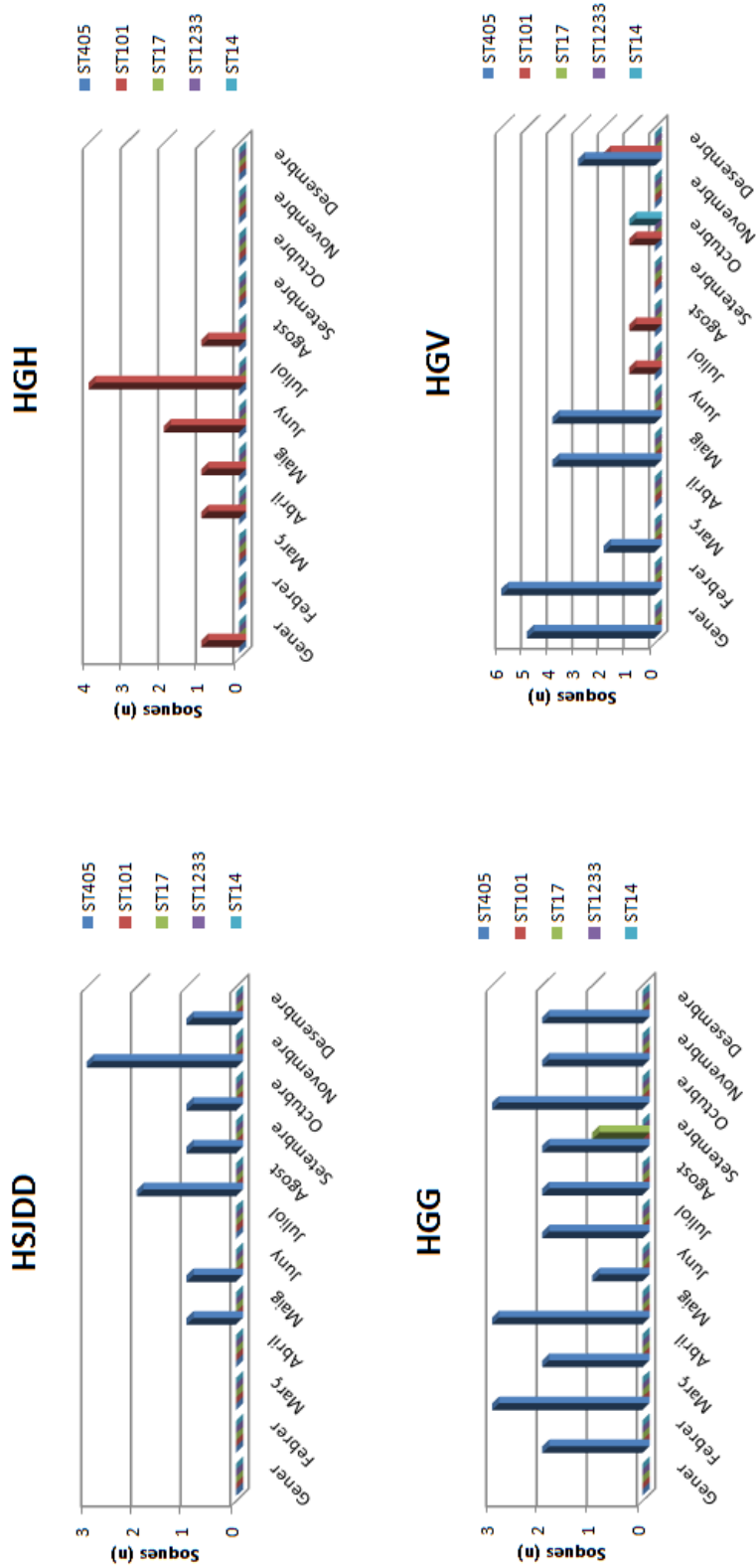


Figura 45. Nombre de soques de les diferents ST aïllades en els hospitals comarcals amb més prevalença.

4.5. Caracterització d'altres gens de resistència a banda de *bla*_{OXA-48}

4.5.1. Betalactàmics

De les 85 soques productores d'OXA-48, 76 (89,41%) coexpressaven el gen *bla*_{CTX-M-15}, 80 (94,1%) el *bla*_{OXA-1} i 73 (85,4%) el *bla*_{TEM-1}. Totes presentaven la penicil·linasa cromosòmica *bla*_{SHV}, pròpia de l'espècie, però 66 (77,6%) expressaven el gen *bla*_{SHV-76}, 17 (20%) el *bla*_{SHV-1}, una (1,1%) el *bla*_{SHV-11} i una (1,1%) el *bla*_{SHV-42}. Cap soca fou portadora de betalactamases adquirides de classe C ni de cap altra de les carbapenemases avaluades de les classes A i B.

La presència d'uns o altres gens de resistència a betalactàmics presentà una certa correlació amb la ST i els pulsotips trobats, tot i que hi ha algunes variacions per pèrdua o guany d'algun gen concret (Figures 46 i 47). La ST101 (Pulsotip A) es caracteritzà perquè les soques presentaven la penicil·linasa cromosòmica *bla*_{SHV-1} i, perquè, totes les soques excepte cinc que no portaven el gen *bla*_{TEM-1}, expressaven tots els gens adquirits que justificaven la resistència a betalactàmics (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{OXA-1}), es a dir, un 68,7% de les soques. Dins de la ST405 (Pulsotip E), totes les soques presentaven la penicil·linasa cromosòmica SHV-76 i el gen *bla*_{OXA-48}, només un 97% presentaven el gen *bla*_{OXA-1}, un 91% el gen *bla*_{CTX-M-15} i un 94% el gen *bla*_{TEM-1}. Cinquanta set soques (86,4%) presentaven els gens *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{TEM-1}, tres soques (4,5%) presentaven els gens *bla*_{OXA-1} i *bla*_{TEM-1}, tres soques (4,5%) presentaven el gen *bla*_{OXA-1}, dos soques (3%) presentaven els gens *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{TEM-1}, i només una soca (1,5%) presentava els gens *bla*_{OXA-1} i *bla*_{CTX-M-15}.

Finalment, cal subratllar que les seqüències tipus minoritàries, la ST17 (Pulsotip B), la ST1233 (Pulsotip C) i la ST14 (Pulsotip D) no presentaven cap gen *bla* associat al gen *bla*_{OXA-48}. La penicil·linasa cromosòmica en ST14 fou SHV-1, en ST17 fou SHV-11 i ST1233 portava el gen *bla*_{SHV-42}. La SHV-42 està classificada com a BLEA, és a dir, dins el grup 2e en la classificació de Bush (www.lahey.org/studies/).

4.5.2. Aminoglicòsids

De les 85 soques estudiades, 81 soques es mostraren resistents a un o altre aminoglicòsid, les excepcions són les tres soques amb seqüència tipus única (ST14, ST17 i ST1233) i una soca del subtipus E₁. El fenotip majoritari, va ser la resistència a kanamicina, tobramicina i gentamicina (KTG), en un 69% de les soques resistents. Tanmateix la resistència a netilmicina només es manifestà en 16 casos i en quatre la de l'amicacina, tots de la ST405 (Taula 17). Aquestes resistències s'expliquen per la presència dels gens *aac(3')-IIa* (KTGN), *aac(6')-Ib* (KTAN) i *aph(3')-Ia* (KNm). Si comparem les dos ST resistents, ST101 i ST405, podem observar que en la ST101 hi ha a més dels enzims indicats anteriorment; l'enzim *aph(3')-Ia* que justifica una resistència d'alt nivell (9 mm) a la neomicina, dues soques amb el gen *aac(2')-Ia* (GTN) i una amb *ant(2'')-Ia* (KTG). En canvi, en el cas de ST405, la majoria de les soques (81,5%) presenten els dos enzims: *aac(3')-IIa* i *aac(6')-Ib* (KTGAN), tanmateix hi havia set soques que només presentaven l'enzim *aac(3')-IIa* (quatre del E₁ i tres del E₅), i cinc soques amb només l'enzim *aac(6')-Ib* (dues E₁ i una dels subtipus E₃, E₆ i E₁₀).

A més a més, d'aquestes diferències en el genotip també hi ha diferències en el fenotip. La presència dels mateixos enzims confereixen fenotips diferents. Tanmateix no hi ha hagut cap soca que el fenotip no concordi amb el genotip.

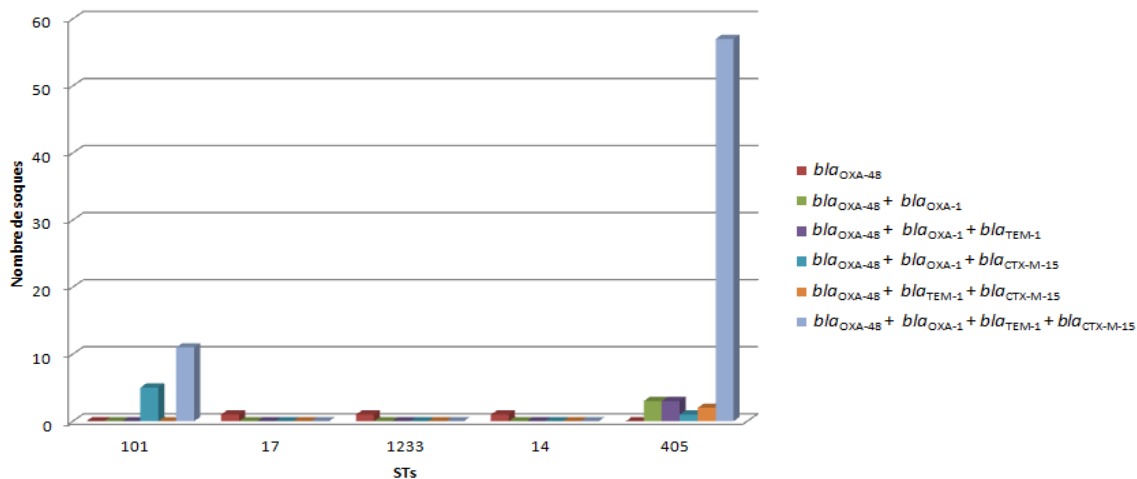


Figura 46. Nombre de soques amb gens *bla* associats a *bla*_{OXA-48}. Totes les soques presentaven la SHV cromosòmica d'espècie (SHV-1, SHV-11, SHV-42 o SHV-76).

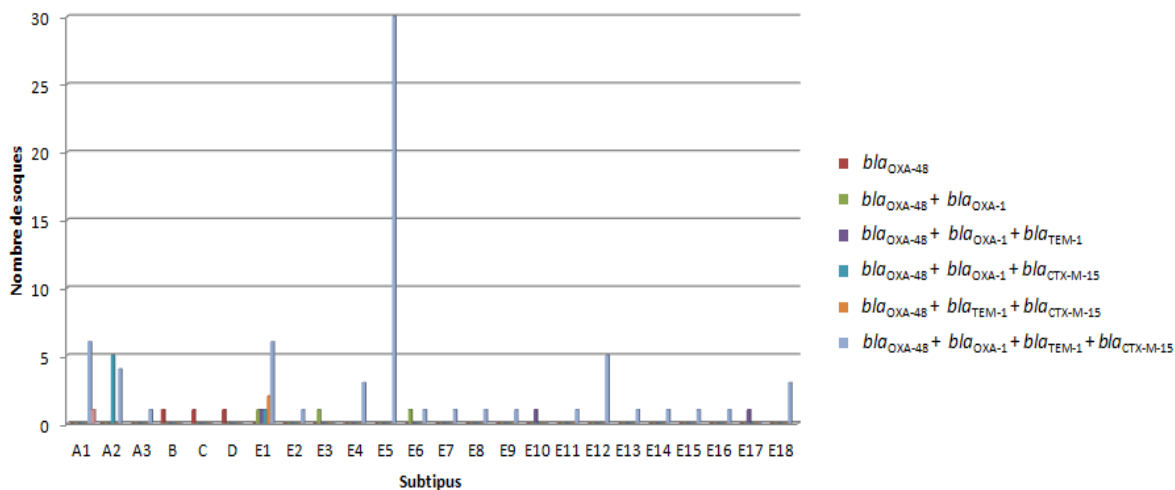


Figura 47. Nombre de soques amb gens *bla* associats a *bla*_{OXA-48} dels diferents subpulsotips. Totes les soques presentaven la SHV cromosòmica d'espècie (SHV-1, SHV-11, SHV-42 o SHV-76).

Taula 17. Fenotip de resistència a aminoglicòsids observat i el seu genotip de les 85 soques productores d'OXA-48.

ST	Subpulsotip (n)	Fenotip de resistència a aminoglicòsids (n)	Gens detectats per PCR
101	A ₁ (6)	KTG (4)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
		KTGNm (2)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib, aph(3')-Ia</i>
	A ₂ (9)	KTG (8)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i> (6) <i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib, aac(2')-Ia</i> (1) <i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib, ant(2'')-Ia, aac(2')-Ia</i> (1)
		KTGNm (1)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib, aph(3')-Ia</i>
A ₃ (1)	KTGNm	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib, aph(3')-Ia</i>	
405	E ₁ (11)	G (2)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i> (1) <i>aac(3')-IIa</i> (1)
		KT (1)	<i>aac(6')-Ib</i>
		KTG (4)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i> (3) <i>aac(3')-IIa</i> (1)
		KTGN (2)	<i>aac(3')-IIa</i>
		KTN (1)	<i>aac(6')-Ib</i>
		E ₂ (1)	KTG
	E ₃ (1)	KTG	<i>aac(6')-Ib</i>
	E ₄ (3)	KTGN (2)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
		KTG (1)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₅ (30)	KTAGN (1)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
		KTG (25)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i> (22)/ <i>aac(3')-IIa</i> (3)
		KTGN (4)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₆ (2)	KTA (1)	<i>aac(6')-Ib</i>
		KT (1)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₇ (1)	KTG	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₈ (1)	KTG	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₉ (1)	KTG	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₁₀ (1)	KTGN	<i>aac(6')-Ib</i>
	E ₁₁ (1)	KTAN	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
	E ₁₂ (5)	KTGN	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>
KTG (4)		<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
E ₁₃ (1)	KTG	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
E ₁₄ (1)	KTG	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
E ₁₅ (1)	KTG	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
E ₁₆ (1)	KTGN	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
E ₁₇ (1)	KTAN	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
E ₁₈ (3)	KTG (2)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	
	KTGN (1)	<i>aac(3')-IIa, aac(6')-Ib</i>	

K (kanamicina), T (tobramicina), G (gentamicina), A (amicacina), N (netilmicina), Nm (neomicina).

Les soques dels pulsotips B, C i D i una del E₁, eren sensibles als aminoglicòsids i no presentaven cap gen codificant d'AME.

4.5.3. Quinolones

Dels diferents gens de resistència a quinolones adquirits (*qnr*, *qepA*, etc.) estudiats, només vàrem detectar en 74 soques (88,23%) el gen *qnrB* i en una soca el *qnrB* amb el *qnrS* (Taula 18). D'aquestes 75 soques, 66 soques (88%) eren resistents a l'àcid nalidíxic i a la ciprofloxacina; una soca (1,3%) era només resistent a l'àcid nalidíxic, i 8 soques (10,6%) eren sensibles tant a l'àcid nalidíxic com a la ciprofloxacina (Taula 18).

Taula 18. Fenotip de resistència observat i gens de resistència adquirida que intervenen en la resistència a quinolones (PMQR) en les 85 soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48.

<i>Qnr</i>	Resistència a Nal i Cip (n)	Pulsotips (n)
<i>qnrB+</i>	NalCip R (65)	A ₁ (5), A ₂ (4), A ₃ (1) E ₁ (6), E ₂ (1), E ₃ (1), E ₄ (3), E ₅ (27), E ₆ (2), E ₇ (1), E ₈ (1), E ₉ (1), E ₁₀ (1), E ₁₁ (1), E ₁₂ (5), E ₁₄ (1), E ₁₅ (1), E ₁₆ (1), E ₁₈ (2)
	Nal R (1)	E ₁ (1)
	NalCip S (8)	E ₁ (3), E ₅ (2), E ₁₃ (1), E ₁₇ (1), E ₁₈ (1)
<i>qnrB+</i> i <i>qnrS+</i>	NalCip R (1)	A ₁ (1)
<i>qnr negatives</i>	NalCip R (5)	A ₂ (5)
	Nal R (1)	E ₁ (1)
	NalCip S (4)	B, C, D, E ₅ (1)
Nal (àcid nalidíxic), Cip (ciprofloxacina)		

4.5.4. Multiresistència en les soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48

Així doncs, a manera de resum podríem dir que totes les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48, llevat les de les ST14, ST17 i ST1233, van resultar ser multiresistents per adquisició de diferents gens. El gen *bla*_{OXA-48} semblava doncs que anava associat a *bla*_{OXA-1}, *aac(3')-IIa* i *aac(6')-Ib* i al *qnrB*. A més, en la majoria de casos també es va adquirir els gens *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{TEM-1} (Taula 19).

Taula 19.A. Gens de resistència a betalactàmics, aminoglicòsids i quinolones presents en les 85 soques de *Klebsiella pneumoniae* productores de l'OXA-48.

ST	Pulso tip	n	Percentatge de gens de resistència	AME	Qnr
ST101	A(A ₁)	6	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} (100%)	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib (66,6%) <i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aph</i> (3')-Ia (33,3%)	<i>qnrB</i> (100), <i>qnrS</i> (50)
ST101	A(A ₂)	9	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} (55,5%) <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} (44,4%)	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib (66,6%) <i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (2')-Ia (11,1%) <i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>ant</i> (2')-Ia, <i>aac</i> (2')-Ia (11,1%) <i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aph</i> (3')-Ia (11,1%)	<i>qnrB</i> (45,5)
ST101	A(A ₃)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aph</i> (3')-Ia	<i>qnrB</i>
ST17	B	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-11}	-	-
ST1233	C	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-42}	-	-
ST14	D	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-1}	-	-

Taula 19.B. Gens de resistència a betalactàmics, aminoglicòsids i quinolones presents en les 85 soques de *Klebsiella pneumoniae* productores de l'OXA-48.

ST	Pulsotip	n	Percentatge de gens de resistència	AME	Qnr
405	E(E ₁)	11	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (9%)	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib (36,3%) <i>aac</i> (3')-IIa (36,3%) <i>aac</i> (6')-Ib (18,1%)	<i>qnrB</i> (91%)
			<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (9%)		
			<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (9%)		
			<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (18%)		
			<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (55%)		
			<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}		
	E(E ₂)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₃)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₄)	3	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₅)	30	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (100%)	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib (90%) <i>aac</i> (3')-IIa (10%)	<i>qnrB</i> (96%)
	E(E ₆)	2	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (50%) <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (50%)	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib (50%) <i>aac</i> (6')-Ib (50%)	<i>qnrB</i>
	E(E ₇)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₈)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₉)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₁₀)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₁₁)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
	E(E ₁₂)	5	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76} (100%)	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib (100%)	<i>qnrB</i> (100%)
	E(E ₁₃)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>
E(E ₁₄)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>	
E(E ₁₅)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>	
E(E ₁₆)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>	
E(E ₁₇)	1	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>	
E(E ₁₈)	3	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-76}	<i>aac</i> (3')-IIa, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB</i>	

4.6. Caracterització dels plasmidis portadors del gen *bla*_{OXA-48} i dels altres gens *bla* identificats.

Es van seleccionar 37 soques representatives dels diferents pulsotips i subpulsotips i se'ls hi va realitzar la PBRT clàssica^{210,212}. Les 31 soques pertanyents a la ST405, foren positives pel grup d'incompatibilitat IncFIIK, vuit (25,8%) foren positives per CoIE i una (3,2%) fou positiva per IncFIA. Les tres soques de la ST101 foren positives per IncFIIK i CoIE, i dues per a IncR. La soca de la ST1233 només fou positiva per CoIE i, en les soques de les ST14 i ST17 no es va obtenir cap amplificat (Taula 20). En cap de les 37 soques es va detectar el grup d'incompatibilitat IncL/M, que era el descrit fins aleshores a la literatura com a portador del gen *bla*_{OXA-48}. Només quan es va utilitzar la nova parella d'iniciadors (detallats a l'annex III), es va poder amplificar el grup IncL/M en totes les 37 soques, i es va fer extensiu a la resta de soques productores de l'OXA-48 (n= 85).

Finalment, per a discernir entre els grups L i M, es van utilitzar els iniciadors específics per a plasmidis IncL dissenyats per Carattoli *et al.*³⁵⁹. En aquest cas, totes les soques (n=85) van ser positives per IncL.

Per tant de les 37 soques estudiades per PBRT podem concloure que totes presentaven un plasmidi IncL, i algunes a més a més portaven plasmidis dels grups d'incompatibilitat FIIK, CoIE, FIA i R. (Taula 20).

Taula 20. Plasmidis presents en 37 soques productores d'OXA-48 amb diferents ST.

ST	Subtipus (n)	Inc (%)
101	A ₁ (1)	L/M, FIIK, CoIE, R
	A ₂ (1)	L/M, FIIK, CoIE, R
	A ₃ (1)	L/M, FIIK, CoIE
17	B(1)	L/M
122	C(1)	L/M, CoIE
14	D(1)	L/M
405	E ₁ (8)	L/M, FIIK (100%) CoIE (50%)
	E ₂ (1)	L/M, FIIK
	E ₃ (1)	L/M, FIIK
	E ₄ (1)	L/M, FIIK
	E ₅ (4)	L/M, FIIK (100%) CoIE (50%)
	E ₆ (1)	L/M, FIIK
	E ₇ (1)	L/M, FIIK
	E ₈ (1)	L/M, FIIK
	E ₉ (1)	L/M, FIIK
	E ₁₀ (1)	L/M, FIIK
	E ₁₁ (1)	L/M, FIIK
	E ₁₂ (2)	L/M, FIIK
	E ₁₃ (1)	L/M, FIIK
	E ₁₄ (1)	L/M, FIIK
	E ₁₅ (1)	L/M, FIIK
	E ₁₆ (1)	L/M, FIIK, F, FIA
	E ₁₇ (1)	L/M, FIIK, CoIE
	E ₁₈ (2)	L/M, FIIK (100%) CoIE (50%)

Per a determinar el tamany del plasmidi Incl portador del gen *bla*_{OXA-48} es va procedir amb les tècniques de transferència i hibridació de les 11 soques amb les quals s'havia determinat la seqüència tipus (Taula 21). Els resultats del PFGE digerit amb l'endonucleasa *S1* i posterior hibridació, van indicar que el gen *bla*_{OXA-48} està situat en un plasmidi del grup d'incompatibilitat Incl d'aproximadament 62 Kb (Figura 48). A més, amb la hibridació del gel de PFGE-*Iceul* amb la sonda *bla*_{OXA-48} es va descartar la presència del gen *bla*_{OXA-48} en el cromosoma bacterià.

Taula 21. Plasmidis presents en un recull de soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48.

Soca	ST/ Pulsotip	Gens <i>bla</i>	Plasmidis (Inc)
CARB115	101/A ₁	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK, CoIE, R
CARB077	101/A ₂	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK, CoIE, R
CARB058	101/A ₃	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK, CoIE
CARB098	17/B	-	L
CARB122	1233/C	-	L, CoIE
CARB117	14/D	-	L
CARB026	405/E ₁₅	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK
CARB130	405/E ₁₂	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK,
CARB056	405/E ₅	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK
CARB044	405/E ₁₇	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK, CoIE
CARB139	405/E ₁₈	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	L, FIIK

Paral·lelament es va voler determinar si el gen *bla*_{CTX-M-15}, gen de la betalactamasa d'espectre ampliat (BLEA) CTX-M-15, causa de diferents brots nosocomials arreu, estava situat en el mateix plasmidi que *bla*_{OXA-48}. Per això es va hibridar la mateixa membrana del gel PFGE-*S1* amb la sonda *bla*_{CTX-M-15} i es va observar que en les soques de la ST101, *bla*_{CTX-M-15} es situava en un plasmidi de 240 Kb mentre que en les soques de la ST405 el gen *bla*_{CTX-M-15} es trobava en un plasmidi d'aproximadament 290 Kb. Segons els resultats obtinguts a la PBRT (Taula 20), el plasmidi possiblement implicat en la difusió de la BLEA CTX-M-15 podria ser del grup d'incompatibilitat FIIK. I així ho demostraren els experiments d'hibridació (Figura 49) que recolzen els resultats descrits en la bibliografia.

Un altre tret per a caracteritzar un plasmidi és determinar la seva freqüència de conjugació. Un plasmidi altament conjugatiu recolza la idea que pot jugar un paper més predominant en la difusió dels gens que porta. La freqüència de conjugació es feu en les mateixes 11 soques. Els experiments de conjugació es van realitzar en medi líquid en totes les soques, excepte les pertanyents a la ST101 on els transconjugants es van obtenir en medi sòlid. La freqüència de conjugació observada va oscil·lar entre $5,06 \times 10^{-7}$ i $1,33 \times 10^{-5}$ (Taula 22).

L'antibiograma dels transconjugants mostrà que només eren resistents a ampicil·lina i a l'associació amoxicil·lina-àcid clavulànic. Una soca fou resistent a piperacil·lina (halos de 12 mm) i una altra a piperacil·lina-tazobactam (halos de 14 mm). Mostrant-se sensibles a la resta d'antibiòtics betalactàmics (cefalosporines, carbapenèmics i monobactams) i a les quinolones (acid nalidíxic i ciprofloxacina). Pel que fa als aminoglicòsids les soques transconjugants foren resistents a la kanamicina, gentamicina i a la neomicina, però no es podia diferenciar si per adquisició dels gens de resistència a aminoglicòsids doncs la soca receptora ja presentava aquest fenotip. Per PCR es va comprovar que totes les soques transconjugants presentaven el gen *bla*_{OXA-48} i el plasmidi Incl. Amb

aquests resultats també podem observar que el plasmidi IncFIIK no conjuga al mateix temps que IncL, per tant *in vitro* ambdós mecanismes de resistència es difonen per separat. Per tant, a nivell de conclusió, direm que el gen *bla*_{OXA-48} en *K. pneumoniae* estava situat en un plasmidi del grup d'incompatibilitat IncL d'aproximadament 62 Kb. Si el plasmidi estava conservat també era interessant veure si es mantenia conservat l'entorn del gen.

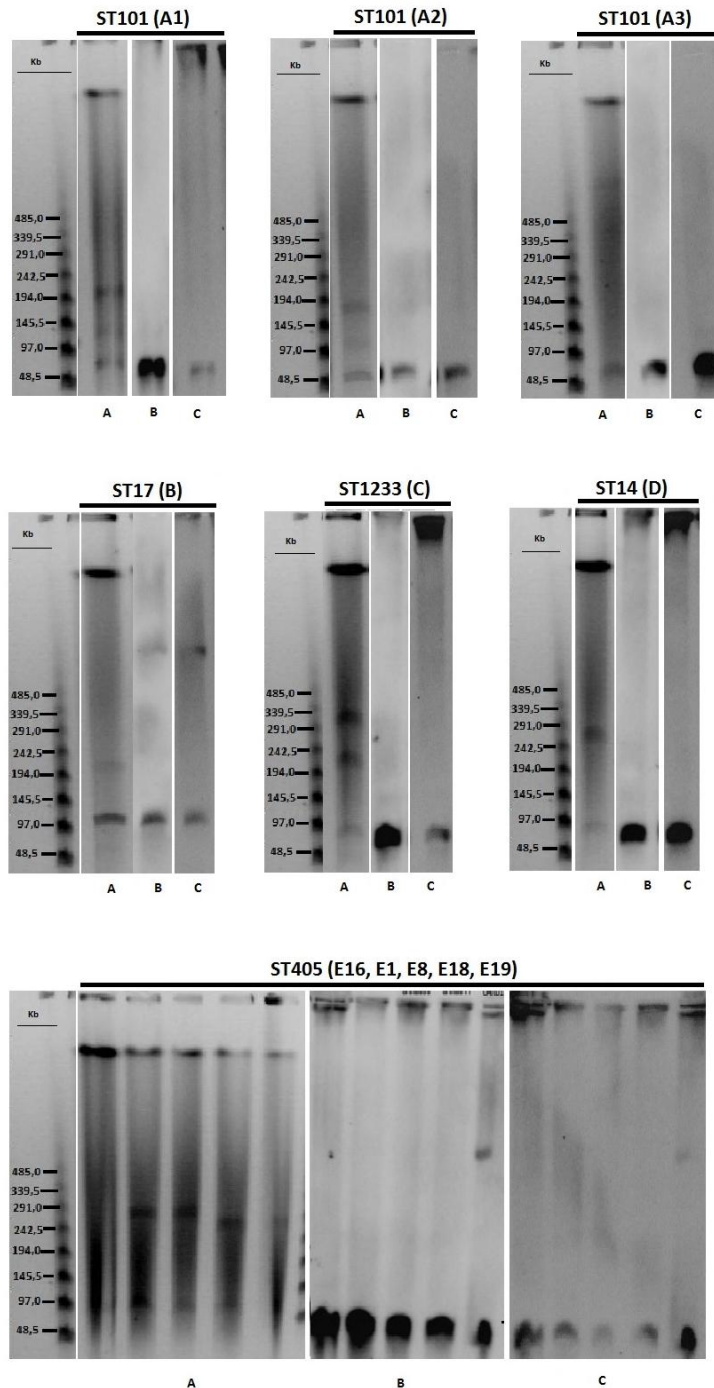


Figura 48. PFGE digerit amb l'endonucleasa *S1* (A), hibridat amb la sonda del replicó IncL/M (B) i sonda del gen *bla*_{OXA-48} (C).

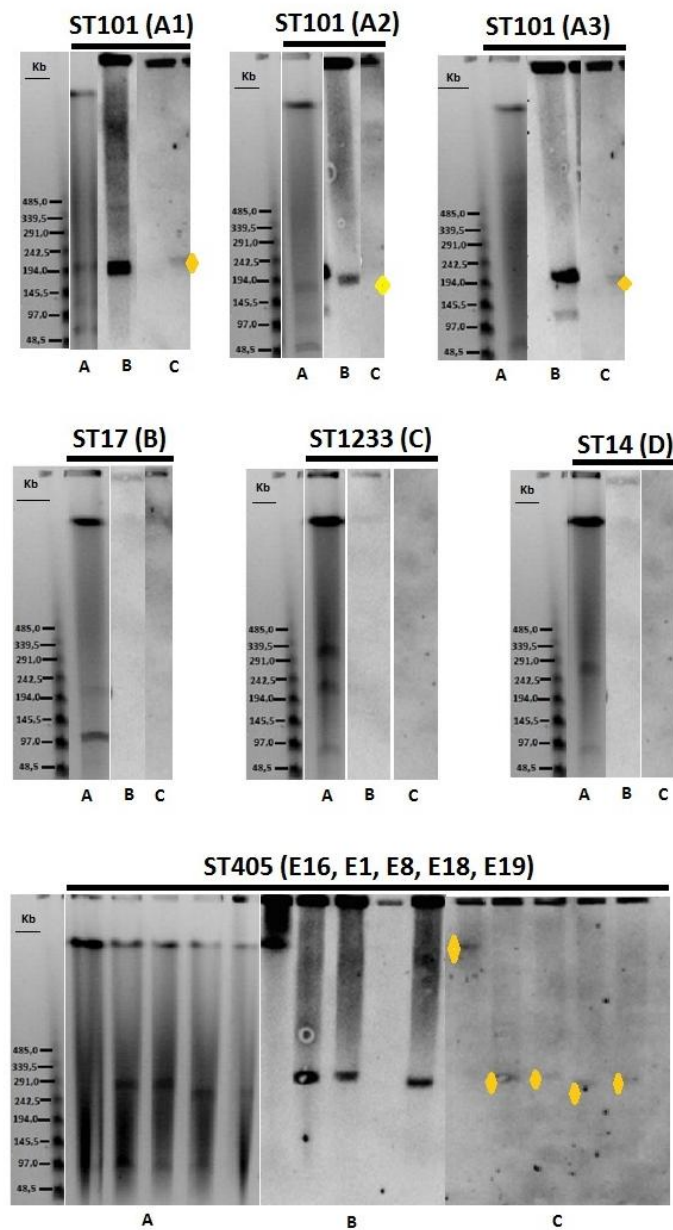


Figura 49. Imatges del revelat de una membrana procedent d'un gel de PFGE digerit amb l'endonucleasa S1 (A), amb 11 soques de les diferents STs hibridades amb sonda del gen *bla*_{CTX-M-15} (B) i sonda del replicó IncFIIK (C) destacat en groc.

Taula 22. Freqüència de conjugació del plasmidi IncI portador de *bla*_{OXA-48}.

ST (n)	Freqüència de conjugació
405 (5)	$5,06 \times 10^{-7}$ - $1,32 \times 10^{-5}$
101 (3)	$2,53 \times 10^{-7}$ - $2,05 \times 10^{-5}$
17 (1)	$2,22 \times 10^{-5}$
14 (1)	$1,73 \times 10^{-6}$
1233 (1)	$1,44 \times 10^{-5}$

4.7. Entorn genètic del gen *bla*_{OXA-48}

De les 85 soques productores d'OXA-48, els resultats de la PCR i la posterior seqüenciació van donar que hi havia dos entorns genètics al voltant del gen *bla*_{OXA-48}, el del transposó Tn1999, present en set soques de la ST405 i el del transposó Tn1999.2, present en la resta de soques (Figura 50).

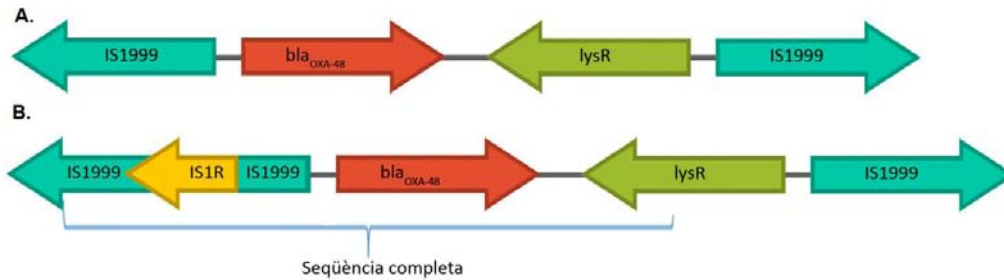


Figura 50. Esquema dels transposons Tn1999 (A) i Tn1999.2 (B)³⁴⁸. En blau s'assenyala la seqüència completa realitzada sobre 11 soques d'aquest estudi (Nombre d'Accés del Genbank: KT265173, KT265174, KT265175, KT265176, KT265177, KT265178, KT265179, KT265180, KT265181, KT265182 i KT265183).

