

Caracterización y tipificación molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de la metallo- β -lactamasa NDM-1

Characterization and molecular typing of metallo- β -lactamase NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates



Trabajo de Fin de Grado

DAVID LÓPEZ MEDINA

Tutorizado por Eduardo Pérez Roth y Julia Alcoba Florez.

Grado en Biología. Julio 2020

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
1.2. <i>K. pneumoniae</i> resistente a los antibióticos.....	3
1.2.1. Antibióticos carbapenémicos	3
1.2.2. Mecanismo de resistencia a carbapenémicos	4
1.2.2.1. Carbapenemasas	5
1.2.3. <i>K. pneumoniae</i> productora de carbapenemasas.....	6
1.2.3.1. New Delhi metalo- β -lactamasas (NDMs).....	6
1.3. Métodos de tipificación molecular	8
1.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	8
1.3.2. Análisis de secuencias en múltiples <i>loci</i> (MLST).....	8
1.3.3. Tipificación molecular de replicones plasmídicos mediante PCR (PBRT)	9
2. Objetivos	11
3. Material y Métodos	12
3.1. Periodo de estudio, aislados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y otras cepas.....	12
3.2. Identificación fenotípica, susceptibilidad antibiótica y detección del gen <i>bla</i> _{NDM-1}	12
3.2.1. Test de Hodge modificado	14
3.3. Siembra, cultivo de microorganismos y tinciones.....	14
3.3.1. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación	14
3.3.2. Tinción diferencial de Gram y tinción negativa.....	15
3.4. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	15
3.4.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR y secuenciación	15
3.4.2. Electroforesis convencional en geles de agarosa	16
3.5. Métodos de tipificación molecular	18
3.5.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	18
3.5.1.1. Preparación del ADN genómico y macrorrestricción	18
3.5.1.2. Electroforesis y análisis de los patrones.....	18
3.5.2. Tipificación de secuencias en múltiples <i>loci</i> (MLST).....	19
3.5.3. Tipificación de replicones plasmídicos basada en PCR.....	19
4. Resultados y Discusión	20
4.1. Nuevos aislados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> productores de la carbapenemasa NDM-1	20
4.1.1. Análisis y comparación de los patrones de susceptibilidad antibiótica	21
4.2. Relación clonal entre los aislados clínicos	23
4.2.1. PFGE y perfiles de macrorrestricción	23
4.2.2. Genotipos MLST	24
4.3. Contenido en replicones plasmídicos	26
4.3.1. Perfiles de amplificación mediante PBRT.....	26
5. Conclusiones	28
Conclusions	28
6. Bibliografía	29

Resumen

Los carbapenémicos son los agentes antimicrobianos de elección para tratar infecciones severas causadas por muchas bacterias Gram-negativas. Desde la primera vez que se detectó en *Klebsiella pneumoniae* en 2009, la New Delhi metalo- β -lactamasa 1 (NDM-1) se ha encontrado en distintas especies y clones alrededor del mundo. La NDM-1, codificada por el gen bla_{NDM-1} que habitualmente se ubica en elementos genéticos móviles, es capaz de hidrolizar casi todos los antibióticos β -lactámicos, incluso los carbapenémicos dando lugar a resistencia frente al tratamiento con los mismos. En 2018 se describió por primera vez en las Islas Canarias un brote de infección causado por el clon ST147 de *K. pneumoniae* productora de NDM-1. En este trabajo se caracterizaron y tipificaron 10 aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de NDM-1 recolectados de pacientes posteriormente a la descripción de dicho brote. El objetivo fue determinar si los nuevos casos estaban relacionados con el clon causante del brote. Los resultados permitieron concluir que los aislados pertenecían al clon ST147- bla_{NDM-1} previamente descrito. Además, algunos aislados mostraron diferente contenido en replicones plasmídicos generalmente asociados con genes de resistencia a los antibióticos, lo que sugiere la adquisición y/o pérdida de los mismos durante su diseminación.

Abstract

Carbapenems are the antimicrobial agents of choice to treat severe infections caused by many Gram-negative bacteria. Since the first time it was detected in *Klebsiella pneumoniae* in 2009, the New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) has been found in different species and clones around the world. NDM-1, encoded by bla_{NDM-1} gene that is usually located in mobile genetic elements, it is capable of hydrolysing almost all β -lactam antibiotics, including carbapenems, resulting in resistance to treatment with them. In 2018, an outbreak caused by the NDM-1-producing *K. pneumoniae* ST147 clone was first described in the Canary Islands. In this work, 10 clinical isolates of NDM-1-producing *K. pneumoniae* recovered from patients after the description of the outbreak were characterized and typified. The objective was to determine whether the new cases were related to the outbreak clone. The results allowed us to conclude that the isolates belonged to the previously described ST147- bla_{NDM-1} clone. In addition, some isolates showed different content in plasmid replicons generally associated with antibiotic resistance genes, suggesting their acquisition and/or loss during dissemination.

1. Introducción

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Las especies bacterianas incluidas en el género *Klebsiella*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, son ubicuas en la naturaleza (Podschun *et al.*, 1998). Dentro del género *Klebsiella*, *K. pneumoniae* es la especie más estudiada y de mayor relevancia clínica ya que desempeña un importante papel como agente etiológico de enfermedades infecciosas (Podschun *et al.*, 1998). Es una bacteria de forma bacilar, gram-negativa, anaerobia facultativa, inmóvil y generalmente encapsulada (**Figura 1**).

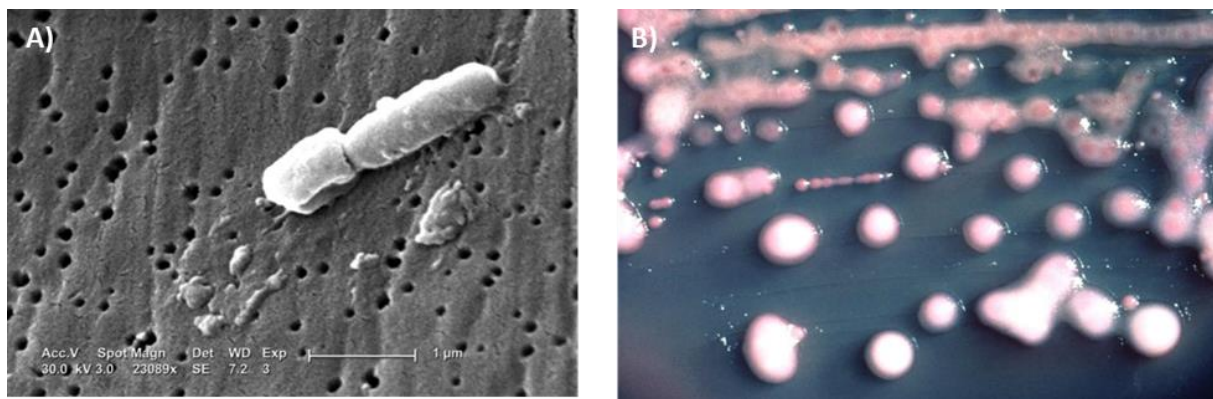


Figura 1. A) Microfotografía electrónica de barrido de *K. pneumoniae*. B) Colonias de *K. pneumoniae*. Tomado de Center for Disease Control and Prevention's Image Library

K. pneumoniae puede sobrevivir en multitud de nichos ecológicos como en el suelo, agua, plantas, insectos, pájaros y muchos animales diferentes en los cuales la bacteria puede ser un organismo comensal o un patógeno potencial (Wyres *et al.*, 2018). En los seres humanos coloniza habitualmente la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Se considera como causante de enfermedad (descrito como causante de neumonía por Carl Friedländer en 1982) y es uno de los patógenos nosocomiales más comunes. Las manifestaciones más habituales son neumonía, infecciones del tracto urinario y heridas, las cuales pueden progresar hacia bacteriemia. Los pacientes más vulnerables son los neonatos, personas de edad avanzada, aquellos con dispositivos médicos insertados y los inmunodeprimidos (Wyres *et al.*, 2020).

Se han descrito factores genéticos que contribuyen a la habilidad de *K. pneumoniae* para causar enfermedad en los humanos. Todas las cepas poseen genes cromosómicos que codifican factores de patogenicidad requeridos para establecer infecciones oportunistas. Además, existen genes accesorios que codifican factores de virulencia que incrementan la severidad de las infecciones y/o propensión para causar enfermedad. Los clones de *K. pneumoniae* se diferencian en el contenido de genes accesorios (Holt *et al.*, 2015).

1.2. *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema creciente y universal. Dentro de las enterobacterias, *K. pneumoniae* ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a un incremento a nivel global en el número de infecciones causadas por cepas resistentes que no responden al tratamiento con antibióticos. En la práctica clínica se ha observado resistencia a todas las clases de antibióticos usadas para tratar a esta bacteria (Wyres *et al.*, 2020). Especialmente, la Organización Mundial de la Salud reconoce a *K. pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos como amenazas críticas para la salud pública (WHO, 2017).

La mayoría de las resistencias a antibióticos observadas en *K. pneumoniae* se debe a la adquisición mediante transferencia horizontal de genes de resistencia accesorios y no a mutaciones en genes cromosómicos (Navon-Venezia *et al.*, 2017). Estos genes accesorios generalmente se ubican en grandes plásmidos conjugativos, capaces de transferirse por sí mismos, pertenecientes a un pequeño número de grupos de incompatibilidad, aunque también pueden localizarse en el cromosoma (Wyres *et al.*, 2020). Se ha descrito que algunas cepas son particularmente permisivas en la adquisición de estos plásmidos, siendo común el aislamiento de cepas portadoras de entre 4 y 6 plásmidos, habiéndose descrito hasta 10 plásmidos en un mismo aislado bacteriano. En la actualidad, se considera que *K. pneumoniae* constituye un importante reservorio de genes de resistencia a los antibióticos, los cuales pueden transferirse horizontalmente a otras bacterias (Conlan *et al.*, 2016; Wyres *et al.*, 2018).

1.2.1. Antibióticos carbapenémicos

Las cuatro clases principales de antibióticos β -lactámicos incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Los carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem) desempeñan un importante papel en nuestro arsenal antibiótico. De los numerosos antibióticos β -lactámicos, los carbapenémicos poseen el espectro de actividad más amplio y la mayor potencia, tanto frente bacterias gram-negativas como gram-positivas (Papp-Wallace, *et al.*, 2011). De esta manera, son a menudo utilizados como *antibióticos de último recurso* cuando los pacientes con infecciones se enferman de manera grave o se sospecha que son portadores de una bacteria resistente, especialmente infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEE (Pitout *et al.*, 2008).

