



CARBAPENEMASAS Y BIOFILMS: DOS PROBLEMAS GRANDES DE ORGANISMOS PEQUEÑOS

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS MÉDICAS
Programa para la Investigación Biomédica (Pro.In.Bio.)
Facultad de Medicina, Universidad de la República

Lic. Romina Papa Ezdra

Orientador: Dr. Rafael Vignoli
Dpto. de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene,
Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Septiembre, 2024

Contenido

Lista de abreviaturas.....	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	12
1 EL COSTO DE LA RAM Y SUS CAUSAS	12
2 PATÓGENOS CRÍTICOS	13
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.2 <i>Enterobacterales</i>	15
2.2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
2.2.2 <i>Enterobacter</i> spp.....	16
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	17
2.2.4 Otras enterobacterias de interés.....	17
3 OPCIONES TERAPÉUTICAS PARA INFECCIONES POR GRAM NEGATIVOS MDR	18
3.1 β -lactámicos.....	18
3.1.1 Estructura y síntesis de la pared celular bacteriana.....	18
3.1.2 Mecanismo de acción de los β -lactámicos.....	20
3.1.3 Penicilinas.....	20
3.1.4 Cefalosporinas.....	21
3.1.5 Carbapenems.....	22
3.1.6 Monobactams.....	22
3.1.7 Inhibidores de β -lactamasas.....	22
3.2 Otros agentes antimicrobianos.....	23
3.2.1 Colistina.....	23
3.2.2 Fosfomicina.....	24
3.2.3 Tigeciclina.....	24
3.2.4 Eravaciclina.....	24
3.2.5 Aminoglucósidos.....	24
3.2.6 Plazomicina.....	24
4 RESISTENCIA A β-LACTÁMICOS	25
4.1 Modificación del sitio blanco.....	25
4.2 Alteraciones en la permeabilidad y eflujo.....	25
4.3 Resistencia mediada por β -lactamasas.....	26
4.3.1 β -lactamasas de clase A.....	26
4.3.2 β -lactamasas de clase B.....	27
4.3.3 β -lactamasas de clase C.....	27
4.3.4 β -lactamasas de clase D.....	28
5 CARBAPENEMASAS	28
5.1 Carbapenemasas de clase A.....	28
5.1.1 KPC.....	28
5.1.2 GES.....	29
5.1.3 Otras carbapenemasas de clase A.....	30
5.2 Carbapenemasas de clase B.....	30
5.2.1 IMP.....	30
5.2.2 VIM.....	31
5.2.3 NDM.....	31
5.2.4 Otras MBL de subclase B1.....	32
5.2.5 MBL de subclase B2 y B3.....	32
5.3 Carbapenemasas de clase D.....	33
5.4 Producción de múltiples carbapenemasas.....	33

5.5	Elementos genéticos móviles implicados en la diseminación de RAM	35
5.5.1	Transposones	36
5.5.2	Secuencias de inserción y transposones compuestos	36
5.5.3	Transposones complejos	38
5.5.4	Integrones	39
5.5.5	Plásmidos	41
6	Mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenems	42
6.1	Reducción de la permeabilidad	42
6.2	Bombas de eflujo	43
6.3	Otros mecanismos no enzimáticos	43
7	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE CARBAPENEMASAS	44
7.1	Métodos fenotípicos	46
7.1.1	Métodos basados en cultivo	46
7.1.2	Métodos bioquímicos	51
7.1.3	Métodos proteómicos: MALDI-TOF	52
7.1.4	Test inmunocromatográficos	53
7.2	Métodos genotípicos	55
7.2.1	Métodos basados en amplificación	55
7.2.2	Plataformas comerciales	56
7.2.3	NGS y WGS	56
8	BIOFILMS	56
8.1	Estructura y ciclo de formación de biofilms	57
8.2	Infecciones asociadas a biofilms	59
8.3	Resistencia y tolerancia a antibióticos en biofilms	60
8.4	Estrategias para control y tratamiento de biofilms	62
9	CONTEXTO	63
	HIPÓTESIS	64
	OBJETIVOS	64
	OBJETIVOS GENERALES	64
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
	CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DE BACIOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES A CARBAPENEMS	65
1	METODOLOGÍA	65
1.1	Aislamientos	65
1.1.1	<i>Pseudomonas</i> spp.	65
1.1.2	<i>Enterobacterales</i>	65
1.2	Estudios de susceptibilidad a antibióticos	65
1.2.1	Antibiograma por disco difusión - Método de Kirby-Bauer	65
1.2.2	Test epsilométrico	66
1.2.3	Dilución en agar	66
1.2.4	Sensititre	66
1.2.5	Evaluación de la efectividad de aztreonam con ceftazidime-avibactam	66
1.3	Caracterización fenotípica de carbapenemasas y BLEE	67
1.3.1	Tamizaje para sospecha de carbapenemasas	67
1.3.2	Detección fenotípica de carbapenemasas	67
1.3.3	Detección fenotípica de BLEE	68
1.4	Extracción de ácidos nucleicos para estudios moleculares	68
1.5	Detección genotípica de carbapenemasas por PCR	69
1.6	Búsqueda de otros determinantes de resistencia por PCR	69
1.6.1	Genes codificantes de BLEE	69
1.6.2	Genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos	69
1.7	Caracterización de entornos genéticos por PCR	69

1.7.1	Entornos de <i>bla</i> _{NDM-1} en <i>Enterobacterales</i>	70
1.8	Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa	70
1.9	Secuenciación de amplicones por método de Sanger	70
1.10	Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	70
1.11	Multilocus sequence typing (MLST)	71
1.12	Caracterización de plásmidos de <i>Enterobacterales</i>	71
1.12.1	Conjugación	71
1.12.2	Determinación de grupos de incompatibilidad plasmídicos	72
1.12.3	Estimación del tamaño plasmídico	72
1.13	Secuenciación de genomas completos	72
1.13.1	Extracción de ADN genómico	72
1.13.2	Secuenciación de lectura corta	72
1.13.3	Secuenciación de lectura larga	73
1.13.4	Análisis de secuencias	73
2	RESULTADOS	75
2.1	Caracterización microbiológica, susceptibilidad y mecanismos de resistencia	75
2.1.1	<i>Pseudomonas</i> spp	75
2.1.2	<i>Enterobacterales</i>	80
2.2	Relaciones de clonalidad	83
2.2.1	<i>Pseudomonas</i> spp. productoras de VIM-2	83
2.2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de KPC y GES	84
2.2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de VIM-2 y PER-1	84
2.2.4	Brote de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de PER-1	85
2.2.5	<i>Enterobacterales</i> productores de carbapenemasas	85
2.3	Entornos genéticos de β-lactamasas y resistencias asociadas	85
2.3.1	<i>Pseudomonas</i> spp. productoras de VIM-2	85
2.3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de KPC y GES	86
2.3.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de PER-1	86
2.3.4	Regiones de resistencia con <i>bla</i> _{PER-1}	87
2.3.5	Enterobacterias productoras de carbapenemasa	90
2.3.6	Caracterización de plásmidos y entorno genético de <i>bla</i> _{NDM-1}	91
3	DISCUSIÓN	94
3.1	Efectividad de ceftazidime-avibactam y aztreonam	94
3.2	Carbapenemasas y diversidad clonal de <i>P. aeruginosa</i>	95
3.3	Carbapenemasas y diversidad en <i>Enterobacterales</i>	97
3.4	Integrones de clase 1 en <i>P. aeruginosa</i>	98
3.5	Entornos de <i>bla</i> _{PER-1} en <i>P. aeruginosa</i> y nuevas plataformas de transposición	99
3.6	Plásmidos y entornos de <i>bla</i> _{NDM-1} en <i>Enterobacterales</i>	100
3.7	Comentarios finales	101
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS		103
1	METODOLOGÍA	103
1.1	Puesta a punto de PCR múltiple en tiempo real para detección de carbapenemasas	103
1.1.1	Aislamientos	103
1.1.2	Condiciones de PCR	104
1.1.3	Análisis	104
1.2	Puesta a punto de MALDI-TOF para detección de actividad carbapenemasa	105
1.2.1	Aislamientos	105
1.2.2	Pruebas de estabilidad de meropenem	105
1.2.3	Preparación de las muestras	106
1.2.4	Obtención de espectros y análisis	106
2	RESULTADOS	107