En les 11 soques, es va obtenir una seqüència única, compresa entre la IS1999, que es troba *upstream* del gen *bla*_{OXA-48}, i el gen *lysR*, situat *downstream* del gen *bla*_{OXA-48}. Aquestes 11 seqüències es van introduir a la base de dades del Genbank, amb els següents nombres d'accés: KT265173, KT265174, KT265175, KT265176, KT265177, KT265178, KT265179, KT265180, KT265181, KT265182, KT265183 (Figura 50).

Analitzant les seqüències completes es van identificar les regions reguladores del gen *bla*_{OXA-48}, la -35 (TGGCAG) i la -10 (TAGGAT), situades a l'inici de la IS1999, i en el cas concret de la regió -35 es va trobar formant part de l'IRR (*inverted repeat right*) de la IS1R. També es van identificar les seqüències repetides invertides (*inverted repeat regions*) de la IS1R: la IRR (*inverted repeat right*) i la IRL (*inverted repeat left*), situades a l'inici i al final de la IS1R, tal i com es pot observar en l'annex IX. Finalment, es van identificar les dues parts codificants que conformen la IS1R: InsA i InsB, i es va observar que estaven solapades (Annex IX).

Totes, excepte la seqüència de la soca CARB010 (KT265173), varen presentar un 100% d'homologia entre elles, un 100% d'homologia amb la seqüència del Tn1999.2 del plasmidi pKpn-E1.Nr7 (KM406491.1) i un 99% amb la dels plasmidis de les soques de *K. pneumoniae* E71T (KC335143.1) i la del plasmidi pKPoxa-48N1 (KC757416.2). En ambdós casos aquesta diferència de l'1% era deguda al canvi d'una timina (T) per una guanina (G) en la posició 911. L'entorn del gen *bla*_{OXA-48} de la soca CARB010 en canvi, presentava un 99% d'homologia amb la resta de seqüències de les soques estudiades i amb la seqüència del Tn1999.2 del plasmidi pKpn-E1.Nr7 (KM406491.1); i un 100% d'homologia amb la del plasmidi de la soca de *K. pneumoniae* E71T (KC335143.1) i amb la del plasmidi pKPoxa-48N1 (KC757416.2) degut a que comptava amb al timidina a la posició 911 de la seqüència d'ADN.

4.8. Core genome MultiLocus Sequence Typing (cgMLST o MLST+)

Aquesta part de l'estudi va ser realitzada a la University Medical Center Groningen (UMCG) sota la direcció del Prof. Alex Friederich, amb la col·laboració de la Dra. Elisenda Miró. Aquest estudi constà de dues parts: una, l'epidemiològica on es volia comparar els resultats obtinguts per PFGE i MLST amb els del cgMLST; i l'altra, aprofitar les dades de la seqüenciació massiva per a definir els gens de resistència adquirida a diferents antimicrobians.

El cgMLST es realitzà en 37 de les 85 soques de *K. pneumoniae* portadores d'OXA-48. La selecció es feu en funció de cada subtipus dels cinc pulsotips trobats i valorant també les diferències, en un mateix pulsotip, sobre el perfil de sensibilitat.

En l'anàlisi es van comparar les 37 seqüències genòmiques amb la soca índex de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Aquesta soca la varen escollir com a soca índex el grup del Prof. A. Friederich perquè el seu genoma és el que presentava una més gran homologia amb la seqüència consens obtinguda a partir de les seqüències genòmiques d'un gran nombre de soques de *K. pneumoniae* estudiades prèviament. A més a més, en el genoma d'aquesta soca índex hi ha un gran nombre de gens nomenats, fet que ens permet després identificar i estudiar la presència d'aquests gens. Al fer la comparació varem obtenir que entre les 37 soques i la soca índex hi havia 2.641 gens comuns. Al descartar aquells gens que estaven sol·lapats i aquells que no estaven nomenats varem restar 2.284 gens. Després varem decidir seleccionar aquells gens que estiguessin presents en la soca índex i en alguna de les 37 soques, i ens vàrem quedar amb 2.049 gens. I, d'aquests, finalment vàrem descartar aquells gens que tenien una homologia nucleotídica del 100% entre ells, quedant-nos amb 1.925 gens. Així doncs, vàrem establir la relació clonal i filogenètica entre les 37 soques comparant 1.925 gens.

Els resultats d'aquesta comparació mostraven l'existència d'una elevada variabilitat genètica (Figura 51). De fet només en quatre casos vàrem descriure parelles de soques idèntiques. Tanmateix aquesta diversitat es podia agrupar, tenint en compte el número de gens diferents entre les soques. Les 31 soques del pulsotip E, ST405, presentaren entre elles d'1 a 10 gens de diferència, agafant com a soca índex la CARB026 que fou la que tingué més homologia amb la *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Lluny de la CARB026 es definiren la resta de les ST. La ST14 mostrà 3.332 gens de diferència amb la soca CARB026, la ST101 d'entre 1.765 i 1.675 (depenen del subtipus), la ST17 1.718 gens i la ST1233 1.702 gens. Entre les tres soques pertanyents al ST101 es van observar 56 gens diferents entre el subtipus A3 i A1, i 13 gens entre A2 i A1 (Figura 51).

Tal com hem dit anteriorment, entre les soques del subtipus E s'observà que per cgMLST hi havia quatre parelles de soques idèntiques (Figura 52). Dues d'aquestes parelles també estaven relacionades per mitjà del PFGE i de les dades epidemiològiques, doncs, una parella pertany al subtipus E₁₈ i ambdues soques foren aïllades a l'Hospital General de Vic, i l'altra la formen dues soques del subpulsotip E₁ aïllades a l'Hospital General de Vic. Però després teniem dues parelles, idèntiques per cgMLST però no per PFGE. Una parella la formaven una soca del subtipus E₁ i l'altra del subtipus E₁₆, que no compartien ni el mateix genotip ni fenotip pel que fa a les resistències als antimicrobians, a més tampoc hi havia dades clíniques que recolzessin aquesta situació, com per exemple que una va ser aïllada al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i l'altre al Hospital de Sant Joan

de Déu de Manresa. L'altra parella estava formada per una soca del subtipus E₁₂ i l'altra del subtipus E₁₃, que compartien el mateix fenotip i els mateixos gens de resistència adquirida, i es varen aïllar en el mateix hospital, Hospital de Sant Joan de Déu de Manresa, però que en el patró de bandes del PFGE hi havia dues bandes de diferència.

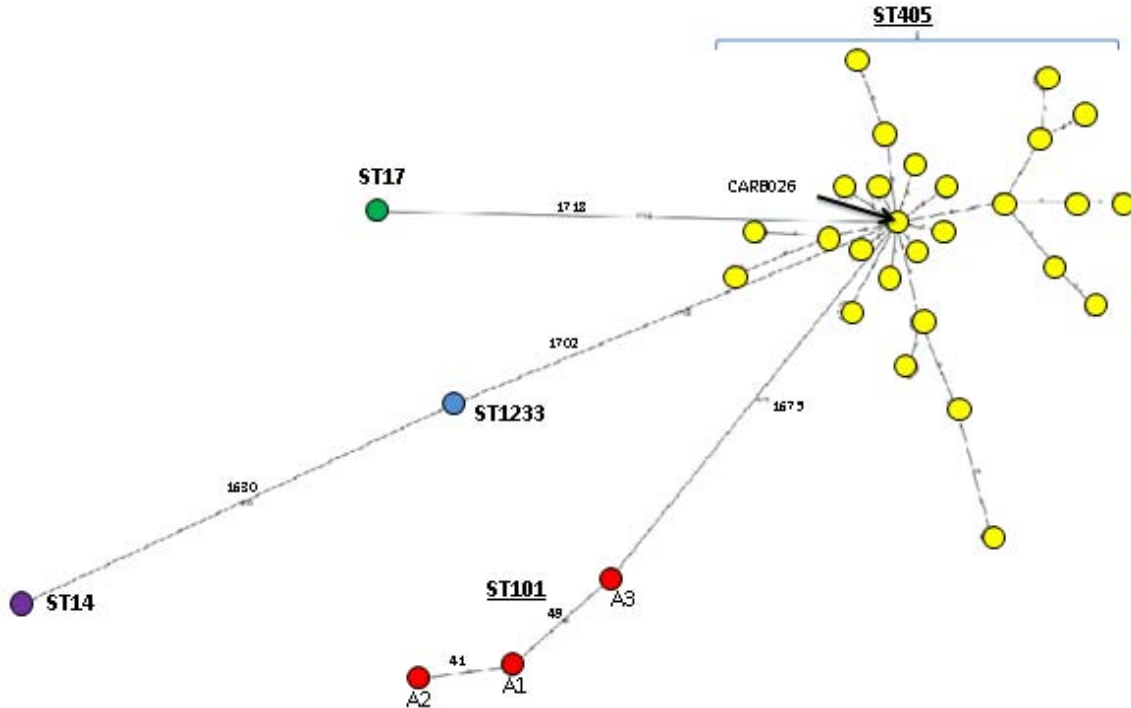


Figura 51. Dendrograma de la relació filogenètica entre 37 soques de *Klebsiella pneumoniae* productores d'OXA-48, obtingut per cgMLST.

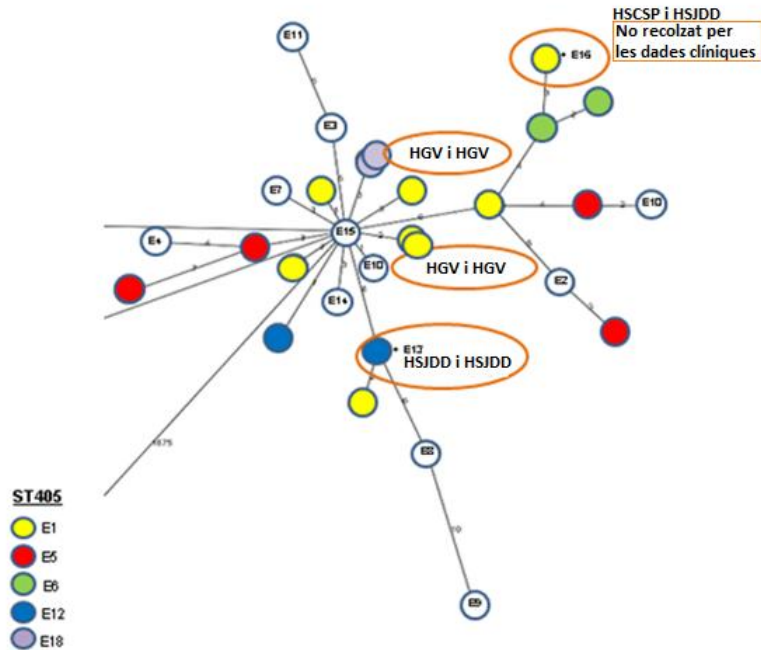


Figura 52. Dendrograma dels diferents subpulsotips del pulsotip E. Tot i que no s'observa en l'esquema la soca del subtipus E₁₃ es troba en la mateixa posició que la soca de subtipus E₁₂.

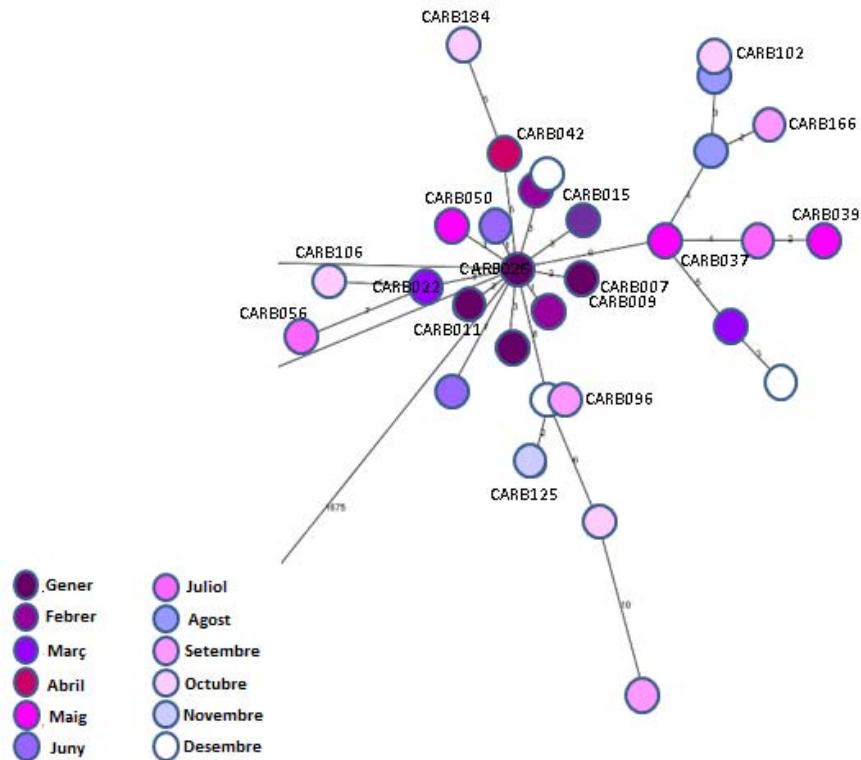


Figura 53. Distribució temporal dels diferents subpulstips del pulstip E al llarg de l'estudi.

Amb la tècnica de cgMLST vàrem voler valorar si existia una relació entre la distribució temporal dels subtipus E i els canvis evolutius (Figura 53). I, efectivament, en el dendrograma es pot observar com les soques aïllades al gener están al centre de la figura mentre que les del novembre cap als extrems. El mes de desembre semblava una excepció. De les tres soques aïllades al desembre, només una estava a l'extrem del dendrograma.

4.9. PlasmidFinder

Els resultats de la pujada de les seqüències obtingudes per WGS al web PlasmidFinder estan detallats a la taula 23. L'avantatge, en aquest cas, és que tenim, no només el grup d'incompatibilitat sinó també, el plasmidi amb el qual hi ha l'homologia més elevada dins del mateix grup. Els resultats mostraren que totes les soques presentaren els plasmidis L/M, FIB i FII, excepte un cas en que no es va detectar el grup L/M (CARB039). En dos casos (ST101; A₁ i A₂) s'identificà el grup R i en dos casos més el grup HI1B (ST405; E₄ i E₅). Al comparar-ho amb els resultats obtinguts amb la PBRT vàrem observar que els grups FIB, FII i HI1B no s'havien pogut detectar per la tècnica convencional. El cas del grup IncFII es va resoldre utilitzant iniciadors específics per a FIIK. En canvi PlasmidFinder no va detectar el grup ColE ni el grup L/M en una soca.

Quan mirem la relació evolutiva dels plasmidis en les soques del pulstip E s'observa que tenien els mateixos plasmidis, excepte les soques CARB022, CARB056 i CARB106 que presentaven també un plasmidi del grup FIB però d'origens diferents. A més, les soques CARB056 i CARB106 havien adquirit el plasmidi HI1B (Figura 54).

Taula 23. Perfil plasmídic obtingut de la WGS de les 37 soques seleccionades.

MLST	PFGE	Seqüenciació massiva	PBRT
101	A ₁ , A ₂	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FIB (PKPHS1) (95,54); FII (96,83); R (100)	L/M, R, ColE
	A ₃	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FII (96,83)	L/M, ColE
17	B	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FIB (Mar) (99,77)	L/M
1233	C	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FIB (Mar) (99,77)	L/M, ColE
14	D	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93)	L/M
405	E ₁ (7), E ₂ , E ₃ , E ₅ (3), E ₆ (2), E ₇ , E ₉ , E ₁₂ (2), E ₁₃ , E ₁₅ , E ₁₈ (2)	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FII (K) (95,95)	L/M
	E ₁ , E ₈ , E ₁₄ , E ₁₇	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FII (K) (95,95)	L/M, ColE
	E ₄	L/M (pOXA-48) (100); FIB (Mar) (100); FIB (K) (98,93); FIB (PKPHS1) (95,36); FII (K) (95,95); HI1B (99,47)	L/M
	E ₅	L/M (pOXA-48) (100); FIB (Mar) (100); FIB (K) (98,93); FII (K) (95,95); HI1B (99,47)	L/M
	E ₁₀	FIB (K) (98,93); FII (K) (95,95)	L/M
	E ₁₁	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FIB (PKPHS1) (96,01); FII (K) (95,95)	L/M
	E ₁₆	L/M (pOXA-48) (100); FIB (K) (98,93); FII (K) (95,95)	L/M, FIA, F

Entre parèntesi el nom del plasmidi amb qui més homologia mostra la nostra seqüència i el percentatge d'homologia. Ressaltat en verd les discordàncies entre PlasmidFinder i PBRT.

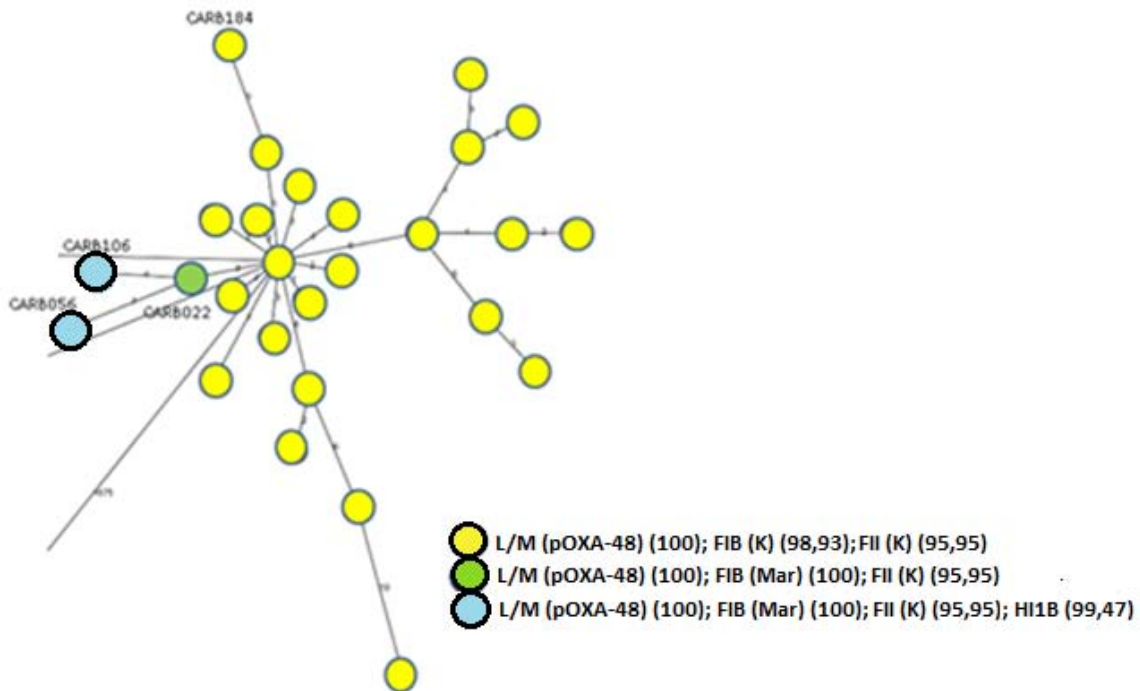


Figura 54. Dendrograma dels diferents subpulsotips del pulsotip E i la relació amb els diferents plasmidis detectats. Entre parèntesi el nom del plasmidi amb qui més homologia mostra la nostra seqüència i el percentatge d'homologia.

Per a diferenciar entre IncL i IncM, utilitzant els resultats de la WGS, es van estudiar els gens *excA*, *traX* i *traY*. En la comparació es va trobar que els tres gens eren presents en 35 de les 37 soques. Una d'aquestes dues soques negatives, havia donat negatiu per IncL/M al PlasmidFinder. En les 35 soques on es van detectar els gens, aquests mostraren una homologia del 100% amb la seqüència aminoacídica dels plasmidis pOXA-48 i pKPOXA-48N1, i d'un 99% amb el plasmidi pKpn-E1.Nr7.

4.10. ResFinder

Els resultats de pujar les seqüències obtingudes per WGS al web del ResFinder mostren una elevada concordància amb els mètodes convencionals, amb l'afegit que es va poder determinar la presència dels gens *strA/strB* que confereixen resistència a l'estreptomicina, dels gens *oqxA/oqxB* relacionats amb la permeabilitat cel·lular, dels gens *drfA* i *sul2* (resistència al trimetoprim/sulfametoxazol), *fosA* (fosfomicina), *catB3* (cloranfenicol), *tet(A)* i *tet(D)*(tetraciclina) (Taula 24).

Una dada a resaltar és que la presència d'aquests gens de resistència van en concordança amb els subtipus de PFGE trobats. Per altra banda, s'han trobat discrepàncies amb els resultats obtinguts per tècniques convencionals, que s'han re-comprovat, no només repetint la PCR sinó també amb tècniques d'hibridació (Taula 25). Els problemes han succeït principalment entre la presència i absència en sis soques de l'oxacil·linasa OXA-1 i la BLEA CTX-M-15. Un cas reflecteix la discrepància amb la presència i absència dels gens *qnrB* i *qnrS*.

Taula 24.A. Resultat de la ResFinder.

MLST	PFGE (n)	OXA-1	TEM-1B	CTX-M-15	Gens AME	Qnr	Altres resistències
101	A ₁	(100)	(100)	(100)	<i>aac(6)-Ib-cr</i> (100); <i>strA</i> (99,88); <i>strB</i> (99,88); <i>aac(3)-Ila</i> (99,88); <i>aph(3)-Ia</i> (100)	-	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>sul2</i> (100); <i>tet(D)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	A ₂	(100)	(100)	(100)	<i>aac(6)-Ib-cr</i> (100); <i>strA</i> (99,88); <i>strB</i> (99,88); <i>aac(3)-Ila</i> (99,88)	-	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>sul2</i> (100); <i>tet(D)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	A ₃	(100)	(100)	(100)	<i>aac(6)-Ib-cr</i> (100); <i>strA</i> (99,88); <i>strB</i> (99,88); <i>aac(3)-Ila</i> (99,88); <i>aph(3)-Ia</i> (100)	<i>qnrB1</i> (100)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(D)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
405	E ₁ (2)	-	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81); <i>sul2</i> (100)
	E ₁	-	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81); <i>sul2</i> (100)
	E ₁ (2)	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(A)</i> (100)
	E ₁	-	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100)
	E ₁	(100)	-	-	<i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>catB3</i> (100)
	E ₁	(100)	-	-	<i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₂	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₃	(100)	-	-	<i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₄	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₅ (3)	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)
E ₅	-	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100)	
E ₆	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)	
E ₆	(100)	-	-	<i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)	
E ₇	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100); <i>strB</i> (100); <i>aac(3)-Ila</i> (99,77); <i>aac(6)-Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>sul2</i> (100); <i>tet(A)</i> (100); <i>catB3</i> (100)	

Les seqüències tipus ST14, ST17 i ST1233, no mostraren resistències associades. En tots els casos hi havia la presència de la bomba d'eflux OqxA/B.

Taula 24.B. Resultat de la ResFinder.

MLST	PFGE (n)	OXA-1	TEM-1B	CTX-M-15	Gens AME	Qnr	Altres resistències
405	E ₈	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₉	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₀	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₁	(100)	(100)	-	<i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>tet</i> (A) (100), <i>catB3</i> (100)
	E ₁₂ (2)	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₃	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₄	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₅	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₆	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₇	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)
	E ₁₈ (2)	(100)	(100)	(100)	<i>strA</i> (100)/ <i>strB</i> (100) ; <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> (99,77); <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> (100)	<i>qnrB66</i> (99,07)	<i>dfrA14</i> (99,59); <i>fosA</i> (98,81) ; <i>sul2</i> (100); <i>tet</i> (A) (100); <i>catB3</i> (100)

Les seqüències tipus ST14, ST17 i ST1233, no mostraren resistències associades. En tots els casos hi havia la presència de la bomba d'eflux OqxA/B.

Taula 25. Discrepàncies entre els resultats dels WGS i els de PCR o hibridació.

ST	Soca	Resultat WGS	Resultat (PCR / hibridació)
101	CARB115	qnrB ⁻ , qnrS ⁻	qnrB+ (PCR) qnrS+(PCR)
405	CARB050	OXA-1 ⁻	OXA-1 ⁺ (PCR)
	CARB009	OXA-1 ⁻	OXA-1 ⁺ (PCR)
	CARB056	OXA-1 ⁻	OXA-1 ⁺ (PCR / hibridació)
	CARB039	CTX-M-15 ⁺	CTX-M-15 ⁻ (PCR) ^a
	CARB184	CTX-M-15 ⁻	CTX-M-15 ⁺ (PCR) ^b
	CARB044	CTX-M-15 ⁺	CTX-M-15 ⁻ (PCR / hibridació) ^a

^a, sense el patró de sensibilitat característic de BLEA; ^b, amb el patró de sensibilitat característic de BLEA.

Voler observar l'evolució al llarg del temps de l'adquisició de les resistències fou complex i de fet no hi va haver un resultat concloent (Figura 55). De manera general i presumptiva podríem dir però que hi havia una tendència a perdre gens de resistència, més que a guanyar-ne.

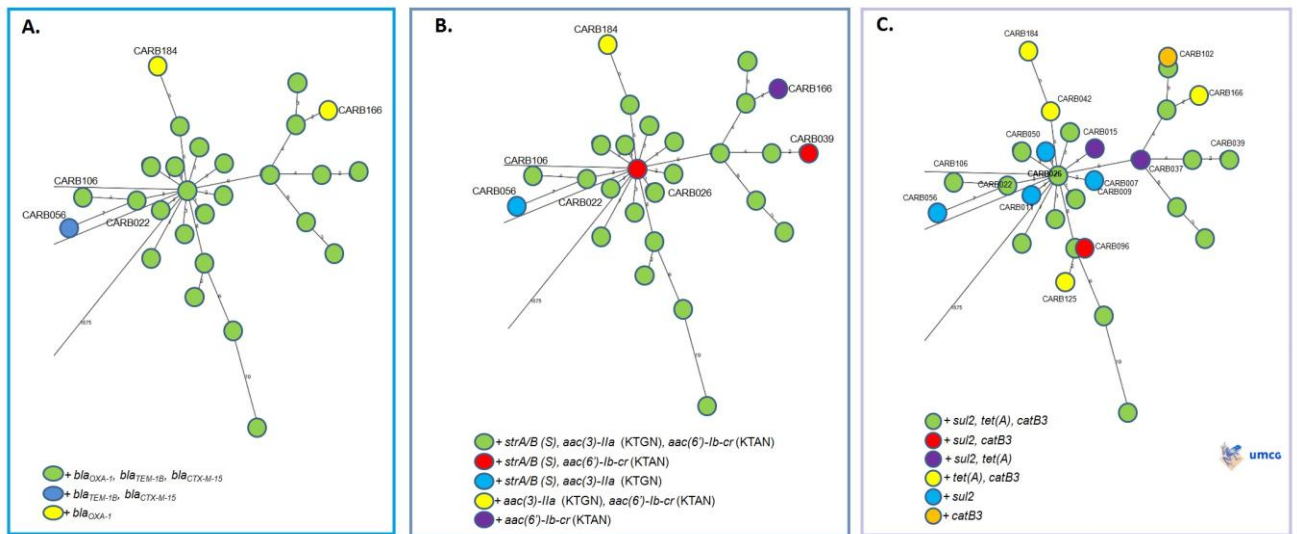


Figura 55. Dendrograma dels diferents subpulsotips del pulsotip E i la relació amb els gens *bla* (A), gens que codifiquen AME (B) i gens que codifiquen altres resistències (C). Les imatges es poden comparar amb la distribució temporal de la figura 53. Totes les soques presentaven els gens *bla*_{SHV-76}, *dfrA14*, *qnrB66*, *oqxAB*, *fosA*.

4.11. Alteracions en la permeabilitat

Al llarg de l'estudi s'ha anat observant que soques estretament relacionades epidemiològicament i amb els mateixos gens de resistència associats, mostraven un patró de sensibilitat diferent. Algunes d'aquestes diferències estaven centrades en antibiòtics relacionats amb alteracions de la permeabilitat com cefalosporines de segona generació (cefoxitina), els carbapenèmics o les quinolones.

Per això a les 37 soques seleccionades per a realitzar el cgMLST, de les quals podíem obtenir les seqüències nucleotídiques de diferents gens implicats en alteracions de la permeabilitat, es va determinar la CIM d'una sèrie d'antibiòtics que es pot veure afectada per alteracions de la permeabilitat com la colistina, tigeciclina, ciprofloxacina, cefalosporines i carbapenèmics (Taula 26).

Sabent que la bomba d'expulsió AcrAB té afinitat per certs compostos^{62,388} com els betalactàmics, la tigeciclina o el bromur d'etidi es va voler valorar si aquest mecanisme estava involucrat en les diferències en el patró de sensibilitat que s'havia observat entre soques d'un mateix pulsotip i/o subpulsotip. Per això, es van seleccionar quatre parelles de soques, que es corresponien amb les que més diferències hi havia en el patró de sensibilitat, per a determinar l'acumulació de bromur d'etidi.

Les parelles seleccionades foren: de la ST101, les soques CARB058 (A₃) i CARB077 (A₂); i de la ST405 la parella del subpulsotip E₁, CARB011 i CARB050, del subtipus E₅, CARB128 i la CARB182, i del subtipus E₁₂ la CARB112 i la CARB130.

Taula 26. CIM de les 37 soques seleccionades per a determinar el paper de les bombes d'expulsió AcrAB.

Soques	MLST/Pulsotip	FOX	CTX	MER	ERT	G	TGC	CIP	COL	FOS	CLR	MNO
CARB115	101/A1	16	32	1	2	32	2	>8	<1	16	4	32
CARB077*	101/A2	>128	>32	>8	>2	32	4	8	>8	256	8	>32
CARB058*	101/A3	32	>32	2	>2	32	0,5	>8	>8	>64	>64	32
CARB122	1233/C	8	0,5	0,5	0,5	<0,25	0,5	<0,0625	<1	64	2	2
CARB117	14/D	4	1	0,5	0,5	<0,25	0,5	<0,0625	<1	8	4	2
CARB098	17/B	4	16	0,25	0,25	8	0,25	1	<1	128	2	1
CARB007	405/E1	4	32	0,5	0,5	16	0,5	0,5	<1	128	4	2
CARB009	405/E1	8	>32	1	1	>32	0,5	>8	<1	128	4	2
CARB011*	405/E1	4	>32	1	1	<0,25	0,5	0,5	<1	>512	4	2
CARB050*	405/E1	128	>32	1	2	>32	4	>8	>8	64	32	32
CARB015	405/E1	4	>32	0,5	0,5	>32	0,5	2	<1	64	4	2
CARB037	405/E1	>32	>32	1	0,5	32	0,5	0,5	2	128	4	2
CARB102	405/E1	8	1	1	1	0,5	0,5	2	<1	512	2	1
CARB125	405/E1	32	0,5	0,5	1	0,5	4	8	<1	128	32	16
CARB039	405/E10	32	1	1	1	32	2	8	<1	32	16	8
CARB184	405/E11	64	>32	0,25	1	2	2	>8	>8	>512	8	4
CARB112*	405/E12	32	>32	4	>2	16	4	>8	<1	128	32	16
CARB130*	405/E12	8	>32	1	1	>32	1	4	>8	64	8	2
CARB096	405/E13	8	>32	8	1	16	1	0,25	<1	32	8	4
CARB010	405/E14	8	>32	2	1	32	2	4	<1	64	16	2
CARB026	405/E15	16	>32	4	>2	16	1	2	2	128	32	2
CARB183	405/E16	8	>32	1	2	0,5	0,5	2	2	32	32	1
CARB044	405/E17	4	1	1	0,5	1	0,5	4	<1	<512	4	2
CARB040	405/E18	16	>32	2	>2	32	2	>8	<1	64	>64	16
CARB139	405/E18	4	>32	1	1	16	0,5	8	<1	64	4	16
CARB020	405/E2	64	>32	2	2	16	4	>8	<1	128	>64	32
CARB042	405/E3	>128	>32	>8	>2	>32	>8	>8	>8	>512	>64	>32
CARB106	405/E4	128	>32	>8	>2	>32	2	>8	<1	64	16	8
CARB022	405/E5	8	>32	0,5	1	32	0,5	2	<1	64	4	2
CARB056	405/E5	32	>32	1	2	>32	4	>8	<1	128	64	32
CARB128*	405/E5	64	8	0,5	0,25	32	0,5	0,125	<1	>512	8	2
CARB182*	405/E5	>128	>32	>8	>2	>32	4	>8	<1	512	64	16
CARB065	405/E6	16	>32	4	>2	0,5	0,5	4	<1	128	4	4
CARB166	405/E6	<1	<0,25	<0,125	0,25	>32	0,25	2	2	8	<1	0,5
CARB038	405/E7	64	>32	4	<0,125	32	4	>8	8	16	64	32
CARB100	405/E8	2	>32	1	1	32	0,5	2	<1	256	2	4
CARB123	405/E9	8	>32	2	1	>32	1	2	<1	64	4	4

AMC (amoxicil·lina/ àcid clavulànic), TZP (piperacil·lina/tazobactam), FOX (cefoxitina), CTX (cefotaxima), MER (meropenem), ERT (ertapenem), G (gentamicina), TGC (tigeciclina), CIP (ciprofloxacina), COL (colistina), FOS (fosfomicina), CLR (cloranfenicol), MNO (minociclina).

*Soques seleccionades per a l'estudi de l'expressió de les bombes d'AcrB.

Totes les soques tenien una CIM a AMC de >64/32 i a TZP >256/4

El color blau representa resistència.

Els resultats dels estudis d'acumulació de bromur d'etidi (Figura 56) suggereixen que en la parella de la ST101 no hi havia diferències significatives en l'expressió de la bomba AcrAB, doncs els valors de fluorescència relativa en ambdós casos foren similars. En canvi, sí s'observaren diferències entre les parelles dels subpulsotips E_1 i E_{12} . En aquests casos, hi havia una menor captació de la fluorescència en les soques sensibles indicant que aquestes podrien expressar la bomba d'expulsió AcrAB i per tant, tenen més capacitat per extreure a l'exterior els antimicrobians afins a aquestes bombes, concretament ens podem fixar en la ciprofloxacina i tigeciclina, que són els antimicrobians que més

s’han estudiat en *Klebsiella*. La rara està en la parella del subpulstotip E₅ que ens donaren uns resultats invertits, que semblaven indicar una sobreexpressió d’aquesta bomba en la soca resistent.