Estos antibióticos están formados por un anillo carbapenémico que es un azobicyclo producto de la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros. Posee en la posición 1 un átomo de C (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos

tienen en la posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración *trans* que protege al anillo β -lactámico de muchas serin- β -lactamasas y en la posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al β -lactámico (Martínez *et al.*, 2010). Los distintos carbapenémicos tienen diferentes sustituciones en las posiciones 1 y 2 (**Figura 2**).

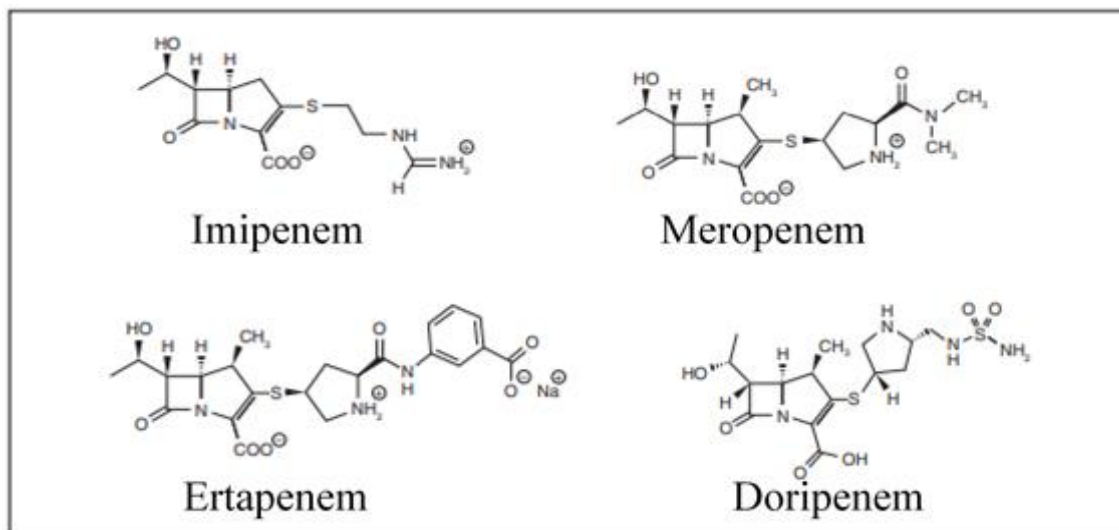


Figura 2. Estructura química de los carbapenémicos. Modificada de Martínez *et al.*, 2010.

Los carbapenémicos, al igual que el resto de antibióticos betalactámicos, inhiben la síntesis de la pared bacteriana durante la transpeptidación. Se unen a residuos de serina del centro activo de las peptidasas, situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática, denominadas proteínas que fijan penicilinas (PBPs, del inglés *Penicillin Binding Proteins*). Sus características estructurales permiten acceder a las PBPs de las bacterias gram-negativas a través de las porinas de la membrana externa. La pared celular se debilita y la bacteria normalmente se lisa. De esta manera, los antibióticos carbapenémicos se comportan habitualmente como antibióticos bactericidas (Martínez *et al.*, 2010).

1.2.2. Mecanismo de resistencia a carbapenémicos

El incremento en la resistencia a carbapenémicos en bacterias gram-negativas se ha convertido en un problema mundial, entre las que se encuentra *K. pneumoniae*. Las evidencias sugieren que los pacientes infectados por bacterias resistentes a carbapenémicos tienen una mayor morbilidad y mortalidad en comparación con aquellos infectados por bacterias susceptibles (van Duin *et al.*, 2013). Actualmente, los antibióticos para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias resistentes a los carbapenémicos son limitados, quedando las polimixinas, tigeciclina, fosfomicina, aminoglucósidos, ceftazidima, avibactam y cefiderocol como alternativas terapéutica, pero también se han descrito resistencias (Lee *et al.*, 2016).

Existen varios mecanismos de resistencia a carbapenémicos (Nordman *et al.*, 2019):

Modificación de la diana en las PBPs: diferentes alteraciones en las PBPs que dificultan la unión del antibiótico β -lactámico a la proteína, disminuyendo su actividad. Este mecanismo de acción es propio de bacterias gram-positivas, aunque también se ha descrito en gram-negativas (Moreno *et al.*, 2013).

Alteraciones en la permeabilidad y en las bombas de expulsión: los antibióticos β -lactámicos, al ser sustancias poco lipofílicas necesitan de poros que les faciliten la entrada al espacio periplásmico para poder unirse a las PBPs y poder ejercer su acción. Así, algunas alteraciones en la permeabilidad pueden modificar la acción del antibiótico (Martínez *et al.*, 2010).

Producción de β -lactamasas: posiblemente el mayor desafío para el uso de los β -lactámicos sea la producción de β -lactamasas, enzimas que hidrolizan estos antibióticos haciéndolos inefectivos e incapaces de inhibir las PBPs (Bush *et al.*, 2020).

1.2.2.1. Carbapenemasas

Las carbapenemasas son β -lactamasas que hidrolizan a la mayoría de los β -lactámicos incluyendo los carbapenémicos y, por tanto, confieren resistencia frente a los mismos.

El sistema de clasificación Ambler categoriza las β -lactamasas dentro de 4 grupos (clases A, B, C y D) en base al dominio catalítico central y la preferencia de sustrato. Las clases A, B y D incluyen carbapenemasas mientras que las enzimas de clase C hidrolizan principalmente cefalosporinas. Las de clase A, C y D tienen serina en el sitio catalítico activo, mientras que las de clase B son metalo- β -lactamasas tienen zinc (**Figura 3**).

β -lactamasas de clase A: tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de betalactámicos, entre ellos, penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Aunque se ha descrito que la hidrólisis de los carbapenémicos es débil, su actividad se incrementa si están presentes otros mecanismos como alteraciones en la permeabilidad o modificaciones de las dianas en las PBPs (Moreno *et al.*, 2013).

β -lactamasas de clase B: poseen actividad carbapenemasa e incluye las enzimas VIM, IMP, y NDM que se encuentran en muchas especies de gram-negativas (Bush *et al.*, 2010).

β -lactamasas de clase C: incluye las β -lactamasas AmpC que no son carbapenemasas propiamente dichas ya que su actividad hidrolítica frente a los carbapenémicos es débil o nula. Pueden jugar su papel en la resistencia a los carbapenémicos en el contexto de defectos en la permeabilidad o modificaciones de las dianas en las PBPs (Meletis *et al.*, 2016).

β -lactamasas de clase D: también denominadas oxacilinasas constituyen un grupo heterogéneo de β -lactamasas con actividad carbapenemasa significativa, especialmente las enzimas tipo OXA-48 en enterobacterias (Nordman *et al.*, 2019).

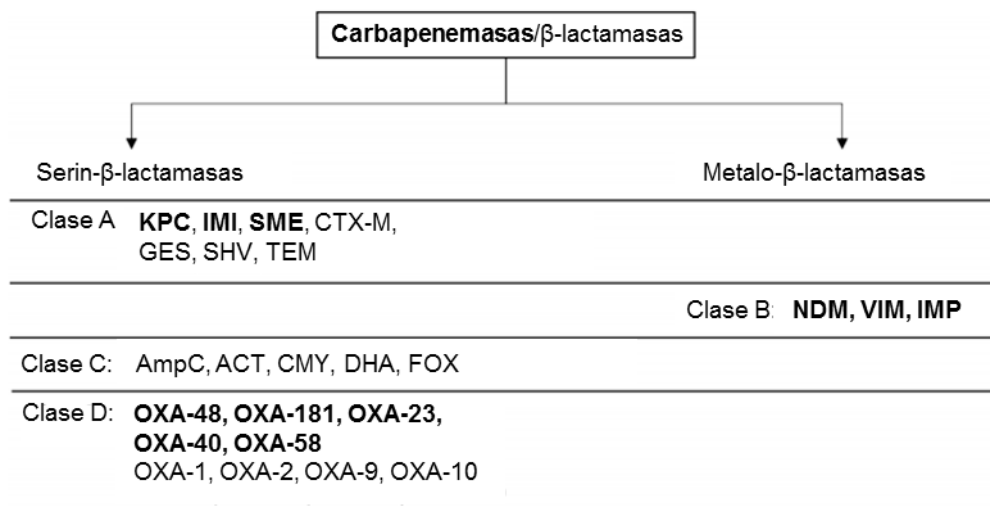


Figura 3. Clasificación de carbapenemasas/ β -lactamasas según su dominio catalítico central. Abreviaturas.

ACT: AmpC tipo β -lactamasa. AmpC: cefalosporinasa cromosómica de ampicilina. CMY: cefamicina que hidroliza β -lactamasas. CTX-M: cefotaxima que hidroliza β -lactamasas. FOX: β -lactamasa de clase C mediada por plásmidos. GES: β -lactamasa de espectro extendido de Guayana. IMI: imipenem que hidroliza β -lactamasas.

IMP: imipenemasa metallo- β -lactamasa. KPC: *K. pneumoniae* carbapenemasa. NDM: Nueva Delhi metallo- β -lactamasa. OXA: oxacilina carbapenemasa. SHV: variante de sulfhidrilo de la enzima TEM. TEM: Temoneira.

VIM: Verona integron-encoded metallo- β -lactamasa. Modificada de Nordmann *et al.*, 2019.

1.2.3. *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas

La prevalencia de enterobacterias que producen carbapenemasas (EPCs) se ha incrementado desde inicios del siglo XXI (Temkin *et al.*, 2014). Concretamente, la detección de diferentes tipos de carbapenemasas en *K. pneumoniae* es cada vez más frecuente. El primer caso de *K. pneumoniae* productora de una carbapenemasa fue detectado en Carolina del Norte en 1996, una carbapenemasa KPC (Yigit *et al.*, 2001). Desde entonces se han encontrado otras carbapenemasas adicionales en *K. pneumoniae* como las MBLs IMP (imipenemasa), VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamasa) y NDM (New Delhi metallo- β -lactamasa). Todas estas se encuentran en otras bacterias y contribuyen a la preocupante diseminación mundial de las bacterias resistentes a los carbapenémicos (Pitout *et al.*, 2015).

1.2.3.1 New Delhi Metallo- β -lactamasas (NDMs)

Dentro de las MBLs las NDMs son una de las carbapenemasas clínicamente más significativas. Son capaces de hidrolizar la mayoría de β -lactámicos, incluyendo a los carbapenémicos, pero no a los monobactámicos (Yong *et al.*, 2009). Está codificada por los genes *bla*_{NDM} localizados generalmente en plásmidos de amplio rango de hospedador que a menudo portan genes adicionales de resistencia a antibióticos, desempeñando un importante

papel en su diseminación. Los genes *bla*_{NDM} se han localizado en plásmidos con variedad de replicones, siendo algunos de ellos IncA/C, IncFIA, IncFIB, IncFII e IncX3 (Wu *et al.*, 2019).