2.1	PCR múltiple en tiempo real para la detección de carbapenemasas	107
2.1.1	Puesta a punto	107
2.1.2	Evaluación en aislamientos productores de carbapenemasas	107
2.2	MALDI-TOF para la detección de actividad carbapenemasa	108
2.2.1	Detección del espectro de masas de meropenem	108
2.2.2	Puesta a punto de ensayos de hidrólisis de meropenem	110
2.2.3	Ensayos de hidrólisis de meropenem	111
3	DISCUSIÓN.....	113
3.1	PCR múltiple en tiempo real	113
3.2	Hidrólisis de meropenem por MALDI-TOF MS	114
CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE BIOFILMS Y SU ERRADICACIÓN		116
1	METODOLOGÍA	116
1.1	Formación de biofilms.....	116
1.1.1	Aislamientos	116
1.1.2	Ensayos	116
1.1.3	Lectura e interpretación	117
1.2	Actividad de antibióticos sobre biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	117
1.3	Actividad de combinación de antibióticos sobre biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	119
1.3.1	Susceptibilidad a antibióticos combinados (<i>checkerboard</i>).....	119
1.3.2	Evaluación de combinaciones de antibióticos sobre biofilms	120
1.4	Determinación de actividad de antibióticos combinados por método Calgary	120
1.4.1	Determinación de la CIM a fosfomicina.....	121
1.4.2	Evaluación del efecto combinado de fosfomicina y azitromicina sobre biofilms	121
1.5	Actividad de agentes antimicrobianos no clásicos sobre biofilms	122
1.5.1	Determinación de la concentración inhibitoria mínima	122
1.5.2	Actividad sobre biofilms	122
2	RESULTADOS	123
2.1	Formación de biofilm	123
2.2	Actividad de antibióticos sobre biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	124
2.3	Actividad de la combinación rifampicina y amikacina sobre <i>P. aeruginosa</i>	126
2.4	Actividad de la combinación fosfomicina y azitromicina sobre <i>P. aeruginosa</i>	128
2.5	Actividad de quercetina, resveratrol y cloruro de decalinio sobre biofilms	130
2.6	Efecto de antibióticos sobre biofilms de <i>P. aeruginosa</i> productoras de PER-1	130
2.6.1	Efecto de antibióticos combinados sobre células planctónicas.....	130
2.6.2	Efecto de antibióticos solos y combinados sobre biofilms	131
3	DISCUSIÓN.....	134
3.1	Formación de biofilms.....	134
3.2	Efecto de antibióticos sobre biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	134
3.3	Evaluación de combinaciones con rifampicina en aislamientos individuales	137
3.4	Efecto de otros agentes sobre biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	138
3.5	Comentarios finales	139
CONCLUSIONES.....		141
PERSPECTIVAS.....		143
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		144
ANEXOS.....		161

Lista de abreviaturas

Algunas de las abreviaturas utilizadas derivan del idioma inglés, y se utilizaron en su forma original en lugar de ser traducidas por ser la forma en que reconocen internacionalmente. En estos casos, se indica entre paréntesis el término original.

2-MPA	Ácido 2-mercaptopropiónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
APB	Ácido fenil-borónico
ATM	Aztreonam
AZM	Azitromicina
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
C/T	Ceftolozane-tazobactam
CAR	Clon de alto riesgo
CAZ	Ceftazidime
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIM-test/mCIM-test	Método de inactivación de carbapenem/modificado (<i>Modified/Carbapenem inactivation method</i>)
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
COL	Colistina
CZA	Ceftazidime-avibactam
DBL	Derivados de β -lactámicos (en referencia a inhibidores de β -lactamasas)
DBO	díaz-biciclo-octano
DPA	Ácido dipicolínico
DR	Repetido directo (<i>direct repeat</i>)
eCIM-test	Método de inactivación de carbapenem modificado con EDTA (<i>EDTA modified carbapenem inactivation method</i>)
ECOFF	Punto de corte epidemiológico (<i>Epidemiological cut-off</i>)
EdPC	<i>Enterobacteriales</i> dobles productores de carbapenemasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGM	Elemento genético móvil
EPC	Enterobacteria/ <i>Enterobacteriales</i> productor de carbapenemasa
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
FDC	Cefiderocol
FEP	Cefepime
FOS	Fosfomicina
GM	Gentamicina
GTasas	Glicosil-transferasas
h	hora/s
HRMA	Análisis de melting de alta resolución (<i>High-resolution melting analysis</i>)
IBL	Inhibidor de β -lactamasas
IPM	Imipenem

IRL/R	Repetido invertido izquierdo/derecho (<i>Inverted repeat left/right</i>)
IS	Secuencia de inserción (<i>Insertion sequence</i>)
kb	kilo bases (equivale a 1000 pb)
LB (caldo/agar)	Luria-Bertani
LFIA	Inmunoensayos de flujo lateral (<i>lateral flow immunoassay</i>)
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
MBL	Metallo- β -lactamasa
MDR	Multidrogo resistente
MEM	Meropenem
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilmurámico
NGS	Secuenciación de última generación (<i>Next generation sequencing</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PBP	Proteína de unión a la penicilina (<i>Penicillin Binding Protein</i>)
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDR	Pan-drogo resistente
PTZ	Piperacilina-tazobactam
RD	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
Tn	Transposón
TPasas	Transpeptidasas
TSA	Tripticasa soja agar
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
WGS	Secuenciación de genomas completos (<i>Whole genome sequencing</i>)
XDR	Extremadamente drogo-resistente

RESUMEN

La resistencia a antibióticos (RAM) es uno de las mayores amenazas a la salud pública a nivel global. En particular, los bacilos Gram negativos como *Enterobacterales* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems se encuentran dentro del listado de microorganismos de prioridad crítica para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. Esto se debe fundamentalmente a que se asocian a fenotipos de multidrogo resistencia, resistencia extrema y pandrogo resistencia, que limitan las opciones terapéuticas para abordar las infecciones que tratan.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar bacilos Gram negativos resistentes a carbapenems, incorporar nuevos métodos diagnósticos para su estudio, y determinar su comportamiento frente a antimicrobianos en biofilms.

Se caracterizaron aislamientos de *Enterobacterales* y *Pseudomonas* spp. resistentes a carbapenems, portadores de carbapenemasas de clase B y A, y multidrogo resistentes.

La evaluación *in vitro* de la efectividad de la combinación de ceftazidime-avibactam (CZA) con aztreonam (ATM) se estudió por sinergia de doble disco y mediante la determinación del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI) establecida por los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) a cada antibiótico solo y de CZA en presencia de 4 mg/L de ATM. Se observó efectividad de la combinación en todos los aislamientos de *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* portadores de carbapenemasa estudiados, ya sea por susceptibilidad a uno de los agentes, test de sinergia de disco positivo y/o sinergia definida por valores de FICI <0,5.

La caracterización de aislamientos de *Enterobacterales* y *Pseudomonas* spp. tanto por métodos fenotípicos, PCR y secuenciación de genomas completos, permitió identificar carbapenemasas de clase B y A circulantes en instituciones de salud nacionales, así como resistencias acompañantes y plataformas de movilización. En *P. aeruginosa*, se encontró *bla_{VIM-2}* como cassette en integrones de clase 1 de diferentes configuraciones, y en diferentes secuenciotipos como ST155, ST1195 y ST1565. Adicionalmente, se describieron nuevas plataformas genéticas en las que dicho gen se halló junto con *bla_{PER-1}* y *qnrVC6* en unidades de transposición basadas en *ISPa17* y embebidas en una estructura derivada de *ISPa40*, donde también se encontró por primera vez en esta especie el transposón de resistencia a amikacina *TnaphA6*. Adicionalmente, se caracterizó un brote hospitalario por *P. aeruginosa* productora de PER-1 (una β -lactamasa de espectro extendido) y perteneciente al ST309, un linaje epidémico recientemente descrito como clon de alto riesgo. *bla_{PER-1}* se halló en un transposón compuesto, en un entorno en tándem junto con *ISCR1* y *qnrVC6*.

Entre los aislamientos de *Enterobacterales*, se destaca la predominancia de *bla_{NDM-1}*, cuya diseminación en una institución estuvo ligada a su asociación con diferentes elementos genéticos móviles. En particular, se describió un nuevo transposón compuesto, conformado por dos copias de *ISKox2-like* que además de portar *bla_{NDM-1}* presentaba *aphA6*. Esta plataforma se encontró en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* y *Morganellaceae* y en distintos tipos de plásmidos, indicando una diseminación multicausal no clonal de *bla_{NDM-1}* en la institución durante el período estudiado. Asimismo, el tipo de plásmido más frecuente fue de tipo IncC, que podría tratarse de un plásmido exitoso, y que además presentó un integrón de clase 1 complejo con *ISCR1-qnrVC6*.

Por otro lado, a partir de los aislamientos caracterizados, se implementaron dos metodologías de identificación rápida de carbapenemasas: PCR múltiple en tiempo real para la búsqueda simultánea de *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{GES}* y *bla_{OXA-48}*; y espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección de espectros de hidrólisis de meropenem. La PCR múltiple en tiempo real identificó el 100% de los genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}* y *bla_{OXA-48}*, mientras que *bla_{KPC}* fue hallado en todos los aislamientos que lo presentaban como única carbapenemasa, pero no en los doble productores (junto con *bla_{NDM-1}*). Por MALDI-TOF se identificó la producción de carbapenemasas de todos los aislamientos portadores de *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*, mientras que los espectros de aislamientos que presentaban *bla_{OXA-48}* mostraron hidrólisis parcial.