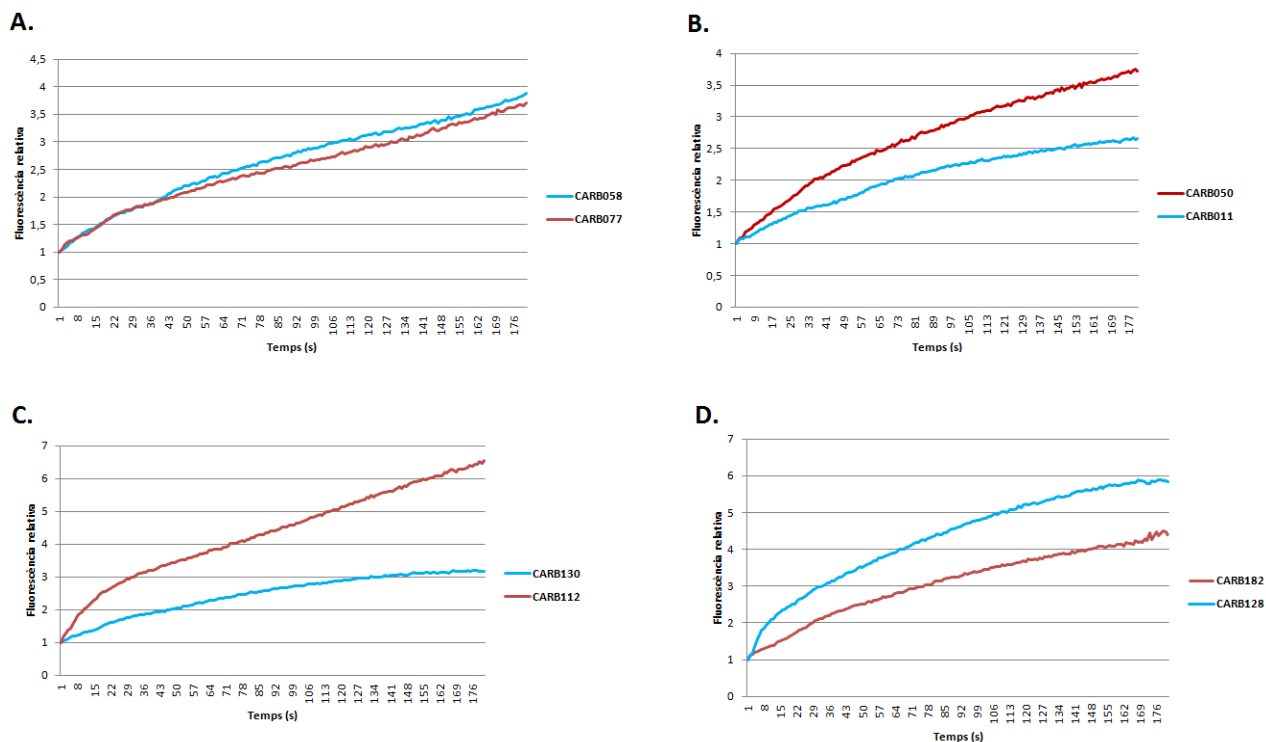


Figura 56. Determinació de la fluorescència relativa del bromur d’etidi en les soques: A, ST101 (A₂ i A₃); B, ST405 (E₁); C, ST405 (E₁₂); D, ST405 (E₅). El blau representa la soca sensible i el vermell la soca resistent.

Per tal de millor entendre el resultat invertit de les soques del subtipus E₅, es va mesurar l’expressió dels gens *acrA* i *acrB* mitjançant la tècnica de qRT-PCR, utilitzant el gen *gapA*, com a gen de referència d’una expressió basal.

Els resultats de qRT-PCR, recollits a la taula 27, mostraren que no existia una diferència significativa en l’expressió del gen *acrB* entre les dues soques, doncs en ambdós casos el nivell d’expressió del gen *acrB* respecte al gen *gapA* era similar, d’unes 15 vegades més.

Taula 27. Resultats de la qRT-PCR.

Soques	Mean Conc <i>acrB</i>	Stand Conc <i>gapA</i>	Increment de l’expressió
CARB128	2.98x10 ⁴	1.92x10 ³	15.5x
CARB182	6.02x10 ⁴	4.01x10 ³	15.0x

Mean concentration: concentració mitjana de l’expressió del gen *acrB*
Standard concentration: la concentració obtinguda de la corba estandard aconseguida en l’expressió del gen *gapA*.

Per tant, de les quatre parelles seleccionades, en dos casos sembla que hi ha una major activitat de les bombes *acrAB* que podrien explicar perquè hi ha soques més resistents i d’altres més sensibles, però en dos casos aquesta major activitat no sembla ser la causa.

Un altre aspecte que podria afectar els valors de la CIM és l'alteració de les proteïnes de la membrana externa, les porines. Per tant, donat que teníem seqüenciat el genoma de 37 soques, vàrem voler determinar si podrien haver mutacions en els gens de diferents porines que es podrien correlacionar amb la variabilitat del fenotip de resistència. Vàrem estudiar els gens de les porines PhoE, LamB, OmpK26, OmpK35, OmpK36 i OmpK37, comparant genoma les seqüències obtingudes per WGS de les 37 soques amb la seqüència aminoacídica de la soca de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (JSZI00000000), que en estudis previs s'havia utilitzat com a soca de referència al ser sensible i no mostrar canvis en les seqüències de les porines, i la soca *K. pneumoniae* MGH78578 (CP000647) que presenta mutacions en determinades porines que están relacionades amb un increment de resistència als antimicrobians.

Els resultats mostren que no hi havia diferències en les porines PhoE i LamB. En el cas de la OmpK26, totes les soques foren 100% homòlogues amb la soca de *K. pneumoniae* ATCC 13883 excepte la CARB098 (ST17), on s'observà la substitució Asn94Leu, deguda al canvi en la base nucleotídica 282 d'una guanina (G) per una tirosina (T). Pel que fa a la OmpK35, la seqüència aminoacídica de les 37 soques és 100% homòloga a la de la porina OmpK35 de la soca de *K. pneumoniae* ATCC 13883, però amb la seqüència de MGH78578 hi ha diferència en la part final de la proteïna, degut a la inserció en la seqüència de MGH78578 d'una guanina(G) en la posició 873 que canvia el marc de lectura. Aquest canvi dona com a resultat l'absència d'aquesta proteïna a la membrana cel·lular.

Les dues porines on es trobà més variabilitat fou en les OmpK36 i OmpK37 (Taules 28 i 29). En el cas de la OmpK36 es va trobar que 31 soques presentaven un 92% d'homologia amb la seqüència aminoacídica de la soca ATCC 13883, i un 100% d'homologia amb les seqüències aminoacídiques de les soques *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (AP006725.1) i NVT2001 (GU461279.1). Les sis soques restants, presentaven un major nombre de mutacions puntuals al comparar-ho amb la soca ATCC 13883. D'aquestes sis soques, n'hi ha dues, les soques CARB042 i CARB182, que presentaven una deleció en la seqüència nucleotídica (en diferents lloc en cada soca) que va originar un canvi en el marc de lectura, donant lloc a una terminació primerenca de la traducció. Així doncs, a aquestes dues soques els hi mancava la porina OmpK36. Les altres quatre soques presentaven mutacions puntuals que, tot i donar lloc a proteïnes de membrana (OmpK36) diferents a la de la soca de referència ATCC 13883, havien estat identificades prèviament. Les mutacions puntuals en l'OmpK36 d'aquestes quatre soques no foren les mateixes, per això es feu una anàlisi de forma individual, amb altres seqüències de l'OmpK36 de soques de *K. pneumoniae* descrites en altres estudis. La seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de les soques CARB077 i CARB039 presentaren una homologia del 99% amb l'OmpK36 de la soca de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. La diferència estava en que la CARB077 tenia una glicina (Gly) i un àcid aspàrtic (Asp) de més a les posicions 136 i 137, degut a la inserció de 6pb (GGCGAC), és a dir, de dos codons (Figura 57). I, en el cas de la CARB039 hi havia quatre diferències, una de les quals era l'aparició d'una Arginina (Arg) a la posició 201, degut a modificacions en el marc de lectura amb la inserció de quatre pb i la deleció d'una pb (Figura 57). La seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de la soca CARB098, de la ST17, presentà un 100% d'homologia amb l'OmpN de la soca de *K. pneumoniae* (WP_020801664.1), un 99% amb la de la soca de *K. pneumoniae* 1516 (AFN06757.1), també de la ST17, on s'hi descrivia dos canvis, dos nous codons en la posició 349 (Gln i Gly), i un 95% d'homologia amb l'OmpK36 de la soca de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (Figura 57). Finalment, la seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de la soca CARB122 (soca resistent només a les penicil·lines) mostrava un 97% d'homologia amb la seqüència de l'OmpK36 la

de soca MGH78578, degut a tres substitucions aminoacídiques: Asp306Asn, Glu308Gly i Gly315Tyr, i una inserció que origina sis codons (AsnPheThrGlyValAsn) a la posició aminoacídica 324 (Figura 57). Al fer una recerca més extensa, es va trobar la seqüència d'una porina idèntica, amb una homologia del 100%, malgrat no tenir la seqüència completa (únicament tenia seqüenciada 331 aminoàcids de 382), de la soca KUN-2012-0129 (AB933364) (Figura 58).

En el cas de la OmpK37, 32 de les 37 soques presentaren una homologia aminoacídica del 100% amb la soca de *K. pneumoniae* Kp52.145 (PMC4214299), soca virulenta del ST66, així com un 99% amb la *K. pneumoniae* MGH78578 i un 95% d'homologia amb la *K. pneumoniae* ATCC 13883. Les diferències aminoacídiques es poden apreciar en la taula 29. Quatre soques foren 99% homòlogues a la seqüència de *K. pneumoniae* ATCC 13883, degut a que presentaven una inserció de tres pb (TAA) que originava una Asparagina (Asn) a la posició 26 (Taula 29), i un 95% d'homologia amb la seqüència de *K. pneumoniae* MGH78578 amb un seguit d'insercions d'aquesta soca amb comparació amb les 4 soques de l'estudi, que han ocasionat l'aparició de codons que els hi mancaven a aquestes quatre soques, com per exemple a la posició 26 (Asn), entre els posicions 238 i 241 (AspAsnAsnPhe) i entre les posicions 280 i 285 (SerSerAsnGlyGly). La soca restant, CARB098, presentà una homologia aminoacídica del 95% amb la *K. pneumoniae* MGH 78578 i era un 98% homòloga a la seqüència de *K. pneumoniae* ATCC 13883, degut a la inserció de tres pb (TAA) així una substitució, Thr265Ala.

Per tant, a l'analitzar les seqüències aminoacídiques de les diferents porines varem observar diferències, però cap en comú i cap que estigués directament relacionada amb la resistència. L'excepció estava en les soques CARB042 i CARB182 que no produïen la OmpK36 i es mostraven altament resistents a la totalitat d'antibiòtics testats, excepte la colistina en la CARB182.

Taula 28. Mutacions en OmpK36.

Soques	n	Canvis respecte l'OmpK36 de l'ATCC 13883																
		86	88-91	93	180	184	185	188	194-197	200	201	213	224	228-229	230			
ATCC13883		Thr	SerSerSer	Ala	Val	Gly	Thr	XX	GlyAlaLeuLys	Gly	X	Tyr	His	AsnGly	Asp			
GRUP 1	31	-	-	-	-	-	Ala	SerPro	ThrTrpGly-	-	-	-	-	ThrAsp	-			
CARB182	1	-	-	-	-	-	Ala	SerPro	ThrTrpGly-	Ala	-	-	-	-	-			
CARB042	1	-	-	-	-	-	Ala	SerPro	ThrTrpGly-	-	-	-	-	ThrAsp	-			
CARB077	1	-	-	-	-	-	Ala	SerPro	ThrTrpGly-	-	-	Trp	-	ThrAsp	-			
CARB122	1	Val	GlyThr AspLys	Ser	Pro	-	-	-	-	-	-	-	Asn	-	-			
CARB098	1	-	-	-	-	Asp	Met	-	ThrGlnSerGlu	-	-	-	-	ThrAsp	-			
CARB039	1	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	Arg	-	-	ThrAsp	Glu			
Soques	n	Canvis respecte l'OmpK36 de l'ATCC 13883																
ATCC13883		Arg	Leu	AspLys	X	Thr	PheSerGly	XXXXXXX	Ser	Ile	Gly	XXXXXX	Leu	Asp	Arg			
GRUP 1	31	Ser	Val	ProAla	-	Ser	AlaGlySer	AsnGlyGluSerAspSerIle	Leu	Leu	-	-	-	Ser	Asn			
CARB042	1	Ser	Val	ProAla	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
CARB077	1	Ser	-	AlaLeu	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	Ser	Asn			
CARB122	1	Ser	Lys	LeuAla	-	-	-	-	-	-	-	AsnPheThr GlyValAsn	Ile	-	Lys			
CARB098	1	Ser	-	-Val	-	Ser	-	-	-	Arg	-	-	Ile	Ser	Asn			
CARB039	1	Ser	Val	Pro-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	Ile	Ser	Asn			

- Indica que no hi ha hagut cap canvi. X No hi ha cap aminoàcid. Les soques carb182 i carb042 tenen un seguit de requadres buits indicant el canvi en el marc de lectura. GRUP 1: CARB007, CARB009, CARB010, CARB011, CARB015, CARB020, CARB022, CARB026, CARB037, CARB038, CARB039, CARB040, CARB042, CARB044, CARB050, CARB056, CARB065, CARB096, CARB100, CARB102, CARB106, CARB112, CARB115, CARB123, CARB125, CARB128, CARB130, CARB139, CARB166, CARB182, CARB183, CARB184.

Taula 29. Mutacions en OmpK37.

Soques	n	Canvis respecte l'OmpK37 de l'ATCC 13883									
		26	230	233-235	237	238-241	243	265	278-285		
ATCC13883	X	Ala	GlnHisPhe	Asn	XXXX	Arg	Thr	AsnAspXXXXXX			
GRUP 1	32	Asn	MetThrGln	Ser	AspAsnAsnPhe	Thr	-	SerThrSerSerThrAsnGlyGly			
GRUP 2	4	Asn	-	-	-	-	-	-			
CARB098	1	Asn	-	-	-	-	Ala	-			

- . No hi ha hagut cap canvi. X - N hi ha cap aminoàcid. GRUP 1: CARB007, CARB009, CARB010, CARB011, CARB015, CARB020, CARB022, CARB026, CARB037, CARB038, CARB039, CARB040, CARB042, CARB044, CARB050, CARB056, CARB065, CARB096, CARB100, CARB102, CARB106, CARB112, CARB115, CARB123, CARB125, CARB128, CARB130, CARB139, CARB166, CARB182, CARB183, CARB184. GRUP 2: CARB058, CARB077, CARB117, CARB122

Epidemiologia de la carbapenemasa OXA-48 en aïllats de *Klebsiella pneumoniae* a Catalunya

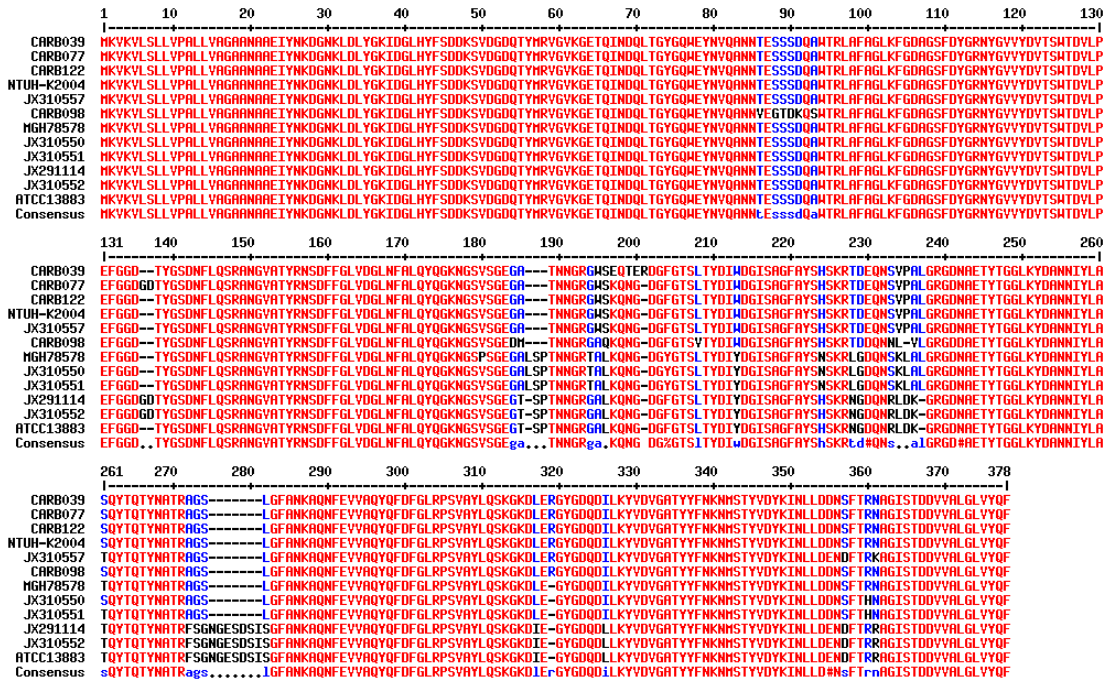


Figura 57. Alineament de la seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de les soques CARB039, CARB077, CARB098 i CARB122 amb altres seqüències descrites: JX310551 (AFR33747.1), JX310550 (AFR33746.1), MGH78578, JX310577 (AFR33753.1), NTUH-K2044, JX31552 (AFR33748.1), JX291114 (AFV34540.1) i ATCC 13883.

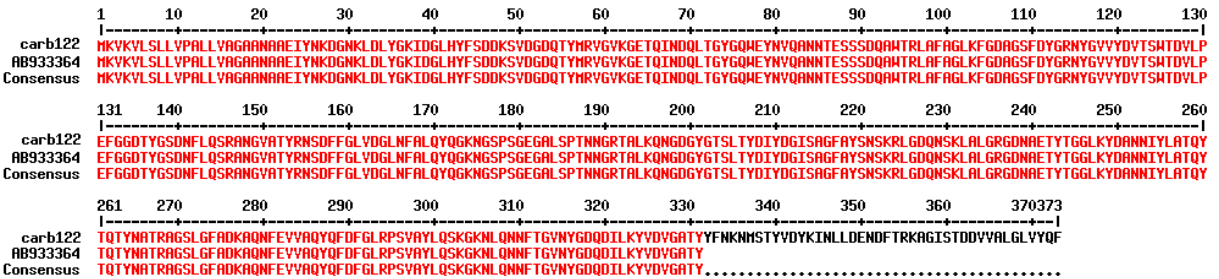


Figura 58. Alineament de la seqüència aminoacídica de l'OmpK36 de la soca CARB122 amb l'OmpK36 de soca KUN-2012-0129.

4.12. Estudi de les mutacions en les dianes d'acció de les quinolones (QRDRs)

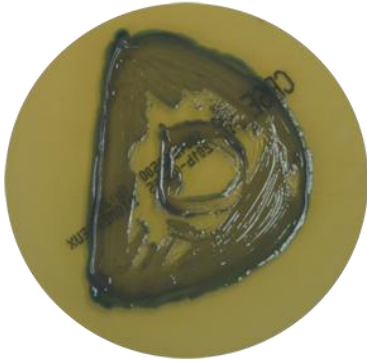
Al disposar dels resultats de la seqüenciació massiva de les 37 soques, es van voler comparar les seqüències nucleotídiques i aminoacídiques dels gens *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE* amb els gens de la soca de referència ATCC 13883, soca sensible a les quinolones, per tal de descriure possibles mutacions que ens expliquessin la resistència a quinolones en aquestes soques.

De les 37 soques, 29 presentaven una CIM a ciprofloxacina ≥ 2 mg/L (Taula 26) però només es varen observar mutacions en GyrA i ParC en les tres soques de la ST101 (CARB058, CARB077, CARB115). En la soca del ST17 es varen observar dues mutacions en GyrA que no han estat descrites com a causa de resistència i per tant és lògic que no confereixi una resistència d'alt nivell, i en la soca del ST405 es trobà una mutació només en GyrA (Taula 30). En cap cas es van trobar mutacions en *gyrB* i *parE*.

Taula 30. Mutacions en les QRDR. Comparació de les seqüències aminoacídiques dels gens *gyrA* i *parC* de les soques de l'estudi amb les de la soca de referència ATCC 13883

Soca	PFGE	ST	NAL	CIP	CIM (CIP)	GyrA	ParC
CARB115	A ₁	101	9	9	>8	Ser83Tyr, Asp87Gly	Ser80Ile, Asn304Ser
CARB077	A ₂	101	9	9	8	Ser83Tyr, Asp87Gly	Ser80Ile, Asn304Ser
CARB058	A ₃	101	9	9	>8	Ser83Tyr, Asp87Ala	Ser80Ile, Asn304Ser
CARB098	B	17	24	36	1	Ala863Val, Thr868Ile	-
CARB039	E ₁₀	405	12	11	8	Ser83Ala	-

En negreta mutacions ja descrites com a causa de resistència.



DISCUSSION

L'aparició de microorganismes multiresistents ha anat emergint a mesura que s'han anat aplicant els nous tractaments antibiòtics. La presència d'aquests microorganismes multiresistents és un greu problema a nivell mundial, tant en l'àmbit hospitalari com en el comunitari, com en el del medi ambient^{3,6,392,393}. Aquesta situació es deu fonamentalment a dos fets. Un, és el fet que els gens de resistència implicats es troben en diferents elements genètics mòbils, com les seqüències d'inserció, els transposons o els plasmidis, que possibiliten la disseminació de les resistències. El segon, és el fet que hi ha una pressió antibiòtica selectiva (intra i extrahospitalària) degut a un mal ús o abús dels nous antibiòtics. En aquest context, els carbapenèmics han jugat un paper important en el tractament d'infeccions causades per bacteris gramnegatius multiresistents^{218,222,394}. Els carbapenèmics són estables a la hidròlisi de la majoria de betalactamases, incloses les betalactamases d'espectre ampliat (BLEA) i les AmpC adquirides³⁹⁵. No obstant això, la seva efectivitat ha minvat des de l'aparició de les carbapenemases i d'altres mecanismes de resistència, relacionats amb alteracions de la permeabilitat cel·lular.

Les carbapenemases han estat detectades en *Enterobacteriaceae* des del 1993 amb *bla*_{IMP-1} en *Serratia marcescens* al Japó³⁹⁶⁻³⁹⁸, *bla*_{KPC-1} en *K. pneumoniae* als EUA al 1996⁵², *bla*_{VIM-1} en *P. aeruginosa* a Itàlia al 1999³⁹⁹, *bla*_{OXA-48} en *K. pneumoniae* a Turquia al 2004²⁹⁹ o *bla*_{NDM-1} en *K. pneumoniae* a l'Índia al 2009²⁴⁹. La primera descripció de carbapenemases en enterobacteris a Espanya va ser la metal-lobetalactamasa VIM-1 en *E. coli* i *K. pneumoniae* al 2005⁴⁰⁰ i, no és fins l'abril del 2009 que es va descriure la primera soca de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48³⁰⁸; des de llavors s'han descrit diversos brots i casos aïllats d'enterobacteris, fonamentalment produïts per *K. pneumoniae*^{236,303,321}. A Madrid, en un centre hospitalari terciari es van aïllar, entre els anys 2009 i 2011, 97 soques de *K. pneumoniae* productores de carbapenemases, de les quals 58 foren productores de l'OXA-48, és a dir, el 59,8%³⁶². Segons dades de l'estudi multicèntric realitzat per Miró *et al.*⁴⁰¹ i les del Programa de Vigilància de la Resistència a Antibiòtics del Centre Nacional de Microbiologia (PVRA-CNM) en dos anys es va passar de cap cas registrat (2009-2010) a 163 casos (2012)²³⁶. I, al 2013, de 83 hospitals espanyols⁴⁰² ja es descriuen 235 soques de *K. pneumoniae* les productores d'OXA-48, observant en aquest cas que les soques pertanyien als ST11 (33,6%) i ST405 (31,1%).

La prevalença de la carbapenemasa OXA-48 depèn en gran mesura de l'àrea geogràfica, de les espècies, del període d'estudi, així com del criteri de selecció utilitzat. A més, és difícil de determinar perquè en la majoria d'estudis es parla de nombre de casos, però no els descriuen dins del total de soques aïllades per aquella espècie. És per aquest motiu que la comparació de les dades de prevalença entre estudis és complex. A nivell mundial s'ha observat un augment en països que estan al voltant de l'àrea mediterrània com França³⁵⁷, Grècia³²³ o l'Orient Mitjà^{353,382}. Un exemple, on es descriu la prevalença és un estudi realitzat al *Ibu Roch University Hospital* al Marroc al 2011 on varen descriure una prevalença del 5,4% en soques de *K. pneumoniae* (9 de 166 soques productores d'OXA-48)³⁷⁷. A més de l'àrea mediterrània, un increment de la seva difusió s'ha constatat en altres zones del món, com per exemple a Noruega³³¹, EUA³⁰⁵, Bèlgica³¹⁰, Alemanya³¹², Regne Unit^{305,320}, Israel³⁰⁰, Japó³⁸¹, Rússia³⁰⁰ o Austràlia³²⁵.

A nivell de l'Estat Espanyol aquesta prevalença ha incrementat de forma exponencial des de la detecció per primer cop al 2009 en *K. pneumoniae* a l'Hospital Universitario La Paz³⁰³, a

Madrid, aïllen 71 soques de *K. pneumoniae* que suposava una prevalença del 5,3% que va incrementar per brots compresos entre l'abril del 2009 i el setembre del 2010³⁰³. Segons l'estudi realitzat per el Programa de Vigilància de la Resistència a Antibiòtics del Centre Nacional de Microbiologia (PVRA-CNM)²³⁶, citat anteriorment, la prevalença global estimada d'infeccions degudes a soques de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa OXA-48 a Espanya respecte al total de soques resistents a carbapenèmics que varen rebre va ser del 75,4% (153/203). En el nostre estudi la prevalència del les soques productores de la carbapenemasa OXA-48 (n=85), en relació al total de soques que varen donar un resultat positiu (o fals positiu) en el THM (n=171) fou del 49,7%, i respecte el total de soques seleccionades, és a dir respecte al total de soques de *K. pneumoniae* resistents a betalactàmics (n=3901) fou del 2,2%. És evident que el criteri de selecció de soques en ambdós casos es diferent i que en el nostre estudi s'inclouen soques que no presentaven resistència a carbapenèmics. A més, el nombre de centres participants, en el estudi de d'Oteo *et al.*²³⁶ van ser 49 centres pertanyents a 24 àrees geogràfiques de l'Estat Espanyol²³⁶ i en el nostre són 12 hospitals de Catalunya.

Un dels factors que pot afectar el càlcul de la prevalença és la tècnica de detecció del mecanisme de resistència. La detecció fenotípica de les soques productores d'OXA-48 és difícil perquè normalment aquest enzim no confereix una resistència d'alt nivell als betalactàmics. Segons Poirel *et al.* al 2004²⁹⁹, l'OXA-48 confereix resistència a penicil·lines i a les combinacions amb inhibidors de betalactamases, sensibilitat a les cefalosporines i una feble activitat enfront els carbapenèmics, essent el més afectat l'ertapenem. A més, la producció d'OXA-48, s'ha vist associada a la producció d'altres betalactamases, principalment s'ha descrit que coexpressa amb una BLEA (p.e. tipus CTX-M). En el nostre estudi només una soca no seguia aquesta premissa, la resta, exceptuant les altres dos soques de les seqüències tipus minoritàries, expressaven també la BLEA, CTX-M-15 o en el seu defecte una TEM-1 i/o una l'oxacil·linasa, OXA-1. Aquesta soca, pertanyent a una seqüència tipus minoritària, es mostrà només resistent a les penicil·lines i a la combinació amb inhibidors, sense cap tipus d'activitat enfront les cefalosporines i els carbapenèmics. En el 89,4% de les soques, la resistència o disminució de la sensibilitat observada enfront les cefalosporines de tercera generació, (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona), cefalosporines de quarta generació, (cefepime) i monobactams (aztreonam), així com la sinergia observada amb àcid clavulànic, era un clar indicatiu de producció d'una betalactamasa d'espectre ampliat (BLEA) i concretament totes expressaven la BLEA CTX-M-15^{10,403-405}.

També es creu que, supeditat a aquesta possible subestimació de la presència d'aquestes betalactamases fonamentat en l'anàlisi dels patrons de resistència hi ha la falta de tests desenvolupats per a detectar la producció d'aquestes carbapenemases. Fins aquest moment, el mètode més emprat és el THM^{10,277,281-283}, tot i que s'ha observat que la seva especificitat per OXA-48 és baixa i que precisa d'ulls experts, poden diferenciar els negatius dels positius dèbils. A més, hem pogut constatar que la presència de falsos positius es deu a hiperproduccions d'AmpC o BLEA que es creu que poden actuar conjuntament amb alteracions de la permeabilitat¹⁰. A part del THM hi ha altres mètodes de detecció fenotípica: medis cromogènics, tècniques de disc difusió amb substrats i inhibidors específics de

carbapenemases o tècniques colorimètriques (p.e. test CarbaNP)^{285,286,287} que permeten detectar la producció de carbapenemases i descarten les hiperproduccions de BLEA i/o AmpC. Tot i així, els mètodes definitius estan en emprar tècniques moleculars (p.e. PCR), que avui en dia són les que tenen una major sensibilitat, especificitat i rapidesa.

Per tal d'evitar una subestimació de la prevalença, en aquest estudi es van seleccionar totes aquelles soques de *K. pneumoniae* que presentaven un patró de sensibilitat diferent al natural, és a dir, que fossin resistents a les aminopenicil·lines i les carboxipenicil·lines i presentessin resistència a algun de la resta de antibiòtics betalactàmics (cefalosporines, carbapenèmics, monobactàmics, i combinacions amb inhibidors de betalactamases). Del total de les 3.901 soques de *K. pneumoniae* aïllades durant el 2012 en els 12 hospitals, un 4,4% varen resultar positives per al THM i d'aquestes, només un 49,7% van resultar portadores de l'OXA-48. Així doncs, tot i que el THM és la tècnica d'ús recomanada pel CLSI per a detectar soques productores de carbapenemasa^{272,273,280-282,298,406}, hem observat una baixa especificitat per l'elevat nombre de falsos positius. Els quals es corresponien a soques que presentaven una BLEA i/o una AmpC adquirida. Des de la modificació del test al 2000, i la recomanació de la seva utilització pel CLSI al 2009, s'han realitzat varis estudis comparant els resultats amb els obtinguts amb altres mètodes com el test de doble disc (DDT)^{282,407}. Tots aquests estudis han arribat a la conclusió que aquesta tècnica és útil com a cribatge de soques productores de carbapenemases, sobretot de la classe A i D. Per a les carbapenemases de classe B, es recomana afegir sulfat de zinc en el medi per poder detectar la seva activitat, descartant així els falsos negatius, però no els falsos positius, com soques hiperproductores de BLEA o AmpC. Totes aquestes dades fan que es consideri el THM, una tècnica amb una bona sensibilitat (95%) però amb una baixa especificitat^{10,219,221,277-282,383,404,406,408-418}. Actualment es manté aquesta tècnica de detecció de carbapenemases en gran part dels laboratoris de diagnòstic, tot i que se n'han desenvolupat altres amb una major especificitat. Algunes d'aquestes altres tècniques utilitzen el canvi de pH produït en la hidròlisi dels carbapenèmics per l'acció de les carbapenemases com a indicador de la seva presència (p.e. Carba NP²⁸⁶, BlueCarba²⁸⁷) o directament utilitzen la hidròlisi dels carbapenèmics per l'acció de les carbapenemases per inactivar disc de carbapenèmics i així permetre el creixement de soques sensibles a aquests antibiòtics, com és el cas del CIM (*Carbapenem Inactivation Method*)²⁸⁵.

Aquesta poca estandardització en les tècniques de detecció, no només afecta la determinació del valor de la prevalença, sinó també l'aplicació de la política de prevenció d'establiment de soques multiresistents que hi ha en els diferents hospitals. La ràpida propagació d'una soca dins d'un mateix centre hospitalari és una gran problemàtica, que requereix una ràpida implementació de diverses mesures per evitar la seva difusió. Això no només succeeix en centres hospitalaris, sinó també en centres sociosanitaris, on poden poden disseminar fàcilment aquests microorganismes^{419,420}. A més, com ja ha succeït amb altres betalactamases, dins de determinades comunitats i regions hi pot haver una propensió a que es converteixin en endèmiques dins i fora dels centres hospitalaris, p.e. la NDM-1 a l'Índia²⁴⁵⁻²⁴⁸, la VIM-1 a Grècia³⁰⁰ o l'OXA-48 a Turquia²⁹⁹, fet que ens mostra que la dispersió en la comunitat no s'hauria de menystenir. De fet, la prevalença d'altres mecanismes de resistència, com la producció de BLEA en la comunitat està en molts casos al voltant del 7%^{403,421-426}. Segons el CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*), es considera que una infecció és d'origen

intrahospitalari o nosocomial, quan la contrau un pacient que porta més de 48 hores ingressat a l'hospital⁴²⁷. Però no s'especifica, si les infeccions relacionades amb l'assistència sanitària cal incloure-les com a nosocomials. Friedman *et al.* al 2002⁴²⁸ defineix una infecció intrahospitalària quan hi ha un hemocultiu positiu després de les 48h. o més d'ingrés. En el cas que el pacient ve transferit d'un altre hospital cal considerar el temps d'ingrés tenint en compte la data del primer dia d'ingrés en el primer centre. L'autor defineix una bacterièmia relacionada amb l'assistència sanitària quan el pacient té un hemocultiu positiu en el moment de l'ingrés hospitalari o dins de les 48h de l'ingrés i: 1) va rebre teràpia intravenosa a la llar; havia de curar-se de ferides o tenia servei d'infermeria especialitzada a través d'una agència de cura de la salut, familiars o amics; o tenia la teràpia mèdica intravenosa autoadministrada en els 30 dies abans de la bacterièmia; 2) va assistir a un hospital o clínica d'hemodiàlisi o van rebre quimioteràpia intravenosa en els 30 dies abans de la bacterièmia; 3) va ser hospitalitzat en un hospital d'aguts durant 2 o més dies en els 90 dies abans de la bacterièmia; 4) resideixen en una llar d'avis o de cures a llarg termini. Finalment, els mateixos autors defineixen la bacterièmia comunitària com aquella que té un pacient al fer l'ingrés hospitalari o 48h després de l'ingrés, i no està relacionat amb l'assistència socio sanitària.

Seguint els criteris del CDC⁴²⁷ i de Friedman *et al.*⁴²⁸ i amb les dades obtingudes dels centres participants, en aquest estudi els casos d'infecció per *K. pneumoniae* productora d'OXA-48 van ser d'un 48,2% d'origen nosocomial i d'un 35,3% relacionats amb l'assistència sanitària, percentatges similars al que s'ha descrit en estudis realitzats tant a Espanya^{236,303,321}, com arreu^{305,312,320}. També hi havia un no menyspreable 16,4% dels pacients d'origen comunitari, encara que és possible que aquesta dada estigui sobreestimada, doncs creiem que en alguns casos no s'han recollit prou dades sobre ingressos o tractaments previs d'alguns pacients. Tot i així, al Marroc⁴²⁹, descriuen un percentatge del 13% en soques de *K. pneumoniae* productores de l'OXA-48.