La NDM-1 fue identificada por primera vez en un aislado de *K. pneumoniae* obtenido a partir de un paciente sueco que había sido hospitalizado en Nueva Delhi en 2008 (Yong *et al.*, 2009). Desde entonces, la NDM-1 se ha encontrado en varias especies de enterobacterias, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, y se han descrito hasta la fecha 24 variantes de NDM, debidas a sustituciones en 17 de los 270 aminoácidos que conforman la enzima (Wu *et al.*, 2019). Desde 2008 las cepas de *K. pneumoniae* productoras de NDM se han diseminado rápidamente alrededor de todo el mundo, siendo más prevalentes en unas regiones que otras (**Figura 4**).

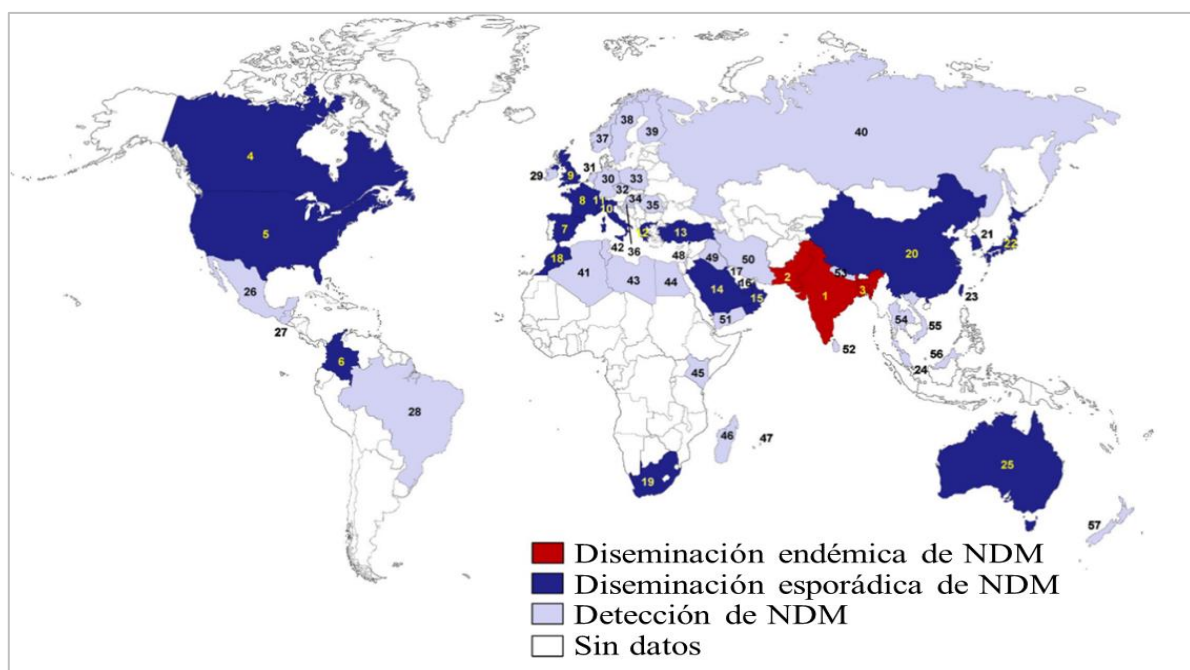


Figura 4. Distribución geográfica mundial de *Klebsiella pneumoniae* productora de NDM. Modificada de Lee *et al.*, 2016.

En España existe poca información acerca del impacto de las enterobacterias productoras de NDMs. En 2012 se describió el primer caso debido a *K. pneumoniae* portadora de NDM (Oteo *et al.*, 2012). Desde entonces se han descrito varios brotes inter-regionales debidos a *K. pneumoniae* pertenecientes a 5 clones epidémicos principales: ST437/NDM-7, ST437/NDM-1, ST147/NDM-1, ST11/NDM-1 y ST101/NDM-1 (Pérez-Vázquez *et al.*, 2019). Recientemente se describió por primera vez en Canarias (Tenerife) un brote que afectó a 10 pacientes hospitalizados debido a *K. pneumoniae* perteneciente al tipo de secuencia 147 (ST147) productora de la carbapenemasa NDM-1 y la β -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15, clon ST147/NDM-1/CTX-M-15. (Sampere *et al.*, 2019).

1.3. Métodos de tipificación molecular

Los sistemas de tipificación molecular comprenden varias técnicas que tienen como objetivo comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. Así, se puede reconocer la relación existente entre aislados vinculados epidemiológicamente, y por lo tanto, derivados de un microorganismo precursor común. El grupo de aislados descendientes de un ancestro común pertenece a un mismo clon, es decir, forman parte de una cadena de transmisión y replicación. Además, las técnicas de tipificación deben ser capaces de diferenciar entre aislados no relacionados epidemiológicamente (Hallin *et al.*, 2012).

A menudo, lo que interesa es determinar la diseminación a corto plazo de un clon dentro de un hospital o en la comunidad local. Alternativamente, las cuestiones que se plantean pueden ser más globales, como conocer la relación entre cepas que causan enfermedad en diferentes continentes en diferentes décadas. Los métodos necesarios para la caracterización de las bacterias en ambas situaciones son diferentes (Ranjbar *et al.*, 2014).

1.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

El uso combinado de la electroforesis en campo pulsante (PFGE, del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte ha permitido la obtención de patrones de macrorrestricción cromosómicos característicos de cada aislado bacteriano estudiado (McClelland *et al.*, 1987). Muchos de los fragmentos obtenidos son de gran tamaño, más de 40kb y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, requiriendo la aplicación del PFGE, técnica que se basa en la aplicación de cambios alternos en la orientación de los campos eléctricos para permitir la resolución de fragmentos de ADN de gran tamaño. La comparación de los patrones de bandas obtenidos para diferentes aislados permite conocer si los relacionados epidemiológicamente lo están genéticamente, representando el mismo clon que se ha diseminado (Hallin *et al.*, 2012).

Las enzimas de restricción se eligen para dar lugar a la máxima variación dentro de la población; consecuentemente, la variación que se detecta está generándose muy rápidamente, generalmente por razones desconocidas. De esta manera, mediante la aplicación de la técnica se pueden obtener evidencias de una relación epidemiológica a corto plazo entre individuos infectados por aislados bacterianos pertenecientes al mismo clon (Tenover *et al.*, 1995).

1.3.2. Análisis de secuencias en múltiples loci (MLST)

La rápida acumulación de variación genética puede ser una desventaja para responder a las cuestiones planteadas en los estudios de epidemiología global, como por ejemplo, si las

infecciones causadas por *K. pneumoniae* en diferentes países están causadas por el mismo clon, o si un clon encontrado en un país corresponde con alguno de los clones prevalentes en otro país. Para ello se requieren métodos de tipificación que mantengan la habilidad de distinguir un gran número de genotipos, pero que detecten la variación que se acumula relativamente despacio. Esta combinación de poder discriminatorio y estabilidad clonal la ha proporcionado el análisis de secuencias en múltiples *loci* (MLST, del inglés *Multilocus Sequence Typing*), un método que ha mostrado ser extraordinariamente efectivo para la identificación de clones y/o líneas clonales en poblaciones bacterianas (Maiden *et al.*, 1998).

El proceso de análisis mediante MLST de *K. pneumoniae* se inicia con la amplificación mediante PCR y posterior secuenciación de ambas cadenas de ADN de fragmentos internos (450-550 pb) de 7 genes *housekeeping* seleccionados para cada aislado (Diancourt *et al.*, 2005). La secuencia obtenida en cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en una base de datos centralizada (<http://www.pasteur.fr/mlst/>), asignándose un número que identifica a cada alelo. Si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario asigna un nuevo número a ese alelo. La identificación de cada uno de los 7 alelos genera un perfil alélico que consiste en una secuencia de 7 números. La acumulación de cambios nucleotídicos en los genes *housekeeping* (genes constitutivos) es un proceso relativamente lento y el perfil alélico de un clon bacteriano es suficientemente estable en el tiempo. A cada perfil alélico único se le asigna un tipo de secuenciación (ST, del inglés *Sequence Type*), un descriptor inequívoco del clon. Los clones mantienen el mismo perfil MLST durante largos periodos de tiempo, permitiendo llevar a cabo el seguimiento de clones específicos durante años o décadas (Hallin *et al.*, 2012).

1.3.3. Tipificación molecular de replicones plasmídicos mediante PCR (PBRT)

El análisis epidemiológico de los plásmidos de resistencia es de vital importancia para el seguimiento de la dispersión de la resistencia a los antibióticos. Así, es posible la identificación del mismo plásmido en diferentes cepas, pero también ayuda a rastrear la transferencia de plásmidos entre diferentes cepas y/o especies bacterianas. Sin embargo, los métodos basados en la purificación de ADN plasmídico y el análisis comparativo de fragmentos de restricción, o en ensayos de incompatibilidad realizados por conjugación son laboriosos. Además, la identificación a menudo se complica por la presencia de múltiples plásmidos dentro de la misma célula. Afortunadamente, actualmente es posible la identificación y clasificación molecular de plásmidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se trata de la detección mediante PCR de replicones plasmídicos, es decir,

las regiones de los grandes plásmidos salvajes que codifican el gen *rep* y los elementos reguladores que actúan en *cis* controlando la replicación del plásmido y su número de copias. Por esto, la tipificación de replicones usando la PCR (PBRT, del inglés *Plasmid Based Replicon Typing*), se ha adoptado en los últimos 10 años como un método rápido y eficiente para la identificación y tipificación de plásmidos en enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005).

2. Objetivos

En base a los antecedentes expuestos se plantean los siguientes objetivos:

2.1. Objetivo General:

Establecer la posible relación epidemiológica existente entre la cepa causante del primer brote de infección en las Islas Canarias debido a *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos carbapenémicos portadora del gen *bla_{NDM-1}* y los aislados clínicos de *K. pneumoniae* portadores de *bla_{NDM-1}* recolectados posteriormente en el mismo hospital.

2.2. Objetivos Específicos:

Se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la existencia de relación clonal entre los aislados clínicos de *K. pneumoniae* mediante aplicación de técnicas de tipificación molecular (PFGE y MLST).
2. Descifrar y comparar el contenido en replicones plasmídicos de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* mediante tipificación de replicones basada en PCR múltiple (PBRT).