El estudio de la capacidad de formación de biofilms y del efecto de antimicrobianos se realizó en modelo estático en placas de poliestireno, y la biomasa de los mismos se estimó por coloración con cristal violeta, solubilización y obtención del valor de la densidad óptica a 590 nm. Se observó una alta proporción de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems formadores fuertes y moderados de biofilm. Antibióticos como imipenem, meropenem,

ceftazidime, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, fosfomicina y azitromicina no mostraron un efecto significativo sobre la biomasa de los biofilms para la mayoría de las concentraciones evaluadas. Tampoco lo hicieron otros antimicrobianos como quercetina, resveratrol y cloruro de decualinio. Sin embargo, rifampicina redujo la biomasa de los biofilms a concentraciones > 16 mg/L.

La evaluación del efecto de rifampicina combinada con otros antibióticos demostró diferencias entre la actividad sobre células planctónicas y en biofilm. En particular, la combinación con amikacina demostró sinergia en sobre crecimiento planctónico, pero no sobre biofilms a las mismas concentraciones. La evaluación con mayores concentraciones de antibióticos mostró una disminución de la biomasa de los biofilms, pero con diferencias entre aislamientos.

La diseminación de carbapenemasas y la emergencia de otras β -lactamasas como PER-1 constituyen un desafío epidemiológico, diagnóstico y terapéutico para nuestro medio. Esto, sumado a su asociación a linajes de alto riesgo y a determinantes de resistencia a otros grupos de antibióticos, así como la capacidad de persistir y tolerar el efecto de antibióticos en biofilms, complejiza su abordaje. Para ello, es fundamental la implementación de sistemas de diagnóstico y vigilancia que permitan mitigar el impacto que puedan representar estos microorganismos. La investigación traslacional de métodos económicos, que permitan aprovechar los recursos adquiridos por los laboratorios en los últimos años, representa una posibilidad de transferencia hacia el ámbito clínico y diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos (RAM) es una de las principales amenazas a la salud pública del siglo XXI. Esto ocurre cuando las bacterias sufren modificaciones que hacen inefectivas a las drogas que usualmente se utilizan para tratar las infecciones que ocasionan[1].

Este fenómeno no es nuevo, el descubrimiento de los antibióticos fue secundado por el reconocimiento de que las bacterias son capaces de desarrollar resistencia contra ellos. Durante la segunda mitad del siglo XX este problema fue controlado con el uso de otros antibióticos, pero a esto le siguió un rápido descenso en el desarrollo de nuevos agentes[2]. La disminución de la efectividad de los antibióticos se ha acelerado por la rápida evolución y diseminación de la resistencia, llegando incluso al origen de microorganismos para los que no se dispone de tratamiento, y dando lugar a una “era postantibiótica”[3].

Como consecuencia, se han reportado mayores tasas de mortalidad en pacientes con infecciones por microorganismos resistentes, así como mayor duración de las enfermedades y de estadías hospitalarias. Los costos asociados al tratamiento de estas infecciones también son mayores, y surgen dificultades para la implementación de otras intervenciones médicas como cirugías, trasplantes de órganos, colocaciones de prótesis y quimioterapias[3,4].

La rápida evolución de la RAM surge fundamentalmente por el uso excesivo e indebido de los antibióticos, tanto en la medicina humana como en los sistemas de producción de alimentos. En respuesta a este problema, y con el objetivo de conservar a los antibióticos para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su 68ª Asamblea Mundial (en 2015), plantea un Plan de Acción Global contra la RAM[5]. Este plan de acción es luego adoptado por los Estados Miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)[6], y varios países de Latinoamérica y el Caribe comenzaron a implementar planes de acción nacionales contra la RAM bajo el lema de ‘Una Salud’. Sin embargo, la pandemia de COVID-19 generó un aceleramiento en la crisis global de la RAM, debido a un desvío en las prioridades sanitarias, y los recursos tanto humanos como financieros y materiales. El aumento de la demanda en los centros de atención, junto con su saturación y la del personal de salud, la escasez de recursos materiales y la alta demanda de camas, y de capacidades diagnósticas, generaron alteraciones en las prácticas de control y prevención de infecciones, afectando la capacidad de vigilancia de la RAM. A esto se le sumó el aumento en la administración de antibióticos en pacientes con COVID-19, para cubrir infecciones bacterianas secundarias o coinfecciones. Como consecuencia, se incrementaron las infecciones en centros de salud, y aumentaron los reportes de organismos multidrogo resistentes (MDR), de bacterias doble productoras de carbapenemasas, y se dió la diseminación geográfica de ciertos mecanismos de resistencia (como OXA-48 y NDM-1)[4].

Actualmente, nos enfrentamos al problema de la RAM bajo una cuarta ola de globalización, que trajo consigo amenazas ecológicas emergentes, así como un incremento en la población humana y en la inequidad social. Por esta razón, la RAM fue ligada a los nuevos objetivos de desarrollo sostenible por la Alianza Cuatripartita conformada por la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, ex OIE) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP)[7].

La OMS también ha alertado sobre la necesidad de desarrollar nuevos antimicrobianos para el tratamiento de patógenos críticos MDR, entre los que incluye a bacilos gram negativos como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems, y *Enterobacterales* resistentes a carbapenems o a cefalosporinas de amplio espectro[8]. La producción de carbapenemasas en estos grupos

bacterianos ha aumentado y se ha diseminado ampliamente en los últimos 25 años, siendo además el principal mecanismo que contribuye a los fenotipos MDR[9,10].

Asimismo, las infecciones por bacilos Gram negativos MDR, y específicamente por productores de carbapenemasas, se asocian a mayores tasas de morbimortalidad, estadías hospitalarias y costos económicos[9,11]. A esto se suma el problema de las limitadas opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones y la cada vez más frecuente necesidad de administrar tratamientos individualizados debido a la complejidad de algunos perfiles de resistencia[12]. La detección rápida y específica de los mecanismos implicados en la resistencia a carbapenems tendrían un impacto directo en la evolución de los pacientes, dado que permitirían la instauración temprana de tratamientos antibióticos efectivos, por lo que la investigación y desarrollo de métodos diagnósticos es un área en constante crecimiento[13,14].

Además de la producción de carbapenemasas, la resistencia a carbapenems puede ocurrir por mecanismos no enzimáticos como la pérdida de porinas y sobreexpresión de bombas de eflujo, así como la combinación de estas alteraciones estructurales con la producción de otras β -lactamasas[13,15]. Adicionalmente, el desarrollo de microorganismos en el contexto de biofilms también constituyen un mecanismo de tolerancia a estos antibióticos[16]. La formación de biofilms suele asociarse con infecciones recurrentes, persistentes o crónicas, habitualmente difíciles de erradicar con las dosis habituales de antibióticos (determinadas en células planctónicas)[17,18], y esta tolerancia a su vez favorece la aparición de RAM, contribuyendo aún más a este problema[17]. La búsqueda de estrategias que permitan prevenir, tratar o erradicar biofilms también supone un desafío clínico y un campo en constante desarrollo[19,20].

MARCO TEÓRICO

1 EL COSTO DE LA RAM Y SUS CAUSAS

La Revisión sobre RAM presidida por el economista británico Jim O'Neil estimó, en su primer reporte publicado en diciembre de 2014, que 700.000 personas morían cada año a causa de infecciones por microorganismos resistentes. El informe final, emitido dos años después, proyectó una estimación alarmante: si no se encuentran soluciones inmediatas para detener el aumento de la RAM, para 2050 se llegaría a 10 millones de muertes anuales a causa de infecciones por microorganismos resistentes, y una pérdida económica acumulada estimada en 100 billones de dólares[21].

Más adelante, el estudio de la carga mundial de morbilidad (*Global Burden Disease -GBD- Study*) estimó que en 2019 hubo 4,95 millones de muertes asociadas con RAM, de las cuales 1,27 millones fueron directamente atribuibles a esta. Los datos evidenciaron a la RAM bacteriana como uno de los principales problemas de salud actuales, siendo particularmente serio en países de bajos y medianos ingresos, en los cuales se observaron mayores tasas de mortalidad por esta causa[1]. Como ya fue comentado, la pandemia de COVID-19 aceleró aún más esta tendencia al aumento de la RAM[4].

De las 1,27 millones de muertes en 2019 atribuibles a RAM, 929.000 fueron causadas por seis patógenos (en orden): *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos microorganismos también representaron 3,57 millones de las 4,95 muertes asociadas a la RAM. A su vez, la resistencia a antibióticos de las familias de las fluoroquinolonas y β -lactámicos fueron responsables de más del 70% de las muertes atribuibles a RAM[1].

Datos del mismo grupo, estimaron 13,7 millones de muertes relacionadas con infecciones (independientemente de la susceptibilidad antibiótica) en 2019 a nivel global, con 7,7 millones (56,2%) asociadas a 33 patógenos bacterianos. Cinco patógenos principales fueron asociados con 30,9% de las muertes relacionadas con infecciones, *S. aureus* causó más de 1 millón de muertes, seguido por *E. coli*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* con aproximadamente 500.000 decesos atribuibles a cada uno. Los síndromes más asociados a mortalidad fueron las infecciones respiratorias bajas, seguidas de infecciones en el torrente sanguíneo e infecciones peritoneales e intraabdominales. En relación al costo en años de vida perdidos, los microorganismos líderes son los mismos pero en diferente orden: *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*[22].