En el nostre estudi, els pacients infectats per *K. pneumoniae* portadora d'OXA-48, foren majoritàriament persones grans, amb una mitjana d'edat de 76 anys i de sexe femení (61%). La majoria patien una infecció del tracte urinari (55%), trobant-se un 7% de bacterièmies. Aquest perfil és similar a l'observat en altres estudis, com per exemple el realitzat a Bèlgica en nou hospitals, entre el 2010 i el 2011³¹⁹, on descriuen set soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48, un 71% de les quals s'aïllaren en homes amb una mitja d'edat de 65 anys (amb un nen de 3 anys) i infecció urinària. A Grècia, entre el desembre del 2011 i el març del 2012, es van detectar nou pacients infectats per *K. pneumoniae* portadora de OXA-48 en cinc hospitals diferents³²³, els quals tenien una mitja d'edat de 66,3 anys (rang d'edat entre els 35 i els 89 anys) i, on el 55,5% de les soques causaren bacterièmia.

El tractament de les infeccions per enterobacteris han anat fent-se cada cop més complexe, degut a l'increment del nombre de mecanismes de resistència que han anat apareixent i a l'increment del percentatge de soques resistents. Primer, en la dècada dels 80, amb la propagació mundial d'enterobacteris productors de BLEA, ja es van limitar les opcions terapèutiques de les cefalosporines de tercera generació, i ara, amb l'aparició dels enterobacteris productors de carbapenemes i la coexpressió d'aquestes amb les BLEA, ha quedat limitat l'ús dels carbapenèmics. A més, també han incrementat el nombre d'altres gens

de resistència que afecten a altres famílies i classes d'antibiòtics, i que malauradament, es poden difondre a través dels mateixos vectors, plasmidis, transposons, etc. En aquests casos de multiresistència s'han explorat les teràpies combinades amb diferents antibiòtics, com l'ús d'agents de tercera línia, amb una eficàcia terapèutica dubtosa i, en canvi, un augment de la toxicitat^{451,452}. Avui no hi ha un tractament eficaç enfront aquestes soques multiresistents. S'està avaluant la utilitat de la tigeciclina, però es veu enfosquida per l'alt percentatge de soques productores de carbapenemases que en són resistents, i la utilitat de la colistina, l'últim antibiòtic amb una fiable activitat *in vitro*, però que està limitada per la toxicitat, l'eficàcia moderada i l'aparició de resistències⁴³⁶⁻⁴⁴¹. Antigament el tractament combinat bàsic era la combinació d'algun betalactàmic d'elecció amb algun aminoglicòsid⁴⁴², però en l'actualitat aquest tractament s'ha variat, ampliant el repertori d'antibiòtics. Les teràpies poden ser diverses, no hi ha res establert, ja que com s'ha mencionat també depèn de les resistències associades, malgrat que s'han obtingut bons resultats en l'ús de teràpies combinades on s'utilitzin polimixines, gliciliclines i aminoglicòsids^{443,444}. La teràpia combinada té com a objectiu intentar aconseguir una acció sinèrgica de varis antibiòtics que provoquin la mort cel·lular. Uns altres factors influents en l'elecció del tractament són el tipus d'infecció i la forma d'administració⁴⁴⁵.

Un dels factors que pot afavorir la selecció de microorganismes productors de carbapenemases és el tractament previ amb aquests o altres antibiòtics^{327,438,440,446-448}. Així doncs una pressió selectiva utilitzant penicil·lines, inhibidors de betalactamases, cefalosporines de primera i segona generació i algun carbapenèmic, p.e. l'ertapenem, podrien donar lloc a la selecció d'una soca productora de la carbapenemasa OXA-48^{300,327,449,450}. En el nostre estudi l'antibiòtic més utilitzat prèviament a identificar la *K. pneumoniae* productora de l'OXA-48, tant com a monoteràpia com combinat amb altres antibiòtics, va ser la combinació de l'amoxicil·lina i l'àcid clavulànic en un 36% dels casos, i un 14% varen rebre carbapenèmics. Tractaments possiblement dirigits a tractar una infecció per soca productora de BLEA tal com menciona Fariñas *et al.* al 2013⁴³⁷. Són pocs els treballs publicats en els que es dona informació del tractament rebut per als pacients infectats/colonitzats per *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48. Uns exemples són els estudis realitzats per Poirel *et al.* al 2004²⁹⁹ a Turquia, el de Voulgari *et al.* al 2013³²³ a Grècia, o el de Cuzon *et al.* al 2014³⁷⁴ a Algèria. En tots ells es constata una àmplia varietat de tractaments previs havent-hi generalment una gran quantitat de tractaments amb betalactàmics, que depenen dels protocols d'actuació dels diferents centres implicats en aquests estudis i de les malalties de base. En els estudis preaviment mencionats, s'observa un elevat ús dels carbapenèmics, especialment en combinació amb altres antibiòtics. En el nostre cas només es van utilitzar en monoteràpia com a tractament previ en un 12%.

Un cop identificat un enterobacteri productor d'una carbapenemasa, el tractament dirigit va en funció de l'antibiograma obtingut, així doncs és comú l'utilització combinada d'aminoglicòsids amb colistina i/o tigeciclina i/o fosfomicina^{299,323,374}, tot i que s'ha observat que una soca productora d'una carbapenemasa sol també presentar multiresistència i en moltes ocasions inclou als aminoglicòsids^{451,452}. Un 9,4% dels pacients de l'estudi havien rebut tractament combinat on se'ls hi havia administrat el carbapenèmic i/o l'aminoglicòsid acompanyat d'algun o alguns del següents antibiòtics: colistina, fosfomicina, tigeciclina, alguna

cefalosporina de tercera generació, inhibidor de betalactamases, nitrofurans. Malauradament amb les dades que disposem només podem descriure els diferents casos i no podem concloure si aquests tractament varen tenir o no cap influència en l'evolució del malalt. En l'estudi va haver una mortalitat del 4,7%, on en un cas, el pacient havia estat tractat amb només un carbapenèmic, i en tres casos restants amb teràpia combinada: carbapenèmic amb polimixina (un cas); carbapenèmic amb polimixina, aminoglicòsid i un inhibidor de betalactamases (els dos restants).

Les soques de *K. pneumoniae* multiresistents solen presentar, en general, una menor diversitat genètica que la que s'observa en *E. coli*. A més, *K. pneumoniae* acostuma a estar més freqüentment involucrada en brots hospitalaris^{437,443,444}. Segons aquest estudi, a Catalunya i dins de les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 hi ha circulat cinc grups clonals, pulsotips de l'A al E, trobant-se dins del pulsotip A i del pulsotip E 3 i 18 subtipus, respectivament. La clona E ha causat brots nosocomials en tres hospitals: Hospital Genetal de Vic, Hospital General de Granollers i Hospital Sant Joan de Deu, i la clona A en l'Hospital General de l'Hospitalet i en el centre sociosanitari La Santa Creu. Els pulsotips descrits en aquest estudi, A-E, es corresponien a les seqüències tipus ST101, ST17, ST1233, ST14 i ST405, respectivament. La ST405, majoritari (77,64%), s'ha detectat en tots els hospitals excepte a l'Hospitalet. Aquesta ST va ser descrit per primer cop en una soca aïllada a Casablanca (Marroc)⁴⁵³, portadora dels gens *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-76}, *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{OXA-1}, però no *bla*_{OXA-48}. Les primeres soques de la ST405 portadores del gen *bla*_{OXA-48} foren descrites per Paño-Pardo *et al.*³⁰³ a Espanya, el 2013, i anaven acompanyades per la resta de gens: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-76}, *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{OXA-1}. En el nostre cas un 86,4% de les soques portaven els quatre gens, lluny del 2,35% que descriviren a Bèlgica o de la única soca estudiada per Potron *et al.*³⁵⁷ en un estudi multicèntric internacional que incloïa països com França, Marroc, Turquia o Bèlgica. Una altra diferència entre les soques de *K. pneumoniae* productores d'OXA-48 de la ST405 està en l'entorn del gen *bla*_{OXA-48}. A Espanya, Paño-Pardo *et al.*³⁰³, i al Marroc, Potron *et al.*³⁵⁷, van descriure que es localitzava en el transposó Tn1999, en canvi a Bèlgica, Glupczynski *et al.*³¹⁹, van descriure que es localitzava en el Tn1999.2. En el nostre estudi es reflecteix aquesta diversitat, essent el Tn1999.2 el majoritari amb un 89,4% dels casos. En canvi hi ha un únic plasmidi que és el responsable de la difusió del gen *bla*_{OXA-48}, del grup d'incompatibilitat Incl (anteriorment classificat com a Incl/M). En algun d'aquests estudis es van estudiar els gens que confereixen resistència enfront els aminoglicòsids i les quinolones, com és el cas del de Glupczynski *et al.*³¹⁹ on un 75% de les soques tenien el *qnrB1* i l'*aac(6')-Ib-cr*, o el realitzat per Samuelsen *et al.*³³¹ on la soca estudiada també tenia un *qnrB* i l'*aac(6')-Ib-cr*. Aquests resultats són similars als observats en el nostre estudi, on el 89,4% de les soques pertanyents a la ST405 tenien el gen l'*aac(6')-Ib-cr* i el 97% el gen *qnrB*.

Així doncs, la ST405 està clarament associat als gens *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} i *bla*_{TEM-1}. En aquesta ST el gen *bla*_{OXA-48} es localitza majoritàriament en l'entorn Tn1999.2 i està vehiculat per un plasmidi Incl.

En el nostre estudi es van aïllar 16 soques (18,8%) productores de la carbapenemasa OXA-48 que pertanyien a la ST101. Aquesta ST s'ha trobat en els hospitals de Mataró i el de General de Vic, i fou l'única ST aïllat a l'Hospital General de l'Hospitalet. Aquesta ST es va aïllar per primer

cop als EUA el 2006 en soques d'origen boví⁴⁵⁴, de les qual no es descriu si portaven algun gen de resistència. Posteriorment, se l'ha relacionat amb la carbapenemasa KPC-2 a EUA, Brasil, Espanya i Itàlia^{237,454-457}, amb la NDM-1 a Turquia⁴⁵⁸, amb la BLEA SHV-12 a Txèquia⁴⁵⁹ i la CTX-M-3 a Taiwan⁴⁶⁰ i Grècia⁴⁹. Tal com hem observat en el nostre estudi, diferents treballs^{314,357} mostren que les soques pertanyents a aquesta ST i que produeixen la carbapenemasa OXA-48, tenen el gen *bla*_{OXA-48} localitzat en el Tn1999.2, excepte Espedido *et al.*³²⁵ que la va descriure en el transposó Tn1999. De la mateixa manera que en la ST405, el gen *bla*_{OXA-48} es situa en un plasmidi Incl/M, que posteriorment s'han caracteritzat com Incl. En el cas de Espedido *et al.*³²⁵ el plasmidi trobat tenia una homologia del 95% amb el plasmidi Incl, degut a que a més de tenir el transposó Tn1999, hi havia dos transposons més. Les soques de la ST101 presentaren la penicil·linasa cromosòmica SHV-1, tal com també descriu Poirel *et al.* al 2014⁴⁵⁸, en canvi Cuzon *et al.* al 2010⁴⁶¹ hi trobaren la SHV-11. I, a l'igual que amb la clona de ST405, en la ST101 el gen *bla*_{OXA-48} es troba associat als gens *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} i *bla*_{TEM-1} en la resta d'estudi entre el 100% i el 53%^{297, 436, 439357}, i en el nostre en un 68,7%. Malauradament no comptem amb informació sobre la presència d'altres gens de resistència a aminoglicòsids o quinolones per poder comparar el fet que les soques de la ST101, a diferència de la ST405, a més de portar els gens *acc(3')-IIa*, *aac(6')-Ib* hem trobat els gens *aac(2')-Ia*, *ant(2')-Ia* o *aph(3')-Ia*. I, és on hem descrit l'únic factor de resistència a quinolones, el *qnrS*, a part del *qnrB*.

La soca de la ST17 es va aïllar a l'Hospital General de Granollers. Aquesta seqüència tipus es va identificar per primera vegada a França el 2005³⁸⁶ i ha estat descrita com a portadora de la carbapenemasa KPC-2 a Grècia i a Brasil^{462,463}. En l'estudi de Glupczynski *et al.*³¹⁹ la localització del gen *bla*_{OXA-48} estava en el Tn1999.2 i en el plasmidi Incl/M, d'aproximadament una mida de 63 Kb, concordant amb els nostres resultats. L'OXA-48 en soques de la ST17 pot^{405,464,465} o no^{319, 380} anar associada a altres betalactamases, concretament les BLEA CTX-M-15 i SHV-12; en el nostre cas no anava associada. La presència de gens de resistència a aminoglicòsids només està determinada en l'estudi d'Oteo *et al.*⁴⁰⁵ on les soques eren portadores dels gens *aac(6')-Ib-cr* i *aac(3')-IIa*. A més descriu dues soques resistents a la ciprofloxacina, una de les quals tenia el gen *qnrB4*. En el nostre estudi la soca fou sensible als aminoglicòsids i a quinolones, i només era portadora dels gens que codifiquen la bomba d'expulsió OqxAB i dels gens *strA* i *strB*.

La soca pertanyent a la ST14 es va aïllar a l'Hospital General de Vic. La ST14 va ser descrita per primera vegada a França el 2005 en una soca productora de la BLEA CTX-M-15³⁸⁶ i, posteriorment, es va descriure en altres indrets del món^{380,466,467}. Pel que fa a les carbapenemasas, la primera soca de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa OXA-48 que es va aïllar a Turquia²⁹⁹ pertanyia a aquesta ST. També s'ha trobat en soques portadores de NDM-1 a la Índia²⁴⁹, Suècia o Regne Unit⁴⁶⁸, i en soques productores de la KPC-2 als EUA⁴⁶⁹. En la primera soca descrita, l'OXA-48 estava situada en el Tn1999, en canvi nosaltres l'hem trobat en l'entorn Tn1999.2 a l'igual que Potron *et al.*³⁵⁷. En el nostre estudi la soca només era portadora de la carbapenemasa OXA-48 i la penicil·linasa cromosòmica SHV-1, a diferència de la de la soca aïllada al 2001 a Turquia, portadora de la SHV-11. En el cas de Poirel *et al.*²⁹⁹ les soques eren també portadores de la CTX-M-15. Pel que fa referència a les resistències associades, només Potron *et al.*³⁵⁷ menciona que tres de les quatre soques eren resistents a les quinolones i als aminoglicòsids, però no descriu els gens implicats. La nostra soca era

sensible a la resta d'antibiòtics estudiats i només era portadora dels gens que codifiquen la bomba d'expulsió OqxAB.

La ST1233 es descriu per primera vegada en aquest treball i és un SLV (*single locus variant*) de la ST540. La soca de *K. pneumoniae* ST1233 es va aïllar de la mostra urinària d'un pacient de 70 anys, amb una infecció del tracte urinari, tractada amb ciprofloxacina. Aquesta soca presentava resistència a l'ampicil·lina, piperacil·lina i a l'amoxicil·lina/àcid clavulànic, i era portadora de les betalactamases OXA-48 i SHV-42. Aquesta penicil·linasa cromosòmica, la SHV-42, variant de la SHV-1, és el tercer cop que es descriu a nivell mundial. Prèviament s'havia descrit en un cas a Canadà i a l'Índia^{470,471}. En aquests estudis, la SHV-42, es classifica com a BLEA, degut a la seva activitat enfront cefalosporines de tercera generació (cefotaxima i ceftazidima), tanmateix en el nostre estudi la soca és sensible a ambos antibiòtics. De fet, l'activitat enfront cefalosporines de tercera generació està en discussió. En aquests dos estudis catalogaven aquesta variant de la SHV-1 com a una BLEA mitjançant estudis "*in silico*" de l'estructura protèica i de l'activitat enzimàtica, sense realitzar estudis de clonació i transformació; a més en els dos estudis hi havia soques amb activitat BLEA a les quals no es va poder identificar quin tipus d'enzim produïa dita activitat. Però tot i així ells catalogaven la SHV-42 com a una BLEA sense proves concluints. Això posa en discussió si la SHV-42 és o no una BLEA. En el nostre estudi la soca fou sensible als aminoglicòsids i a quinolones, i només era portadora dels gens que codifiquen la bomba d'expulsió OqxAB.

Utilitzant els criteris més exigents, es van agrupar les STs en grups anomenats complexos clonals (CC). Un complex clonal està format per un conjunt de STs que comparteixen 6 al·lels idèntics dels 7 locus. Aquesta classificació s'ha fet utilitzant el eBURST(<http://eburst.mlst.net/>). Chen L. *et al.*⁴⁷², al 2015, va descriure que s'havien descrit 136 CC i 528 singletons (STs simples que no pertanyen a cap CC). En un intent de proporcionar una estructura filogenètica dins de l'amplia epidemiologia de *K. pneumoniae*, Breuer *et al.*⁴⁵³ va proposar subdividir els CCs en grups clonals (CG), on la ST més prevalent seria el que donaria el nom al CG i incloure tant els SLV (*Single Locus Variant*) com els SLV d'aquests SLV. Per exemple, la ST258 és la ST més prevalent del CG258, la ST512 és una SLV de la ST258; la ST650 és un SLV de la ST512, i així aquestes dos ST estan dins el llinatge filogenètic del CG258⁴⁵³. Les seqüències tipus que es descriuen en aquest estudi pertanyen al CG15 (ST14), al CG17 (ST17), al CG101 (ST101), CC450 (ST405) i al CC540 (ST1233), segons es descriuen en diversos estudis^{387,474-476}. El CG15 s'ha descrit en soques de *K. pneumoniae* productores de BLEA d'origen espanyol⁴⁷³, africà⁴⁵³ i vietnamita; el CG17 i CG101 en soques *K. pneumoniae* productores de BLEA d'origen francès i italià, respectivament⁴⁷³; i el CC405 en soques de *K. pneumoniae* productores de BLEA d'origen txec⁴⁵⁹.

Amb l'aparició de la seqüenciació massiva dels genomes microbians, es va obrir tot un ventall de possibilitats per a la seva tipificació filogenètica. Una d'elles és l'anomenada *core genome MultiLocus Sequence Typing* (cgMLST o MLST+) que es basa en la tipificació mitjançant la comparació d'un alt nombre de gens dels diferents genomes, en comptes dels set o vuit que s'utilitzen en el MLST.

Les dades obtingudes per MLST+, mitjançant la seqüenciació massiva del genoma de 37 soques representatives dels diferents pulsotips (i subpulsotips) ens van permetre observar una elevada correlació amb els resultats obtinguts en l'estudi de clonalitat, mitjançant PFGE, i els de filogènia, mitjançant el MLST. A més ens va permetre observar la diferència genètica, el nombre de gens de diferència entre les diferents STs i entre els diferents subtipus dins una mateixa ST. Tot i la correlació dels resultats, també es van observar certes discrepàncies. Dins de la ST405, ens vàrem trobar dues parelles que per MLST+ eren idèntiques i que en canvi per PFGE presentaven diferents subtipus. Una parella englobava els subtipus E₁₂ i E₁₃ (dues bandes de diferència) i l'altra dels subtipus E₁ i el E₁₆ (amb dues bandes de diferència). Totes les soques van ser aïllades en diferents hospitals i clínicament no semblava que hi hagués cap relació epidemiològica. El problema actual del MLST+ és el de la interpretació dels resultats. En el nostre cas teníem el PFGE i el MLST per a poder agrupar les soques i establir relacions de clonalitat, però no sempre és així. Weterings *et al.* al 2015⁴⁷⁷ va recórrer a l'ús de la WGS i al MLST+ per a l'estudi d'un brot en dues institucions hospitalàries d'Holanda originat per soques de *K. pneumoniae* del ST258 productores de la carbapenemasa KPC-2 i resistents a la colistina. Abans d'emprar aquestes tècniques havia realitzat el MLST i AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), i al comparar els resultats, va trobar també una concordància entre el MLST+ i els d'AFLP englobant totes les soques en el mateix *cluster*, pertanyent a la ST258. També Bathoorn *et al.* al 2015⁴⁷⁸ van utilitzar tècnica el MLST+ per comparar una soca de *K. pneumoniae*, pertanyent a la ST16 i portadora de carbapenemasa NDM-5, aïllada d'un pacient holandès amb d'altres soques de la mateixa ST aïllades a Dinamarca, i varen concloure que les soques estaven relacionades clonalment, ja que no mostraven canvis en els al·lels. Així, és possible que per PFGE poguem detectar petites variacions del genoma com translocacions o mutacions en zones no codificadores i que crean o eliminen dianes per l'enzim de restricció, i que no són detectables o si més no valorables per MLST+. En ambdós treballs es conclou doncs que el WGS és una tècnica potencial per l'estudi epidemiològic, que permet obtenir una extensa informació de l'ADN amb només una tècnica.

Des de la identificació de la carbapenemasa OXA-48²⁹⁹ i el posterior estudi del seu entorn genètic^{303,348,350,479} s'ha descrit que el gen *bla*_{OXA-48} es trobava dins d'un transposó, el Tn1999, el qual depenent del nombre de seqüències d'inserció (IS1R) o de la inserció d'un altre transposó (Tn2015) ha donat lloc a diferents variants: Tn1999.2³⁵⁴, Tn1999.3³⁴⁹ i Tn1999.4⁴⁷⁹. A nivell mundial la més descrita és la Tn1999.2, tal i com van demostrar en un estudi intercontinental realitzat per Potron *et al.*³⁵⁷ on el 92,3% de les *K. pneumoniae* identificades en diferents regions del món (Marroc, França, Holanda, Bèlgica, Sud Àfrica, Líban, Tunísia, Turquia o Egipte) tenien el gen *bla*_{OXA-48} en el Tn1999.2. En aquest estudi el 91,8% presentaren aquest entorn, i es distribuïen entre tots les ST identificades, mentre que la resta que tenien el gen *bla*_{OXA-48} en el Tn1999 eren totes de la ST405. Les nostres seqüències del Tn1999.2, des de la IS1999 *upstream* fins el gen *lysR*, són 100% idèntiques a les descrites en el plasmidi pKPN-El-Nr.7³⁵⁹, el qual mostra un elevat percentatge d'homologia (aprox.99%) amb altres plasmidis seqüenciats portadors del gen *bla*_{OXA-48}.

El gen *bla*_{OXA-48} s'ha descrit majoritàriament arreu en un plasmidi conjugatiu del grup d'incompatibilitat IncL, anteriorment classificat com IncL/M. Aquest plasmidi té un tamany

aproximat de 62 Kb^{303,348,390}. Tal i com s'ha mencionat prèviament en l'apartat de l'introducció referit a l'OXA-48, el plasmidi IncL és l'únic responsable de la dispersió i difusió d'aquesta carbapenemasa en soques d'enterobacteris arreu del món^{312,314,320,323,331,354,367,375,376}. També s'ha identificat aquest plasmidi com a portador dels gens *merA* (que codifica per una mercuri reductasa) i *bla*_{TEM-1}³⁵⁹.

És interessant ressaltar que la carbapenemasa OXA-48, que ha estat, i és la més freqüentment aïllada arreu, vagi acompanyada d'una BLEA pandèmica com la CTX-M-15^{305,306,314,317,324,357,480}. És per això que ens vàrem preguntar si ambdós enzims es podrien difondre a través d'un mateix plasmidi o no. Els resultats mostren que els gens *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{OXA-1} es localitzaven en un plasmidi IncFIIK, tal i com descriu la bibliografia quan es fa referència a soques de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-15^{125,213,481}.

L'alt percentatge (89,4%) de soques que coexpressen la OXA-48 i la CTX-M-15 ha estat ampliament documentada^{301,319,350,460}, descrivint-se però en percentatges lleugerament inferiors (al voltant del 64%)^{260,303,305,311,314,317,326,357,480}.

El problema de les soques portadores de carbapenemasas és que són soques multiresistents^{219,222,238,252,482}, i en el cas de l'OXA-48 no hi ha una excepció. Les soques han resultat ser resistents en la majoria dels casos a aminoglicòsids, quinolones, tetraciclins, cloranfenicol, sulfamides i fosfomicina. En el cas dels aminoglicòsids es van estudiar els enzims modificadors d'aminoglicòsids (AME) i vàrem observar que els gens responsables de la resistència eren *aac(3)-IIa* i *aac(6')-Ib-cr*. La presència d'aquests gens també ha estat descrita per Oteo J. *et al.* al 2012³²¹. Per mitjà de la WGS, a més, es va poder determinar que els gens de resistència a estreptomicina (*strA* i *strB*) i el gen *aph(3')-Ia* en les soques de la ST101. Aquests gens no varen ser evaluats per les tècniques clàssiques perquè per al diagnòstic clínic només s'avaluen la tobramicina, la gentamicina i l'amicacina. També cal dir que tant el gen *acc(3')-IIa* com el gen *aac(6')-Ib-cr* s'han descrit en el plasmidi IncFIIK, conjuntament amb el gen *bla*_{CTX-M-15}¹²⁵, això podria explicar el fet que la majoria de les nostres soques siguin portadores dels tres gens *bla*_{CTX-M-15}, *aac(3)-IIa* i *aac(6')-Ib-cr*.

Històricament, la resistència a quinolones s'ha associat a mutacions en les regions QRDR de les topoisomerases, en especial las subunitats GyrA i ParC en bacteris gramnegatius, mentre que la presència dels factors plasmídics pot trobar-se tant en soques sensibles com resistents a quinolones, tal i com hem pogut corroborar en el nostre estudi. Diversos estudis^{260,369,483} han cercat la relació entre resistència a quinolones i la presència dels Qnr en soques productores d'OXA-48. Talment els nostres resultats, descriuen soques resistents només a l'àcid nalidíxic amb *qnrB*, i sense presentar mutacions als QRDR⁴⁸³; o resistents a l'àcid nalidíxic i a la ciprofloxacina amb amb *qnrS* i/o *qnrB*, però no havent estudiat els QRDR^{260,369}. Aprofitan que teníem les seqüències de les topoisomerases, obtingudes per WGS, varem voler determinar si en la resistència a quinolones també hi estava implicada la regió QRDR. I, únicament es van observar canvis en la seqüències de GyrA i ParC en cinc soques. Algunes mutacions ja havien estat descrites com a causa de la resistència a quinolones, com per exemple, en GyrA Ser83Tyr o Asp87Gly^{88,89,91,95-102}, o en ParC Ser80Ile^{89,91,96-100,103,106,484,485}; però també, com en el cas de la soca del pulsotip B (ST17), les mutacions trobades en *gyrA* no es trobaven en cap regió codificant important. Així doncs, en el 86,5% de les nostres soques la resistència a quinolones

no es deu a mutacions en els QRDR, cap doncs la possibilitat que l'accumulació de mutacions en els *qnr* poguessin originar resistència a les quinolones¹⁴², o més plausible i amb una major concordança amb els nostres resultats, seria el fet de la presència conjunta dels gens *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr* i la modificació de l'activitat de la bomba d'expulsió OqxAB, podria generar dita resistència⁴⁸⁶.

També vam observar per WGS que totes els soques presentaven la bomba d'expulsió OqxAB. Aquesta bomba participa en el grau de resistència a les quinolones quan la seva expressió ha estat truncada o quan es sobreexpressa⁴⁸⁷⁻⁴⁸⁹; tot i que en un principi es creia que es trobaria en totes les soques de *K. pneumoniae*, en alguns estudis, com per exemple un de Rodríguez-Martínez *et al.*⁴⁹⁰ hi ha soques que no la presenten tot i no esclarir el perquè d'aquesta absència.

Davant l'evidència de la diversitat de patrons de resistència als antibiòtics betalactàmics en soques d'un mateix clon i amb el mateix genotip, es va voler observar si les proteïnes de la membrana externa, porines, i la bomba d'expulsió AcrAB hi jugaven algun paper que expliqués aquesta diversitat.

En *K. pneumoniae*, les porines que per alteracions en la seva expressió poden originar canvis en la sensibilitat del bacteri enfront antibiòtics betalactàmics i/o fluoroquinolones són l'OmpK35, l'OmpK36 i la LamB^{32,34,39,40,47,49,323,491}. Per mitjà de la WGS vàrem determinar que les porines LamB, PhoE, OmpK35 no presentaven cap dels canvis estructurals que han estat descrits que afecten el seu funcionament^{34,48,492}. En el cas de la porina OmpK26, només hi havia una soca que presentava una substitució, però que no afectava a la viabilitat de la porina ni a la seva funcionalitat. En l'estudi de García-Sureda *et al.*³⁷ descriu que el paper d'aquesta porina s'accentua amb pèrdua de les porines principals (OmpK35 i OmpK36) ja que compensa l'absència d'aquestes dues, i en el cas de sobreexpressar-se s'ha vist que pot conferir resistència als carbapenèmics. I en el cas de la porina quiescent OmpK37^{33,51,52}, les soques amb canvis puntuals i/o insercions en la seqüència nucleotídica tot i provocar un canvi estructural a nivell proteïc, no tenien cap efecte en la sensibilitat, ja que com s'ha citat^{51,52}, l'alteració d'aquesta porina no ha estat relacionada amb la resistència antibiòtica.

La més descrita ha estat l'OmpK36, la seva pèrdua o tenir una variant específica d'aquesta porina, en soques de *K. pneumoniae* productores de BLEA o AmpCp, s'ha associat amb un descens de la sensibilitat als carbapenèmics^{46,493,494} i també pot comportar una disminució de la sensibilitat a fluoroquinolones³⁵. En el cas que també hi hagi una deficiència de la porina OmpK35, aquesta sensibilitat es redueix encara més. En el nostre estudi el 83,4% de les soques, de les que se'ls va obtenir la seqüència de les porines (n=37), tenien la seqüència aminoacídica idèntica a la porina OmpK36 de la soca NTUH-K2044 i la de la soca NVT2001 (GU461279.1). En canvi, l'altre 16,6% de les soques presentaven canvis: dues (CARB182, CARB042) presentaven una deleció en la seqüència nucleotídica (en diferents lloc en cada soca) que va originar un canvi en el marc de lectura, donant lloc a una terminació primerenca de la traducció. Aquestes dues soques eren resistents a fluoroquinolones i als carbapenèmics (ertapenem i imipenem). Així doncs, en el cas de la soca CARB182, la pèrdua de la porina OmpK36 sumat a que tenia una betalactamasa tipus CTX-M (CTX-M-15) i una carbapenemasa de classe D (OXA-48) podria explicar la elevada resistència a l'imipenem i l'ertapenem, i

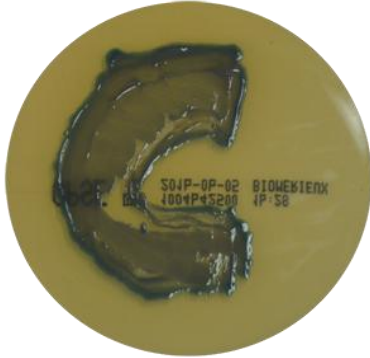
segurament a la pèrdua de la porina OmpK36 si li sumem la possible sobreexpressió de la bomba d'expulsió OqxAB, això explicaria la elevada resistència a les quinolones (àc. nalidíxic) i a les fluoroquinolones (ciprofloxacina)^{35,489,490}. En la soca CARB042, que no tenia la betalactamasa tipus CTX-M, tenia un patró de resistència enfront els carbapenèmics, quinolones i fluoroquinolones menor al de la soca CARB182.

Les altres quatre soques presentaven mutacions puntuals que, tot i donar lloc a proteïnes de membrana (OmpK36) diferents a la de la soca de referència ATCC 13883, havien estat identificades prèviament.

La soca CARB098 la seqüència de la seva porina OmpK36 era 99% semblant a la variant descrita com OmpK36-v5³² específica de la ST17, mateixa ST que la soca CARB098, tot i que en aquell estudi les CIM als carbapenèmics variaven, p.e. imipenem (1 - >32) i ertapenem (0,38 - >32), degut a les carbapenemases (KPC-2 i/o VIM-1), i en el nostre cas la soca era sensible als carbapenèmics i només tenia l'OXA-48. La soca CARB039 tenia dos mutacions importants a nivell nucleotídic, i tenia un 99% d'homologia amb la seqüència aminoacídica de la porina OmpK36 de les soques NTUH-K2044 i la de la soca NVT2001 (GU461279.1), aquesta última descrita en un estudi realitzat per Matsumura Y. *et al.* al 2014⁴⁹³. Si ens fixem amb el seu patró de sensibilitat, s'observà que era sensible a l'imipenem, a cefalosporines de tercera i quarta generació i cefoxitina, això ens indicà que tenia una OmpK36 viable i funcional, ja que tal i com s'ha dit amb anterioritat l'absència d'aquesta porina ocasionaria canvis en la sensibilitat a aquest antibiòtic^{34,38,40,43,45,48,49,489,492}. La resistència d'aquesta soca a les quinolones no s'explicà, doncs, per la pèrdua de la porina OmpK36 ni cap altra porina, però sí per la mutació en *gyrA*, la presència del *qnrB*, *aac(6')Ib-cr* i/o a la sobreexpressió de la bomba d'expulsió OqxAB, que tot i detectar-la no s'havia estudiat la seva expressió. En la soca CARB077, la seva porina OmpK36 era 99% semblant a la de les soques NTUH-K2044 i NVT2001 (GU461279.1), amb la única diferència, descrita per Shields *et al.*³⁸, de la inserció de dos codons que no provocaven canvis estructurals que afectessin a la funcionalitat de la proteïna. El patró de sensibilitat d'aquesta soca als betalactàmics i a les quinolones s'explica, en el cas dels betalactàmics per les betalactamases que presentava, i en el cas de les quinolones i les fluoroquinolones per les dues mutacions en *gyrA* i una en *parC*, la presència del *aac(6')Ib-cr* i potser també a la sobreexpressió de la bomba d'expulsió OqxAB, que tot i detectar-la no s'ha estudiat la seva expressió. En la soca CARB122, la seva porina OmpK36 era 91% semblant a la porina OmpK36 de la soca ATCC 13883, 97% a la de la soca MGH78578, i 100% a la de la soca KUN-2012-0129, malgrat que aquesta última estava parcialment seqüenciada i li faltaven 42 aminoàcids finals de la proteïna. Segons Matsumura *et al.* al 2014⁴⁹³, la soca que presentava aquesta OmpK36 modificada, per SDS-PAGE s'observava dita porina, demostrant que no estava afectada d'una manera que pogués afectar a la seva expressió. Aquesta soca era resistent solament a l'ampicil·lina, la piperacil·lina i la combinació amb l'inhibidor de betalactamases: amoxicil·lina/ àc. clavulànic. Presentava els gens *bla*_{OXA-48}, i *bla*_{SHV-76}, que expliquen el patró de resistència als antibiòtics betalactàmics. Així doncs, tot i presentar una variant de l'OmpK36 no semblava indicar que tingués un rol en el que es referia a la resistència enfront els antibiòtics.