3. Material y Métodos

3.1. Periodo de estudio, aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y otras cepas

Entre noviembre de 2018 y julio de 2019 se recolectaron e identificaron por parte del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria 10 aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos productores de la carbapenemasa NDM-1. Un 30% de los aislados se correlacionó con desarrollo de infección. Los aislados se recolectaron en varios servicios y a partir de distintos tipos de muestra (Tabla 1, Figura 5).

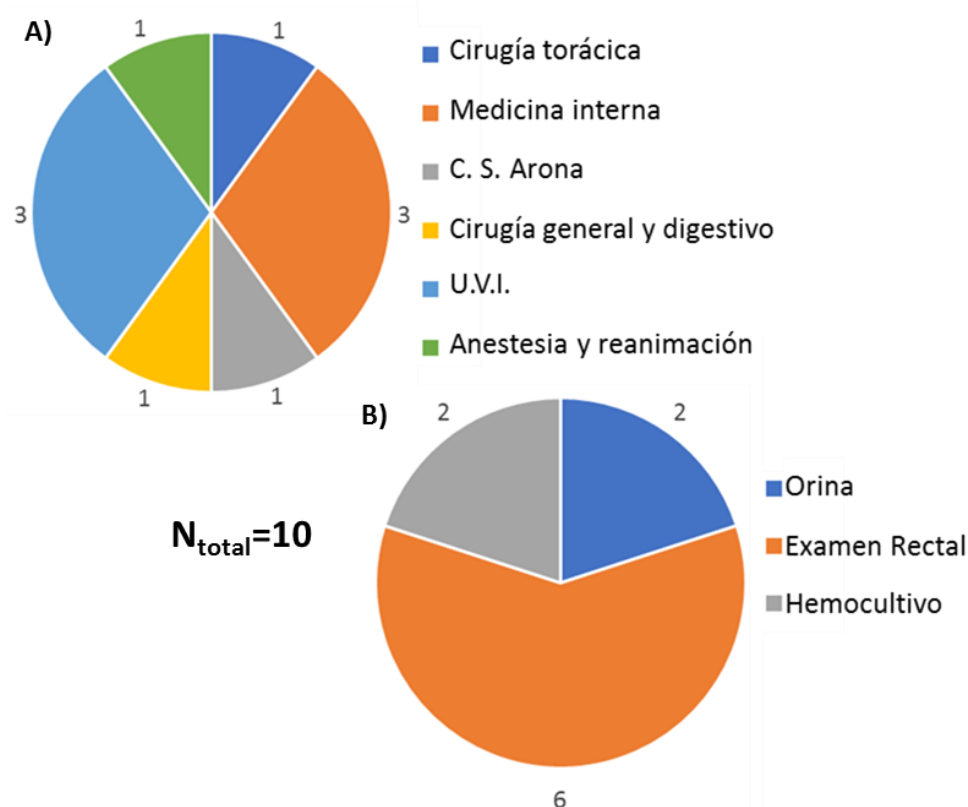


Figura 5. A) Servicio donde se obtuvo la muestra. B) Tipo de muestra

Se utilizaron las cepas de referencia *E. coli* ATCC35218 y *K. pneumoniae* ATCC700603 (sensible a carbapenémicos) para realizar el test de Hodge modificado.

3.2. Identificación fenotípica, susceptibilidad antibiótica y detección de *bla*_{NDM-1}

La identificación fenotípica y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados se llevaron a cabo por el personal del Servicio de Microbiología del HUNSC. La identificación específica se realizó mediante espectrometría de masas asistida por matriz (MALDI-TOF/MS) (VITEK MS; bioMérieux; Marcy-l'Étoile, Francia). Las pruebas preliminares de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron utilizando el sistema VITEK2 con las tarjetas AST-N243 y AST-N245 (bioMérieux) determinando la sensibilidad frente a los antibióticos piperacilina-tazobactam, ceftazimida, cefepima, ertapenem, imipenem,

Tabla 1. Nuevos aislados de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos carbapenémicos portadores de la carbapenemasa NDM-1 utilizados en este TFG

Paciente	Edad	Sexo	Aislado de <i>K pneumoniae</i>	Fecha del aislamiento	Servicio	Lugar del aislado	Estado	TZP	CAZ	FEP	ETP	IPM	MEM	GEN	TOB	CIP	COL	FOS	SXT	TGC
1	65	F	155038	16/01/19	Anestesia y reanimación	Hemocultivo	Infección	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
2	73	M	192893	15/11/18	Medicina interna	Examen Rectal	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
3	58	M	159154	15/02/19	Cirugía general y digestivo	Examen Rectal	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
4	84	F	405408	12/02/19	C. S. Arona	Orina	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
5	74	F	199869	12/02/19	Medicina interna	Orina	Infección	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
6	65	M	156240	24/02/19	Medicina interna	Hemocultivo	Infección	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
7	64	M	163859	09/03/19	UVI	Examen Rectal	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
8	63	F	167101	14/04/19	Cirugía torácica	Examen Rectal	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
9	63	M	174410	29/06/19	UVI	Examen rectal	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
10	19	F	175193	09/07/19	UVI	Examen Rectal	Colonización	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S

TZP: peperacilina-tazobactam. CAZ: ceftamizida. FEP: cefepima. ETP: ertapenem. IPM: imipenem. MEM: meropenem. GEN: gentamicina. TOB: tobramicina.

CIP: ciprofloxacina. COL: colistina. FOS: fosfomicina. SXT: trimetoprim-sulfametoxazol. TGC: tigeciclina. R: resistente. S: sensible

meropenem, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, colistina, fosfomicina, timetoprimsulfametoxazol y tigeciclina. La confirmación de la resistencia a carbapenémicos se realizó mediante E-test y utilizando métodos de inhibición de disco (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Dinamarca) para la detección del posible tipo de carbapenemasas. Asimismo, se confirmó la producción de carbapenemasas para cada aislado mediante la realización de una PCR múltiple en tiempo real (Real Cycler Universal INOCVK-U INOCVK-G v.2; Progenie Molecular SL, Valencia, España) para la detección de los genes de carbapenemasas *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA48}* y *bla_{KPC}*, y el gen de β -lactamasa de espectro extendido *bla_{CTX-M}*.

3.2.1. Test de Hodge

En este trabajo se realizó el test de Hodge modificado siguiendo la metodología previamente descrita (Lee *et al.*, 2001). Brevemente, se realizó una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC35218 que se ajustó a 0,5 en la escala McFarland. Se diluyó 1/10 en agua y se inoculó por extensión una placa de agar Müller-Hinton. A continuación, se colocó en el centro de la placa un disco de 10 μ g del antibiótico carbapenémico meropenem (bioMerieux). Finalmente, se tomaron 3 o 4 colonias del aislado bacteriano en estudio y se realizó una estría desde el borde de la placa hasta el centro, teniendo mucho cuidado de no tocar el antibiótico. Como control, se utilizó la cepa *K. pneumoniae* ATCC700603 sensible a carbapenémicos.

3.3. Siembra, cultivo de microorganismos y tinciones

3.3.1. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación

Los aislados se sembraron en placas de Petri conteniendo los medios de cultivo agar Müller-Hinton (MH), agar Sangre y agar MacConckey los cuales se usaron en forma de preparado comercial. La composición de dichos medios se muestra en las Tabla 2, 3 y 4. Las placas inoculadas se incubaron en la estufa a 37°C y una vez obtenido el crecimiento se mantuvieron durante breves periodos de tiempo en la cámara fría a 4°C. Además, los aislados se conservaron en tubos eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de una solución de leche en polvo en agua mili-Q al 10% (p/v) previamente esterilizada. En cada tubo se introdujeron unas colonias crecidas en placas de MH. Los tubos se guardaron en el congelador a -80°C.

Tabla 2. Composición del Müller Hinton

<i>Agar Müller- Hinton</i>	2 g de extracto de carne
	17,5 g de hidrolizado de caseína
	1,5 g de almidón
	15 g de agar

Tabla 3. Composición del Agar Sangre

<i>Agar Sangre</i>	10 g de infusión de corazón
	10 g de peptona de carne
	15 g de agar

Agar MacConkey	17 g de digerido pancreático de gelatina
	1,5 g de digerido pancreático de caseína
	1,5 g de digerido pancreático de tejido animal
	10 g de lactosa
	1,5 g de sales biliares
	5 g de cloruro sódico
	0,03 g de rojo neutro
	0,001 g de cristal violeta
	13,5 g de agar

3.3.2. Tinción diferencial de Gram y tinción negativa

La tinción de Gram y la tinción negativa se realizaron según los métodos descritos (López-Jácome *et al.*, 2014). La tinción de Gram se llevó a cabo para observar la morfología y agrupación de las bacterias, así como confirmar el carácter gram-negativo de las mismas. La tinción negativa con nigrosina se realizó para poner de manifiesto la cápsula de polisacáridos. La observación se realizó al microscopio óptico con el objetivo 100x y aceite de inmersión.

3.4. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

3.4.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR y secuenciación

En las reacciones de amplificación por PCR convencional se empleó el termociclador de ADN i-Cycler (Bio-Rad), ADN taq polimerasa (Diatheva), tampón de reacción 1X [16mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8)], MgCl₂ (Bioline) y desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Diatheva). El programa de temperaturas para la amplificación, así como la concentración de los reactivos empleados se detallan en los siguientes apartados.

La secuenciación nucleotídica de los productos de PCR para la técnica MLST se llevó a cabo en un termociclador ProFlex PCR System (Applied BiosystemsTM). Antes de llevar a cabo la secuenciación empleando el BigDyeTM Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher) se realizó una purificación de los productos de PCR mediante el kit ExoSAP-ITTM (Thermo Fisher). Finalmente se empleó el BigDye X-TerminatorTM Purification kit (Thermo Fisher) para la purificación de los productos de secuenciación. Se utilizó el secuenciador automático 3500 Series Genetic Analyzer (Applied BiosystemsTM) para la separación de los productos de las reacciones de secuenciación y la recolección de las secuencias. Posteriormente se analizaron utilizando el programa informático MEGA X 10.1.

En la Tablas 5 y 6 se muestran los diferentes cebadores empleados para la amplificación por PCR y secuenciación de los fragmentos de ADN en las diferentes técnicas empleadas.