En ambos casos se evidencia el impacto que tienen estos microorganismos como fuente de afección a la salud a nivel mundial. De hecho, no es casualidad que se encuentren entre las amenazas más importantes según varios autores o instituciones, por ejemplo como parte de la lista de patógenos ESKAPE de Rice[23], los microorganismos multidrogo resistentes más destacados según Magiorakos y cols.[24], las amenazas de resistencia a los antibióticos para los Estados Unidos del *Center for Disease Control and Prevention* (CDC)[25] o la lista de microorganismos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos de la OMS[8].

En 2008, Louis Rice señaló a un grupo emergente de patógenos del ámbito hospitalario que lograban escapar a la acción de los antibióticos disponibles. Este grupo se denominó ESKAPE, como un acrónimo formado por las iniciales de sus componentes: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Su notoriedad no se debió solo a su creciente prevalencia como agentes de infecciones hospitalarias, sino también a sus características desde el punto de vista de la patogenicidad, transmisión y resistencia[23].

El consenso de Magiorakos y cols. publicado en 2012, también destaca a enterobacterias, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *Enterococcus* spp. como patógenos frecuentemente encontrados en ámbitos de la salud con resistencias emergentes y preocupantes, y sintetiza la terminología que luego fue adoptada por la mayoría de los autores en el área de organismos multidrogo resistentes, extremadamente resistentes y pan-drogo resistentes[24]. Si bien este consenso tiene algunos años y no incluye ciertos antibióticos como las combinaciones de β -lactámicos con nuevos inhibidores o cefiderocol, las categorías antes mencionadas y los criterios para definir las siguen siendo válidos y ampliamente utilizados. Es así que se definen bacterias:

- Multidrogo resistentes (MDR): no susceptibles al menos a un antibiótico en al menos tres clases activas, las cuales dependen de cada especie o grupo considerado;
- Extremadamente drogo-resistentes (XDR): no susceptibles al menos a un agente en todas las clases con excepción de dos;
- Pan-drogo resistentes (PDR): no susceptibles a todas las clases de antimicrobianos activos[24].

Por su lado, el informe del CDC sobre las amenazas de resistencia a los antibióticos en Estados Unidos publicado en 2013, indica que, entre todos los problemas relacionados a la RAM, los patógenos Gram negativos son los más preocupantes ya que pueden llegar a desarrollar resistencia a casi todos los agentes disponibles para tratarlos. Se destacan entre las infecciones por Gram negativos, aquellas asociadas a los cuidados de la salud por *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp[25].

Finalmente, en 2017 la OMS emite una lista de microorganismos prioritarios para los cuales la investigación y desarrollo de antibióticos nuevos y eficaces es esencial, la cual continúa vigente hasta hoy en día. Esta lista hace énfasis en patógenos multidrogo resistentes (MDR) que son agentes de infecciones severas, y con frecuencia mortales. Dentro de la categoría de prioridad crítica, se incluyen *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems, y *Enterobacterales* resistentes a carbapenems o cefalosporinas de tercera generación (incluye *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp.)[8].

En la emergencia global de MDR en bacterias Gram negativas, se destacan los clones exitosos o clones de alto riesgo (CAR)[26]. Se trata de un número limitado aunque creciente de linajes específicos dentro de cada especie, que han contribuido significativamente al mantenimiento y transmisión de determinantes de RAM[7]. Estos clones se caracterizan por presentar: distribución mundial, resistencia a múltiples antimicrobianos, mayor patogenicidad y *fitness*, capacidad para colonizar y persistir en sus huéspedes por largos períodos de tiempo, alta transmisibilidad y capacidad de causar infecciones graves o recurrentes[26].

Independientemente de los CAR, la diseminación de la RAM puede producirse por la relación existente entre sus genes codificantes con diversos tipos de elementos genéticos transponibles y otros elementos genéticos móviles como los plásmidos[7]. El rol de éstos se discutirá más adelante.

2 PATÓGENOS CRÍTICOS

Como se mencionó anteriormente, los patógenos de prioridad crítica según la OMS, para los cuales es necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos son *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems, y *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de tercera generación o a carbapenems[8,27]. Estos Gram negativos resistentes a carbapenems se caracterizan por presentar una creciente incidencia en los últimos 25 años, y por su asociación a infecciones con altas tasas de mortalidad, para las cuales las opciones terapéuticas son limitadas e incluso nulas[27].

Dentro de este grupo, en este trabajo se hará énfasis en *P. aeruginosa* y *Enterobacterales*, cuyas principales características se describirán a continuación.

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno oportunista, ubicuo, que se encuentra entre las principales causas de infecciones hospitalarias e infecciones crónicas, con elevadas tasas de morbimortalidad asociada, al cual se le atribuye un estimado de 300.000 muertes anuales[28]. Suele afectar principalmente a pacientes internados en unidades de cuidados intensivos (UCI) y personas inmunocomprometidas, y a su vez se le señala como el principal agente de neumonía asociada a ventiladores e infecciones en quemados[29]. Además, dentro de las infecciones hospitalarias, también puede causar infección del torrente sanguíneo asociada a catéter, infección urinaria asociada a catéter e infecciones en pacientes sometidos a cirugía o trasplantados[30]. Dentro de las infecciones crónicas, se destacan las que afectan las vías respiratorias de personas con fibrosis quística[29], donde se adapta pudiendo permanecer allí durante toda la vida del individuo sin ser erradicada[30].

P. aeruginosa tiene una gran versatilidad y capacidad de adaptación a sus huéspedes, donde su arsenal de factores de virulencia altamente regulados, la capacidad de formar biofilms y su resistencia intrínseca a varios antimicrobianos juegan un rol central[30,31].

Dentro de sus atributos de virulencia, se destacan:

- Lipopolisacárido (LPS), cuyo lípido A actúa como endotoxina generando una respuesta inflamatoria que media el daño tisular;
- Proteínas de membrana externa (OMPs), que permiten el intercambio de nutrientes, median la adherencia y también están involucradas en la RAM;
- Sistemas de secreción de tipo 1 a 6, involucrados en la colonización, adherencia, *swimming/swarming* y respuesta a señales quimiotácticas. El sistema de secreción de tipo 6 (SST6) se asocia al flagelo y media la inyección de efectores en otras bacterias, mediando la competencia. El SST4 se asocia a los pili y a la transferencia horizontal de genes. Mientras que el SST3 media la inyección de citotoxinas de tipo ExoU/T/S/Y en la célula huésped que bloquean la señalización intracelular provocando su muerte;
- Exotoxina A, es una citotoxina capaz de inhibir la síntesis proteica en la célula hospedera provocando su muerte;
- Piocianina, también es una potente citotoxina que causa daño tisular;
- Enzimas líticas que causan daño tisular permitiendo la invasión, como elastasas LasA y B, proteasa alcalina (AprA), lipasa (LipC), fosfolipasa C (PlcB) y estearasa A;
- Ramnolípidos, capaces de degradar el surfactante pulmonar y destruir las uniones estrechas de células epiteliales, causando daño a nivel de la tráquea y el pulmón;
- Sideróforos pioverdina y pioquelina, que le permiten a la bacteria sobrevivir en ambientes pobres en hierro;
- Enzimas antioxidantes como catalasas, hidróperóxido reductasa y superóxido dismutasa, que neutralizan la actividad de las sustancias reactivas de oxígeno en células fagocíticas;
- Exopolisacáridos como alginato, Psl y Pel, que facilitan la formación de biofilms, dificultando la eliminación bacteriana[30,31].

Por su parte la formación de biofilms se relaciona con la supervivencia a la fagocitosis, al estrés oxidativo, la restricción de nutrientes u oxígeno, la acumulación de desechos metabólicos, la competencia interespecie y la presencia de agentes antimicrobianos[30].

La expresión de un conjunto de genes relacionados a la producción de factores de virulencia, movilidad, formación de biofilm, RAM y vías metabólicas se encuentra altamente regulada por un sistema de comunicación inter-celular denominado *quorum sensing* (QS)[30,31]. El QS se basa en la detección de la densidad poblacional bacteriana a través de señales químicas llamadas autoinductores, que desencadenan la expresión génica coordinada que permite una respuesta en masa[31]. Así, el QS juega un rol central en la supervivencia y colonización en las etapas iniciales de la infección, así como en el progreso de infección aguda a crónica[30].

Finalmente, la amenaza creciente de *P. aeruginosa* se debe a su gran capacidad de desarrollar RAM. Este fenómeno ocurre ya sea por mutación de genes cromosómicos, así como por transferencia horizontal de genes, particularmente los que codifican carbapenemasas o β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), frecuentemente transferidas junto a determinantes de resistencia a aminoglucósidos y/o fluoroquinolonas, entre otros[28,29].