Finalment, mencionar que diferents estudis^{62,63,388} han postulat que una desregulació de la bomba d'expulsió AcrAB, podria donar lloc a una sobreexpulsió dels substrats als quals tenia afinitat, entre ells els antibiòtics betalactàmics, i així generar que la bactèria presentia

resistència a dits substrats; en el nostre estudi no es va poder afirmar, degut a la manca de diferències en la expressió d'aquesta bomba entre soques d'un mateix ST però amb diferent patró de sensibilitat als antibiòtics betalactàmics, i a altres famílies d'antibiòtics que també tenien afinitat per aquesta bomba (p.e. fluoroquinolones).



ONCLUSIONS

1. La prevalença de *K. pneumoniae* portadores de la carbapenemasa OXA-48 és baixa (2,2%).
2. El test modificat de Hodge té una baixa especificitat per detectar la carbapenemasa OXA-48.
3. Entre les soques de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa OXA-48 a Catalunya aïllades al 2012, es va detectar una baixa diversitat genètica, identificant-se 5 clons (A-E) per PFGE que es correspongueren amb les ST101, ST17, ST14, ST1233 i ST405, respectivament. Això indica una difusió clonal de la carbapenemasa.
4. L'OXA-48 és present en la majoria de centres estudiats (8 de 12) amb una baixa diversitat clonal (essent ST101 i ST405, les seqüència tipus majoritàries).
5. El plasmidi IncI i l'entorn genètic Tn1999.2 són els elements genètics mòbils implicats en la difusió del gen *bla*_{OXA-48}, seguint la dinàmica mundial.
6. L'OXA-48 es troba freqüentment associada a la betalactamasa d'espectre ampliat CTX-M-15 (89,4%) tot i que els gens responsables es troben en plasmidis diferents.
7. Les soques portadores de l'OXA-48 dels ST101 i ST405 presentaven resistència associada a aminoglicòsids (95,3%), quinolones (85,8%) i sulfamides (89,4%).
8. Els patrons de resistència a aminoglicòsids es justifiquen per la presència dels gens dels enzims modificadors d'aminoglicòsids (AME) AAC(3')-IIa i/o AAC(6')-Ib que confereixen resistència a kanamicina, tobramicina, gentamicina i ampicacina.
9. Dels diferents mecanismes de resistència a quinolones, QnrB s'ha trobat en el 88,2% de les soques. Alteracions en la regió QRDR de les topoisomerases només s'han observat en el 10% de les 37 estudiades per seqüenciació massiva.
10. Els estudis d'expressió de les bombes d'expulsió AcrAB, que pretenien explicar les diferències en els nivells de resistència a betalactàmics i altres antimicrobians, no han estat concloents. L'anàlisi de les seqüències aminoacídiques de les porines tampoc no mostraren diferències que poguessin explicar el diferent fenotip.
11. La seqüenciació massiva del genoma microbià s'ha mostrat com una eina útil per als estudis d'epidemiologia molecular i per a la detecció de mecanismes de resistència. Tot i això, la detecció de certes discrepàncies en les relacions clonals de les soques obtingudes per altres tècniques, com el PFGE, o discrepàncies amb la detecció individualitzada de gens de resistència, fa que s'hagi de valorar amb cura els resultats obtinguts i, possiblement, s'hagi d'optimitzar tant la tècnica com sobretot les eines per a l'anàlisi de les seqüències.

1. The prevalence of OXA-48 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* was low (2.2%).
2. The modified Hodge test has a low specificity for the detection of OXA-48 carbapenemase.
3. Genetic diversity among the OXA-48 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains isolated in Catalonia in 2012 was low. Five clones were identified (A to E) by PFGE corresponding to the strains MLST ST101, ST17, ST14, ST405 and ST1233, respectively. This indicates a clonal spread of this carbapenemase.
4. OXA-48 was detected in the majority of the studied hospitals (8 of 12) with a low clonal diversity (ST101 and ST405 being the predominant sequence types).
5. The IncL plasmid and genetic background Tn1999.2 were the mobile genetic elements identified as involved in the spread of the *bla*_{OXA-48} gene, which matches the global dynamic.
6. OXA-48 was frequently associated with CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (89.4%), although the responsible genes were located in different plasmids.
7. OXA-48-carrying ST101 and ST405 strains showed resistance associated with aminoglycosides (95.3%), quinolones (85.8%) and sulfonamides (89.4%).
8. The aminoglycoside resistance pattern was justified by the presence of genes expressing aminoglycoside-modifying enzymes (AME) AAC(3')-IIa and / or AAC(6')-Ib, which confer resistance to kanamycin, tobramycin, gentamicin and amikacin.
9. Of the various resistance mechanisms against quinolones, QnrB was found in 88.2% of the 37 strains studied by massive sequencing. Alterations in the QRDR region of topoisomerases were observed only in 10% of these strains.
10. Studies on the efflux pump AcrAB expression, aimed at understanding the differences in levels of resistance to beta-lactam and other antibiotics, were not conclusive. Analysis of porin amino acid sequences show any differences that could explain the variable resistance pattern.
11. Massive sequencing of microbial genomes has proved to be a useful tool for molecular epidemiology studies and for the detection of resistance mechanisms. However, the detection of certain discrepancies in the clonal relatedness among strains when comparing results obtained with other techniques such as PFGE, or in the detection of individual resistance genes, calls for a careful assessment of the results, and possibly the techniques, above all the sequence analysis tools, need to be optimized.



REFERÈNCIES

1. Bergey DH. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 2: The *Proteobacteria*, Part B - The *Gammaproteobacteria*.; 2005.
2. Janda J AS. The Enterobacteria. 2nd ed. Washington DC, USA; 2006.
3. Prats G. Microbiología Y Parasitología Médicas. *Editorial Médica Panamericana, ed.*. Madrid; 2013.
4. Janda J. Taxonomic Update on Enteric- and Aquatic-Associated Gram-Negative Bacteria: Proposed New Species and Classification Changes. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2014;36(1):5.
5. Madigan M. Brock Biology of Microorganisms, 13th Edn.; 2012.
6. Murray Patrick R, Rosenthal Ken S & PMA. Microbiología Médica. Elsevier España, S.A.; 2005.
7. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2(5).
8. Luce E. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition. *Lippincott Williams & Wilkins*; 2010.
9. Navarro F, Miró E MB. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:638-45.
10. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2011;29(07).
11. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010;13(5):558-64.
12. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J. Intern. Med.* 2012.
13. Martínez-Martínez L., Calvo J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(Supl 2):25-31.
14. García-Sánchez J, García-Merino E M-RA. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? *Rev Esp Quim.* 2012;25:100-21.
15. Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, et al. Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D β -lactamases. *J. Biol. Chem.* 2013;288(39):27960-71.
16. van Heijenoort J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:636-63.
17. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology*. WCB/McGraw-Hill; 1999.
18. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 2010.
19. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003;36((Supl 1)):S11-23.

20. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 2010;362(19):1804-13..
21. Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006;14(9):413-420.
22. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(4):380-391..
23. Jacoby GA. Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(4):1123-1129..
24. Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2011;65(1):455-478.
25. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989;33(3):259-63..
26. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-33..
27. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976.
28. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1980;289(1036):321-31.
29. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 2009.
30. Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: History, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy* 2012;32(5):399-407.
31. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.* 1998;27 Suppl 1:S48-S53.
32. Papagiannitsis CC, Giakkoupi P, Kotsakis SD, et al. OmpK35 and OmpK36 porin variants associated with specific sequence types of *Klebsiella pneumoniae*. *J Chemother.* 2013;25(4):250-4.
33. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of *bla*_{ACT-1} β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006.
34. Clancy CJ, Chen L, Hong JH, et al. Mutations of the *ompK36* porin gene and promoter impact responses of sequence Type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013.
35. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003.

36. Hernández-Allés S, Albertí S, Alvarez D, *et al.* Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 1999;145:673-679.
37. García-Sureda L, Doménech-Sánchez A, Barbier M, Juan C, Gascó J, Albertí S. OmpK26, a novel porin associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011.
38. Shields RK, Nguyen MH, Potoski BA, *et al.* Doripenem MICs and OmpK36 porin genotypes of sequence type 258, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* may predict responses to carbapenem-colistin combination therapy among patients with bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(3):1797-801.
39. Shi W, Li K, Ji Y, *et al.* Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin ompK36 loss and DHA-1 β -lactamase production. *Brazilian J. Microbiol.* 2013.
40. García-Fernández A, Villa L, Carta C, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(4):2143-2145.
41. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, *et al.* Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(10):4201-7..
42. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen G-X. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(6):2014-8.
43. Sho T, Muratani T, Hamasuna R, Yakushiji H, Fujimoto N, Matsumoto T. The Mechanism of High-Level Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Underlying OmpK36-Deficient Strains Represent a Threat of Emerging High-Level Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* with IMP-1 β -Lactamase Production in Japan. 2013.
44. Mena A, Plasencia V, García L, *et al.* Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(8):2831-7.
45. Shin SY, Bae IK, Kim J, *et al.* Resistance to carbapenèms in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. *J. Med. Microbiol.* 2012.
46. Tsai YK, Liou CH, Fung CP, Lin JC, Siu LK. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenèms. *PLoS One* 2013.
47. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011.
48. Zhang Y, Jiang X, Wang Y, *et al.* Contribution of β -lactamases and porin proteins OmpK35 and OmpK36 to carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014.
49. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, *et al.* Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-

- M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *J. Clin. Microbiol.* 2013.
50. Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, *et al.* Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 1992;358(6389):727-33.
 51. Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, Benedí VJ, Albertí S. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 1999;181(9):2726-2732.
 52. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-1161.
 53. Ley P, Bekkers A, Meersbergen J, Tommassen J. A comparative study on the *phoE* genes of three enterobacterial species. Implications for structure-function relationships in a pore-forming protein of the outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 1987;164(2):469-475.
 54. Chatterjee S, Rothenberg E. Interaction of bacteriophage λ with its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses* 2012;4(11):3162-78.
 55. Bambeke F Van, Balzi E, Tulkens M. Antibiotic Efflux Pumps. *Biochem. Pharmacol.* 2000;60(00):457-470.
 56. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980;77(7):3974-3977.
 57. Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: Regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003;6(5):446-451.
 58. Piddock LJ V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006;4(8):629-636.
 59. Paulsen IT, Chen J, Nelson KE, Saier MH. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001;3(2):145-150.
 60. Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, Schmitt L. Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps-first come, first served? *FEBS J.* 2010;277(3):540-549.
 61. Piddock LJ V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19(2):382-402.
 62. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010.
 63. Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, *et al.* Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One* 2009.
 64. Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(8):4450-4458.

65. Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, *et al.* In vitro selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011.
66. Veleba M, Schneiders T. Tigecycline resistance can occur independently of the *ramA* gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(8):4466-4467.
67. Linde HJ, Notka F, Metz M, Kochanowski B, Heisig P, Lehn N. In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of *marR*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(7):1865-1868.
68. Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2009;1794(5):769-781..
69. Nikaido H, Zgurskaya HI. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001;3(2):215-218.
70. Tikhonova EB, Yamada Y, Zgurskaya HI. Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem. Biol.* 2011;18(4):454-463.
71. Li D-W, Onishi M, Kishino T, *et al.* Properties and expression of a multidrug efflux pump AcrAB-KocC from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull.* 2008.
72. Du D, Wang Z, James NR, *et al.* Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 2014;509(7501):512-515.
73. Tikhonova EB, Zgurskaya HI. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *J. Biol. Chem.* 2004;279(31):32116-32124.
74. Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 2011;77:1-60.
75. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1993;175(19):6299-313.
76. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014.
77. Ruiz C, Levy SB. Regulation of *acrAB* expression by cellular metabolites in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014;69(2):390-399.
78. Lawler AJ, Ricci V, Busby SJW, Piddock LJ V. Genetic inactivation of *acrAB* or inhibition of efflux induces expression of *ramA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(7):1551-1557.
79. Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. Real-time PCR and statistical analyses of *acrAB* and *ramA* expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008.
80. Fèbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* 2009;2(1):40-61.
81. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: action and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem.* 2009;9(11):981-998.

82. Livermore DM1. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(4):283-97.
83. Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis*. 2005;41 Suppl 2:S113-S119.
84. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Updat*. 1999.
85. Aminov RI, Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett*. 2007;271(2):147-161.
86. Blondeau JM. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv. Ophthalmol*. 2004;49(2 SUPPL. 2).
87. Rodríguez-Martínez JM, Pichardo C, García I, *et al*. Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. *Clin. Microbiol. Infect*. 2008.
88. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 1997;61(3):377-392.
89. Bagel S, Hüllen V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999;43(4):868-875.
90. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol*. 2010;8(6):423-35.
91. Eaves DJ, Randall L, Gray DT, *et al*. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004;48(10):4012-4015.
92. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003;51(5):1109-1117.
93. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis*. 2005;41 Suppl 2:S120-S126.
94. Nam YS, Cho SY, Yang HY, *et al*. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013;41(2):126-129.
95. De La Fuente C M, Dauros S P, Bello T H, *et al*. Mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* en cepas de bacilos Gram negativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas. *Rev. Med. Chil*. 2007;135(9):1103-1110.
96. Liu BT, Liao XP, Yang SS, *et al*. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. *J. Med. Microbiol*. 2012;61(PART 11):1591-1599.
97. Li Z, Deguchi T, Yasuda M, *et al*. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the

- ParC subunit of DNA topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(12):3293-3295.
98. Hopkins KL, Arnold C, Threlfall EJ. Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing technology. *J. Microbiol. Methods* 2007;68(1):163-171.
 99. Kulkarni S, Bala M, Sane S, Pandey S, Bhattacharya J, Risbud A. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates in India. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2012;40(6):549-553.
 100. Nakano R, Okamoto R, Nakano A, *et al.* Rapid assay for detecting *gyrA* and *parC* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae*. *J. Microbiol. Methods* 2013;94(3):213-216.
 101. Bansal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011;37(3):253-255.
 102. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47(2):559-562.
 103. Kumagai Y, Kato JI, Hoshino K, Akasaka T, Sato K, Ikeda H. Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(3):710-714.
 104. Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, Sato K, Kato JI, Ikeda H. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(11):2623-2627.
 105. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* 1998;273(42):27668-27677.
 106. Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(4):879-885.
 107. Yang H, Chen S, White DG, *et al.* Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(8):3483-3489.
 108. Pakzad I, Zayyen Karin M, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS Hyg. Infect. Control* 2013;8(2):Doc15.
 109. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007;60(1):145-147.
 110. Hong BK, Wang M, Chi HP, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009.
 111. Wong MHY, Chan EWC, Chen S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux

- pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(6):3290-7.
112. Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, *et al.* New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51(9):3354-3360.
 113. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(10):3801-3804.
 114. Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, *et al.* Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 2006;45(1):1-10.
 115. Park KS, Lee JH, Jeong DU, *et al.* Determination of pentapeptide repeat units in Qnr proteins by the structure-based alignment approach. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(9):4475-4478.
 116. Chen X, Zhang W, Pan W, *et al.* Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(6):3423-3427.
 117. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;58(1):18-22.
 118. Jacoby G a, Walsh KE, Mills DM, *et al.* *qnrB* , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(4):1178-1182.
 119. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63(2):274-281.
 120. Veldman K, Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, van Pelt W, Mevius D. Characterization of multidrug-resistant, *qnrB2*-positive and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Salmonella Concord* and *Salmonella Senftenberg* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(5):872-875.
 121. Hu FP, Xu XG, Zhu DM, Wang MG. Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008;29(3):320-324.
 122. Paiva MC, Nascimento AMA, Camargo ILBC, Lima-Bittencourt CI, Nardi RMD. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2012;107(5):687-689.
 123. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56(3):463-469.
 124. Filippa N, Carricajo A, Grattard F, *et al.* Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *qnrB1* and *bla_{CTX-M15}* in a French intensive care unit. *Ann. Intensive Care* 2013;3(1):18.
 125. Dolejska M, Vill L, Dobiasova H, Fortini D, Feudi C, Carattoli A. Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the czech republic producing CTX-

- M-15 and QnrB1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(2):1073-1076.
126. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351(9105):797-799.
127. Cambau E, Lascols C, Sougakoff W, *et al.* Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006;12(10):1013-1020.
128. Cheung TKM, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RWH, Kam KM. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56(3):586-589.
129. Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(8):3523-3525.
130. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(4):664-689.
131. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.* 2006;43(3):297-304.
132. Torpdahl M, Hammerum AM, Zachariasen C, Nielsen EM. Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63(2):406-8.
133. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual Á. Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *J. Infect. Chemother.* 2011;17(2):149-182.
134. Wang M, Guo Q, Xu X, *et al.* New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(5):1892-1897.
135. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(2):603-608.
136. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99(8):5638-5642.
137. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(1):118-125.
138. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2006;6(10):629-640.
139. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. In-vitro mutagenesis of *qnrA* and *qnrS* genes and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13(9):940-943.
140. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006;12(5):440-

- 445.
141. Xu X, Wu S, Ye X, *et al.* Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51(11):4105-4110.
 142. Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Velasco C, Conejo MC, Martínez-Martínez L, Pascual A. Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63(6):1128-1134.
 143. Palomino J, Pachón J. Aminoglycosides. *Aminoglucósidos* 2003;21:105-115.
 144. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;43(4):727-737.
 145. Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides--50 years on. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995;39(6):597-603.
 146. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* 1998;17(22):6437-6448.
 147. Rather PN. Origins of the aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 1998;1(5):285-291.
 148. Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999;2(5):499-503.
 149. Davis BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* 1987;51(3):341-350.
 150. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, *et al.* The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin. Infect. Dis.* 1997;24 Suppl 1:S46-S62.
 151. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 2006;12(1):83-8.
 152. Doumith M, Dhanji H, Ellington MJ, Hawkey P, Woodford N. Characterization of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(4):878-885.
 153. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, *et al.* Genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(6):2467-2475.
 154. Nakamatsu EH, Fujihira E, Ferreira RCC, Balan A, Costa SOP, Ferreira LCS. Oligopeptide uptake and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007;269(2):229-33.
 155. Klepsch MM, Kovermann M, Löw C, *et al.* *Escherichia coli* peptide binding protein OppA has a preference for positively charged peptides. *J. Mol. Biol.* 2011;414(1):75-85.
 156. Romanowska J, Reuter N, Trylska J. Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. *Proteins Struct. Funct.*

- Bioinforma*. 2013;81(1):63-80.
157. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005;49(7):2949-53.
 158. Yan J-J, Wu J-J, Ko W-C, *et al*. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J. Antimicrob. Chemother*. 2004;54(6):1007-12.
 159. Lee H, Yong D, Yum JH, *et al*. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2006;56(3):305-12.
 160. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* Due to 16S rRNA Methylation. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003;47(8):2565-2571.
 161. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, *et al*. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004;48(2):491-496.
 162. Ma L, Lin C-J, Chen J-H, *et al*. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009;53(1):104-11.
 163. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, *et al*. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(3):459-464.
 164. Alekshum MN LS. Multidrug, Molecular mechanisms of antibacterial Resistance. *Cell* 207AD;128:1037-50.
 165. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol*. 2006;4(1):36-45.
 166. Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev*. 1994;58(3):563-602.
 167. Thomas CM NK. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:711-21.
 168. Averhoff B FA. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch Microbiol* 2003;180:385-93.
 169. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000;405(6784):299-304.
 170. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev*. 2011;35(5):790-819.
 171. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol*. 1952;64(5):679-

- 699.
172. Baker MD, Wolanin PM, Stock JB. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* 2006;28(1):9-22.
173. Thierauf A, Perez G, Maloy AS. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* 2009;501:267-286.
174. Thomas CM. Paradigms of plasmid organization. *Mol. Microbiol.* 2000;37(3):485-491.
175. Bergstrom CT, Lipsitch M, Levin BR. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics* 2000;155(4):1505-1519.
176. Frost LS. Bacterial conjugation: everybody's do it. *Can. J. Microbiol.* 1992;38(11):1091-1096.
177. Filutowicz M, Burgess R, Gamelli RL, *et al.* Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid* 2008;60(1):38-44.
178. Frost LS. Conjugation, Bacterial. In: *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*.; 2009:517-531.
179. Seubert A, Hiestand R, De La Cruz F, Dehio C. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 2003;49(5):1253-1266.
180. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, De la Cruz F. Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* 2002;45(1):1-8.
181. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010;74(3):434-452.
182. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3(9):722-732.
183. Lambowitz A, Belfort M. Introns as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* 1993;62:587-22.
184. Van Elsas JD, Bailey MJ. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002;42(2):187-197.
185. Leplae R, Lima-Mendez G, Toussaint A. ACLAME: A classification of mobile genetic elements, update 2010. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(SUPPL.1).
186. Arkhipova IR. Mobile genetic elements and sexual reproduction. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;110(1-4):372-382.
187. Osborn AM, Böltner D. When phage, plasmids, and transposons collide: Genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid* 2002;48(3):202-212.
188. Siguier P, Filée J, Chandler M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006;9(5):526-531.
189. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62(3):725-774.

190. Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front. Microbiol.* 2011;2(SEP).
191. Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu. Rev. Genet.* 2003;37:3-29.
192. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 2008;153 Suppl :S347-S357.
193. Di Conza JA, Gutkind GO. integrones: Los coleccionistas de genes. *Rev. Argent. Microbiol.* 2010;42(1):63-78.
194. Cambray G, Guerout A-M, Mazel D. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 2010;44:141-166.
195. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elem.* 2012;2(5):211-223.
196. Rowe-Magnus DA, Mazel D. Integrons: Natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001;4(5):565-569.
197. White PA, Mclver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(9):2658-2661.
198. Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 1995;59(4):579-90.
199. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. Conjugative transposons: The tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 2002;46(3):601-610.
200. Pembroke JT, MacMahon C, McGrath B. The role of conjugative transposons in the *Enterobacteriaceae*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002;59(12):2055-2064.
201. Frost LS, Koraimann G. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* 2010;5(7):1057-1071.
202. Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(8):552-563.
203. Jaworski D, Clewell D. A functional origin of transfer (*oriT*) on the conjugative transposon Tn916. *J. Bacteriol.* 1995;177(22):6644-6651.
204. Hentschel U, Hacker J. Pathogenicity islands: The tip of the iceberg. *Microbes Infect.* 2001;3:545-548.
205. Nakano M, Yamamoto S, Terai A, *et al.* Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001;205(1):71-76.
206. Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2009;364(1527):2275-2289.
207. Hedges RW, Datta N. fi- R Factors giving Chloramphenicol Resistance. *Nature* 1971;234(5326):220-221.
208. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int. J.*

- Med. Microbiol.* 2011;301(8):654-658.
209. Couturier M, Bex F, Bergquist PL MW. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 1988;52:375-95.
 210. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 2005;63(3):219-228.
 211. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, *et al.* Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12(7):1145-1148.
 212. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009.
 213. Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, *et al.* Dissemination of IncFIIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2012;40(6):510-515.
 214. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010.
 215. Carattoli A, Zankari E, García-Fernandez A, *et al.* PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;(April).
 216. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, De La Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. In: *FEMS Microbiology Reviews*. Vol 33.; 2009:657-687.
 217. Lang AS, Zhaxybayeva O, Beatty JT. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* 2013;123(3):106-116.
 218. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(11):4943-4960.
 219. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010.
 220. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007.
 221. Nordmann P, Carrer A. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Arch. Pediatr.* 2010.
 222. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: A problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 2000;3(5):489-495.
 223. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, *et al.* SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(11):3035-9.
 224. Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, *sme-1*, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(6):1262-70.
 225. Boyer-Mariotte S. Enzymatic resistance to imipenem in gram-negative bacilli: NMC-A,

- an original carbapenemase. *Ann. Pharm. françaises* 1998;56(6):244-9.
226. Mariotte-Boyer S, Nicolas-Chanoine MH, Labia R. A kinetic study of NMC-A beta-lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996;143(1):29-33.
 227. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. Nmca carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 2003;9(8):999-1002.
 228. Radice M, Power P, Gutkind G, *et al.* First class a carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(3):1068-9.
 229. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, *et al.* Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(9):2080-6.
 230. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(5):939-46.
 231. Kocsis E, Lo Cascio G, Piccoli M, Cornaglia G, Mazzariol A. KPC-3 Carbapenemase Harbored in FIIK Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST512 and *Escherichia coli* ST43 in the Same Patient. *Microb. Drug Resist.* 2014;0(0):1-6.
 232. Patel G, Bonomo RA. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2011;9(5):555-570.
 233. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(8):3365-3370.
 234. Miriagou V, Tzouveleki LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47(4):1297-300.
 235. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(2):776-8.
 236. Oteo J, Saez D, Bautista V, *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(12):6344-7.
 237. Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2014;43(5):460-4.
 238. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, *et al.* Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406-12
 239. Robustillo Rodela a, Díaz-Agero Pérez C, Sanchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita

- López MJ, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill.* 2012;17(7):1-6.
240. Valentín-Martín A, Valverde-De Francisco A, Bosque-Vall M, Cantón-Moreno R. First report of colistin-resistant KPC-2 producing ST258-*Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. clínica* 2013;31(7):489-91.
241. Wachino J, Doi Y, Yamane K, *et al.* Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(8):2905-10.
242. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(9):2598-603.
243. Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(9):2247-53.
244. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(3):622-32.
245. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-595.
246. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J. Clin. Microbiol.* 2011.
247. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 2011;11(5):355-362.
248. Yong D, Toleman MA, Giske CG, *et al.* 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-5054.
249. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Woodford N, Pitout JD. New Delhi Metallo-β-Lactamase from Traveler Returning to Canada. *Emerging Infectious Diseases* . 2011;17 (2).
250. Kant S, Haldar P. Is NDM-1 actually being imported to UK from India? *Indian J. Public Health* 54(3):151-4.
251. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: Here is the storm! *Trends Mol. Med.* 2012.
252. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(3):S8-14.
253. Poirel L, Ros A, Carricajo A, *et al.* Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate

- producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(1):447-448..
254. Oteo J, Domingo-García D, Fernández-Romero S, *et al.* Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *J. Med. Microbiol.* 2012;61(6):864-867.
 255. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014.
 256. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010.
 257. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57(3):373-383.
 258. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh B. Carbapenemases : A Review. 2015;2(4).
 259. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45(2):583-588.
 260. Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, *et al.* Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(12):2802-2808.
 261. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, *et al.* Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51(6):2001-2004.
 262. Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, *et al.* Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(1):429-432.
 263. Sari AN, Biçmen M, Gülay Z. The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66(5):439-442.
 264. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(1):202-208.
 265. Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;55(1):115-118.
 266. Aly M, Tayeb HT, Al Johani SM, *et al.* Genetic diversity of OXA-51-like genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014.
 267. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13(12):1193-1198.
 268. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel

- carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(12):5035-5038.
269. Ergin A, Hascelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scand. J. Infect. Dis.* 2012:1-6.
270. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005;11(1):15-23.
271. Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(9):907-913.
272. Testing S. *M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial.*; 2013.
273. Cockerill F. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement.*; 2012.
274. Rules E. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2015:0-77.
275. Giske CG, Martinez L, Cantòn R, *et al.* EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;(December):1-40.
276. GOTS JS. Production of extracellular penicillin-inactivating substances associated with penicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1945;60:165-8.
277. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001;7(2):88-91.
278. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(3):1274-8.
279. Jeremiah SS, Balaji V, Anandan S, Sahni RD. A possible alternative to the error prone modified Hodge test to correctly identify the carbapenemase producing Gram-negative bacteria. *Indian J. Med. Microbiol.* 32(4):414-8.
280. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(2):477-479.
281. Amjad A, Mirza IA, Abbasi SA, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran. J. Microbiol.* 2011;3(4):189-193.

282. Ramana K V, Rao R, Sharada C V, Kareem M, Reddy LR, Ratna Mani M. Modified Hodge test: A useful and the low-cost phenotypic method for detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* members. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2013;4(2):346-8.
283. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: Detection and surveillance issues. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010.
284. Masuda G, Tomioka S, Hasegawa M. Detection of beta-lactamase production by gram-negative bacteria. *J. Antibiot. (Tokyo).* 1976;29(6):662-4.
285. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 2015;10(3):1-13.
286. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012.
287. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2013.
288. Seral C, Gude MJ. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen , importancia , detección y alternativas terapéuticas. 2012;25(2):89-99.
289. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamasas in *Escherichia coli*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2006;24(6):370-372.
290. Martínez Rojas DDV. Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev. la Soc. Venez. Microbiol.* 29(2):78-83.
291. Ruppé E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler class C 1 AmpC beta-lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(11):4204-7.
292. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(4):1019-25.
293. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamasas in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(8):4163-4167.
294. Infeciosas UDE, Infeciosas UDE. y Microbiología Clínica. 2015;30(Supl 1):33-37.
295. Dijk K Van, Scharringa J, Voets G, *et al.* A novel phenotypic detection strategy for class A , B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using temocillin. 2013:48.
296. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, *et al.* Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: Therapeutic approach and infection control. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010.
297. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for

- interpretation of MICs and zone diameters. 2014.
298. Testing S. *M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial.*; 2014.
 299. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
 300. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012.
 301. Galler H, Feierl G, Peternel C, *et al.* KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(2).
 302. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, *et al.* Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(1):369-372.
 303. Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, *et al.* Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013.
 304. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(7):1660-1665.
 305. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011.
 306. Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, *et al.* First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalized at a military hospital in Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014;33(9):1641-1646.
 307. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, *et al.* First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: The “menace” arrives in the new world. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(2):680-683.
 308. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(9):4398-4401.
 309. Wrenn C, O’Brien D, Keating D, *et al.* Investigation of the first outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *J. Hosp. Infect.* 2014;87(1):41-46.
 310. Cuzon G. Plasmid-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase OXA-48 in an Imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52 (9): 3463-3464.
 311. Kilic A, Aktas Z, Bedir O, *et al.* Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Turkey. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2011;41(2):161-166.

312. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, *et al.* Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012.
313. Pirš M, Andlovic A, Cerar T, *et al.* A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(50):20042.
314. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011.
315. Kocsis E, Savio C, Piccoli M, Cornaglia G, Mazzariol A. *Klebsiella pneumoniae* harbouring OXA-48 carbapenemase in a Libyan refugee in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013;19(9).
316. Székely E, Damjanova I, Jánvári L, *et al.* First description of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-181} producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013;303(8):697-700.
317. Kalpoe JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P. Detection of an ambler class D OXA-48-type beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in the netherlands. *J. Med. Microbiol.* 2011;60(5):677-678.
318. Majewski P, Wiczorek P, Sacha PT, *et al.* Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* ST89 infection in Poland. *Int. J. Infect. Dis.* 2014;25.
319. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, *et al.* Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2012;39(2):168-172.
320. Thomas CP, Moore LSP, Elamin N, *et al.* Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013;42(6):531-536.
321. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(2):317-321.
322. Lafeuille E, Decré D, Mahjoub-Messai F, Bidet P, Arlet G, Bingen E. OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Libyan patients. *Microb. Drug Resist.* 2013;19(6):491-7.
323. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, *et al.* Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013.
324. Aktaş Z, Kayacan ÇB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008;54(2):101-106.
325. Espedido BA, Steen JA, Ziochos H, *et al.* Whole Genome Sequence Analysis of the First Australian OXA-48-Producing Outbreak-Associated *Klebsiella pneumoniae* Isolates: The Resistome and In Vivo Evolution. *PLoS One* 2013.
326. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, *et al.* Successful control of a hospital-

- wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Eurosurveillance* 2014;19(9).
327. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(5):413-31.
 328. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(5).
 329. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(10):4896-4899.
 330. Villa L, Carattoli A, Nordmann P, Carta C, Poirel L. Complete sequence of the IncT-type plasmid pT-OXA-181 carrying the *bla*_{OXA-181} carbapenemase gene from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(4):1965-1967.
 331. Samuelsen Ø, Naseer U, Karah N, *et al.* Identification of *Enterobacteriaceae* isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(7):1682-5.
 332. Balm MND, Ngan G, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore. *BMC Infect. Dis.* 2013;13(1):58.
 333. Williamson D a., Heffernan H, Sidjabat H, *et al.* Intercontinental transfer of OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* into New Zealand. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(12):2888-2890.
 334. Shanthi M, Sekar U, Arunagiri K, Goverdhandas Bramhne H. OXA-181 beta-lactamase is not a major mediator of carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Diagnostic Res.* 2013;7(9):1986-1988.
 335. Abdelaziz MO, Bonura C, Aleo A, El-Domany R a., Fasciana T, Mammina C. OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(7):2489-2491.
 336. Poirel L, Castanheira M, Carrër A, *et al.* OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(6):2546-2551.
 337. Kasap M, Torol S, Kolayli F, Dundar D, Vahaboglu H. OXA-162, a novel variant of OXA-48 displays extended hydrolytic activity towards imipenem, meropenem and doripenem. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2012:1-7.
 338. Van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, *et al.* A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(4):345-349.
 339. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(1):633-636.
 340. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, *et al.* Genetic and biochemical characterisation of OXA-

- 232, a carbapenem- hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013;41(4):325-329.
341. Gomez S, Pasteran F, Faccone D, *et al.* Inpatient emergence of OXA-247: A novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013;19(5).
342. Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos JC, *et al.* Detection of OXA-370, an OXA-48-related class d β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(6):3566-3567.
343. Zong Z. Discovery of blaOXA-199, a Chromosome-Based bla_{OXA-48}-Like Variant, in *Shewanella xiamenensis*. *PLoS One* 2012;7(10).
344. Laurent Poirel CHPN. Chromosome-Encoded Ambler Class D β -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. Paris; 2004.
345. Tacao M, Correia A, Henriques I. Environmental *Shewanella xiamenensis* strains that carry bla_{OXA-48} or bla_{OXA-204} genes: Additional proof for bla_{OXA-48}-Like gene origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(12):6399-6400.
346. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(9):4405-4407.
347. Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(1):348-351.
348. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012.
349. Giani T, Conte V, Di Pilato V, *et al.* *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012.
350. Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of β -lactam resistance genes. *J. Bacteriol.* 2006.
351. Maddocks SE, Oyston PCF. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 2008;154(Pt 12):3609-23.
352. Beyrouthy R, Robin F, Cougnoux A, *et al.* Chromosome-mediated OXA-48 carbapenemase in highly virulent *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013.
353. Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, *et al.* Introduction of OXA-48-producing enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(12):2763-2766.
354. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010.
355. Beyrouthy R, Robin F, Delmas J, *et al.* IS1R-mediated plasticity of IncL/M plasmids leads to the insertion of bla_{OXA-48} into the *Escherichia coli* chromosome. *Antimicrob. Agents*

- Chemother.* 2014.
356. Power K, Wang J, Karczmarczyk M, *et al.* Molecular Analysis of OXA-48-Carrying Conjugative IncL/M-Like Plasmids in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Ireland.
 357. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Eurosurveillance* 2013.
 358. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008.
 359. Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One* 2015;10(5):e0123063.
 360. Bonnin R a., Nordmann P, Carattoli A, Poirel L. Comparative genomics of IncL/M-type plasmids: Evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(1):674-676.
 361. Berger S, Alauzet C, Aissa N, *et al.* Characterization of a new *bla*_{OXA-48}-carrying plasmid in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(8):4064-7.
 362. Brañas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015;46(1):111-116.
 363. Akta&scdil; Z, Bal Kayacan çiğdem, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase, OXA-48, Persists in *Klebsiella pneumoniae*; in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008;54(2):101-106.
 364. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang T-D, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(9):3463-4.
 365. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, *et al.* Emergence of OXA-48-Type Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in German Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(4):2125-2128.
 366. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: The first years (2008-11). *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(12):2860-2864.
 367. O'Brien DJ, Wrenn C, Roche C, *et al.* First isolation and outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Irish hospital, March to June 2011. *Eurosurveillance* 2011;16(29).
 368. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2014.
 369. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, *et al.* Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-

- resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(1):143-4.
370. Poirel L, Abdelaziz MO, Bernabeu S, Nordmann P. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013;41(1):90-91.
 371. Ben Nasr A, Decre D, Compain F, Genel N, Barguelli F, Arlet G. Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(8):4089-4090.
 372. Ktari S, Mnif B, Louati F, *et al.* Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(7):1644-1646.
 373. Poirel L, Carbonnelle E, Bernabeu S, Gutmann L, Rotimi V, Nordmann P. Importation of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* from Kuwait. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(8):2051-2052.
 374. Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, *et al.* First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015.
 375. Aggoune N, Tali-Maamar H, Assaous F, Benamrouche N, Naim M, Rahal K. Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2014;2:1-3.
 376. Barguigua A, El otmani F, Lakbakbi el yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *Apmis* 2013;121(7):675-677.
 377. Barguigua A, Zerouali K, Katfy K, El Otmani F, Timinouni M, Elmdaghri N. Occurrence of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco. *Infect. Genet. Evol.* 2015;31:142-8.
 378. Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A. The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Infect. Dis.* 2013;17(12):e1130-e1133.
 379. Brink AJ, Coetsee J, Corcoran C, *et al.* Emergence of OXA-48 and OXA-181 Carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and Evidence of *In Vivo* Selection of Colistin Resistance as a Consequence of Selective Decontamination of the Gastrointestinal Tract. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(1):369-372.
 380. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(1):130-6.
 381. Nagano N, Endoh Y, Nagano Y, *et al.* First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66(1):79-81.
 382. Adler A, Solter E, Masarwa S, *et al.* Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive

- care unit in Jerusalem, Israel. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(9):2926-30.
383. (Cdc) C for DC and P. Modified Hodge test for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae. 2013:2-4.
384. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997.
385. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995.
386. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Patrick AD, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(8).
387. Brisse S, Fevre C, Passet V, *et al.* Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 2009;4(3):e4982.
388. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* 1996;178(1):306-308.
389. Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellems J, Hugget J, Kubista M. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4):611-622.
390. Carattoli A, Zankari E, Garcíá-Fernández A, *et al.* *In Silico* detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-3903.
391. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(11):2640-4.
392. Murray P, Baron E, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology.* ASM Press.; 2011.
393. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* : a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(10):AAC.01019-15.
394. Walsh TR. Emerging carbapenemases: A global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010;36(Suppl. 3).
395. Paterson D, Bonomo R. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18(4):657-686.
396. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(4):824-9.

397. Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, *et al.* Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(8):2006-11.
398. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, *et al.* A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(7):1612-5.
399. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol a, *et al.* Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-1590.
400. Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, *et al.* First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(8):3492-3494.
401. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;32(2):253-259.
402. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, *et al.* Prospective multicenter study of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain: High in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(6):AAC.00086-15.
403. Mirelis B, Navarro F, Miró E, Jesús Mesa R, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum β -lactamase [3]. *Emerg. Infect. Dis.* 2003;9(8):1024-1025.
404. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 2010.
405. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, *et al.* Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;64(3):524-528.
406. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, *et al.* Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the carba NP test, with the modified hodge test for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 2013.
407. Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;61(3):548-53.
408. Mathers AJ, Carroll J, Sifri CD, Hazen KC. Modified hodge test versus indirect carbapenemase test: Prospective evaluation of a phenotypic assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(4):1291-1293.
409. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 2012.
410. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(5):1965-1969.

411. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, *et al.* Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012.
412. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(2):249-51.
413. Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, Choi EC, Chong Y. Further modification of the Hodge test to screen AmpC beta-lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Microbiol. Methods* 2002;51(3):407-10.
414. Wong MH, Li Y, Chan EW, Chen S. Functional categorization of carbapenemase-mediated resistance by a combined genotyping and two-tiered Modified Hodge Test approach. *Front. Microbiol.* 2015;6:293.
415. Kim H-K, Park JS, Sung H, Kim M-N. Further Modification of the Modified Hodge Test for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Ann. Lab. Med.* 2015;35(3):298-305.
416. Takayama Y, Adachi Y, Nihonyanagi S, Okamoto R. Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J. Med. Microbiol.* 2015;64(7):774-7.
417. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J. Chemother.* 2015:1973947815Y0000000063.
418. Kalantar-Neyestanaki D, Fatahi Bafghi M. The Modified Hodge Test: Is it an appropriate method for detection of KPC enzyme or not? *Iran. J. Microbiol.* 2015;7(2):123-4.
419. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control* 2008;36(5):309-32.
420. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am. J. Infect. Control* 1988;16(3):128-140.
421. Birgy A, Cohen R, Levy C, *et al.* Community faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in French children. *BMC Infect. Dis.* 2012;12(1):315.
422. Bilal NE, Gedebou M. Clinical and community strains of *Klebsiella pneumoniae*: multiple and increasing rates of antibiotic resistance in Abha, Saudi Arabia. *Br. J. Biomed. Sci.* 2000;57(3):185-91.
423. Diestra K, Coque TM, Miró E, *et al.* Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2008;26(7):404-410.
424. Isendahl J, Turlej-Rogacka A, Manjuba C, Rodrigues A, Giske CG, Naclér P. Fecal carriage of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in children in Guinea-Bissau: a hospital-based cross-sectional study. *PLoS One* 2012;7(12):e51981.
425. Kader a. a., Kamath K a. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the community. *East. Mediterr. Heal. J.* 2009;15(6):1365-1370.

426. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013;26(4):744-758.
427. Kouchak F, Askarian M. Nosocomial infections: the definition criteria. *Iran. J. Med. Sci.* 2012;37(2):72-3.
428. Friedman ND. Health Care–Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Ann. Intern. Med.* 2002;137(10):791.
429. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda a., Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(4):350-354.
430. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, *et al.* An update of the evolving epidemic of *bla*_{KPC-2}-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(7):1510-3.
431. Souli M, Galani I, Antoniadou A, *et al.* An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 2010;50(3):364-73.
432. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, *et al.* Imported *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae* Clones in a Greek Hospital: Impact of Infection Control Measures for Restraining Their Dissemination. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(8):2618-2623.
433. Zagorianou A, *et al.* Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Eurosurveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles. European communicable disease bulletin* 17(7), 2012.
434. Bonura C, Giuffrè M, Aleo A, *et al.* An Update of the Evolving Epidemic of *bla*_{KPC} carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones. *PLoS One* 2015;10(7):e0132936.
435. Monaco M, Giani T, Raffone M, *et al.* Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(42).
436. Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(5):439-48.
437. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2013;31(6):402-409.
438. Wernli D, Hausteiner T, Conly J, Carmeli Y, Kickbusch I, Harbarth S. A call for action: the application of The International Health Regulations to the global threat of antimicrobial resistance. *PLoS Med.* 2011;8(4):e1001022.

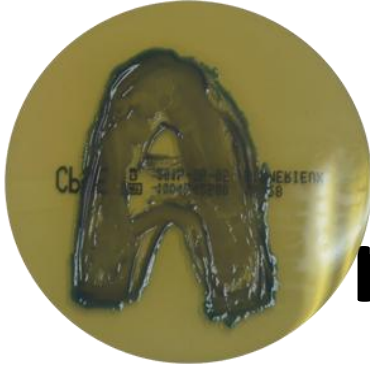
439. Viale P, Giannella M, Bartoletti M, Tedeschi S, Lewis R. Considerations About Antimicrobial Stewardship in Settings with Epidemic Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing or Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Infect. Dis. Ther.* 2015;4(Suppl 1):65-83.
440. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2013;1(2):63-69.
441. MacGowan A, Macnaughton E. Antibiotic resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2013;41(11):642-648.
442. Korvick JA, Bryan CS, Farber B, et al. Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992;36(12):2639-44.
443. Srougy R El. Carbapenem - Resistant Enterobacteriaceae: An Emerging Threat. 2016;38(12):1-10.
444. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of Carbapenem-Resistant Infection and the Impact of *Klebsiella pneumoniae* Antimicrobial and Adjunctive Therapies. *Source Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2008;29(12):1099-1106.
445. Bennett J, Dolin R, Blaser M. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.*; 2014.
446. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995;8(4):557-584.
447. Gbelska Y, Krijger J, Breunig KD. Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(3):345-355.
448. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* 2003;36(Suppl 1):S11-23.
449. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, et al. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(1):143-144.
450. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. *Med. Mal. Infect.* 2014.
451. Levy Hara G, Gould I, Endimiani A, et al. Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: recommendations from an International Working Group. *J. Chemother.* 2013;25(3):129-40.
452. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(9):862-72.
453. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013;19(4):349-355.

454. Paulin-Curlee GG, Singer RS, Sreevatsan S, *et al.* Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;90(8):3681-3689.
455. Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, *et al.* Multiplex real-time PCR for detection of an epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(6):3444-7.
456. Frasson I, Lavezzo E, Franchin E, *et al.* Antimicrobial treatment and containment measures for an extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 isolate carrying pKPN101-IT, a novel fully sequenced *bla*(KPC-2) plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(11):3768-72.
457. Mammina C, Bonura C, Aleo A, Fasciana T, Brunelli T, Pesavento G, Degl'Innocenti R NA. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(6):543-5.
458. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, *et al.* Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(5):2929-2933.
459. Hrabák J, Empel J, Bergerová T, *et al.* International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases in a Czech Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(10):3353-3357.
460. Ma L, Lu PL, Kristopher Siu L, Hsieh MH. Molecular typing and resistance mechanisms of imipenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: Results from the Taiwan surveillance of antibiotic resistance (TSAR) study, 2002-2009. *J. Med. Microbiol.* 2013;62(PART1):101-107.
461. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010;36(1):91-3.
462. Pereira PS, de Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(2):312-6.
463. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, *et al.* An update of the evolving epidemic of *bla*_{KPC-2}-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(7):1510-1513.
464. Jin Y, Shao C, Li J, Fan H, Bai Y, Wang Y. Outbreak of multidrug resistant NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from a neonatal unit in Shandong Province, China. *PLoS One* 2015;10(3):e0119571.
465. Peirano G, Hung King Sang J, Pitondo-silva A, Laupland KB, Pitout JDD. Molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* over a 10 year period in Calgary, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(5):1114-1120.
466. Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(2):934-936.

467. Mshana SE, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T, Imirzalioglu C. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2013;13(1):466.
468. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, *et al.* Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of *bla*_{NDM-1} in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(5):2735-8.
469. Nadkarni AS, Schliep T, Khan L, Zeana CB. Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Manhattan. *Am. J. Infect. Control* 2009;37(2):121-6.
470. Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, *et al.* Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. *Society* 2004;48(4):1204-1214.
471. Dhara L, Tripathi A. Genetic and structural insights into plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase activity of CTX-M and SHV variants among pathogenic *Enterobacteriaceae* infecting Indian patients. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2014;43(6):518-526.
472. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* ;22(12):686-96 2015;22(12):686-696.
473. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, *et al.* Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(4):1992-7.
474. Wang Q, Li B, Tsang AKL, Yi Y, Woo PCY, Liu CH. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates. *PLoS One* 2013;8(2):e57091.
475. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, *et al.* Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(11):1812-20.
476. Ewers C, Stamm I, Pfeifer Y, *et al.* Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014;(March 2010):1-5.
477. Weterings V, Zhou K, Rossen JW, *et al.* An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015:1647-1655..
478. Bathoorn E, Rossen JW, Lokate M, Friedrich AW, Hammerum AM. Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without travel history abroad, August 2015. 2015;(August):16-18.
479. Potron A, Nordmann P, Rondinaud E, Jauregui F, Poirel L. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: Towards pan-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(2):476-477.

480. Liapis E, Pantel A, Robert J, *et al.* Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(12):O1121-O1123.
481. Löhr IH, Hülter N, Bernhoff E, Johnsen PJ, Sundsfjord A, Naseer U. Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFIIK plasmid in a *Klebsiella pneumoniae* ST17 host during two years of intestinal colonization. *PLoS One* 2015;10(3):e0116516.
482. Barbarini D, Russello G, Brovarone F, *et al.* Evaluation of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in an Italian setting: Report from the trench. *Infect. Genet. Evol.* 2015;30:8-14.
483. Rodríguez Martínez JM, Díaz-de Alba P, Lopez-Cerero, Ruiz-Carrascoso G, Gomez-Gil R, Pascual A. Presence of quinolone resistance to *qnrB1* genes and *bla*_{OXA-48} carbapenemase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 32(7):441-2.
484. Yang Y L, Lauderdale T L, Lo H J. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Klebsiella*. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 2004;4(4):295-302.
485. Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(12):4268-4273.
486. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, *et al.* *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(4):886-897.
487. Med SSD. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae*. 2012.
488. Perez F, Rudin SD, Marshall SH, *et al.* OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013.
489. Hashemi A, *et al.* Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Hippokratia* 2013;17(4):355-358.
490. Rodríguez-Martínez JM, de Alba PD, Briales A, *et al.* Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013..
491. Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 2009;58(Pt 10):1303-8.
492. Shields RK, Clancy CJ, Hao B, Chen L, Press EG, *et al.* Effects of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase subtypes, extended-spectrum β-lactamases, and porin mutations on the in vitro activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Sep;59(9):5793-7.
493. Matsumura Y, Tanaka M, Yamamoto M, *et al.* High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015;45(1):33-40.

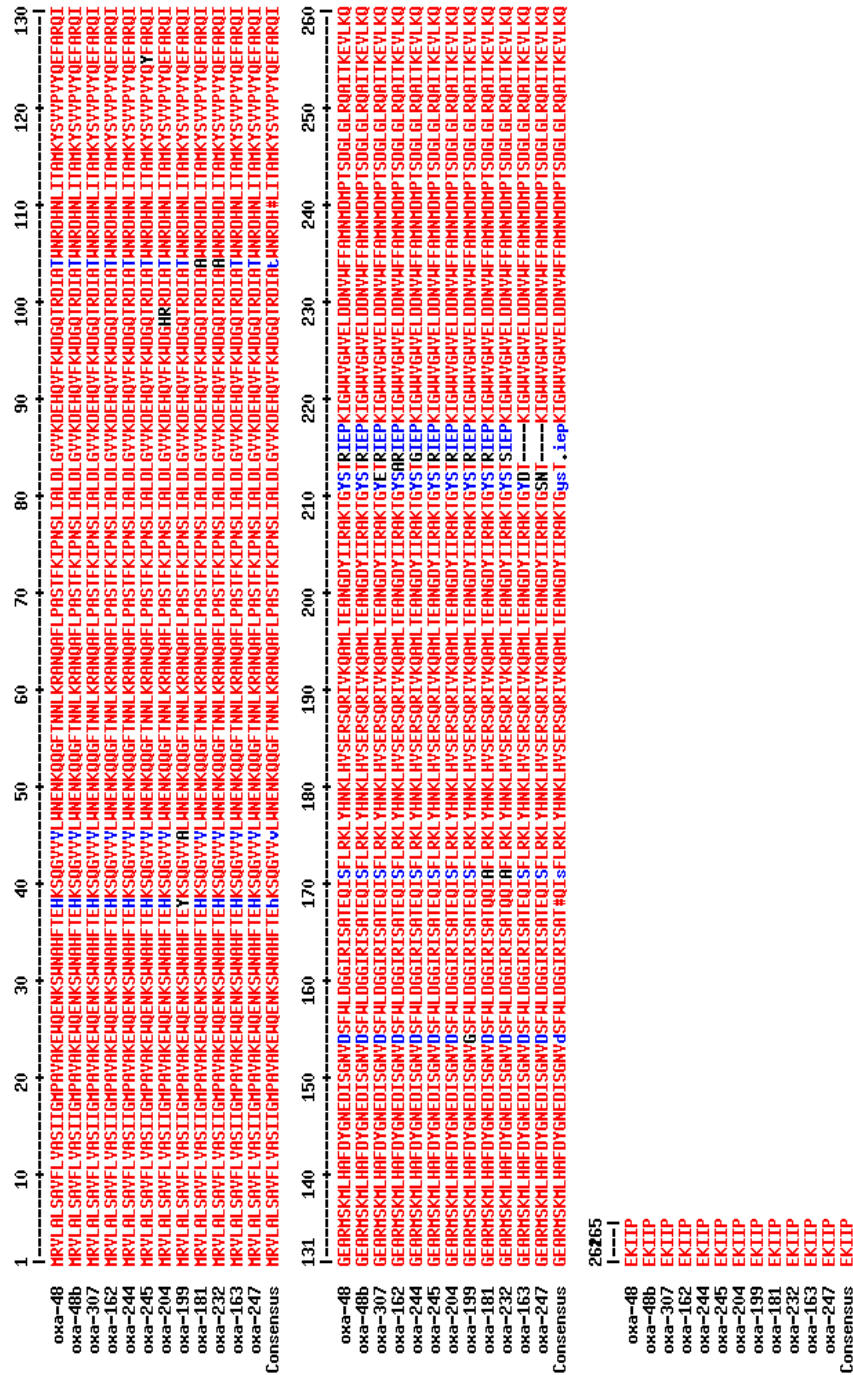
494. García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, *et al.* An ertapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(10):4178-4184.
495. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 1995;226(2):235-40.



Annexos

ANNEX I.

Alineament de les seqüències aminoacídiques de la carbapenemasa OXA-48 i les seves variants.



L'homologia aminoacídica de les variants amb l'OXA-48 és del 100% (OXA-48B), 99% (OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-245, OXA-370, OXA-199) i 98% (OXA-181, OXA-163, OXA-232).

ANNEX II

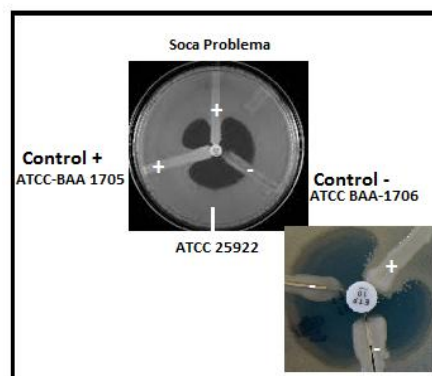
Test de Hodge modificat

Protocol

- Inocular en una placa de Mueller Hinton (Biomérieux España S.A, Madrid, Espanya) un escobillo mollat en una tub amb una suspensió 0,5 McFarland diluïda 1:10 de la soca *E. coli* ATCC 25922 (soca sensible als carbapenèmics).
- Col·locar un disc d'un carbapenem (imipenem, meropenem o ertapenem) al centre de la placa.
- Inocular 2 colònies control, soca productora de carbapenemases (ATCC BAA-1705) i soca no productora de carbapenemases (ATCC BAA-1706), i la soca o soques problema formant una estria radial a partir de 2-3 mm del disc de carbapenem. Alternativament es pot efectuar una incisió en l'agar amb un portaobjectes a 2-3 mm del disc de carbapenem formant una estria radial i inocular l'interior de l'estria amb la soca problema.
- Incubar a 36 ± 2 °C durant 18-24 hores a l'aire

Interpretació dels resultats

- Positiu: Un resultat positiu es posarà de manifest pel creixement de la soca d'*E. coli* ATCC 25922 en la part d'intersecció entre l'halos d'inhibició que genera la difusió de l'antibiòtic i l'estria de la soca que era objecte del nostre estudi, formant així una esquerdada a la part propera al disc. Això posa en evidència la presència de carbapenemases en la soca problema que han estat alliberades al medi permetent així el creixement d'*E. coli*.
- Negatiu: No hi ha creixement d'*E. coli* en el punt d'intersecció de l'estria de la soca problema i l'halos del inhibició del antimicrobià, és a dir, s'aprecia un halo d'inhibició perfecte al voltant del disc.



Consideracions

- Es poden estudiar fins a quatre o cinc soques per placa.
- En les soques que presentin un fenotip d'hiperproducció d'AmpC és necessari utilitzar agar Mueller Hinton suplementat amb cloxacil·lina (250 µg/ml) ja que els enzims AmpC presenten una certa activitat hidrolítica sobre els carbapenèmics que donen lloc a resultats falsament positius. La inhibició de les betalactamases AmpC també es pot realitzar col·locant un disc

de cloxacil·lina 500 µg en Mueller Hinton un mínim de dues hores abans de col·locar el disc de carbapenem.

- Si el resultat és ininterpretable (inhibició del creixement de la soca indicadora als costats de l'estria) es recomana repetir la prova utilitzant una altra soca indicadora com *E. coli* ATCC 35218.

ANNEX III

Protocol de la tècnica de PCR i seqüenciació.

Tècnica de PCR

Mitjançant aquesta tècnica podem amplificar *in vitro* grans quantitats d'un fragment d'ADN. En el nostre estudi l'hem utilitzat per amplificar gens de resistència, replicons de plasmidis (Inc), entorns genètics, etc. Consta amb un procés previ, Pre-PCR, en el que s'obté l'ADN amb el que es treballarà, i uns processos posteriors, Post-PCR, ens els que es visualitza el producte de PCR en un gel d'agarosa, i si es necessari, purificació, seqüenciació del producte i anàlisi de les seqüències.

Iniciadors utilitzats per a la PCR i seqüenciació

Iniciadors utilitzats en la PCR per a la caracterització dels gens *bla*, AME, PMQR i QRDR.

Grup	Gen	Iniciadors	Seqüència (5'-3')	Tm PCR (°C)	Mida (pb)
<i>bla</i>	<i>bla</i> _{TEMt}	P4	AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG	55	938
		P3	AGTGTGCGACTTACCAATGCTTAATCAGT		
	<i>bla</i> _{SHVt}	SHVA	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	55	992
		SHVB	TCTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA		
	<i>bla</i> _{CTX-M-9t}	IATG	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	55	850
		ISTOP	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
	<i>bla</i> _{CTX-M-AB}	CTX-A	CTTACCAGCGTCAGA	55	393
		CTX-B	GCGATGTGCAGTACCAGTAA		
	<i>bla</i> _{ctx-m-3}	M3 up	ATGGTTAAAAAATCACTGCG	60	879
		M3 dn	CTATTACAAACCGTCGGTG		
	<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48 up	CGTTATGCGTGTATTAGCCTTAT	50	797
		OXA-48 dn	TTTTCTGTTTGAGCACTTCTTT		
	<i>bla</i> _{GES}	GES-1-up	ATGCGCTTCATTACGCAC	50	863
		GES-1-dn	CTATTTGTCCGTGCTCAGG		
	<i>bla</i> _{IMI}	IMI-up	GTCACCTAATGTAAAACC	50	878
		IMI-dn	TTAAGGTTATCAATTGCG		
	<i>bla</i> _{KPC}	KPC-up	TGCACTGTATCGCCGTC	50	880
		KPC-dn	TTACTGCCGTTGACGCC		
	<i>bla</i> _{NMC}	NMCA-up	GTCACCTAATGTAAAGCA	50	878
		NMCA-dn	GGTTATCAATTGCAATTC		
	<i>bla</i> _{SME}	SME-up	CGGCTTCATTTTGTTTA	50	884
		SME-dn	CAATTGCCTGAATTGCAAT		
	<i>bla</i> _{GIM}	GIM-up	ACTTGTAGCGTTGCCAGC	50	721

		GIM-dn	AATCAGCCGACGCTTCAG		
	bla_{IMP}	IMP up	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	50	740
		IMP dn	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC		
	bla_{SPM}	SPM-1 A	CTGCTTGGATTTCATGGGCGC	50	783
		SPM-1 B	CCTTTTCCGCGACCTTGATC		
	bla_{VIM}	VIMB	ATGGTGTGGTTCGCATATC	50	501
		VIMF	TGGGCCATTCAGCCAGATC		
	bla_{ACCt}	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	60	346
		ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
	bla_{FOXt}	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	60	190
		FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
	bla_{DHA}t	DHAMF	AACCTTTCACAGGTGTGCTGGGT	60	405
		DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
	bla_{MOXt}	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	60	520
		MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGGTGC		
	bla_{CITt}	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	60	462
		CITMR	TTTCTCTGAACGTGGCTGGC		
	bla_{CMY-2t}	CMY-2 ATG	ATGATGAAAAAATCGTTATGC	55	1143
		CMY-2 STOP	TTGCACTTTTCAAGAATGCGC		
	bla_{DHA-1t}	DHA-1A	CTGATGAAAAAATCGTTATC	55	1141
		DHA-1B	ATTCCAGTGCACCTCAAAAATA		
PMQR	qnrA	QnrA Up	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	53	516
		QnrA Dn	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
	qnrB	QnrB Up	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	53	469
		QnrB Dn	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
	qnrS	QnrS Up	ACGACATTCGTCAACTGCAA	53	417
		QnrS Dn	TAAATTGGCACCTGTAGGC		
	qepA	QepA-F	AACCTGCTTGAGCCCGTAGAT	58	596
		QepA-R	GTCTACGCCATGGACCTCAC		
AMEs	ant(2'')-Ia	ANT-2''Ia FW	ACGCCGTGGGTGCGATGTTTGATGT	55	572
		ANT-2''Ia R	CTTTTCCGCCCGAGTGAGGTG		
	aac(6')-Ia	ACC-6'-Ia FW	ATGAATTATCAAATTGTG	40	558
		ACC-6'-Ia R	TACTCTTTGATTAAACT		
	aac(3')-IIa	AAC-3'-IIa FW	GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA	55	563
		AAC-3'-IIa R	TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG		
	aac(6')-Ib	ACC-6'-Ib FW	CGCGCGGATCCAAAGTTAGGCATCACA	55	540
		ACC-6'-Ib R	ACCTGTACAGGATGGAC		
	aac(6')-Ic	ACC-6'-Ic FW	CTACGATTACGTCAACGGCTGC	60	130
		ACC-6'-Ic R	TTGCTTCGCCCACTCTGCACC		
	aac(6')-IId	AAC(6')-IiD FW	TTGCAATGCTGAATGGAGAG	55	218
		AAC(6')-IiD RV	CGTTTGGATCTTGGTGACCT		
	aac(3')-IVa	AAC(3')-Iva FW	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC	55	628
		AAC(3')-Iva RV	AGTTGACCCAGGGCTGTCCG		
	aac(2')-Ia	AAC(2')-Ia FW	AGAAGCGCTTTACGATTTATTA	50	563
		ACC(2')-Ia RV	GACTCCGCCTTCTTCTTCAA		
	aac(3')-Ia	AAC(3')-Ia FW	GCAGTCGCCCTAAAACAAA	55	563

	AAC(3')-Ia RV	CACTTCTCCCGTATGCCCAACT		
<i>aac(3')-Ib</i>	AAC(3')-Ib FW	GCAGTCGCCCTAAAACAAA	55	563
	AAC(3')-Ib RV	GGATCGTCACCGTAGTCTGC		
<i>ant(4'')-IIa</i>	ANT(4'')-IIa	CCGGGGCGAGGCGAGTGC	55	563
	FW			
	ANT(4'')-IIa rv	TACGTGGGCGGATTGATGGGAACC		

Iniciadors dels diferents gens del MLST per *K. pneumoniae*.

Gen	Iniciadors	Seqüència (5'-3')	Tm PCR (°C)	Mida (pb)
<i>rpoB</i>	F: Vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	50	501
	R: Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
<i>gapA</i>	F: gapA173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	60	450
	R: gapA181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		
<i>mdh</i>	F: mdh130	CCCAACTCGCTTCAGGTTCCAG	50	477
	R: mdh867	CCGTTTTTCCCAGCAGCAG		
<i>pgi</i>	F: pgi1F	GAGAAAAACCTGCCTGTAAGTCTGGC	50	432
	R: pgi1R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
<i>phoE</i>	F: phoE604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	50	420
	R: phoE604.2	TGATCAGAAGTGGTAGGTGAT		
<i>infB</i>	F: infB1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	50	318
	R: infB1R	CGCTTTCAGCTCAAGAAGTTC		
<i>tonB</i>	F: tonB1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	45	414
	R: tonB2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

Iniciadors diferents utilitzats per a seqüenciar els productes de PCR del MLST

Gen	Iniciadors	Seqüència (5'-3')
<i>infB</i>	infB2F	ACTAAGTTGCCTCCGGCGAAGC
<i>pgi</i>	pgi2F	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
	pgi2R	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT

Iniciadors utilitzats per a la tipificació plasmídica

Grup Inc.	Iniciadors	Seqüència (5'-3')	Tm (°C)	Mida (pb)
HI1	HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	60	471
	HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
I1/Iy	I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	60	139
	I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
HI2	HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	60	644
	HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
X	X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	60	376
	X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
L/M	L/M FW	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG	60	785
	L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
N	N FW	GTCTTAGCAGCTTACCGAAG	60	559
	N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
FIA	FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	60	462
	FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTCCGCAG		
FIB	FIB FW	GGAGTTCTGACACAGATTTTCTG	60	702
	FIB RV	CTCCCGTCGTTCCAGGGCATT		
W	W FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	60	242
	W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
P	P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	60	534
	P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
Y	Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	60	765
	Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
FIC	FIC FW	GTGAAGTGGCAGATGAGGAAGG	60	262
	FIC RV	TTCTCCTCGTCCAAACTAGAT		
A/C	A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	60	465
	A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
T	T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	60	750
	T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
FIIs	FIIs FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	60	270
	FIIs RV	CTCTGCCACAAACTCAGC		
K	K/B FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAAC'	60	160
	K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
B/O	K/B FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAAC	60	159
	B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCCA		
F	F FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	52	270
	F RV	GAAGATCAGTCACACCATCC		
ColE	oricoIE FW	GTTCGGCATAACAGTCCA	55	187
	oricoIE RV	GGCGAAACCCGACAGGAC		
U	IncU FW	TCACGACACAAGCGCAAGGG	55	843
	IncU RV	TCATGGTACATCTGGGCGC		
R	IncR FW	TCGCTTCATTCTGCTTCAGC	55	251
	IncR RV	GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA		
L.HSCSP	IncL.Fw	GCGCCAGGAACAGAAGAGTA	60	622
	IncLM.Rv	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
FIK	FIK.fw	TCTTCTCAATCTTGCGGA	55	147
	FIK.rv	GCTTCTGTGCACRCAAGGA		
L	IncL.Fw	CGGAACCGACATGTGCCTACT	63	891
	IncL/M.RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		

Iniciadors utilitzats en l'estudi de l'entorn genètic del gen *bla*_{OXA-48}

Part del transposó	Iniciadors	Seqüència (5'-3')	Tm (°C)	Mida amplicó (pb)
IS1999-<i>bla</i>OXA48	ISTn1999A	TGGTGTAAGAATGTTGTAGGATA	58,3	1572
	<i>bla</i> OXAGSP3	TCTGTCCATCCCCTAAAGACTT		
<i>bla</i>OXA48-LysR	BlaOXaintF	ATGGTTTAGGGCTGCGCCAAGC	60	725
	BlaOXAlysR	ATCATAGTGGTATTCTGCTAGGAA		
Is1999-IS1R	IS1999A	CAGCAATTCTTCTCCGTG	60	1391
	IS1R.L	GCGTCTTATGAGCCTGCTGT		
IS1R-<i>bla</i>OXA48	IS1R.R	CACCGATTTGAGAACGACA	60	1156
	<i>bla</i> OXAGSP3	TCTGTCCATCCCCTAAAGACTT		
LysR-Is1999	lysR-TnpA.F	TATCCTTACCCACCAAACC	60	1190
	lysR-TnpA.R	TCGGCATAGGGTTACCAGAA		

Tampons i solucions del protocol de PCR

- Tampons per PCR (pels gels d'agarosa):
 - 2 L de TBE 5X (mantenir a temperatura ambient): 108 g de Trizma, 7,5 g d'EDTA, 55 g d'àcid bòric, i enrasar fins a 2 L d'aigua destil.lada.
 - 1 L de TBE 0,5X (mantenir a temperatura ambient): 100 ml TBE 5X + 900 ml d'aigua destil.lada.
- Gels d'agarosa
 - 1%: 1,5 g d'agarosa, 150 ml TBE 0,5X, bullir al microones per dissoldre l'agarosa.
 - 2%: 3 g d'agarosa, 150 ml TBE 0,5X, bullir al microones fins que quedi líquid.
- Tampó de càrrega: 0,124 g de Blau de Bromofenol, 25 ml glicerol i afegir aigua destil.lada fins a 50ml.
- Marcador de pes molecular (VIII): 75 µl d'aigua destil.lada estèril, 10 µl de tampó de càrrega i 15 µl del DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, Espanya).

Protocol**Pre-PCR**

Extracció de l'ADN: Es van utilitzar els següents procediments d'extracció:

- Per ebullició: el procés consta de la resuspensió d'una colònia, mitjançant una nansa d'1 µl, en un tub eppendorf amb 100 µl d'aigua destil.lada estèril. Bullir la suspensió en un termociclador. Programa: 1 cicle de 20 minuts a 95 °C i 1 cicle amb temps indefinit a 4 graus.
- Kit d'extracció genòmica: GenElute™ Bacterial Genomic DNA kits (Sigma-Aldrich. USA).

Reacció d'amplificació de la polimerasa (PCR): Aquesta tècnica es divideix en tres etapes:

- Desnaturalització: L'ADN bicatenari es separa en cadenes monocatenàries per efecte de la temperatura (95 °C).
- Annealing: Els iniciadors s'uneixen a les zones complementàries (3' o 5') de cada cadena monocatenària del fragment a amplificar. Aquesta hibridació (iniciador-ADN monocatenari) és necessària per a que actui la polimerasa, degut a que aquesta necessita una regió bicatenària d'ADN per a iniciar la síntesi de la cadena complementària utilitzant de motlle la cadena monocatenària.

3. Extensió: es realitza la síntesi de les dues cadenes complementàries a les cadenes dels fragment inicial per part de la polimerasa.

Protocol

1-Descongela el tampó de reacció amb MgCl₂.