Tabla 5. Cebadores utilizados en la técnica MLST			
<i>Diana</i>	<i>Nombre</i>	<i>Secuencias nucleotídica (5'→3')</i>	<i>Referencia</i>
rpoB	Vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	Diancourt <i>et al.</i> , 2005
	Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	“
gapA	gapA173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	“
	gapA181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	“
mdh	mdh130	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	“
	mdh867	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	“
pgi	pgi1F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	“
	pgi1R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	“
phoE	phoE604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	“
	phoE604.2	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	“
infB	infB1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	“
	infB1R	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	“
tonB	tonB1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	“
	tonB2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	“

El ADN molde para las reacciones de PCR se obtuvo de dos maneras diferentes. Para la tipificación mediante PBRT el ADN se obtuvo suspendiendo 1 colonia bacteriana en 25 µl de agua estéril y añadiendo 1,5 µl de dicha suspensión directamente en los tubos de PCR (Pérez-Roth *et al.*, 2001). En el caso del MLST el ADN molde se obtuvo suspendiendo una colonia bacteriana en 50 µl de agua y se llevó a cabo un tratamiento a 95°C durante 5 minutos. A partir de dicha suspensión se añadieron 3 µl a los tubos de PCR (Englen *et al.*, 2000).

3.4.2. Electroforesis convencional en geles de agarosa

Para la comprobación de los productos de amplificación por PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa a una concentración entre el 1-2,5 % p/v utilizando como tampón de electroforesis el TBE 1x (Tris 89 mM a pH 8, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM). El marcador de peso molecular utilizado fue el 100 pb ladder (Takara), que presenta bandas entre 1500 y 100 pb. Los geles se sometieron a 80V durante 1.5 horas. Tras la electroforesis, para revelar las bandas de ADN se añadió Midori Green (20X) como agente intercalante. Los geles se visualizaron con luz ultravioleta en el sistema Gel Doc de Bio-Rad.

Tabla 6. Cebadores utilizados en la técnica PBRT

PCR	Replicones	Secuencias nucleotídica (5'→3')	Referencia
1	H11 (534)	ATTCCAGAAAACCGATCTCTTT AATCATGGTGTGGGATCGTTT	Dolejska <i>et al.</i> , 2013 “
	H12 (298-308)	No disponible	
	H1α (159)	No disponible	
2	M (741)	No disponible	
	N (514)	No disponible	
	I2 (316)	No disponible	
	BO (159)	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	Carattoli <i>et al.</i> , 2005 “
3	FIB (683)	No disponible	
	FIA (462)	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	Carattoli <i>et al.</i> , 2005 “
	P1 (345)	No disponible	
	W (242)	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	Carattoli <i>et al.</i> , 2005 “
4	L (854)	CGGAACCGACATGTGCCTACT GAACTCCGGCGAAAGACCTTC	Carattoli <i>et al.</i> , 2015 “
	X3 (284)	No disponible	
	H1γ (161)	No disponible	
5	T (750)	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	Carattoli <i>et al.</i> , 2005 “
	A/C (418)	No disponible	
	FIIS (259-260)	CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC CAGTCACTTCTGCCTGCAC	Villa <i>et al.</i> , 2010 “
	N2 (177)	No disponible	
6	U (843)	TCACGACACAAGCGCAAGGG TCATGGTACATCTGGGCGC	García-Fernández <i>et al.</i> , 2009 “
	X1 (370)	No disponible	
	R (248)	No disponible	
	FIK (142-148)	TCTTCTCAATCTTGGCGGA GCTTATGTTGCACRGAAGGA	Villa <i>et al.</i> , 2010 “
7	FIB KN (631)	No disponible	
	X2 (376)	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC	Carattoli <i>et al.</i> , 2005 “
	FIB KQ (258)	No disponible	
	K (190)	No disponible	
8	HIB-M (570)	CAAAACAGAGTATTCAACCC CTGATTCTTTTCGAGACAGGG	Villa <i>et al.</i> , 2012 “
	FIB-M (440)	GTTACGATGGATGTGTCCCGC TATCAAGAGCCTTAAGGCGAA	“ “
	FII (288-292)	No disponible	
	X4 (172)	No disponible	

3.5. Métodos de tipificación molecular

3.5.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

3.5.1.1. Preparación del ADN genómico y macrorrestricción

El ADN genómico de cada aislado de *K. pneumoniae* se preparó en bloques de agarosa. Para ello se sembraron en agar sangre y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Seguidamente se procedieron a suspender unas pocas colonias en 1 mL de tampón SE (75 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 7.5) hasta llegar a una turbidez de 3 en la escala McFarland. Posteriormente, se preparó la agarosa de bajo punto de fusión al 1,6 % (Bio-Rad). Se mezclaron 300 µL de la agarosa preparada con 300 µL de la suspensión bacteriana y se dispensó en los moldes de los bloques y se dejó solidificar en la nevera durante 45 minutos. Seguidamente, se sacaron los bloques de su molde, se vertieron en tubos conteniendo 2 mL de tampón de lisis I (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% Sarcosyl; 50 mg/mL lisozima; 2 mg/mL ARNasa A; pH 8.0) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Tras dicho periodo se retiró el tampón de lisis y los bloques se pasaron a tubos con 2 mL de tampón de lisis II (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% Sarcosyl pH 8.0; 20 mg/mL proteinasa K) y se incubaron (55°C, 48 horas). Finalmente, los bloques se transfirieron a tubos con 10 mL de tampón TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8.0) y se guardaron a 4°C hasta realizar la restricción enzimática.

La restricción enzimática se realizó incubando los bloques durante toda la noche usando 40 unidades de la enzima de baja frecuencia de corte *XbaI* (secuencia diana *TCTATG*).

3.5.1.2. Electroforesis y análisis de los patrones

Los fragmentos de macrorrestricción se separaron mediante PFGE. Para ello se prepararon geles de agarosa al 1% (Bio-Rad) en TBE 0,5X (45 mM Tris; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA; pH 8,3). Los bloques se insertaron en los pocillos de los geles. En dos pocillos se añadió el marcador de peso molecular CHEF DNA Size Standard Lambda Ladder (Bio-rad). Los pocillos se sellaron con agarosa fundida. Los geles se sumergieron en el tanque del aparato CHEF-DRIII (BioRad) con TBE 0,5X que se mantuvo circulando a 1L/min y a 12°C. Las condiciones de electroforesis fueron: 200 voltios (6 voltios/cm) durante 24 horas aplicando una rampa lineal de pulsos de corriente de 1 a 30 segundos y un ángulo de 120°.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y fotografiaron bajo luz ultravioleta en el sistema Gel Doc (Bio-Rad). Los patrones se analizaron con el programa informático BioNumerics (Applied Maths, BioMérieux). Se aplicó el coeficiente de similitud Sorensen-Dice para comparar los patrones aplicando una

tolerancia del 1%. Los dendrogramas se generaron mediante el método UPGMA (del inglés *unweighted pair-group method using arithmetic average*).

3.5.2. Tipificación de secuencias en múltiples loci (MLST)

EL MLST se realizó siguiendo la metodología previamente descrita mediante secuenciación de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* (Diancourt *et al.*, 2005). Los fragmentos de los 7 genes (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* y *tonB*) se amplificaron por PCR. Se empleó tampón de reacción NH₄ 1X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 25 mM, 0,5 U de enzima BioTaq ADN polimerasa (Bioline), 10 μM de cada pareja de los cebadores indicados en la Tabla 5 en un volumen final de 50 μL. Los parámetros de amplificación fueron: 94°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos (94°C, 60 seg, 50°C, 60 seg, 50°C, 60 seg, 72°C, 90 seg) seguido de 72°C durante 5 min y con una extensión final de 4°C durante 10 min.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el software MEGA. Los números de alelo se asignaron mediante comparación con las secuencias de los alelos depositadas en la base de datos MLST de *K. pneumoniae* (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Para cada aislado, los números de los alelos en el orden *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB* definieron su perfil alélico y, tras realizar la consulta, a cada perfil alélico se le asignó el ST.

3.5.3. Tipificación de replicones plasmídicos basada en PCR

El contenido en replicones plasmídicos se llevó a cabo empleando el kit comercial PBRT 2.0 (Diatheva). La tipificación consistió en la realización de 8 ensayos de PCR múltiple convencional (M1 a M8) para la detección de 30 replicones plasmídicos de los principales grupos de incompatibilidad y genes de replicación identificados en plásmidos de resistencia que circulan habitualmente en las enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005). En la Tabla 6 se muestran todos los replicones detectados en las 8 PCRs múltiples, M1-M8.

Los parámetros de amplificación empleados fueron: 95°C durante 10 min, 30 ciclos (95°C, 60 seg, 60°C, 30 seg, 72°C, 60 seg), con una extensión final a 72°C durante 5 min. La obtención del ADN molde, la electroforesis de los productos de PCR y la visualización de los geles de agarosa se llevaron a cabo tal como se describió en el apartado 3.4.2.

4. Resultados y Discusión

Desde su identificación en 2008, la NDM-1 se ha encontrado en cepas de *K. pneumoniae* en diferentes partes del mundo (Wu *et al.*, 2019). Recientemente, en 2018 se detectó por primera vez en las Islas Canarias, concretamente en el Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria de Tenerife, un brote causado por *K. pneumoniae* mutirresistente, resistente a varios tipos de antibióticos, entre ellos a los carbapenémicos. Dicho brote afectó a 10 pacientes entre Enero y Agosto de 2018. Se determinó que los aislados clínicos de *K. pneumoniae* obtenidos a partir de dichos pacientes eran productores de la carbapenemasa NDM-1 y la β -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15. El análisis molecular de los aislados demostró que los aislados estaban relacionados y pertenecían a la misma cepa, siendo asignados al clon pandémico de alto riesgo ST147 (Sampere *et al.*, 2019).

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización fenotípica y la tipificación molecular de 10 nuevos aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos productores de la carbapenemasa NDM-1. Estos aislados fueron recolectados a partir de pacientes entre Noviembre de 2018 y Julio de 2019. El objetivo fue determinar la posible relación genética existente entre los nuevos aislados y los causantes del brote iniciado a principios de 2018.

4.1. Nuevos aislados de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa NDM-1

Entre Noviembre de 2018 y Julio de 2019 se identificaron 144 aislados de *K. pneumoniae* probablemente productores de carbapenemasas. Se determinó que 10 de los 144 aislados (6,9%) mostraban un fenotipo compatible con la producción de una metalo- β -lactamasa y que eran portadores del gen de la metalo- β -lactamasa NDM-1, *bla*_{NDM-1}, así como del gen de la β -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15, *bla*_{CTX-M-15}. De esta manera, los 10 nuevos aislados resistentes a carbapenémicos con fenotipo compatible con producción de una metalo- β -lactamasa eran productores de la carbapenemasa NDM-1 al igual que los aislados previamente caracterizados causantes del brote iniciado en el año 2018.

Una vez recibidos en el laboratorio los 10 nuevos aislados de *K. pneumoniae*, estos fueron sembrados en placas de Mueller-Hinton (MH) y agar MacConkey (**Figura 6**). En el medio MH se observaron colonias grandes, homogéneas, de aspecto mucoso y color blanquecino, mientras que en el agar MacConkey se observaron colonias grandes, homogéneas, de aspecto mucoso y color rosado, color característico que adquieren las colonias de esta bacteria en dicho medio debido a la capacidad de fermentar la lactosa.