La combinación de dichos mecanismos de RAM dio origen a perfiles de resistencia complejos y alarmantes que han sido abordados por expertos a lo largo de la última década. Así, a las categorías de MDR, XDR y PDR previamente mencionadas, donde las clases activas consideradas son penicilinas combinadas con inhibidores de β -lactamasas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, fosfomicina y polimixinas[24], se le suma recientemente el concepto de *P. aeruginosa* con resistencia difícil de tratar (DTR). *P. aeruginosa* DTR se considera no susceptible a piperacilina-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, meropenem, imipenem-cilastatina, ciprofloxacina y levofloxacina[32].

P. aeruginosa tiene una estructura poblacional epidémica no clonal, que presenta una alta frecuencia de recombinación[28,33]. Cuenta con un número limitado de linajes diseminados, seleccionados a partir de otros genotipos raros no relacionados[28]. Dentro de esta especie también podemos encontrar algunos CAR como fue mencionado anteriormente[28,33]. En relación a su prevalencia, nivel de diseminación y asociación con perfiles MDR/XDR/DTR, particularmente con la producción de carbapenemasas o BLEE, los linajes de alto riesgo son ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654, y ST298. Sin embargo, más recientemente otros clones ganaron relevancia como ST309, ST773 y ST463[28].

2.2 Enterobacterales

El orden *Enterobacterales* está compuesto por un grupo heterogéneo de bacterias Gram negativas y fermentadoras de glucosa. Son agentes de una variedad de síndromes clínicos que incluyen infecciones urinarias, neumonía asociada a los cuidados de la salud, gastroenteritis, meningitis, infecciones del tracto sanguíneo, sepsis, shock tóxico, infecciones intraabdominales, entre otras. Dentro de los géneros con mayor implicancia a la salud en este grupo taxonómico, se destacan *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Citrobacter* spp[34].

El problema actual asociado a las infecciones causadas por *Enterobacterales* es el incremento de aislamientos resistentes a los antibióticos, particularmente aquellos que adquieren genes que codifican BLEE o carbapenemasas. En este sentido, la resistencia a carbapenems se ha asociado a altas tasas de mortalidad (frecuentemente > 40%), sobre todo en infecciones graves[35].

Al igual que para *P. aeruginosa* y otros microorganismos que han adquirido determinantes de RAM, se han descrito criterios para definir *Enterobacterales* (que incluye a las familias *Enterobacteriaceae* y *Morganellaceae*) MDR, XDR y PDR. En este caso las categorías de antibióticos activos son penicilinas,

penicilinas combinadas con inhibidores de β -lactamasas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, cefamicinas, carbapenems, monobactams, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, inhibidores de la síntesis de folatos, fosfomicina, tigeciclina, tetraciclinas, fenicoles y polimixinas. Existen excepciones en la conformación de las categorías según las resistencias naturales que presentan algunos miembros del orden, en cuyo caso no deben tomarse en cuenta en el número de clases activas[24].

2.2.1 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es un patógeno oportunista, y se considera una de las principales causas de infecciones hospitalarias en Estados Unidos, donde junto con otras especies del género *Klebsiella*, son la tercera causa de neumonía hospitalaria, encontrándose dentro de las principales causas de neumonía asociada a la ventilación mecánica. *K. pneumoniae* también es la segunda causa de infecciones del torrente sanguíneo (precedida solo por *E. coli*), cuyo foco en general es el tracto urinario, gastrointestinal o respiratorio, así como catéteres intravenosos o urinarios. También es agente de infecciones urinarias, incluyendo aquellas asociadas a catéteres, y de infecciones de heridas o sitio quirúrgico[36].

La estructura poblacional de *K. pneumoniae* se caracteriza por presentar gran diversidad genética, con una pequeña proporción de linajes clonales altamente exitosos. A su vez, estos CAR se dividen en dos grupos fenotípicamente distintos, caracterizados por ser MDR (como ST11, ST258 y ST437) o hipervirulentos (como ST23, ST65 y ST86)[37].

Entre sus principales factores de virulencia, se destaca la producción de una cápsula polisacárida, que es más densa en cepas hipervirulentas (conocida como cápsula hipermucoviscosa). Esta estructura confiere resistencia a la respuesta inmunitaria del hospedero durante la infección, incluyendo la evasión de la activación de la respuesta inmune y de la lisis por complemento o por péptidos antimicrobianos. Por otro lado, el LPS brinda protección contra el sistema de complemento, mientras que el lípido A es una endotoxina que activa una respuesta inflamatoria, permitiendo la diseminación tisular[38]. Esta endotoxina desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias mediante la activación de TLR4, y puede provocar una respuesta hiperinflamatoria que conduce al desarrollo de sepsis, con consecuente fallo multiorgánico y muerte[39].

Otros factores de virulencia esenciales son las fimbrias, fundamentalmente las de tipo 1 y 3, ya que median la adherencia durante la infección. Las fimbrias de tipo 1 (FimA/FimH) se expresan en la mayoría de las enterobacterias, y en el caso de *K. pneumoniae* juegan un rol en la invasión de la vejiga, así como en la formación de biofilms tanto en dicho sitio como en superficies abióticas (como catéteres urinarios). Las fimbrias de tipo 3 se unen a componentes de la matriz extracelular y a superficies abióticas (como tubos endotraqueales, catéteres), siendo también necesarias para la producción de biofilms. Finalmente, *K. pneumoniae* presenta una variedad de sideróforos como enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina y aerobactina, que le permiten capturar hierro de su huésped durante la colonización[38].

2.2.2 *Enterobacter* spp.

Enterobacter cloacae y *E. aerogenes* (actualmente *Klebsiella aerogenes*) hace más de 35 años que representan una amenaza en las UCI, particularmente en pacientes asistidos con ventilación mecánica y en alas neonatales. *K. aerogenes* MDR se comenzó a diseminar por ondas clonales epidémicas en Europa a fines de los 90s, y hacia 2010 fue sustituido por especies del complejo *E. cloacae* (incluyendo también a *E. hormaechei*) en el ámbito nosocomial[35].

E. cloacae es una bacteria ubicua en ambientes terrestres y acuáticos, y también forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales. Se desenvuelve fundamentalmente como un patógeno nosocomial, asociado a bacteriemia, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis e infecciones de piel y tejidos blandos. También puede contaminar equipamientos y dispositivos médicos[40].

2.2.3 *Escherichia coli*

Los crecientes niveles de RAM en *E. coli* son uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la salud humana y animal actualmente[35], y se destaca por ser la primera causa de muerte atribuible a RAM en 2019[1].

E. coli patógeno extraintestinal (ExPEC) es responsable de un amplio espectro de infecciones, tanto comunitarias como hospitalarias, como meningitis neonatal, peritonitis, infecciones del tracto urinario y bacteriemia[41]. Gracias a su capacidad de adquirir material genético de otros *Enterobacterales* por transferencia horizontal, puede acumular numerosos determinantes de RAM[35].

Actualmente, se encuentran diseminados varios CAR de *E. coli* Extraintestinales (EXPEC) tanto con o sin perfiles de multiresistencia como ST131 y ST95, así como otros CAR asociados con MDR como ST69, ST10, ST405, ST38, ST648, ST73 y ST1193[35,41].

2.2.4 Otras enterobacterias de interés

Citrobacter freundii y *Citrobacter koseri* son las especies más implicadas en la salud humana del género *Citrobacter*. Suelen causar infección urinaria, fundamentalmente asociada a catéteres, siendo frecuentes agentes de ITU nosocomiales y brotes. También pueden estar involucradas en infecciones intraabdominales, de piel y tejidos blandos, osteomielitis, y bacteriemia como consecuencia de procedimientos invasivos. *C. koseri* ha causado brotes hospitalarios de meningitis neonatal[42].

Finalmente, los géneros *Morganella* (*M. morganii*), *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*) y *Providencia* (*P. rettgeri*, *P. stuartii*), clásicamente clasificados dentro del grupo o tribu *Proteeae* y actualmente dentro de la familia *Morganellaceae* (Orden *Enterobacterales*), son considerados patógenos oportunistas, reconocidos principalmente por causar infecciones urinarias[43]. También se caracterizan por producir una cefalosporinasa de tipo AmpC cromosómica[42]. En los últimos años también se los ha asociado con otras afecciones de diferente gravedad, incluyendo infecciones del torrente sanguíneo, y son propensos a adquirir diferentes determinantes de RAM, destacándose actualmente como una causa emergente de MDR[43].

Proteus mirabilis es responsable del 80-90% de las infecciones por *Proteus*, y es una causa importante de infección urinaria complicada, asociada a catéteres, litiasis vesical o renal y en individuos con anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario, a partir de la cual puede provocar bacteriemia[42]; aunque también se lo ha asociado a infecciones en heridas[44]. La formación de biofilms mediada por pili manosa-resistentes (MR/P), permite la colonización de la vejiga y riñones, así como la adherencia a catéteres. Por otro lado, la producción de ureasa genera un aumento en el pH de la orina que resulta esencial para la colonización, induce daño en las células uroteliales y promueve la formación de litiasis urinaria[45].