2-Descongela els dNTPs que estan a 100 mM, fer una alíquota de 1 ml a 2 mM (20 µl de cada dNTP i enrasar a 1ml amb aigua destil·lada estèril: 920 µl).

3-Es preparen els parells d'iniciadors (veure taula X) a 10 mM a partir d'una solució mare de 100 mM.

4-Es prepara la Master Mix, per a les PCR dels gens *bla* (excepte AmpC), quinolones (PMQR i QRDR), aminoglicòsids (AME), MLST, entorns de gen *bla*_{OXA-48} (volum final 50 µl) i per a PBRT (amb volum final de 30 µl).

Reactius	Volum (50 µl)	Volum (25 µl)
Aigua	30,5	12,7
Tampó (10X)	5	2,5
dNTP (2mM)	5	2,5
Iniciador Forward (10 µM)	2	2,5
Iniciador Reverse (10 µM)	2	2,5
Taq polimerasa (5U/ µl)	0,5	0,3
DNA	5	2

Per les PCR dels gens *bla* tipus AmpC., els reactius foren:

Reactius	Volum / mostra (µl)
Aigua	30,5
Tampó (10X)	5
dNTP(2mM)	5
Iniciadors A (10 µM)*	3
Iniciadors B (10 µM)*	2,5
Iniciadors C (10 µM)*	2
DNA	2

*Pool iniciadors A (MOXMR, MOXMF, CITMR, CITMF, DHAMR, DHAMF), pool iniciadors B (ACCMR, ACCMF, EBCMR, EBCMF) i pool iniciadors C (FOXMR i FOXMF)

5- Col·locar els tubs al termociclador amb el programa predeterminat.

Cicle	Temperatura (°C)	Temps
1x Desnaturalització	95	5 min
30x ^a Amplificació		
Desnaturalització	95	30 seg
Hibridació	T _m	30 seg
Extensió	70	1 min
Extensió final	70	7 min

^a en alguns casos s'ha incrementat a 35x.

T_m, s'escollirà la temperatura en funció dels iniciadors. Dels dos iniciadors s'escull la T_m més baixa.

Post-PCR

Visualització dels productes de PCR per electroforesis en gel d'agarosa.

L'observació dels amplificats obtinguts per PCR es va realitzar mitjançant la tècnica d'electroforesis de corrent continua en gels d'agarosa, amb la tinció de l'ADN mitjançant el bromur d'etidi (EtBr) i la seva visualització utilitzant la llum ultraviolada (UVA).

Aquesta tècnica permet observar els diferents amplificats depenent de la seva mida, ja que es basa en la migració del ADN (el qual té una càrrega negativa) cap un pol positiu dins d'un camp elèctric uniforme i constant. Això permet separar fragments d'ADN amb una mida d'entre 10 pb als 50 Kb, que migren pel gel depenent del seu pes molecular. Per a la seva observació cal l'utilització de Bromur d'etidi, un agent intercalant a l'ADN que amb contacte amb la llum UVA emet una llum roja-ataronjada.

Protocol

1-Preparar la solució d'agarosa al 1% en tampó TBE 0,5X. Es dissol al microones i es deixa atemperar. Un cop atemperat se li afegix el bromur d'etidi (0,5 µg/ml), abocar-ho al motlle amb les pintes i segellat amb cinta.

2- Passat uns 20 minuts el gel està sòlid i ja se li poden retirar les pintes i la cinta. Es col·loca el motlle amb el gel dins la cubeta d'electroforesis plena amb tampó TBE 0,5X.

3-Barrejar 10 µl de producte de PCR amb 2 µl de tampó de càrrega.

4-Carregar les mostres i el tampó de càrrega en els pouets del gel.

5-Deixar correr el gel a 100 V (35 mA aprox.) fins que les bandes del marcador de pes molecular quedin ben separades. El voltatge i el temps depèn de la mida esperada dels amplificats.

6-Visualització del gel al transil·luminador de llum UVA i realitzar fotografies.

Protocol de seqüenciació

La purificació dels productes de PCR es va realitzar amb el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR clean-up System* (Promega). Basat en l'habilitat de l'ADN a unir-se a una membrana de sílice en presència de concentracions altes de sals que permet l'eliminació dels restes d'iniciadors i de dNTPs. Els purificats es van quantificar utilitzant el suport tècnic de l'espectrofotòmetre de Biotek, Epoch (http://www.biotek.com/products/microplate_detection/epoch_microplate_spectrophotometer.html) i el software Gen5™ (http://www.biotek.com/products/microplate_software/gen5_data_analysis_software.html).

La seqüenciació la va realitzar l'empresa MacroGen Europe (Amsterdam, Holanda) i la preparació dels purificats per ser seqüenciats es va fer seguint les indicacions de MacroGen (https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_submission.jsp).

Les seqüències obtingudes van ser analitzades i editades utilitzant el software Vector NTI Advance (versió 9.0) d'Invitrogen. Posteriorment, es van comparar amb la base de dades del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilitzant el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), més específicament el nBLAST específic per seqüències nucleotídiques.

Un cop obtinguda la seqüència nucleotídica es transcriví per obtenir la seva seqüència aminoacídica amb EXPASY (<http://web.expasy.org/translate/>) i es realitzava una comparació amb el pBLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

ANNEX IV

Electroforesi en gel de camp pulsant (PFGE)

La tècnica es basa en la digestió de l'ADN cromosòmic en fragments grans per enzims de restricció de baixa freqüència de tall i la seva separació mitjançant una electroforesi on s'apliquen camps elèctrics que regularment canvien de direcció (pulsos). Aquesta alteració de la direcció dels pulsos elèctrics provoca el canvi de conformació de l'ADN, que l'obliga a reorientar-se a cada pols en funció del camp elèctric, i acaba migrant fent ziga-zaga pel gel, en comptes de fer-ho lineal com succeeix en un gel d'agarosa convencional. S'utilitza aquesta tècnica perquè els gels d'agarosa convencional només separen fragments màxims de 50Kb, i en el PFGE els fragments obtinguts poden oscil·lar entre 30 i 1000 Kb.

Per a realitzar aquesta anàlisi cal tenir l'ADN el màxim intacte possible, amb el mínim de trencaments mecànics, per aquesta raó es realitzen mètodes d'extracció d'ADN on la lisi cel·lular es realitza en blocs d'agarosa (inserts). La matriu d'aquests blocs protegeix l'ADN i al mateix temps permet l'acció de detergents i proteases.

L'ADN és digerit per enzims de restricció amb baixa freqüència de tall, així s'obté un nombre relatiu petit de fragments (no inferior a 10). L'elecció de l'enzim de restricció depèn en gran mesura del contingut de G+C del genoma de l'espècie bacteriana a estudiar, de la diana de restricció i de la mida i el nombre de fragments que s'obtinguin, que ens permeti obtenir un patró de bandes específic per a cada gènere. En el cas de l'ADN plasmídic únicament ens interessa utilitzar un enzim de restricció que ens permeti linealitzar el plasmidi per a permetre el seu traspàs per la matriu d'agarosa en funció del seu pes molecular, realitzant la tècnica descrita per Barton *et al.*⁴⁹⁵.

El procediment consta de la preparació de l'ADN (inserts i lisi cel·lular), rentat dels inserts, digestió enzimàtica de l'ADN cromosòmic amb l'enzim de restricció escollit, electroforesi dels fragments de restricció i visualització. Per a *K. pneumoniae* s'utilitza l'enzim de restricció *XbaI* en el cas de l'estudi de la relació epidemiològica entre soques, per obtenir un patró de bandes de l'ADN cromosòmic en funció de les còpies del ARNr 16S s'utilitza l'enzim de restricció *IceUI*, i en el cas d'obtenir un patró de bandes que reflexa els plasmidis presents en la soca s'utilitza l'endonucleasa *S1*.

Tampons i solucions del protocol del PFGE

- 1 L de TE amb un pH de 8 (mantenir a temperatura ambient): 1,212 g de Tris-Base, 0,372 g d'EDTA, s'ajusta a un pH de 8 i s'afegeix aigua destil·lada fins un litre.
- 1 L de CSB amb un pH de 8 (mantenir a temperatura ambient): 12,12 g de Tris-Base, 37,2 g d'EDTA, ajustar a un pH de 8 i afegir aigua destil·lada fins un litre.
- 500 ml de CLYSISB (mantenir a temperatura ambient): 5 g de SLS en 100 ml d'aigua destil·lada, 250 ml de CSB i afegir aigua destil·lada fins a 500 ml.
- 200 ml de Tris-HCl 1M (mantenir a temperatura ambient): 24,2 g de Tris-Base en 185 ml d'aigua, ajustar a pH de 7,5 (amb HCl) i afegir aigua destil·lada fins a 200 ml.
- 500 ml de Tris-HCl 10mM (mantenir a temperatura ambient): 5ml Tris-HCl 1 M, afegir 400 ml d'aigua, ajustar a pH de 7,5 i afegir aigua destil·lada fins arribar als 500 ml.
- 50 ml del Tampó de S1 (mantenir a 4 °C): 25 ml de NaCl (100 mM), 20 ml d'acetat de sodi (75 mM i pH de 4,5) i 5 ml de ZnSO₄ (50 mM).
- 500 µl de l'endonucleasa S1 a una dilució 1:100 (mantenir a -20 °C): 495 µl d'aigua destil·lada, 5 µl de l'enzim S1.

- h. 200 ml d'ES (EDTA-SLS): 18,61 g d'EDTA a 70ml d'aigua destil·lada, ajustar a un pH de 9 (amb NaOH 10M), enrasar amb aigua fins a 100 ml i afegir 1 g de SLS.
- i. 1 L de TBE 10X (mantenir a 4 °C): 121,5 g de Trizma, 0,745 g d'EDTA, 61,8 g d'àcid Bòric i afegir aigua destil·lada fins un litre.
- j. 1 L de TBE 0,5X (mantenir a temperatura ambient): 50 ml de TBE 10X i 950 ml d'aigua destil·lada .
- k. 25 ml de Thiourea 0,1 M (mantenir a temperatura ambient): 1,8105 g de Thiourea i afegir 25 ml d'aigua destil·lada .
- l. 1%: 2 g d'agarosa Seakem i 200 ml de TBE 0,5X.

Protocol

1. Preparació dels inserts i lisis cel·lular:
 - a. Sembrar les soques en plaques d'agar sang (Biomérieux España S.A, Madrid, Espanya), incubar a 37 °C durant 18h.
 - b. Preparar agarosa a l'1% en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH8). Preparar 300 µl/insert (es fan entre 4 o 5 inserts per soca). Dissoldre escalfant a la flama l'agarosa en TE. Un cop dissolta es manté l'agarosa en el *heatblocker* a 55 °C per evitar que es solidifiqui.
 - c. Resuspendre diverses colònies de la soca en 1 ml de tampó CSB (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 7,5). En el cas del estudi de l'ADN plasmídic el nombre de colònies a resuspendre serà major.
 - d. Transferir 250 µl de la suspensió bacteriana a un eppendorf de 1,5 ml, i afegir 1,5 µl de proteïnasa K (50 mg/ml).
 - e. Segellar la part inferior dels motlles dels inserts amb cinta adhesiva transparent.
 - f. Barrejar 250 µl de suspensió bacteriana amb 250 µl d'agarosa.
 - g. Transferir 100 µl de la barreja a cada bloc del motlle (evitant la formació de bombolles).
 - h. Posar a la nevera i deixar solidificar els inserts (temps aprox. 15 minuts).
 - i. Agafar tubs de vidre de 5 ml (tants com soques tinguem) i afegir 2 ml de Solució de lisis Clysis B (Tris 50 mM, EDTA 50 mM i Sarkosyl 1%, pH 7,5) i 12 µl de proteïnasa K (50 mg/ml). A continuació introduir els inserts dins la solució i deixar ficar a un bany a 55°C amb agitació durant dos hores.
2. Rentat dels inserts
 - a. Atemptar a 37 °C una ampolla d'aigua destil·lada estèril i una de tampó TE (pH 8).
 - b. Transferir els inserts a un tub de vidre on hi han 2 ml d'aigua destil·lada estèril i incubar-los al bany a 55 °C amb agitació durant 10 minuts. (repetir-ho dos cops, canviant l'aigua).
 - c. Canviar l'aigua destil·lada per 2 ml de tampó TE, i ficar al bany a 55°C durant 10 minuts (repetir el rentat dos cops més canviant cada vegada el TE).
 - d. Guardar els inserts en un eppendorf amb 1 ml de TE a la nevera, si es fes una pausa.
3. Digestió enzimàtica de l'ADN cromosòmic/plasmídic.
 - a. *Xba*I
 - i. Es talla un terç del insert (un insert per soca) i es col·loca en un tub eppendorf on hi hauran 168 µl de solució de digestió (143 µl d'aigua destil·lada estèril, 20 µl de tampó de restricció 10X, 2 µl d'albúmina sèrica bovina i 30U del enzim de restricció = 3 µl, en aquest cas és *Xba*I).
 - ii. Incubar en un bany a 37 °C amb agitació, durant 18 hores.

iii. Guardar a la nevera 30 minuts abans de carregar-los en el gel d'electroforesi.

b. *S1*

- i. Realitzar una barreja de 200 µl de tampó *S1* (acetat de sodi 30 mM, NaCl 50 mM i sulfat de zinc 5 mM) amb 0,28 µl de dilució 1/100 d'enzim *S1*. Col·locar un terç de l'insert en un eppendorf de 1,5 ml amb la barreja de digestió.
- ii. Incubar en un bany a 37 °C amb agitació 45 min.

c. *Iceul*

- i. Tallar 1/3 del insert i dipositar-lo en un tub amb 1 ml de Tris-HCl 10 mM durant 10 min. Repetir-ho un segon cop.
- ii. Realitzar una master mix, que per mostra conté: 176,4 µl d'aigua, 20 µl de Tampó (4), 2 µl de BSA i 1,6 µl d'*Iceul*. Col·locar l'insert en un eppendorf de 1,5 ml amb la barreja de digestió.
- iii. Incubar en un bany a 37 °C amb agitació, durant 3 hores.
- iv. Treure del bany i posar en gel fins que es carreguin els inserts.

4. Electroforesi dels fragments de restricció

a. Preparar el gel d'agarosa l'1%:

- i. Agafar 2 g d'agarosa (Seakem®-Inderlab) i barrejar-la amb 200 ml de TBE 0,5X. Escalfar al microones.
- ii. Muntar la base per fer gels del CHEF, col·locar la pinta i afegir l'agarosa, reservant una mica per poder utilitzar-la posteriorment per segellar els pouets.
- iii. Deixar refredar el gel uns 30 minuts.

b. Col·locar en cada pouet l'insert i a cada pouet de l'extrem col·locar un marcador de pes molecular (*Lambda ladder PFGE marker-Roche*).

c. Segellar els pouets amb l'agarosa reservada.

d. Afegir a la cubeta d'electroforesi del CHEF 2,3 ml de TBE 0,5X i 75 µM de tiourea (per evitar problemes de lisi de l'ADN bacterià). Posar la bomba del CHEF a 80 i programar la unitat de refrigeració a 14 °C (*cooling module*).

e. Desmuntar el motlle del gel i solament deixar la base negra (sense cap rastre d'agarosa per sota ni pels costats).

f. Col·locar el gel dins la cubeta quan la temperatura del tampó sigui de 14 °C.

g. Programar les condicions d'electroforesi al CHEF DRII *Power Module*. L'angle d'electroforesi es de 120° i 6 volts/cm. Les condicions d'electroforesi varien depenent de l'espècie.

i. *XbaI*: en *K. pneumoniae* : Bloc 1: 10-25 "(6 hores) Bloc 2: 25-45 "(18 hores).

ii. *S1*: en *K. pneumoniae* : Bloc 1: 5-25 "(6 hores) Bloc 2: 30-45 "(18 hores).

iii. *Iceul*: s'utilitzen les condicions descrites per *E. coli*: Bloc 1: 20-120 "(12 hores) Bloc 2: 60-100 "(12 hores).

5. Visualització de l'ADN

a. Col·locar el gel en una cubeta de plàstic amb 250 ml de tampó del CHEF i 40 µl de Bromur d'etidi (0,4 µg/ml).

b. Deixar en agitació 45 '.

c. Posar al transil·luminador per a observar el patró de bandes obtingut i foto del gel.

ANNEX V**Southern Blot i Hibridació**

Consta de dues parts, per una banda la transferència de l'ADN separat per electroforesi, es a dir d'un gel, a una membrana de nylon; i per l'altre hi ha l'hibridació de l'ADN amb sondes.

La transferència permet tenir l'ADN més accessible, gràcies a la membrana de nylon, per a les sondes amb les que s'hibridarà.

Tampons i solucions del protocol de Souther Blot**Transferència**

- a. 2 L de SSC20X (mantenir a temperatura ambient): 176,5 g Na-citrat-deshidratat amb 400 ml d'aigua destil·lada , 350,6 g NaCl amb 700 ml d'aigua destil·lada , ajustar a un pH de 7, i afegir aigua destil·lada fins als 2 litres.
- b. 1 L de SSC10X (mantenir a temperatura ambient): 500 ml del SSC20X i 500 ml d'aigua destil·lada.
- c. 1 L de SSC5X (mantenir a temperatura ambient): 250 ml del SSC20X i 750 ml d'aigua destil·lada.
- d. 1 L de SSC2X (mantenir a temperatura ambient): 100 ml del SSC20X i 900 ml d'aigua destil·lada.
- e. 500 ml de solució de depuritzadora (mantenir a temperatura ambient, i preparar al moment): 11 ml de HCl 0,25M (35%) i afegir aigua destil·lada fins els 500 ml.
- f. 1 L de solució de desnaturalització 1 (mantenir a temperatura ambient): 87,66 g de NaCl 1,5M, 20 g de NaOH 0,5M i afegir aigua destil·lada fins el litre.
- g. 1 L de solució de desnaturalització 2 (mantenir a temperatura ambient): 87,66 g de NaCl, 60,57 g de Trizma, ajustar a un pH de 7,5 i afegir aigua destil·lada fins arribar al litre.

Hibridació

- a. 1 L de tampó de deshibridació (mantenir a temperatura ambient): 1 g SDS, 8 g NaOH i afegir aigua destil·lada fins arribar al litre.
- b. 1 L de *low stringency buffer* (mantenir a temperatura ambient): 100 ml de SSC2X, 1 g de SDS i afegir aigua fins arribar al litre.
- c. 1 L de *high stringency buffer* per un alt percentatge de G/C (mantenir a temperatura ambient): 20 ml de SSC5X, 1 g de SDS i afegir aigua fins arribar al litre.
- d. 1 L de *high stringency buffer* per un baix percentatge de G/C (mantenir a temperatura ambient): 100 ml de SSC5X, 1 g de SDS i afegir aigua fins arribar al litre.
- e. 1 L d'àcid maleic 10X (mantenir a temperatura ambient): 116 g d'àcid maleic, 87,6 g de NaCl, ajustar a un pH de 7,5 (amb NaOH) i afegir aigua destil·lada fins arribar al litre.
- f. 1 L d'àcid maleic 1X (mantenir a temperatura ambient): 100 ml d'àcid maleic i 900 ml d'aigua destil·lada .
- g. 1L de *washing buffer* 1X (mantenir a temperatura ambient): 100 ml d'àcid maleic 10X, 900 ml d'aigua destil·lada i 3 ml de Tween 20.
- h. 500 ml de *blocking solution* 10X (mantenir a temperatura ambient i preparar al moment): 50 g de blocking agent i 500 ml d'àcid maleic 1X.
- i. 100 ml de *blocking solution* 1X (mantenir a temperatura ambient i preparar al moment): 10 ml de blocking solution 10X i 90 ml d'àcid maleic 10X.

- j. 1 L de *detection buffer* 10X (mantenir a temperatura ambient): 121 g de Trizma, 58,6 g de NaCl, ajustar a un pH de 9,5 (amb HCl) i afegir aigua destil·lada fins arribar al litre.
- k. 30 ml de *detection buffer* 1X (preparar al moment): 3 ml de *detection buffer* 10X i 27 ml d'aigua destil·lada.

Protocol

1. Preparació del gel

- a. Banyar el gel durant 5 minuts en aigua destil·lada i agitació per a eliminar les restes de bromur d'etidi.
- b. Eliminar l'aigua i col·locar el gel amb 500ml de solució de desnaturalització (HCl 0,25 M). Agitació durant 25 minuts.
- c. Netejar el gel amb aigua destil·lada, durant 5min en agitació.
- d. Eliminar l'aigua i cobrir el gel amb la solució de desnaturalització (NaCl 1,5 mM, NaOH 0,5 M) en agitació durant 30 minuts.
- e. Netejar el gel amb aigua destil·lada en agitació durant 5minuts.
- f. Eliminar l'aigua i cobrir el gel amb la solució de neutralització (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M; pH 7,5) en agitació durant 30 minuts.

Per realitzar una transferència més eficient, es fragmenta l'ADN en fragments d'aprox. 1Kb, alternant un tractament àcid amb un tractament alcalí.

2. Preparació de la membrana.

- a. Tallar la membrana Hybond N+ i el paper Whatmann 3 mm a la mida del gel, deixant 1 cm de marge per cada costat.
- b. Mullar el paper Whatmann en una cubeta amb SSC 2X (dilució 1/100 de SSC20X: citrat trisòdic 0,3 M, NaCl 3 M; pH 7) i col·locar sobre el suport porós de la unitat de transferència (BioRad).
- c. Col·locar la membrana Hybond N+ humida amb SSC 2X sobre el paper Whatmann.
- d. Col·locar la finestra de plàstic sobre la membrana, fent coincidir el forat a on ha de posar-se el gel, marcant amb llapis els extrems de la finestra.

3. Transferència.

- a. Acabada la neutralització del gel, es neteja el gel amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
- b. Transferir el gel a l'aparell de transferència, centrat a la finestra i evitant la formació de bombolles.
- c. Segellar els laterals amb agarosa i col·locar el *sealing frame* per a tancar l'aparell.
- d. Connectar la bomba de buit i ajustar la pressió a 3-4 inc. Hg.
- e. Abocar SSC 10X sobre la part superior del gel, fins a cobrir. Repetir aquest procés cada 30 minuts.
- f. Transferir durant 3 h.
- g. Retirar el gel i col·locar-lo en una cubeta amb bromur d'etidi per a comprovar al transiluminador si s'ha transferit correctament l'ADN.

4. Post-transferència

- a. Netejar la membrana durant 2 minuts amb SSC 2X.

- b. Col·locar la membrana sobre paper de filtre i mantenir en un forn a 80°C durant 30 minuts, per a fixar l'ADN.

Hibridació amb sondes

Per a la hibridació i la seva posterior detecció es va utilitzar el DIG Luminiscent Detection Kit (Roche). El principi fonamental és la digoxigenina, un hapten esteroideu que s'uneix a dUTP, UTP o ddUTP i així marca l'ADN, ARN o oligonucleòtids, per a l'hibridació i la posterior detecció.

Les sondes hibridades amb la antidigoxigenina (fragments FAb conjugats amb fosfatasa alcalina) són immunodetectables, i mitjançant un substrat quimioluminiscent: CSPD (Disodium 3-(4-metoxi-spiro{1,2-diox-etano-3,2-(5'-clor)tricycle[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)fenilfosfat) es visualitzen. La defosforilació enzimàtica del CSPD per la fosfatasa alcalina produeix una emissió de llum (477 nm). La senyal quimioluminiscent del CSPD persisteix durant dies a la membrana de nylon.

Les sondes utilitzades van diferir, depenent de si la membrana procedia d'un PFGE digerit amb S1 o amb Iceul:

- S1 → les sondes utilitzades van ser: *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, IncL/M, ColE, R, FIIK.
- Iceul → les sondes utilitzades van ser: ARNr 16S, *bla*_{OXA-48}, IncL/M.

Protocol

1. Hibridació

- Calcular la temperatura d'hibridació: $T_m = 49,82 + [0,4 \times (\%GC)] - (600 / \text{longitud d'ona})$, $T_{\text{òptima}} = T_m$ (de 20 a 35 °C)
- Preescalfar 20ml de tampó d'hibridació (Dig Easy Hyb, Roche) a la temperatura d'hibridació calculada (normalment ajustada a 42 °C).
- Col·locar la membrana en un tub d'hibridació i afegir 20 ml de tampó d'hibridació atemperat. Incubar durant 30 minuts en un forn a 42 °C amb rotació.
- Calcular el volum de sonda a desnaturalitzar (entre 5 i 25 ng de sonda per ml de tampó d'hibridació).
- Bullir durant 5 minuts el volum de sonda a desnaturalitzar barrejat amb aigua fins arribar a un volum de 50 µl (així s'evita possible evaporació).
- Col·locar en gel durant 5 minuts. I fer un pols a la centrifuga.
- Afegir la sonda al tampó d'hibridació.
- Incubació *overnight* al forn a 42 °C amb rotació.

2. Revel·lat

- Retirar el tampó d'hibridació amb la sonda i es guardar a -20 °C. Si es vol reutilitzar s'ha de desnaturalitzar la sonda a 65 °C durant 30 minuts (sense bullició).
- Afegir 100ml de *Low Stringency Buffer* (SSC 2X, 0,1% SDS) en una cubeta i col·locar la membrana. Posar en agitació durant 5 minuts a temperatura ambient. Fer-ho un segon cop més.
- Passar la membrana al tub d'hibridació i afegir 100ml de *High Stringency Buffer*, depenent del contingut de GC hi han dos: alt %GC (SSC 0,1X, 0,1% SDS) i baix %GC (SSC 0,5X, 0,1% SDS), que

prèviament s'ha atemperat a 65 °C. Posar al forn durant 15 minuts a 65 °C amb forta rotació. Fer-ho un segon cop més.

- d. Treure el buffer i afegir 100ml de *Washing Buffer* 1X (0,1 M àc. Maleic, 0,15 M NaCl; pH 7,5 (20 °C); 0,3% (v/v) Tween 20) en una cubeta i col·locar la membrana. Amb agitació durant 5 minuts i temperatura ambient.
- e. Eliminar la solució i afegir 100 ml de *Blocking Solution* 1X (10 ml de Blocking Buffer, 90 ml d'àcid maleic 1X) amb agitació suau durant 30 minuts i temperatura ambient.
- f. Eliminar la solució i afegir 20 ml de *Antibody solution* (2 µl de Anti-digoxigenina-AP + 20 ml de *blocking solution* del pas anterior) amb la membrana a una cubeta petita i agitació suau durant 30 minuts a temperatura ambient.
- g. Eliminar la solució i passar la membrana a la cubeta gran i afegir 100 ml de *Washing Buffer* 1X. Incubar 15 minuts amb agitació suau i temperatura ambient. Fer-ho un cop més.
- h. Eliminar la solució i afegir 25 ml de *Detection Buffer* (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5). Incubar durant 5 minuts amb agitació i temperatura ambient.
- i. Col·locar la membrana en una bossa d'hibridació i afegir-hi 2 ml de CSPD i expandir-ho evitant la formació de bombolles.
- j. Incubar 5 minuts a temperatura ambient i 15 minuts a 37.
- k. Col·locar la membrana amb la bossa al GBOX per a capturar imatges.

3. Deshibridació

- a. Rentar la membrana amb 100 ml de solució de deshibridació (0,2 M NaOH, 0,1% SDS) durant 15 minuts a 37 °C . Fer-ho un segon cop.
- b. Rentar la membrana amb SSC2X.

Els protocol del Southern Blot i la hibridació són els mateixos que els anteriorment mencionats a l'apartat de l'estudi de l'ADN plasmídic; on únicament canvia a l'hibridació l'utilització de la sonda del 16S. També es va hibridar amb la sonda del gen *bla_{oxa-48}* i del Incl/M

ANNEX VI

Conjugació

Tampons i solucions del protocol de conjugació

Medis de cultiu

- a. 1 L de medi Luria Bertani – LB (mantenir a 4 °C): 5 g d'extracte de llevat, 10 g de NaCl, 10 g de Peptona tripticasa i afegir aigua destil·lada fins arribar al litre.
- b. 1 L de medi Luria Bertani amb agar (mantenir a 4 °C): 5 g d'extracte de llevat, 10 g de NaCl, 10 g de Peptona tripticasa, 20 g d'agar i afegir aigua destil·lada fins arribar al litre.

Protocol

1. Cultiu *overnight* de les soques donadora i receptora (*E. coli* VA6190: Rif^R i amb GFP: *green fluorescent protein*, proteïna fluorescent que al ser irradiada amb llum UVA emet fluorescència) en una placa d'agar sang (Biomérieux España S.A, Madrid, Espanya) incubada a 37 °C.
2. Resuspendre 1 colònia en 10 ml de LB (en ampolla de 50 ml) amb 10 µl d'antibiòtic de selecció (dilució 1:1000). En el cas de la soca donadora, l'antibiòtic utilitzat serà la ceftazidima (100 mg/ml) i en el cas de la soca receptora la rifampicina (100 mg/ml).
3. Incubar en un bany a 37 °C amb agitació suau de 18-20 hores.
4. Inocular 200 µl del cultiu de la soca donadora en 2 ml de medi líquid Luria Bertani (LB, veure annex VI) (dilució 1:10) (sense antibiòtic i en ampolla de 50ml). Inocular 400 µl del cultius de la soca receptora en 4 ml de LB.
5. Incubar amb agitació a 37 °C durant aproximadament 2 hores per tal d'obtenir un creixement exponencial.
6. Transferir 200 µl de la soca receptora en un tub eppendorf de 1,5 ml i centrifugar 14.000g durant 1 minut. Fer el mateix amb la soca donadora. S'ha de aconseguir una quantitat de precipitat equivalent, com que la soca receptora creix més lentament que la soca donadora, s'haurà de fer més transferències i centrifugacions fins aconseguir una proporció entre precipitats de 1:4 (soca donadora : soca receptora).
7. Un cop aconseguida aquesta proporció es barrejarà en un tub eppendorf de 1,5 ml i es centrifugarà a 14.000g durant 1 minut, per obtenir el tub amb el precipitat que originarà transconjugants.

Conjugació en medi líquid:

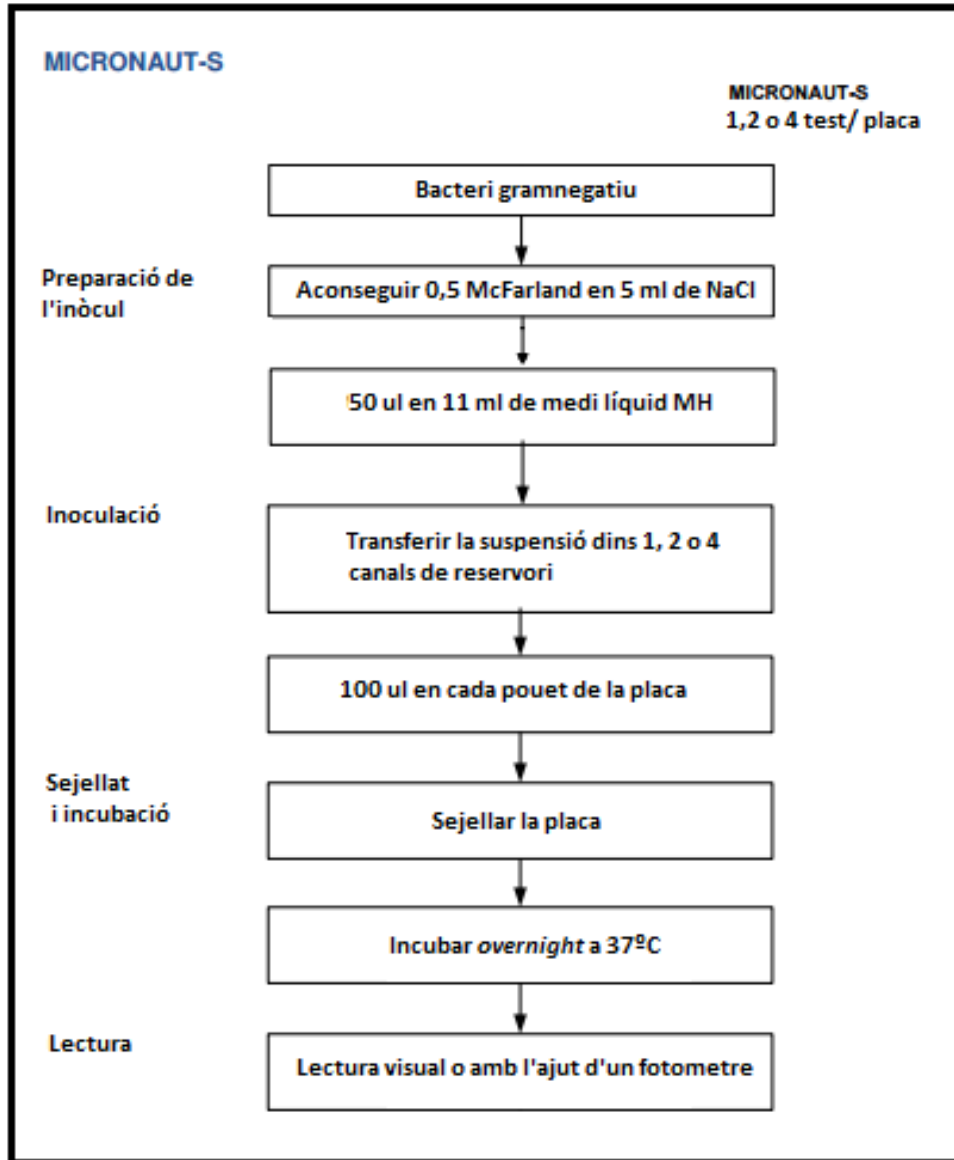
1. Resuspendre el *pellet* d'un tub amb la soca donadora, soca receptora i el dels futurs transconjugants dins un tub (amb capacitat de 15ml) amb 2 ml de LB.
2. Incubar de 18-20 hores en estufa de 37 °C col·locant el tub de conjugació inclinat.
3. Recuperar els 2 ml de cultiu i centrifugar en un eppendorf de 1,5 ml.