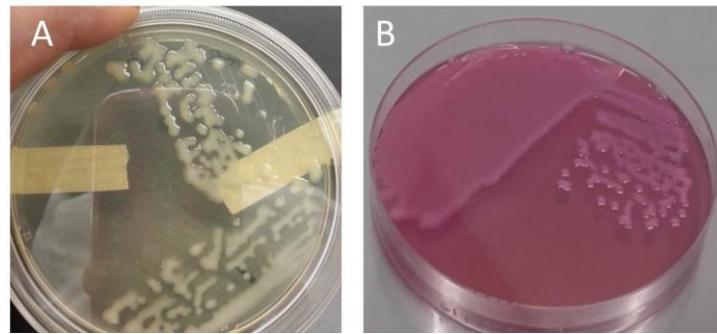


Figura 6. Crecimiento del aislado KP173030 en medio MH (A) y MacConkey (B), 37°C, 24 h.

Algunos aislados (KP173030, KP183054, KP192893 y KP405408) se seleccionaron para confirmar algunas de las características fenotípicas básicas propias de *K. pneumoniae* y que se disponía de cultivos puros. La tinción de gram mostró que se trata de bacterias gram-negativas con forma de bastón, características de esta especie bacteriana (**Figura 7**). Para intentar poner de manifiesto la presencia de cápsula bacteriana, se realizó una tinción negativa empleando nigrosina. Como se puede observar en la Figura 7, la comparación entre la fotografía de la tinción de Gram y la fotografía de la tinción negativa pone de manifiesto la presencia de una gruesa cápsula en los aislados analizados. Se vió diferencia en el tamaño de las bacterias al comparar las imágenes, siendo mayores en la tinción negativa. La cápsula la producen casi todas las cepas de *Klebsiella*, implicada en virulencia, (Podschun *et al.*, 1998).

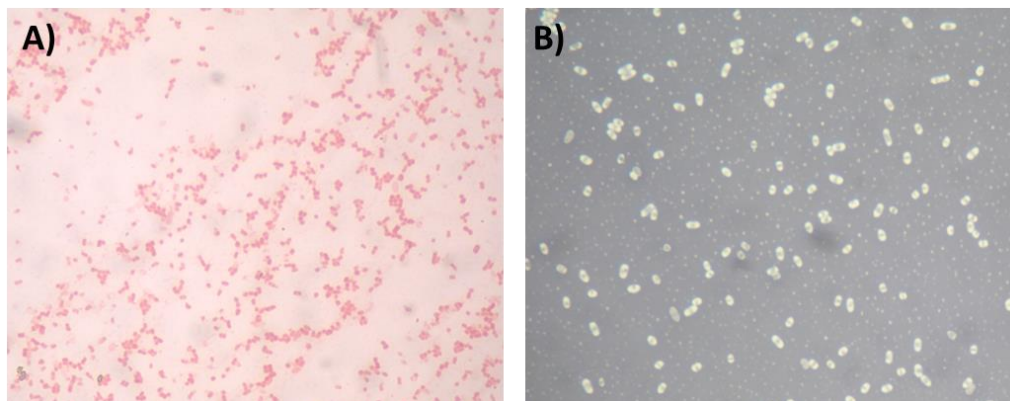


Figura 7. Tinción de Gram (A) y tinción negativa (B) del aislado KP192893

4.1.1. Análisis y comparación de los patrones de susceptibilidad antibiótica

El manejo de las infecciones debidas a *K. pneumoniae* se ha complicado enormemente debido a la adquisición de resistencia a los antibióticos. Habitualmente los aislados de *K. pneumoniae* son resistentes a los antibióticos de primera línea, incluyendo cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Es preocupante el surgimiento de resistencia a los carbapenémicos ya que estos son a menudo la última línea de la terapia para el tratamiento de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* multirresistente (Wyres *et al.*, 2020).

Se llevó a cabo el análisis comparativo de los resultados de susceptibilidad antibiótica realizados frente a un conjunto de agentes antimicrobianos pertenecientes a las siguientes familias: β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos), aminoglucósidos, polimixinas, glicilglicinas, trimetoprima-sulfametoxazol, fluoroquinolonas y fosfonatos. Todos los aislados mostraron multirresistencia, siendo resistentes al menos a algún representante de al menos 3 familias diferentes de antibióticos aparte de a los β -lactámicos (**Tabla 1**). Este resultado está en consonancia con el incremento en la prevalencia de aislados de *K.pneumoniae* multirresistentes a nivel global (Holt *et al.*, 2015). Se identificaron dos patrones de susceptibilidad antibiótica que se diferenciaron en la susceptibilidad a fosfomicina. Así, siete aislados mostraron el patrón 1 caracterizado por resistencia a piperaciclina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, trimetoprima-sulfametoxazol y fosfomicina, y sensibilidad a colistina y tigeciclina. Los tres aislados que mostraron el patrón 2 se diferenciaron respecto a los del patrón 1 en que fueron sensibles a fosfomicina (**Tabla 1**).

Los patrones de susceptibilidad antibiótica de los nuevos aislados fueron similares a los de los aislados causantes del brote de 2018, los cuales también fueron multirresistentes. Sin embargo, se pueden destacar algunas diferencias. El % de nuevos aislados resistente a fosfomicina (70%) fue mayor que el % de aislados de 2018 resistentes a fosfomicina (30%). Además, entre los nuevos aislados ninguno mostró resistencia a colistina, mientras que uno de los aislados causante del brote fue resistente. Finalmente, se observó una mayor homogeneidad en las CMI's a los carbapenémicos de los nuevos aislados en relación a las CMI's de los aislados de 2018 en los cuales se observó una variabilidad. En general, las CMI's a carbapenémicos de los nuevos aislados fueron mayores que las de los aislados de 2018, presentando CMI's homogéneas a los carbapenémicos, a excepción del aislado KP199869, el cual presentó tanto para meropenem, como para ertapenem, una CMI inferior a las de los demás aislados. Los resultados sugieren una mayor resistencia a carbapenémicos en los nuevos aislados.

El test de Hodge modificado es una prueba fenotípica empleada para la detección de carbapenemasas, principalmente en enterobacterias (Lee *et al.*, 2001). Se ha descrito que este test tiene una detección muy pobre de la NDM-1 (Pasteran *et al.*, 2016). Se seleccionaron algunos de los aislados para comprobar la capacidad del Test de Hodge de detectar la producción de NDM-1 en los nuevos aislados. Los resultados obtenidos permitieron observar que todos los aislados ensayados fueron positivos para el Test de Hodge, es decir, productores de carbapenemasas (**Figura 8**). Se observó crecimiento de los aislados de *K. pneumoniae*

dentro de un halo de inhibición producido por el carbapenémico, donde la cepa control de *E. coli* se ha lisado. A pesar de las limitaciones de la técnica, debido a su bajo rendimiento, se puede confirmar fenotípicamente la producción de carbapenemasas en todos los aislados.

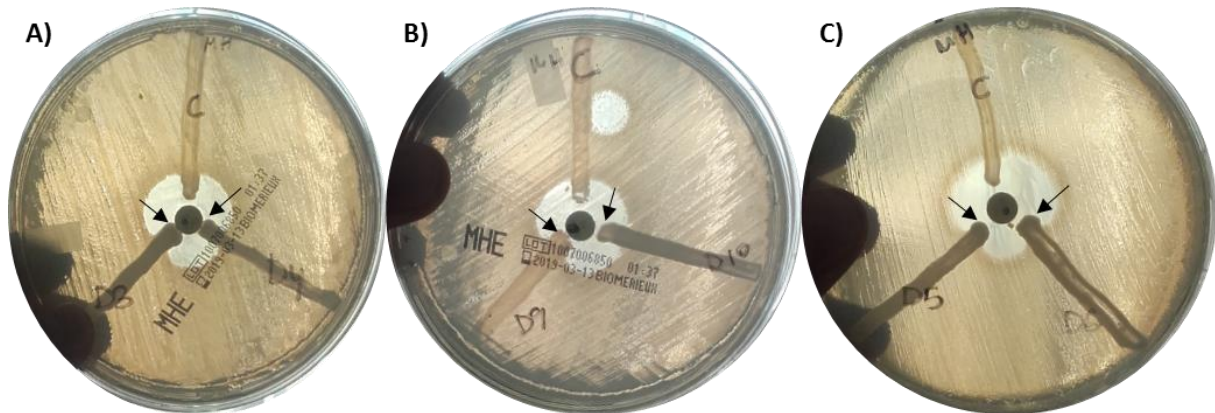


Figura 8. Resultados del test de Hodge modificado de los aislados KP175017 y KP175787 (A), KP183054 y KP151606 (B) y KP176661 y KP176937 (C) donde se indica el crecimiento de los aislados.

4.2. Relación clonal entre los aislados clínicos

La habilidad de determinar de una manera fiable la relación genética existente entre los aislados de bacterias patógenas es fundamental para monitorizar su diseminación (Hallin *et al.*, 2012). Se llevó a cabo la tipificación molecular de los nuevos aislados clínicos y su comparación con los aislados vinculados epidemiológicamente causantes del brote iniciado en 2018, para tratar de determinar si estaban relacionados genéticamente entre ellos y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común. La clonalidad a corto plazo, intra-hospitalaria, se determinó mediante análisis de los perfiles de macrorrestricción genómicos obtenidos tras realizar la PFGE para cada uno de los aislados. Además, para determinar la clonalidad a largo plazo y tratar de relacionar los aislados estudiados con otros a nivel global, estos se analizaron mediante MLST que permite establecer la relación existente entre aislados incluso en diferentes continentes y diferentes épocas (Diancourt *et al.*, 2005).

4.2.1. PFGE y análisis de los perfiles de macrorrestricción

Todos los aislados se tipificaron con éxito mediante PFGE, obteniéndose perfiles de macrorrestricción genómicos característicos, por lo que la capacidad de tipificación con este método fue del 100%. Para cada aislado se obtuvieron entre 14 y 16 fragmentos de restricción (bandas) con un tamaño comprendido entre 48,5 y 1000 kb. El análisis visual e informático de los perfiles de los 10 nuevos aislados reveló la existencia de 2 perfiles de macrorrestricción diferentes (el perfil A lo mostraron 9 aislados y el perfil B 1 único aislado) que se agruparon con una similitud > 95% en un único genotipo de PFGE (**Figura 9**).