Providencia stuartii y *P. rettgeri* son especies asociadas fundamentalmente al ámbito hospitalario, donde suelen provocar infecciones urinarias asociadas a catéteres, sobre todo en pacientes añosos, con elevado riesgo de bacteriemia y alta mortalidad. La formación de biofilms y la producción de ureasa han sido propuestos como sus principales factores de virulencia[42].

Morganella morganii es ubicua en el ambiente y puede formar parte de la microbiota de humanos y animales. A pesar de ser un patógeno oportunista, las infecciones asociadas a cepas MDR y XDR son

cada vez más reportadas, e incluyen sepsis, abscesos, infecciones urinarias, bacteriemia, infecciones de heridas, entre otras[46].

3 OPCIONES TERAPÉUTICAS PARA INFECCIONES POR GRAM NEGATIVOS MDR

Dentro de las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, una de las familias de antibióticos más utilizadas son los β -lactámicos. Motiva este hecho su amplio espectro de actividad, sus escasos efectos adversos y el constante desarrollo de nuevas moléculas e inhibidores de β -lactamasas que permiten potenciar y reimpulsar constantemente esta familia de antimicrobianos [47–49]. Debido a su importancia, a continuación, se hará especial hincapié en este grupo de fármacos, y más adelante se comentarán los principales mecanismos de resistencia β -lactámicos.

3.1 β -lactámicos

Los β -lactámicos son la familia de antibióticos con más prescripciones para el tratamiento de enfermedades infecciosas[47,48]. Entre 2004 y 2014, los β -lactámicos representaron el 65% de las prescripciones de antibióticos inyectables en Estados Unidos, de los cuales la mitad fueron cefalosporinas[48].

Se reconocen cuatro clases principales de antibióticos β -lactámicos, en función a su estructura química, que son penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams (Figura 1)[50]. Estos antibióticos contienen una estructura cíclica denominada anillo β -lactámico, que en el caso de penicilinas, cefalosporinas y carbapenems se une a una segunda estructura cíclica conformada por tiazolidina, dihidrotiazina o pirrolina respectivamente, mientras que los monobactams son estructuras monocíclicas[47].

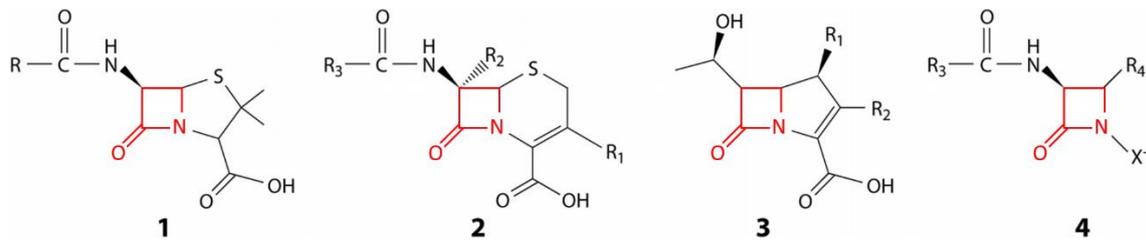


Figura 1. Estructura principal de las cuatro clases dentro de la familia de los β -lactámicos: Penicilina (1), cefalosporina (2), carbapenem (3) y monobactam (4). Se destaca en rojo la estructura del anillo β -lactámico. Adaptado de Bush K. & Bradford P. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2)[50].

El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en la inhibición del último paso de la síntesis de la pared celular, por unión covalente a las transpeptidasas denominadas proteínas de unión a la penicilina (PBPs)[48]. Para comprender mejor este proceso, se realizará una breve reseña sobre la estructura y síntesis de la pared, para luego continuar con el mecanismo de acción de los β -lactámicos y su clasificación.

3.1.1 Estructura y síntesis de la pared celular bacteriana

La pared bacteriana tiene como principal función conferir rigidez y resistencia a la presión osmótica, así como el mantenimiento de la morfología bacteriana[51]. También se encuentra íntimamente involucrada en el crecimiento y división celular[52].

El principal componente de la pared es la capa de peptidoglicano, que consiste en una estructura con forma de malla, compuesta por cadenas de glucano conectadas por oligopéptidos. En Gram negativos,

esta malla consiste generalmente en una capa delgada, mientras que en Gram positivos es más gruesa[53].

Dichas cadenas de glucano, están formadas por residuos alternados de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM), unidos por enlaces β -1 \rightarrow 4. A su vez el NAM, está unido a un pentapéptido lineal, compuesto generalmente por L-Alanina (L-Ala) en la posición 1 (proximal a NAM), ácido γ -D-Glutámico (γ -D-Glu) en la posición 2, ácido meso-diaminopimélico (meso-A2pm) en la posición 3 de la mayoría de los Gram negativos, mientras que en la mayoría de los Gram positivos es L-Lisina (L-Lys), y dos D-Alanina en las posiciones 4 y 5 (D-Ala-D-Ala), aunque la D-Ala terminal se pierde en la macromolécula madura. El entrecruzamiento de las cadenas de glucano, ocurre entre el grupo carboxilo de la D-Ala en la posición 4 y el grupo amino del aminoácido en la posición 3 (meso-A2pm o L-Lys), ya sea de forma directa o a través de un puente peptídico corto[52].

La síntesis de la pared ocurre en tres etapas. El primer paso ocurre en el citosol y consiste en la síntesis de los precursores activados de NAG y NAM con uridina difosfato (UDP-NAG y UDP-NAM), a través de reacciones secuenciales llevadas a cabo por enzimas Mur. En la segunda etapa, UDP-NAM se ancla al aceptor undecarpenil-fosfato en la cara interna de la membrana citoplasmática (conformando el lípido I), y luego se agrega una molécula de UDP-NAG, formando la subunidad monomérica del peptidoglicano (lípido II), que luego será trasladada a través de la membrana hacia el periplasma. En la tercera etapa se da la polimerización del lípido II, liberando UDP y resultando en cadenas de glucano que se incorporan a la capa de peptidoglicano[54] (Figura 2).

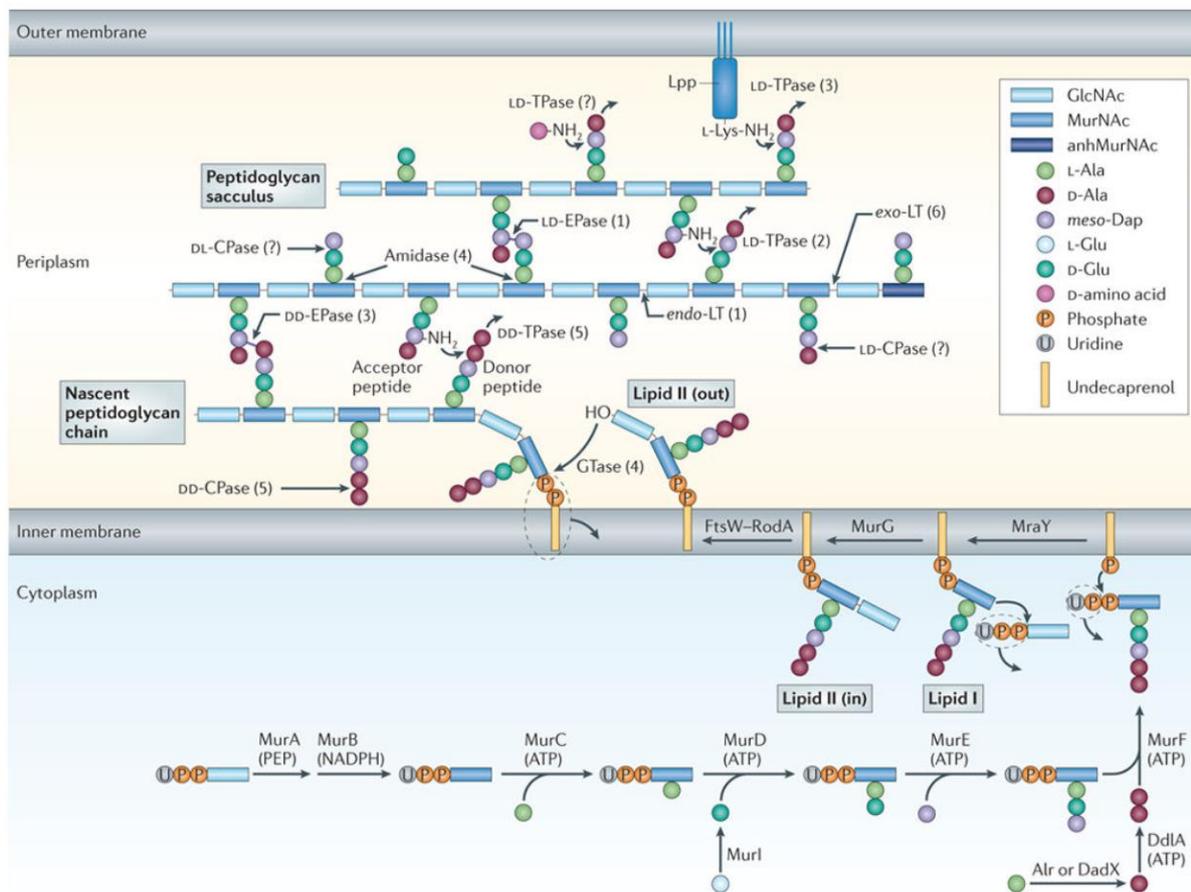


Figura 2. Síntesis de peptidoglicano en Gram negativos. La síntesis de precursores comienza en el citosol, mediada por enzimas Mur. El lípido II (NAM-NAG-UDP) es trasladado a través de la membrana interna, y es agregado a la cadena creciente de peptidoglicano por una glicosil-transferasa (GTasa). Las cadenas de peptidoglicano son unidas por entrecruzamiento de los pentapéptidos unidos a NAM, mediante DD-transpeptidasas (DD-TPasas). Tomada de Typas A et al. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(2): 123–136[54].