Conjugació en medi sòlid:

1. Resuspendre el *pellet* en 200 µl de LB.
 2. Col·locar un filtre de 0.22 µm x 47 mm (Millipore, França) al mig d'una placa d'agar sang (Biomérieux España S.A, Madrid, Espanya) i inocular els 200 µl de la suspensió bacteriana al centre del filtre intentant aconseguir forma de gota.
 3. Incubar de 18-20 hores a 37 °C .
 4. Extreure els filtres i introduir en un tub amb sèrum fisiològic estèril, fer un vòrtex, obtinguda la suspensió descartem el filtre.
 5. Centrifugar en un eppendorf de 1,5 ml.
-
8. Resuspendre el *pellet* en 300 µl de sèrum fisiològic estèril.
 9. Preparar un banc de dilucions per passar de la suspensió directa (S_0) a una dilució de 10^{-5} .
 10. Sembrar 100 µl de la suspensió directa S_0 a la dilució 10^{-3} en plaques de LBA (Luria Bertani amb Agar, veure annex VI) amb els antibiòtics de selecció per transconjugants.
 11. Sembrar 100 µl de la dilució 10^{-4} i 10^{-5} en plaques de LBA amb l'antibiòtic de selecció per a la soca donadora, per poder contar la freqüència de conjugació (Freqüència de conjugació= (Nombre de colònies tranconjugants x Factor de dilució x volum pipetejat a la placa) / (Nombre de colònies de la soca receptora x Factor de dilució x volum pipetejat a la placa)).
 12. Incubar les plaques a 37 °C durant 18-20 hores.
 13. Picar les colònies que creixin en les plaques de selecció i ressebrar en estries a una placa d'agar sang (Biomérieux España S.A, Madrid, Espanya). Posar discos d'antibiòtic de selecció per les transconjugants.
 14. Incubar a 37 °C de 18-20 h.
 15. De les estries que presenten resistència als antibiòtics de selecció fer antibiograma i biotipat.
 16. Comparar antibiograma i biotipat per confirmar obtenció de transconjugants i si és així sembrar per congelar al dia següent.
 17. Comprovar el mecanisme de resistència i la presència del plasmidi que el vehicula mitjançant PCR.

ANNEX VII

Estudi de sobreexpressió de la bomba d'expulsió AcrAB



Protocol

1) Calcular la concentració inhibitoria mínima (CIM) de les soques seleccionades

- Cultiu *overnight* de la soques en una placa d'agar sang (Biomérieux España S.A, Madrid, Espanya) a 37 °C.
- Seguir el protocol de plaques Micronaut-s (Merlin, Alemanya) .
- Lectura de CIM i interpretació seguint els punts de tall del CLSI.

2) Assaig d'acumulació de bromur d'etidi (BrEt)

- Selecció de soques en funció del pulsotip i el patró de sensibilitat.
- Cultiu *overnight* en 10 ml de medi líquid LB a 37 °C amb agitació.

- c) Ressembla en 15 ml de medi líquid LB i incubació fins assolir una absorvència de 0,8.
- d) Centrifugació (4000 g, 5 min a 4 °C) i mantenir en gel.
- e) Descartar el sobrenadant i resuspendre en 1,5 ml de tampó fosfat (50 mM tampó fosfat pH 7,5; 1 mM MgSO₄).
- f) Centrifugar (4000g, 3 min a 4 °C).
- g) Mesurar l'absorvència (una solució 1:100) [blanc: tampó fosfat, mostra: 900 µl de tampó fosfat + 100 µl de mostra]
- h) Ajustar a una absorvència de 20.
- i) Omplir la placa :Inocular per pouet 185 µl de solució bacteriana + 5 µl de Glucosa (0.2%) + 10µl de Solució de BrEt.
- j) Introduir en el fluoròmetre Infinite M1000 (TECAN, Suïssa) amb el programa indicat (amb una longitud d'ona d'excitació de entre 520-580 nm i sempre a una temperatura de entre 36,5 i 37,5 °C). Lectura de 30 min.
- k) Càlcul de la fluorescència relativa. La fluorescència relativa és la relació entre les dades de fluorescència primes del flux de sortida i la de cèl·lules carregades amb BrEt. El flux de sortida es representa així com la relació de fluorescència que roman per unitat de temps, relativament a la de les cèl·lules.

3) Estudi de l'expressió del gen *acrB* en *K. pneumoniae*.

És una tècnica que es basa en la quantificació relativa de l'expressió del gen a estudiar en relació a l'expressió d'un gen conservat (*housekeeping*). En el nostre cas el gen a estudiar és el gen *acrB* i el comparem amb el gen *gapA* de la mateixa soca.

- a) Ambient lliure de ribonucleases:
 - i) S'ha de tenir una especial cura per evitar la introducció de RNases a la preparació de ARN, tant durant com després de la seva extracció per la qual cosa s'hauran en compte les següents precaucions:
 - (1) Descontaminar l'ambient (taula de treball i gradetes) i el material (guants pipetes) que s'utilitzarà amb el *RNaseZap RNase decontamination Solution* (Applied Biosystems).
 - (2) Utilitzar material de plàstic (eppendorf) net de RNases.
 - (3) S'ha de treballar sempre en gel per evitar la degradació de l'ARN

b) Extracció de l'ARNm total bacterià

L'extracció d'ARN missatger (ARNm) bacterià es porta a terme amb el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). El procediment és el següent, utilitzant tres rèpliques per mostra.

- i) Procediment

Passos previs a l'extracció:

- a) Sembrar una colònia de la soca d'estudi en 5 ml de medi Luria-Bertani (LB) *overnight* a 37 °C amb agitació suau.
- b) Afegir 50 µl d'aquest cultiu a 5 ml de medi LB nou i incubar durant 2 o 3 hores a 37 °C amb agitació suau fins a obtenir una O.D 600nm (densitat òptica a $\lambda = 600$ nm) de aproximadament 0,5 (ajustar 1 ml amb LB).
- c) Tampó TE (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8) contenint 1 mg/ml de lisozima.
- d) Tampó de lisi RLT (*RNeasy Lysis Buffer*) + β -mercaptoetanol: Afegir 10 ml de β -mercaptoetanol per 1 ml de tampó RLT (aquesta solució és estable durant 1 mes).

- e) Afegir 0,5 ml de cultiu a un tub amb 1 ml de *RNAprotect Bacteri Reagent*. Agitar 5 segons i incubar 5 minuts a temperatura ambient.
 - f) Centrifugar durant 10' a 5.000 g.
 - g) Decantar el sobrenedant i eliminar el sobrenedant residual deixant el tub invertit sobre paper (no eliminar amb pipeta).
- 1) Afegir 100 µl de tampó TE.
 - 2) Agitar 10 segons i incubar a temperatura ambient 5 minuts (incubar amb agitació o agitar 10 segons almenys cada 2 minuts).
 - 3) Afegir 350 µl de tampó de lisi RLT + β-mercaptoetanol (1/100) i agitar vigorosament. Si existeix material particulat visible, centrifugar i utilitzar el sobrenedant.
 - 4) Afegir 250 µl d'etanol (96-100%) i barrejar amb pipeta.
 - 5) Transferir 700 µl del llistat (sense incloure el precipitat que es pugui haver format) a una columna de RNeasy Mini amb el seu tub col·lector de 2 ml. Tancar la tapa i centrifugar 15 segons com a mínim a 8.000 g. Descartar el líquid i reutilitzar el tub per al següent pas.
 - 6) Afegir 350 µl del tampó de rentat RW1 a la columna i centrifugar 15 segons a ≥ 8.000 g. Descarta el líquid.
 - 7) Afegir 10 µl de DNasa a 70 µl de tampó RDD. Barrejar invertint el tub (no agitador) i fer un pols de centrifuga per baixar el líquid residual de les parets del tub.
 - 8) Afegir la mix de DNasal (80 µl) directament a la membrana de la columna i incubar a temperatura ambient 15 minuts.
 - 9) Afegir 350 µl del tampó de rentat RW1 a la columna, esperar 5 minuts i, centrifugar 15 segons a ≥ 8.000g. Descartar el líquid i el tub col·lector.
 - 10) Col·locar la columna en un nou tub col·lector de 2ml. Afegir 500 µl de tampó de rentat RPE i centrifugar 15 segons a ≥ 8.000 g. Descartar el líquid.
 - 11) Afegir 500 µl de tampó de rentat RPE i centrifugar 2 minuts a ≥ 8.000 g. Descartar el líquid i el tub.
 - 12) Col·locar la columna en un nou tub de 1,5 ml. Afegir 30-50 µl d'aigua RNasa-free i centrifugar 1 minut a ≥ 8.000 g.
 - 13) Ajustar la concentració d'ARN a 50 ng/ml i emmagatzemar a -80 °C.

c) Síntesi d'ADNc

Un cop tenim l'ARN, la part corresponent al ARNm del gen, la responsable de la seva expressió, amb el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) donarem lloc a ADNc, que serà el motlle per a la reacció de PCR en temps real (RT-PCR).

d) PCR a temps real (qRT-PCR)

La PCR en temps real és un mètode basat en la detecció de fluorescència dels amplicons d'ADN obtinguts en cada cicle durant la PCR. Es fa servir el termociclador LightCycler (Roche) i el kit QuantiFast™ SYBR® (Qiagen). Com més expressat estigui el gen, la senyal de fluorescència de l'amplificació per PCR passarà abans el llindar (*threshold*) i serà detectat per l'aparell. El valor del CT (*cycle threshold*) obtingut pel LightCycler serà proporcional a la quantitat d'ARNm del gen.

Un cop obtinguts la "*Mean Concentration*" del gens *acrB* de les dos soques i la *Standard concentration* del gen control (*gapA*). Podem calcular la diferència entre l'expressió dels dos gens en cada soca (= *Mean conc. acrB / Standard conc. gapA*) i aquest valor dividir entre els dos soques per veure si existeix diferències considerables en al expressió (valor per sobre de 20).

ANNEX VIII

Whole-genome sequencing (WGS).

Protocol

1. Extracció d'ADN

- a) Etiquetar dos tubs de 0,5 ml del Qubit Assay per a la Standard #1 i #2 i un tub per mostra.
- b) Realitzar la Qubit working solution: Diluir el reactiu de Qubit dsDNA BR en una proporció 1:200 en el tampó de Qubit dsDNA BR (1 µl de reactiu BR + 199 µl de tampó BR per mostra).
- c) Pipetejar 190 µl de la Qubit working solution en cada un dels tubs etiquetats.
- d) Afegir 100 µl de les 2 Qubit standard al tub apropiat i barrejar per vòrtexs durant 3 segons, anant en compte de no crear bombolles.
- e) Diluir la mostra d'ADN 1:10 amb aigua MGB (2 µl de mostra + 18 µl d'aigua).
- f) Incubar els tubs a temperatura ambient durant 2 minuts.
- g) A la pantalla d'inici del fluoròmetre Qubit 2.0, premer ADN i a continuació seleccionar dsDNA High Sensitivity Assay i el tipus d'assaig. El Standard Screen es visualitza automàticament.
- h) En el Standard Screen prémer Yes per a continuar una nova calibració.
- i) Insertar el tub que conté la Standard #1 en el fluoròmetre, tancar la tapa i prémer Read. La lectura triga uns 3 segons. Retira la Standard #1.
- j) Repetir el procés amb la Standard #2.
- k) Inserir la primera mostra i prémer Read Next Sample.
- l) Completar el mesurament de les mostres, prémer Calculate Stock Conc. Observar en la pantalla del calculador de dilució com el volume roller wheel es visualitza.
- m) Utilitzar el volume roller wheel, seleccionar el volum de les mostres originals (2 a 3 µl) que s'ha afegit al tub d'assaig.
- n) Per a canviar les unitats, prémer ng/ml. Canviar a ng/µl.
- o) Sortir de la pantalla de calculador de dilució, prémer Read Next Sample.
- p) Repetir el procés de lectura i càlcul en els mostres següents.
- q) Diluir la mostra a 0,2 ng/µl amb aigua. Utilitzar una fulla d'excel per escriure les dades.

2. Preparació de la llibreria genòmica

2.1. Tagmentació

- a) Treure els iniciadors index del congelador i deixar-los a temperatura ambient.
- a) Invertir el tampó TD (*Tagment DNA buffer*) descongelat i l'ATM (*Amplicon Template Mix*) entre 3 i 5 cops, seguit de una molt breu centrifugació en la micro-centrifuga.
- b) Etiquetar una nova placa NTA (*Nextera XT Tagment amplicon Plate*) de PCR de 96 pous.
- c) Afegir 10 µl de tampó TD a cada pouet per a ser usat en aquest assaig.
- d) Afegir 5 µl d'ADN a 0,2 ng/µl (1 ng total) a cada pouet de mostra de la placa de NTA.
- e) Afegir 5 µl d'ATM als pous que contenen ADN i tampó TD. Canviar puntes entre mostres.
- f) Segellar la placa NTA amb el segell adhesiu Microseal.
- g) Centrifugar a 280 g a 20 °C durant 1 minut.
- h) Col·locar la placa NTA en el termociclador amb el programa: 5 minuts a 55 °C i mantenir a 10 °C.

- i) Quan la mostra arriba a 10 °C, procedir immediatament per neutralitzar NTA mentre el transposoma segueix actiu.
- j) Retirar el segell adhesiu i afegir 5 µl del tampó NT (*Neutralize Tagment buffer*) en cada pouet.
- k) Cobrir la paca amb l'adhesiu.
- l) Centrifugar a 280 g a 20 °C durant 1 minut.
- m) Deixar la placa de NTA a temperatura ambient durant 5 minuts.

2.2. PCR Index

- a) Retirar el NPM (*Nextera PCR Master mix*) del congelador i descongelar a temperatura ambient.
- b) Invertir els tubs de NPM i dels iniciadors index de 3 a 5 cops, per a barrejar el seu contingut, seguit d'una curta centrifugació en la micro-centrifuga.
- c) Afegir 15 µl de NPM a cada pouet de mostra.
- d) Afegir 5 µl del iniciador index 2 (tap blanca, i50x) a cada pouet amb mostre.
- e) Afegir 5 µl del iniciador index 1 (tap taronja, ii7xx) a cada pouet amb mostre.
- f) Cobrir la placa amb l'adhesiu de PCR i barrejar durant 5 segons a 1800rpm.
- g) Centrifugar la placa NTA a 280g a 20 °C durant 1 minut.
- h) Realitzar la PCR utilitzant el següent programa en un termociclador:
 - 3 minuts a 72 °C
 - 30 segons a 95 °C
 - 12 cicles de:
 - 10 segons a 95 °C.
 - 30 segons a 55 °C.
 - 30 segons a 72 °C.
 - 5 minuts a 72 °C.
 - Mantenir a 10 °C.

Aquí es pot realitzar una parada i deixar les mostres a 4 °C un termini màxim de 2 dies.

2.3. PCR cleanup

- a) Posar les alíquotes d'AmPure XP a temperatura ambient.
- b) Preparar etanol fresc 80% d'etanol absolut.
- c) Retirar el tampó de resuspensió (RSB) del congelador i deixar que es descongeli a temperatura ambient.
- d) Centrifugar la placa NTA a 280g durant 1 min (20 °C) per recollir la condensació.
- e) Vortejar les perles d'AmPure XP durant 30 segons per assegurar-se que les perles estan uniformement dispersades.
- f) Afegir 25 µl de perles AmPure XP a cada pouet (la mida dels inserts de la llibreria >500 pb).
- g) Barrejar a 1800 rpm durant 2 minuts.
- h) Incubar a temperatura ambient sense sacsejades durant 5 minuts.
- i) Col·locar la placa en un suport magnètic durant 2 minuts o fins que el sobrenedant s'ha aclarit.
- j) Amb la placa al suport magnètic, rentar les perles amb etanol al 80% de la següent manera: (1) afegir 200 µl d'etanol al 80% a cada pouet amb mostra. No s'han de

resuspandre les perles. (2) Incubar la placa en el suport magnètic durant 30 segons. (3) Retirar i descartar el sobrenedant.

- k) Realitzar un segon rentat amb etanol al 80% amb la placa al suport magnètic.
- l) Col·locar la placa en una microcentrifuga i realitzar un petit *spin*.
- m) Col·locar la placa al suport magnètic i retirar l'etanol residual.
- n) Deixar el pelet assecant-se al aire durant 15 minuts.
- o) Retirar la placa del suport magnètic i afegir 52,5 µl de RSB a cada pouet.
- p) Barrejar per pipeteig fins estar segur que les perles estan completament resuspeses.
- q) Incubar a la temperatura ambiental durant 2 minuts.
- r) Col·locar la placa en el suport magnètic durant 2 minuts o abans que el sobrenedant s'hagi netejat.
- s) Etiquetar dos noves plaques de PCR de 96 pouets: CAN (*Clean Amplified NTA*) i LNP (*Library Normalization Plate*).
- t) Transferir 50 µl del sobrenedant a la placa CAN.
- u) Transferir 20 µl dels sobrenedant de la placa CAN a la LNP.
- v) Congelar els 30 µl del sobrenedant en la placa CAN a -15 °C.

Aquí es pot realitzar una parada i deixar les mostres a -15 °C un termini d'una setmana.

2.4. Normalització de la llibreria

- a) Preparar 0,1 mol/L NaOH.
- b) Retirar LNA1 (*Library Normalization Additives 1*) del congelador i deixar-lo a temperatura ambiental. Fer un vòrtex i assegurar-se que el precipitat està completament dissolt.
- c) Retirar LNB 1 (*Library Normalization Beads 1*) i el LNW1 (*Library Normalization Wash 1*) de la nevera i deixar-los a temperatura ambiental. Barrejar vigorosament el LNB1, fent que les perles estiguin bé resuspeses i que no hi hagi pelet.
- d) Assegurar-se que el LNS1 (*Library Normalization Storage 1*) està a temperatura ambiental abans d'utilitzar-lo.
- e) Pipetejar 45,8 µl de LNA1 per mostra (917 µl per 20 mostres) en un tub eppendorf de 1,5 ml.
- f) Resuspandre LNB1 i un cop estigui ben resuspès, es transfereix 8,3 µl per mostra (166,7 µl per 20 mostres) al tub eppendorf amb LNA1. Barrejar el contingut.
- g) Afegir 45 µl del combinat LNA1/LNB1 a cada pouet de la placa LNP.
- h) Segellar la placa.
- i) Centrifugar la placa a 1800rpm durant 30 minuts.
- j) Col·locar la placa en un suport magnètic durant 2 minuts.
- k) Confirmar que el sobrenedant s'ha netejat.
- l) Retirar i descartar el sobrenedant.
- m) Retirar la placa del suport magnètic i netejar les perles amb LNW1 seguint els següents passos (dos cops): (1) afegir 45 µl de LNW1 a cada mostra, (2) segellar la placa amb el film adhesiu, (3) centrifugar la placa a 1800rpm durant 5 minuts, (4) col·locar la placa en el suport magnètic durant 2 minuts fins que s'ha netejat el sobrenedant. (4) descartar el sobrenedant.
- n) Retirar la placa del suport magnètic.
- o) Afegir 30 µl de 0,1 mol/L de NaOH a cada pouet amb mostra. Barreja.

- p) Segella la placa.
- q) Centrifuga la placa a 1800 rpm durant 5 minuts.
- r) Afegir 30 µl de LNS1 a cada pouet de la placa SGP.
- s) Després de 5 minuts d'elució, col·locar la placa LNP en el suport magnètic durant 2 minuts fins que el sobrenedant estigui net.
- t) Transferir 30 µl del sobrenedant de la placa LNP a la placa SGP.
- u) Segellar la placa SGP.
- v) Centrifugar la placa a 1800 rpm durant 5 segons i fer-li un petit spin.

Aquí es pot realitzar una parada i deixar les mostres a -15 °C un termini de dos setmanes

2.5. Posta en comú de la llibreria (*Library pool*)

- a) Deixar el HT1 (*Hybridization buffer*) a temperatura ambient.
- b) Encendre un *Heat Block* per a tubs de 1,5 ml a 96 °C.
- c) Etiquetar un tub eppendorf com PAL (*Pooled Amplified Library*).
- d) Transferir 5 µl de cada mostra en el tub PAL.
- e) Etiquetar un segon tub eppendorf d'1,5 ml com DAL (*Diluted Amplified Library*).
- f) Pipetejar 586 µl del HT1 dins el tub DAL.
- g) Transferir 14 µl de PAL al tub de DAL. I barrejar.
- h) Realitzar un petit *spin* a la microcentrifuga.
- i) Incubar el tub DAL a 96 °C durant 2 minuts.
- j) Barrejar per inversió el contingut del tub DAL (2 cops).
- k) Immediatament col·locar el tub DAL en gel durant 5 minuts (deixar el tub DAL en gel fins el començament de la MiSeq).
- l) Carregar DAL dins un cartutx de reactius de MiSeq descongelat. (Nota: Cal fer aquest pas de desnaturalització per calor immediatament abans de la càrrega DAL en el cartutx de reactiu MiSeq per assegurar una càrrega eficient de l'ADN en la cèl·lula de MiSeq.).
- m) Tapar el tub PAL i segellar la placa SGP amb Microseal B.
- n) Desar el tub PAL i la placa SGP de -25 °C a -15 °C durant un màxim d'una setmana.

2.6. Preparar un control PhiX de seqüenciació

- Preparar HT1:
 - a) Extreure el tub de HT1 (Tampó d'hibridació) de -15 a -25 °C i descongelar a temperatura ambient.
 - b) Quan estigui descongelat, emmagatzemar entre 2 i 8°C, fins que estigui llest per a diluir a les llibreries desnaturalitzades.
- Preparar una dilució de NaOH:
 - a) Preparar 1 ml de 0,2 N de NaOH: aigua bidestilada (800 µl) i 0,1 N NaOH (200 µl), en tub de microcentrifuga.
 - b) Invertir el tub diverses vegades per barrejar.
- Preparar el control PhiX:
 - a) Combinar els següents volums per a diluir el PhiX a 4nM: 10 nM de PhiX (2 µl), 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 amb 0,1% de Tween 20 (3 µl).
 - b) Si no s'ha elaborat en les últimes 12 hores, preparar una dilució fresca de 0,2 N NaOH.
- Desnaturalitzar el control PhiX:

- a) Combinar els següents volums de 4nM PhiX i 0,2 N de NaOH en un tub de microcentrifuga: 4 nM PhiX (5 µl) i 0,2 N NaOH (5 µl).
 - b) Passar per un breu vòrtex per barrejar la solució de 2 nM PhiX.
 - c) Centrifugar la solució a 280 g durant 1 minut.
 - d) Incubar durant 5 minuts a temperatura ambient per desnaturalitzar el PhiX.
 - e) Afegiu el següent volum de HT1 pre-refredat al tub que conté desnaturalitzat PhiX biblioteca per donar com a resultat 20 pM PhiX: PhiX (10 µl) i HT1 Pre-refredat (990 µl).
- Diluir el control PhiX desnaturalitzat:
 - a) Es dilueix el 20 pM PhiX desnaturalitzat a 12,5 pM barrejant el següent: 20 pM de PhiX desnaturalitzat (375 µl) i HT1 Pre-refredat (225 µl).
 - b) Invertir diverses vegades per barrejar la solució.
 - c) Descartar la dilució restant de 0,2 N NaOH.
 - Combinar la mostre de la llibreria i el control PhiX:

Il·lumina recomana una baixa concentració de control PhiX augmentat en l'1% per a la majoria de les llibreries; i per llibreries de baixa diversitat, augmentar el control PhiX almenys a 5%.

- a) Combini els següents volums dels controls PhiX desnaturalitzat i la seva mostra de la llibreria desnaturalitzada.

Taula 39. Quantitats utilitzades per combinar la mostra de llibreria i el control PhiX.

	Majoria de llibreries (1%)	Llibreries de baixa diversitat (≥ 5%)
Control PhiX desnaturalitzat i diluït	6 µl	30 µl
Mostra de la llibreria desnaturalitzada i diluïda	594 µl	570 µl

- b) Barrejar el PhiX i la mostre i deixar en gel fins que es carregui el cartutx de reactius de MiSeq.

2.7. Preparació del cartutx de reactius

- Descongelar els reactius del cartutx:

Les següents instruccions descriuen com es descongela el cartutx de reactius utilitzant un bany maria.

- a) Treure el cartutx de reactius de -15 a -25 °C.
- b) Col·locar el cartutx de reactius en un bany maria a temperatura ambient per submergir la base del cartutx de reactiu. No permetre que l'aigua sobrepassi la línia màxima d'aigua impresa al cartutx de reactius (fletxes taronges).



- c) Deixar que el cartutx de reactius es descongeli al bany maria a temperatura ambient aproximadament 1 hora o fins que s'hagi descongelat del tot.
- d) Treure el cartutx del bany d'aigua i colpejar suaument al banc per treure l'aigua de la base del cartutx. Assecar la base del cartutx.

- Inspeccionar el cartutx de reactius

- a) Inverteix el cartutx de reactius deu vegades per barrejar els reactius descongelats, i després visualment inspeccionar que totes les posicions es descongelen.
- b) Inspeccionar visualment els reactius en les posicions 1, 2 i 4 per assegurar-se que siguin mixtes i sense precipitat.
- c) Evitar la creació de bombolles.
- d) Col·locar el cartutx en gel entre 2 i 8 °C (fins a 6 hores) fins que estigui llest per carregar-lo al Miseq i corre la seqüenciació. Per a millors resultats, carregar les mostres abans de carregar-lo al Miseq.

2.8. Preparar l'execució del MiSeq

- Carregar les llibreries de mostres:
 - a) Utilitzar una punta de pipeta neta de 1 ml per perforar el segell d'alumini sobre l'etiqueta de càrrega (*Load Samples*).
 - b) Pipetejar 600 µl de llibreries preparades en el dipòsit de càrrega de mostres. Evitar tocar el segell d'alumini a mesura que es dispensa la mostra.
 - c) Procedir directament als passos de configuració d'execució utilitzant el software de control d'instruments de seqüenciació.
- Configurar el Executar utilitzant software de Control MiSeq (MCS)
 - a) A la pantalla de Benvinguda, seleccionar Administrar Instrument.
 - b) A la pantalla de Gestiona Instrument, seleccionar Reiniciar per reiniciar el software del sistema.
 - c) A la pantalla de Benvinguda, seleccionar Seqüència per començar els passos de configuració de l'execució.
- Netegeu la cel·la de flux (*Flow Cel*)
 - a) Posar en un nou parell de guants nets.
 - b) Utilitzant les pinces de plàstic, agafa la cel·la de flux per la base del cartutx de plàstic i treure del recipient de la cel·la de flux.
 - c) Esbandir lleugerament la cel·la de flux amb aigua bidestilada, assegurant-se que tant el vidre i cartutx de plàstic es renten a fons de l'excés de sals.
 - d) Utilitzant una tovallola amb alcohol, netegi el vidre de la cel·la de flux. Assegureu-vos que el vidre està lliure de ratlles, empremtes dactilars, i fibres de borrisol o de teixits. Eviteu l'ús de la tovallola d'alcohol a la cel·la de flux.
 - e) Eixugar qualsevol excés d'alcohol amb un mocador de paper per netejar lents i sense fils.
- Carregar la cel·la de flux
 - a) Aixecar la tapa del compartiment de la cel·la de flux, i després premeu el botó d'obertura cap a la dreta del pestell cel de flux. El pestell de cel·la de flux s'obrirà.
 - b) Sostenint la cel·la de flux per les vores del cartutx de la cel·la de flux, posar la cel·la de flux en la plataforma.
 - c) Prémer suaument cap avall el pestell de la cel·la de flux per tancar-la sobre la cel·la de flux.
 - d) Comprovar la cantonada inferior esquerra de la pantalla per confirmar que el RFID de la cel·la de flux serà llegit correctament.
 - e) Tancar la tapa del compartiment de la cel·la de flux.
 - f) Seleccionar Següent a la pantalla de càrrega de la cel·la de flux.

- Carregar el PR2 i comprovar l'ampolla de residus:
 - a) Extreure l'ampolla de PR2 de 2 a 8 ° C. Invertir suaument l'ampolla per barrejar el contingut i retirar la tapa.
 - b) Obrir la porta del compartiment de reactius.
 - c) Aixecar la maneta d fins que encaixi al seu lloc.
 - d) Col·locar l'ampolla PR2 en l'osca a la dreta del reactiu refrigerat.
 - e) Assegurar-se que l'ampolla de residus esta buida.
 - f) Baixar lentament la maneta.
 - g) Comprovar la cantonada inferior esquerra de la pantalla per confirmar que el RFID de l'ampolla PR2 es llegirà correctament.
 - h) Seleccionar Següent a la pantalla dels reactius de càrrega.
- Carregar el cartutx de reactius:
 - a) Obrir la porta del refrigerador de reactius.
 - b) Sostenir el cartutx de reactius a l'extrem amb l'etiqueta de llumina, i fer lliscar el cartutx de reactius en el refrigerador de reactius fins que el cartutx s'aturi.
 - c) Tancar la porta del refrigerador de reactius.
 - d) Comprovar la cantonada inferior esquerra de la pantalla per confirmar que el RFID del cartutx de reactius es llegeix correctament.
 - e) Tancar la porta del compartiment de reactius.
 - f) Seleccionar Següent a la pantalla de reactius de càrrega.

ANNEX IX

```

>SEQ10
GCCTGAGTACCTCCAATCCCAAGCGAATCGTTGAGAGTACCGTTTCGATGCCCAATGGTATTGGCCTGAAAATGCCT
ATCCCAGCCCTGTTGCTGTGCGTGTAAACCAACTAGCCACAACAGGCATTG AACCATC AACGCTATCAGTAGG ATG
ATGTCGAATCGCTCTGGACTGTTGGTACGACTTTGGCGTAAGCCAAGCCGTA TGCCGGGCTTTTGAGG TCACGA
AAGGTTTCCTCTATTTGCATACGTTTGGCGTACAGG TTTACCAGCTGCTTTGGGCTCCGAGATTCTGGTGGTAAAT
GCTGGCTAACACCCCAAGGCTCTTTGCGCGATGTTGAGTACGTTTTTGGCCGATGGATGGTGGC AATTAGTCCCTGTT
GAACGCTGATTTGTACGCCCTTAGTTTTGCTACGATAAAGCGTGAGA TGGCAATTGATAGGGTTAGTTTGGTCA
AAGTCTTACAACCCAGGCTCTTCGCTTACCCTTGGCCAAGTCAATGT TACTTCG AACTGCACGCCAAATTTACAGCG
CCAATATCTGCAAATGAACTGTACCGCGAATACGGCTTAGCCAAAACCAACC ATGCGCCTCAACCTCTTTGTACCA
AGGCACCTTTGAACCCCGCTCAGTCACGATGAGAGGGGTAACATGCAAAGGT AAAATCTTGGCTAAG TCCGCTAA
AAAACCGTTGTGGGAGGCCCTTAGAGCATTGTTCTGATAGGGGATAGG ACTTCTC ATACAGGG TAA TAGAGCGGCC
ATTGAAGGCTATTGAGGCGCGCAGAGCCATGATGCGTTTATGCTC TCGGATGTC TGACCAATCGACGAGACAAT
CGGCATAGGGTTACCAGAACAGATGAGGCTGGCATGCCATTGGTAGACAGC TAACCGT TCTTGA TGCAGATGCGT
GTTGCCGAGCAAACGATCAATGCGCTTATGTTGCTTGGTTCGGG;3CCGTGGTTGGTAAATTCGACCTAACTCA
GTC AAGGTCAGTGTCTTACATTC AATCAGCGCTTAGAGGCCAGCATCAAGCTG TTTAATCGTTT TAGGTTG AAGTT
CTGGGCAGTATTGGTGTAAAGAATGTGGTAA TGACTCCAACTTATTGATAG TG TTTATG TTCAGATAATGCCCGA
TGACTTTGTCATGCAGCTCCACCGATTTTGAAGACGACGCGACTTCCGTCACGCGGTGCCAGGTGCTGCCTCAG
ATTGAGGTTATGCGCGCTCAATTCGCTGCGTATATCGCTTGGCTGATTACGTTGCAGGTTTCCCTTACAGG
CGGGATTACATACAGCGGCCAGCCATCCGTCATCCATATCAACACGTC AAAGGGTGAACAGC
AGGCTCATAAGACGCCCCAGCGTCGCCATAGTGGCTTACCGAATACGTGCGCAACAACC
GTCTTCCGGAGCCTGTACATCGCGTAAACAGCCAGCGCTGGCGGATTTAGCCCGGAGC
TATCCCACTGTTGCTCCATTTCCGCGCAGACGATGACGTC ACTGCCCGGCTGTATGCCG
GAGGTTACCGACTGCGGCGCTGACTTTTTTAAATGGCGGAAAATCGTGTTGAGGCCAACCG
CCATAATGCCGGGCGGTTGCCCGGCATCCAACGCCATTTCATGGCCATATCAATGATTTTCT
GGTGGCTACCGGGTTGAGAAGCGGTGTAAGTGAACCTGCAGTTGCCATGTTTTACCGGCGAT
GAGAGCAGAGATAGCGCTGATGTCCGGCGGTGCTTTTGGCGTTACGCCACCACCGCGTAG
TAGCTGAACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAGAAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAACACCATCAT
ACACTAAATCAGTAAGT TGGCAGCATCACCAAGAATGTTG TAGGATATTGGCTTCGCGCATCTTGTTGTCCAAGTG
TAGTTTTTGGCGAAAACATTTGATCATGCAACAAG ATGCGCTTCCACCCTAATTTGATGATTTATTTG TAAATCATC
AGGGGATTCTCAGTATATTGCATTAAGC AAGGGGACGTT ATGCGTGT ATTAGCCTTATCGGCTGTGTTTTGGTG
GCATCGATTATCGGAATGCCTGCGGTAGCAAAGGAATGGCAAGAAAACAAAAGTTGG AATGCTC ACTTTACTGA
CATAAATCACAGGGCGTAGTTGTGCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCAAGG ATTTACCAATAATCTTAAACGGGCG
AACCAAGCATTTTTACCCGCATCTACCTTTAAAT TCCCAATAGCTTGA TCGCCCTCGATTGGGGCGTGGTTAAGGA
TGAACACCAAGTCTTTAAGTGGGATGGACAGACGCGCGGATA TCGCCACTTGGAAATCGCGATCA TAATCTAATCACC
GCGATGAAAATATTGAGTTGTGCTGTTTATCAAGAATTTGCCCGCCAAATTGGCGAGGCACGATG AGCAAG ATGC
TACATGCTTTCGATTATGGTAATGAGGACATTTCGGGCAATGTAGACAGT TCTGGCTCGACGGTGGTATTCGAAT
TTCGGCCACGGAGCAAATCAGCTTTTAAAGAAAGCTGTATCAC AAT AAGTTACACGTATCGGAGCGCAGCCAGCG
TATTGTCAAACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGACTAT ATTATTCGGGCTAAA ACTGGAT ACTCGACTAGA
ATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTCGGTTGGGTTGAACTTG ATGATAATGTGTGGTTTTTTCGATGAATATG
CATATGCCACATCGGATGGTTTAGGGCTGCGCCAAAGCCATGACAAAAG AAGTGTCA AACAGGAAA AAAATTAAT
    
```

Representació d'un tros de la seqüència de l'entorn genètic del gen *bla*_{OXA-48} de la soca carb010. IRR i IRL senyalitzats en taronja i les regions reguladores (-10 i -35) en blanc, IS1999 en groc, IS1R en blau, InsA en vermell, InsB en blau i *bla*_{OXA-48} en verd.