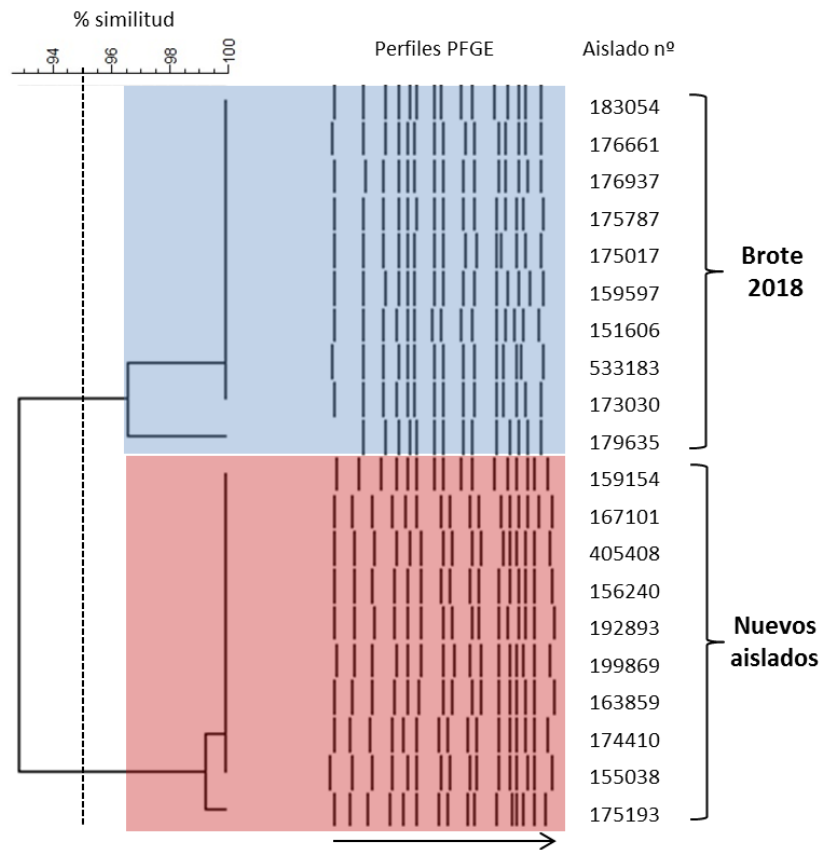


Figura 9. Dendrograma generado mediante el empleo del programa informático Bionumerics para los 20 aislados de *K. pneumoniae* productores de la carbapenemasa NDM-1 (10 aislados del brote de 2018 y 10 nuevos aislados) construido empleando el método UPGMA, lustrando las similitudes (basadas en el cálculo de los coeficientes de Sorensen-Dice) de los perfiles de PFGE obtenidos tras digestión con la enzima *Xba*I. La línea discontinua vertical se sitúa en el 95% de similitud. La flecha situada en la parte inferior indica la dirección de avance de la electroforesis, de mayor a menor peso molecular.

Se llevó a cabo la comparación de los perfiles de los nuevos aislados y los obtenidos para los aislados causantes del brote de 2018. El % de similitud de los perfiles de macrorrestricción entre los nuevos aislados y los aislados del brote fue superior al 80%. Por lo tanto, según los criterios de similitud establecidos, todos los aislados pertenecen al mismo genotipo de PFGE, tratándose de aislados clínicamente estrechamente relacionados genéticamente derivados de un ancestro reciente común y que se han ido diseminando intrahospitalariamente. El análisis visual de los perfiles de ambos grupos de aislados parece indicar que estos son prácticamente idénticos. Sin embargo, aunque estrechamente relacionados aparecen separados en el dendrograma. Probablemente esto se deba a que los geles de PFGE se llevaron a cabo independientemente en diferentes momentos y por diferentes personas, lo que influyó en la resolución de las bandas y su análisis (**Figura 9**).

4.2.2. Genotipos MLST

Una vez se estableció la existencia de relación clonal a corto plazo entre los aislados vinculados epidemiológicamente, para poder comparar el genotipo de los mismos a nivel

global se procedió a llevar a cabo la tipificación mediante MLST de los 10 nuevos aislados (Diancourt *et al.*, 2005). Se obtuvieron productos de PCR de los tamaños esperados para los 7 fragmentos génicos utilizados en el esquema MLST para los 10 nuevos aislados de *K. pneumoniae*, siendo la capacidad de tipificación del MLST del 100%. La secuenciación y el análisis de las secuencias de dichos fragmentos dio lugar a la obtención del mismo perfil alélico, 3:4:6:1:7:4:38, para todos los aislados. Este perfil alélico se corresponde al ST147.

Los nuevos aislados comparten el ST147 con los aislados causantes del brote de 2018 y, por lo tanto, pertenecen al mismo clon que ha continuado su dispersión intra-hospitalaria desde su detección por primera vez. El hecho de que los aislados de 2018 y los recolectados posteriormente compartan el mismo ST es algo que era esperable debido a la elevada relación genética obtenida mediante el análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos mediante PFGE. El ST147 se considera un clon pertenece al grupo clonal 147 (GC147) y causa problemas a nivel mundial, que se caracteriza por su multirresistencia (Wyres *et al.*, 2020).

Según la información disponible en la base de datos MLST de *K. pneumoniae* (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) hasta el mes de junio de 2020, esta contiene información de un total de 6619 aislados, habiéndose descrito un total de 3497 STs, siendo el ST147 el quinto más representado con un total de 82 aislados (1.3%). De los 6619 aislados, 293 proceden de España (4.4%), perteneciendo 7 de estos aislados al ST147, el segundo ST más representado junto al ST37 (**Figura 10**). Este hecho es un indicativo de la elevada prevalencia de este clon en España, al igual que en otros lugares alrededor del mundo, el cual se ha ido dispersando internacionalmente desde su detección en el año 2009. Sin embargo, según la información disponible hasta la fecha, ninguno de los aislados incluidos en la base de datos pertenecientes el ST147 porta la NDM-1 (datos no mostrados).

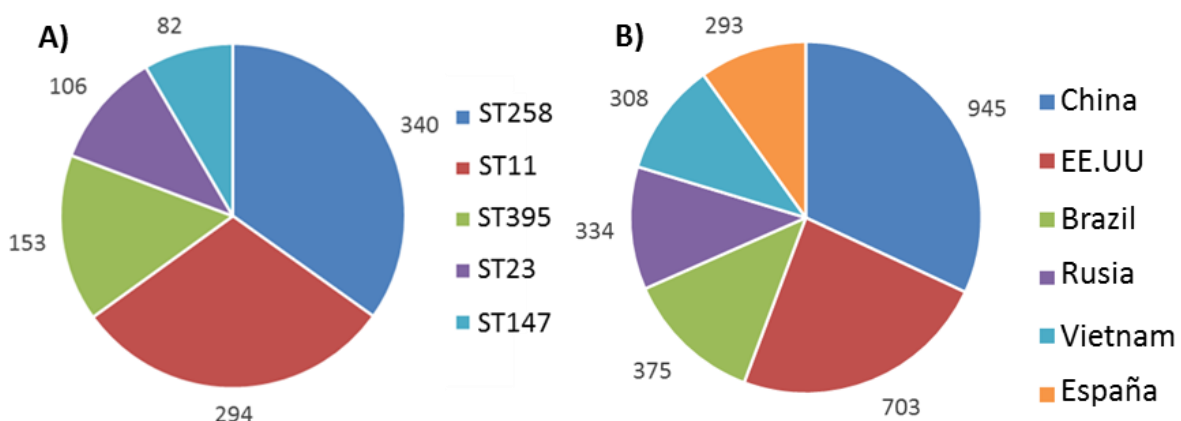


Figura 10. Principales STs de aislados de *K. pneumoniae* depositados en la base de datos hasta junio de 2020 (A) y número de aislados de *K. pneumoniae* por países disponibles en la base de datos (B)

4.3. Contenido en replicones plasmídicos

Se ha observado en diferentes estudios que el clon ST147 tiene un gran potencial para la adquisición de diferentes elementos de resistencia y para facilitar su rápida diseminación a otros clones pandémicos de *K. pneumoniae* (Wyres *et al.*, 2018). Muchos de estos determinantes de resistencia se encuentran habitualmente ubicados en plásmidos conjugativos. Para comprobar la posible diversidad en el contenido de replicones plasmídicos de los nuevos aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes al clon ST147 llevamos a cabo la detección mediante tipificación por PCR de los replicones más comúnmente detectados en enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005). Adicionalmente se analizaron algunos aislados causantes del brote de 2018 para comparar con los nuevos aislados. Se trataba de comprobar el potencial del clon ST147 de ganar o perder elementos móviles durante su dispersión e identificar posibles replicones plasmídicos comúnmente asociados con el gen *bla*_{NDM-1}.

4.3.1. Perfiles de amplificación mediante PBRT

En la Tabla 7 se muestran los perfiles de amplificación obtenidos para los 10 aislados seleccionados, 7 del brote de 2018 y 3 de los nuevos aislados. Se detectaron los replicones *H11*, *H12*, *I1 α* , *FIA*, *L*, *I1 γ* , *A/C*, *FIIS*, *R*, *FIBKQ*, *HIB-M*, *FIB-M*, *FII* y los aislados mostraron los 5 perfiles de amplificación obtenidos (**Tabla 7**). No hubo coincidencia en los perfiles de amplificación de los aislados del brote analizados (perfiles 1, 2 y 3) y los de los nuevos aislados (perfiles 4 y 5). Como se puede observar en la Tabla 7, en todos los aislados analizados se detectó más de un replicon plasmídico, existiendo cierta variabilidad entre los diferentes aislados, tanto entre los aislados causantes del brote de 2018 como entre los nuevos aislados. Este resultado sugiere que el ST147 ha ganado y/o perdido diferentes elementos plasmídicos. Muy probablemente, estos eventos hayan tenido lugar durante la diseminación intrahospitalaria de este clon ya que la posibilidad de que se produjeran introducciones independientes en el hospital del ST147 con diferentes contenido plasmídico es improbable según los resultados de tipificación molecular. En la Figura 11 se muestra un ejemplo del resultado obtenido mediante la aplicación de la PBRT, en este caso para un aislado del brote.

Se han asociado varios tipos de replicones con los plásmidos portadores del gen *bla*_{NDM-1}, principalmente *A/C*, *FIA*, *FIB*, *FII* y *X3* (Wu *et al.*, 2019). Algunos de dichos replicones se detectaron en los aislados de este estudio, así como otros replicones (*H12*, *I1 α* , *I1 γ* , *FIIS*) asociados a otras NDMs (**Tabla 7**). Asimismo, también se detectó el replicón *FIB-KQ*, el cual se asocia al gen *bla*_{CTX-M-15} presente en los aislados estudiados. implicado en la resistencia a fluoroquinolonas (Fortini *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de que se realizaron

algunos intentos para purificar los plásmidos presentes en los aislados para tratar de asociar el gen *bla*_{NDM-1} con alguno de ellos, no se consiguió por diversos problemas en las extracciones.