Esta última etapa, requiere de dos tipos de enzimas: glicosil-transferasas (GTasas) que polimerizan las cadenas de glicanos, y DD-transpeptidasas (DD-TPasas o PBPs) que realizan el entrecruzamiento de los pentapéptidos de moléculas vecinas[54]. Las transpeptidasas o PBPs (proteínas de unión a la penicilina - *Penicillin binding protein*) reconocen el motivo D-Ala-D-Ala terminal del pentapéptido, y el entrecruzamiento es inducido por la formación de un enlace covalente entre el residuo de serina en el sitio activo de la PBP y el grupo carboxilo terminal producido por hidrólisis de la D-Ala terminal[51]. Se reconocen tres tipos de enzimas con actividad GTasa o TPasa: enzimas funcionales GTasas-TPasas (PBPs de clase A), TPasas monofuncionales (PBPs de clase B) y GTasas monofuncionales. En el caso de *E. coli* por ejemplo, se han identificado tres enzimas bifuncionales (PBP1a, 1b y 1c), una GTasa y dos TPasas monofuncionales (PBP2 y PBP3)[54].

3.1.2 Mecanismo de acción de los β -lactámicos

Los β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana por unión covalente a las PBPs[48]. Esto se debe a que el anillo β -lactámico es estructuralmente similar al motivo D-Ala-D-Ala terminal del pentapéptido anclado a NAM. Por ello, reaccionan con el residuo de serina en el sitio activo de las PBPs, lo que produce una apertura en el anillo β -lactámico, con la consiguiente acilación irreversible de la enzima inhibiendo su capacidad de realizar el entrecruzamiento del peptidoglicano[47,55] (Figura 3).

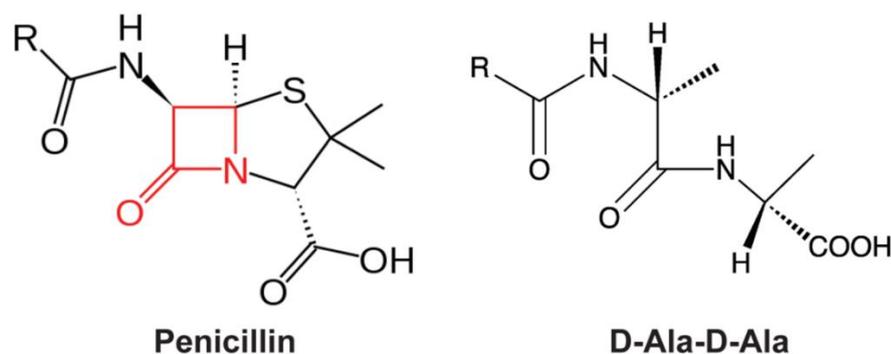


Figura 3. Similitud entre la estructura química de los β -lactámicos, en este caso penicilina, con el dipéptido D-Alanina-D-Alanina (D-Ala-D-Ala). El anillo β -lactámico se destaca en color rojo. Tomada de Zeng X. & Lin J. *Front Microbiol.* 2013;4(128)[55].

Como se mencionó anteriormente, existen varios tipos de PBPs, y todas las especies bacterianas tienen entre 3 y 8 PBPs características, de las cuales al menos una resulta esencial y tiene una especificidad única por los β -lactámicos, por lo que la muerte bacteriana puede resultar de la inhibición de una o más enzimas[48].

A continuación, se describirán brevemente las cuatro clases de β -lactámicos disponibles y los principales inhibidores de β -lactamasas.

3.1.3 Penicilinas

Las penicilinas son una clase de β -lactámicos naturales y semisintéticos, derivados de compuestos producidos por diferentes especies de *Penicillium spp*[56].

El primer compuesto en esta clase y fundador de la familia de los β -lactámicos fue la penicilina G, descubierta en 1929 por Alexander Fleming y aprobada para su uso clínico en 1946. La penicilina G se administra por vía parenteral o intramuscular y continúa siendo usada para el tratamiento de infecciones estreptocócicas. Le siguió la penicilina V, de similares características y espectro pero de administración por vía oral. Oxacilina, meticilina y cloxacilina fueron introducidas posteriormente por

ser penicilinas estables a las penicilinasas estafilocóccicas, y fueron ampliamente utilizadas hasta la emergencia de *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) en 1979-80. Ampicilina y amoxicilina son derivados semisintéticos que mejoran su espectro hacia bacterias Gram negativas, fundamentalmente enterobacterias, pudiendo administrarse por vía oral. Todas estas son consideradas penicilinas de espectro estrecho, y actualmente penicilina G y V, así como ampicilina y amoxicilina se utilizan como monoterapia casi exclusivamente para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* del grupo A y *Treponema pallidum*.

Las penicilinas de amplio espectro como carbenicilina, piperacilina y ticarcilina aumentaron su espectro hacia *P. aeruginosa*, y cubren además *Staphylococcus* spp., enterobacterias y anaerobios[48,56].

3.1.4 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son compuestos derivados de *Cephalosporium acremonium*, que contienen un anillo de dihidrotiazina unido al anillo β -lactámico. Los numerosos tipos de cefalosporinas difieren en sustituciones en su estructura, fundamentalmente en las posiciones 3 y 7, que provocan cambios en sus propiedades antibacterianas y farmacocinéticas[56]. Estos antibióticos se dividen en cinco generaciones.

Las cefalosporinas de primera generación (Ej. cefalexina, cefazolina), son consideradas de espectro estrecho. Presentan buena actividad sobre Gram positivos y más moderada sobre Gram negativos, y luego de su introducción a la práctica clínica fueron rápidamente vencidas por la emergencia de β -lactamasas transferibles de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*. Cefazolina se ha empleado ampliamente para el tratamiento de infecciones de piel por *S. aureus* meticilino sensible, y gracias a sus elevadas concentraciones biliares, para profilaxis quirúrgica y tratamiento de infecciones abdominales.

Las cefalosporinas de segunda generación (Ej. cefuroxime), pueden administrarse por vía oral o parenteral, y son estables frente a penicilinasas. Ampliaron su espectro hacia los Gram negativos como enterobacterias, *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. y *Moraxella* spp, pero son menos activas sobre Gram positivos.

Un grupo particular son las cefamicinas (Ej. cefoxitin), que presentan un espectro expandido hacia los anaerobios y además son estables frente a penicilinasas y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las cefalosporinas de espectro expandido o de tercera generación (Ej. cefotaxime, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidime), ganaron actividad sobre Gram negativos, pero son menos activas frente a Gram positivos. Adicionalmente, ceftazidima y cefoperazona presentan actividad contra *P. aeruginosa*. Por otro lado, las cefalosporinas de cuarta generación (Ej. cefepime) presentan una mayor actividad sobre enterobacterias, cubriendo incluso aquellas que producen altos niveles de cefalosporinasas de tipo AmpC, y también sobre *P. aeruginosa*.

Finalmente, las cefalosporinas de quinta generación (ceftaroline, ceftobiprole), fueron desarrolladas para el tratamiento de SAMR, ya que presentan alta afinidad por las PBP2a[48,56].

Pocos años después de la introducción las cefalosporinas de tercera generación para su uso clínico, surgieron en Gram negativos β -lactamasas de espectro extendido o BLEE con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera y hasta cuarta generación (ver más adelante). Es por ello que surge una clase particular de agentes conocidos como inhibidores de β -lactamasas (IBLs), en general sin actividad antimicrobiana propia, pero capaces de contrarrestar el efecto de estas enzimas. También se desarrollaron nuevas cefalosporinas, como ceftolozane, que combinado con tazobactam presenta una

potente actividad sobre *P. aeruginosa* y enterobacterias[48], y cefiderocol, una cefalosporina con una sustitución por un sideróforo que ingresa a la célula por un mecanismo de transporte de hierro y muy estable frente a β -lactamasas, incluyendo carbapenemasas[27].

3.1.5 Carbapenems

Los carbapenems son los β -lactámicos de mayor espectro y por mucho tiempo han sido considerados como agentes de última línea de defensa ante infecciones por BGN MDR[57]. Presentan una cadena lateral hidroxietil, que les brinda estabilidad frente a la mayoría de las β -lactamasas, con excepción de las carbapenemasas[56]. Se unen fuertemente a PBP2 de Gram negativos, pero también pueden inhibir PBP1a, 1b y 3, brindando más mecanismos de muerte bacteriana[48].