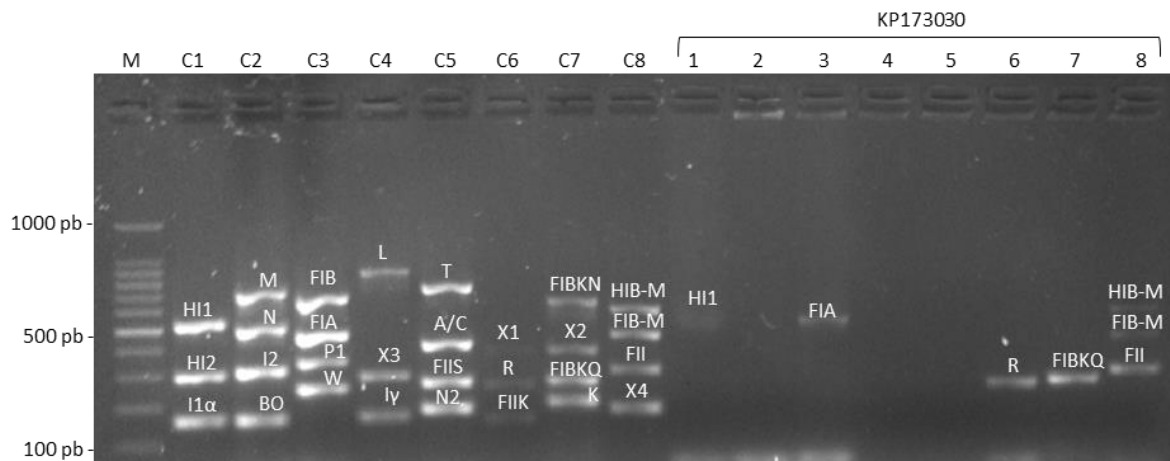


Figura 11. Perfiles de amplificación de PBRT. C1-C8, PCRs del control positivo. 1-8, PCRs del aislado KP173030, perteneciente al perfil de amplificación 1. M: marcador de peso molecular.

Tabla 7. Perfiles de amplificación mediante PBRT

Perfiles	Replicones													
	Aislados	<i>HI1</i>	<i>HI2</i>	<i>I1α</i>	<i>FIA</i>	<i>L</i>	<i>I1γ</i>	<i>A/C</i>	<i>FIIS</i>	<i>R</i>	<i>FIB-KQ</i>	<i>HIB-M</i>	<i>FIB-M</i>	<i>FII</i>
1	KP173030 y KP533183	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	KP175017, KP176661, KP179597 y KP151606	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	KP183054	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	KP192893	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
5	KP405408 y KP156240	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Hasta la fecha, únicamente se han dispersado globalmente unos pocos clones de *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos. Concretamente, el clon ST147 es un clon internacional considerado de alto riesgo cuya prevalencia se está incrementando rápidamente. La resistencia a carbapenémicos en el ST147 se detectó por primera vez en relación a la carbapenemasa VIM y posteriormente se identificó su asociación con otras carbapenemasas, incluyendo la NDM-1. Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido comprobar que los nuevos aislados postadores de NDM-1 se encuentran relacionados genéticamente y pertenecen al ST147, lo que sugiere que éste continúa su dispersión intra-hospitalaria. La asociación entre el ST147 y la NDM-1 es preocupante ya que aparte de ser un clon prevalente en los humanos también se ha detectado resistencia a carbapenémicos en aislados pertenecientes al ST147 recolectados a partir de aguas residuales y en animales de compañía. Finalmente, la detección de variabilidad en el contenido en replicones plasmídicos entre los aislados pertenecientes al ST147 sugieren la adquisición y/o pérdida de elementos genéticos móviles que generalmente se han asociado a genes de resistencia antibiótica.

5. Conclusiones:

1. Los nuevos casos de infección/colonización ocasionados por *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos carbapenémicos productores de la carbapenemasa NDM-1 se debieron a la diseminación clonal intrahospitalaria del ST147-*bla*_{NDM-1}, el mismo clon que inició el brote a comienzos del año 2018.

2. Durante la diseminación intra-hospitalaria del clon ST147-*bla*_{NDM-1} probablemente han tenido lugar varios eventos de adquisición y/o pérdida de elementos plasmídicos, algunos de los cuales se han asociado con resistencia a diferentes antimicrobianos. Este hecho pone de manifiesto la gran capacidad de intercambio genético que muestra este clon.

3. No se determinó la localización genética del gen *bla*_{NDM-1} y, por lo tanto, tampoco su posible asociación con alguno de los replicones plasmídicos detectados en cada uno de los aislados. Esta fue la principal limitación de este estudio, lo que impidió obtener una visión más completa acerca de la dispersión del gen *bla*_{NDM-1}.

Conclusions:

1. All new cases of infection/colonization due to NDM-1-producing carbapenem-resistant *K. pneumoniae* were due to the dissemination of the ST147-*bla*_{NDM-1} clone, which had already started an outbreak in early 2018.

2. During the intrahospital spread of the ST147-*bla*_{NDM-1} clone, several events of acquisition and/or loss of plasmid elements have probably occurred, some of which have been associated with resistance to different antimicrobials. This fact highlights the great capacity of this clone for genetic exchange.

3. The genetic location of the *bla*_{NDM-1} gene and, therefore, its possible association with any of the plasmid replicons detected in each of the isolates was not determined. This was the main limitation of this study, which prevented obtaining a more complete view of the *bla*_{NDM-1} gene spread.

6. Bibliografía

- Bush K.** (2010). Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical care (London, England)*, 14(3), 224.
- Bush, K., & Bradford, P. A.** (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), e00047-19.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J.** (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219-228.
- Carattoli, A., Seiffert, S. N., Schwendener, S., Perreten, V., & Endimiani, A.** (2015). Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS One*, 10(5).
- Conlan, S., Park, M., Deming, C., Thomas, P. J., Young, A. C., Coleman, H., Sison, C., NISC Comparative Sequencing Program, Weingarten, R. A., Lau, A. F., Dekker, J. P., Palmore, T. N., Frank, K. M., & Segre, J. A.** (2016). Plasmid Dynamics in KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae* during Long-Term Patient Colonization. *mBio*, 7(3), e00742-16.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., & Brisse, S.** (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4178-4182.
- Dolejska, M., Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., & Carattoli, A.** (2013). Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the Arma 16S RNA methylase and a resistance–modulation–cell division/multidrug efflux pump. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 34-39.
- Englen, M. D., & Kelley, L. C.** (2000). A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Letters in applied microbiology*, 31(6), 421-426.
- Fortini, D., Fashae, K., Villa, L., Feudi, C., García-Fernández, A., & Carattoli, A.** (2015). A novel plasmid carrying blaCTX-M-15 identified in commensal *Escherichia coli* from healthy pregnant women in Ibadan, Nigeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 3(1), 9-12.
- García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., & Carattoli, A.** (2009). Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 274-281.
- Hallin, M., Deplano, A., & Struelens, M. J.** (2012). Molecular Typing of Bacterial Pathogens: A Tool for the Epidemiological Study and Control of Infectious Diseases. In *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases* (pp. 9-25). Springer, Dordrecht.
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., ... & Brisse, S.** (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), E3574-E3581.
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H.** (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 895.
- Lee, K., Chong, Y., Shin, H. B., Kim, Y. A., Yong, D., & Yum, J. H.** (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(2), 88-91.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R.** (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investig. en discapacidades*, 3(1), 10-18.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G.** (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140-3145.
- Martínez, M. J., García, M. I., Sánchez, E. G., & Sánchez, J. E.** (2010). Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias [Available carbapenems: Properties and differences]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 28 Suppl 2, 53-64.
- McClelland, M., Jones, R., Patel, Y., & Nelson, M.** (1987). Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids research*, 15(15), 5985-6005.
- Meletis G.** (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*, 3(1), 15-21.
- Monge, K. M. M.** (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y centroamérica*, 70(608), 599-605.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A.** (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252-275.

- Nordmann, P., & Poirel, L.** (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **69** (Supplement_7), S521–S528.
- Oteo, J., Domingo-García, D., Fernández-Romero, S., Saez, D., Guiu, A., Cuevas, O., ... & Campos, J.** (2012). Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Journal of Medical Microbiology*, *61*(Pt 6), 864–867.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A.** (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**(11), 4943–4960.
- Pasteran, F., Gonzalez, L. J., Albornoz, E., Bahr, G., Vila, A. J., & Corso, A.** (2016). Triton Hodge test: improved protocol for modified Hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(3), 640–649.
- Perez-Roth, E., Claverie-Martin, F., Villar, J., & Mendez-Alvarez, S.** (2001). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(11), 4037–4041.
- Pérez-Vázquez, M., Sola Campoy, P. J., Ortega, A., Bautista, V., Monzón, S., Ruiz-Carrascoso, G., ... Sáez, D.** (2019). Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding blaNDM-like genes as determined by WGS. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(12), 3489–3496.
- Pitout, J. D., & Laupland, K. B.** (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, **8** (3), 159–166. doi:10.1016/s1473-3099(08)70041-0
- Pitout, J. D., Nordmann, P., & Poirel, L.** (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 5873–5884.
- Podschun, R., & Ullmann, U.** (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589–603.
- Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G. M., & Mammina, C.** (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The New Microbiologica*, *37*(1), 1–15.
- Sampere, Á., García Martínez de Artola, D., Alcoba Florez, J., & Pérez Roth, E.** (2019). Emergence of carbapenem-resistant NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* high-risk sequence type 147 in a tertiary care hospital in Tenerife, Spain. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *17*, 240–241.
- Temkin, E., Adler, A., Lerner, A., & Carmeli, Y.** (2014). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: biology, epidemiology, and management. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1323*, 22–42.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(9), 2233–2239.
- van Duin, D., Kaye, K. S., Neuner, E. A., & Bonomo, R. A.** (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *75*(2), 115–120.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A.** (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(12), 2518–2529.
- Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., & Carattoli, A.** (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(7), 1645–1650.
- World Health Organization.** Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics (WHO, 2017).
- Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z.** (2019). NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2), e00115–18.
- Wyres, K. L., & Holt, K. E.** (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *45*, 131–139.
- Wyres, K. L., Lam, M., & Holt, K. E.** (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature reviews. Microbiology*, 10.1038/s41579-019-0315-1.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., ... & Tenover, F. C.** (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(4), 1151–1161.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R.** (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(12), 5046–5054.