Imipenem fue el primer carbapenem de uso clínico, y se debe administrar en combinación con cilastatina dado que es hidrolizado por dehidropeptidasas I renales. Presenta buena actividad sobre Gram positivos, Gram negativos fermentadores y no fermentadores, así como anaerobios. Más tarde se desarrollaron meropenem, ertapenem y doripenem, con similar espectro, pero químicamente más estables, lo que permite su administración en infusión prolongada.

Meropenem es más activo que imipenem frente a enterobacterias, pero menos potente contra Gram positivos, además puede utilizarse para el tratamiento de meningitis ya que alcanza altas concentraciones en líquido cefalorraquídeo. Junto con doripenem, conservan actividad sobre *P. aeruginosa* con alteraciones en la porina OprD, que afectan significativamente la efectividad de imipenem.

Ertapenem presenta una vida media más prolongada que los otros carbapenems, posibilitando su administración una vez al día. Su espectro es similar a los otros sobre enterobacterias, pero carece de actividad sobre *P. aeruginosa*[48].

Antes de la introducción al uso clínico de las nuevas generaciones de inhibidores de β -lactamasas, las formulaciones incluyendo carbapenems fueron una de las opciones de tratamiento para infecciones por EPC, administrados en altas dosis, infusión prolongada y en combinación con otros agentes activos. En este sentido, se demostró una elevada eficacia para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* productor de KPC cuando los valores de CIM a meropenem son ≤ 8 mg/L[58].

3.1.6 Monobactams

Los monobactams son β -lactámicos monocíclicos, y aztreonam es el único aprobado para uso clínico dentro de esta clase. Se une fundamentalmente a las PBP3 de aerobios Gram negativos, y presenta actividad sobre enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp., pero no cubre anaerobios y Gram positivos[48,56]. Tiene como particularidad ser muy estable frente a la hidrólisis de metalo- β -lactamasas[48].

3.1.7 Inhibidores de β -lactamasas

La emergencia de resistencia enzimática a β -lactámicos mediada por β -lactamasas, fundamentalmente en Gram negativos a finales de los 70s, desembarcó en el desarrollo de enzimas que pudieran contrarrestar su actividad, conocidas como inhibidores de β -lactamasas (IBL)[59].

El ácido clavulánico fue el primer IBL en introducirse al uso clínico, y es un producto natural de *Streptomyces clavuligerus*. Inhibe β -lactamasas de clase A, con un espectro limitado a penicilinasas y cefalosporinasas (BLEE). A éste, le siguieron otros dos compuestos de actividad similar: sulbactam y tazobactam. Estos tres inhibidores son derivados de β -lactámicos (DBL), pero no presentan actividad antimicrobiana. Desde el punto de vista funcional, se los conoce como inhibidores irreversibles “suicidas” ya que forman un complejo irreversible con la β -lactamasa, que involucra la acilación del

sitio activo con hidrólisis del inhibidor, y la consiguiente inactivación de la enzima. Los IBL actúan de manera sinérgica con β -lactámicos y deben combinarse con agentes con características farmacocinéticas similares. Dentro de las combinaciones de β -lactámico-IBL (BL-IBL) más utilizadas se encuentran ácido clavulánico con amoxicilina (para administración por vía oral) o con ticarcilina (parenteral), ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam[48,59]. Más recientemente, se combinó piperacilina con ceftolozane, una nueva cefalosporina similar a ceftazidime, pero con mayor tolerancia a mecanismos de resistencia como eflujo, pérdida de porinas y sobreproducción de AmpC[58].

La nueva generación de IBLs no son derivados de β -lactámicos y surgen con el objetivo de ampliar el espectro de los IBL clásicos para cubrir β -lactamasas de clase B, C o D, fundamentalmente carbapenemasas. Avibactam presenta una estructura diazo-biciclo-octano (DBO), y se destaca por su potente capacidad de inhibición de BLEEs así como serin-carbapenemasas, β -lactamasas de clase C y algunas de clase D, pero no clase B. A diferencia de los IBL clásicos, avibactam establece una unión covalente reversible con las β -lactamasas, por lo que se recicla luego de la inactivación de las mismas. Se encuentra disponible para uso clínico en combinación con ceftazidime, mientras que avibactam-aztreonam se encuentra en desarrollo fundamentalmente para su uso contra carbapenemasas de clase B[48,59].

Relebactam también es un DBO, y se desarrolló en combinación con imipenem-cilastatina. Presenta un espectro similar a avibactam pero con menos actividad sobre β -lactamasas de clase D[59]. Otros IBL de tipo DBO se encuentran en fases más tempranas de desarrollo, como nacubactam (para combinación con meropenem), zidebactam (con cefepime) y durlobactam (con sulbactam)[59,60].

Otra clase de nuevos IBL está conformada por derivados de ácido borónico, los cuales se destacan por ser potentes inhibidores de serin- β -lactamasas. El primero de su clase fue vaborbactam, el cual es un IBL competitivo que se une por enlaces covalentes reversibles a su blanco. Presenta actividad sobre β -lactamasas de clase A, incluyendo carbapenemasas, y clase C, y se utiliza en combinación con meropenem[59].

Nuevos IBL en desarrollo de tipo boronato bicíclicos incluyen a taniborbactam (para combinación con cefepime), que agrega actividad sobre β -lactamasas de clase B[61], xeruborbactam activo también frente a β -lactamasas de clase B y D, y ledaborbactam etzadroxil activo sobre BLEE y serin-carbapenemasas[60].

3.2 Otros agentes antimicrobianos

La emergencia de bacilos Gram negativos con perfiles MDR/XDR/PDR, particularmente aquellos resistentes a carbapenems, impulsó una reinención de los antibióticos de uso corriente, así como a la recuperación de viejos antibióticos. También surgieron nuevas drogas que de a poco han sido aprobadas para diferentes usos[58]. Si bien no es el objetivo centrarse en cada uno de estos antibióticos, se mencionarán sus aspectos más importantes y principales usos. Los nuevos agentes derivados de β -lactámicos, se desarrollarán con más detalle en la siguiente sección.

3.2.1 Colistina

Las polimixinas (colistina y polimixina B) se encontraban en desuso, pero se recuperaron como último recurso a raíz del aumento de la RAM y de la falta de nuevos antibióticos. La colistina es activa frente a *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y enterobacterias, excepto aquellas del grupo *Proteaeae*, que son naturalmente resistentes. Se recomienda su uso en régimen basado en dosis carga y en el clearance de creatinina[58]. Presenta baja eficacia como monoterapia, por lo que se debe utilizar en

combinación con otra droga activa, y además es neuro y nefrotóxica[27]. Actualmente la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) desalienta fuertemente el uso de colistina para el tratamiento de *Enterobacterales* resistentes a carbapenems y *P. aeruginosa* difícil de tratar (DTR-Pa), que podría considerarse una alternativa únicamente ante infección del tracto urinario (ITU) baja no complicada si no hay otras opciones terapéuticas[32].

3.2.2 Fosfomicina

La fosfomicina sódica de administración intravenosa fue reintroducida en la práctica clínica hace aproximadamente 15 años[58], mientras que en su formulación para administración por vía oral (fosfomicina-trometamol) ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de ITU no complicada por *E. coli*. Se ha reportado desarrollo de resistencia *in vivo*, por lo que debe utilizarse en combinación con otros antibióticos activos. Existen dificultades para la determinación de la susceptibilidad con métodos de laboratorio clínico convencionales y automatizados, siendo agar dilución el único método válido para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)[27], así como falta de consenso en los puntos de corte entre las distintas guías internacionales[62,63].

3.2.3 Tigeciclina

Es una gliciliciclina con amplio espectro sobre Gram negativos con excepción de *P. aeruginosa* y grupo *Proteaeae*[27]. Su uso está aprobado para el tratamiento de infecciones intraabdominales (IIA) e infecciones de piel y tejidos asociados, pero no alcanza buenas concentraciones séricas y pulmonares. Se recomienda su uso en dosis altas (superior a dosis estándar) y en combinación con otros agentes para el tratamiento de EPC[58].

3.2.4 Eravaciclina

Es una tetraciclina sintética, con mecanismo similar a la tigeciclina[58]. Al igual que tigeciclina, es una alternativa para el tratamiento de IIA, infecciones de piel y tejidos asociados, respiratorias y osteomielitis por enterobacterias resistentes a carbapenems[32].

3.2.5 Aminoglucósidos

Este grupo de antibióticos ha sido ampliamente usado para el tratamiento de infecciones por Gram negativos, pero presentan niveles variables de susceptibilidad debido a la presencia de enzimas modificadoras, que en general son cotransferidas con otros determinantes de resistencia. Por otro lado, la presencia de metiltransferasas del ARNr confiere resistencia a todos los aminoglucósidos y frecuentemente se asocian a NDM-1. Su uso como monoterapia se recomienda solo para el tratamiento de ITU, mientras que para otros focos se deben combinar con otro agente activo. Presentan toxicidad renal[58]. Actualmente, para el caso de *P. aeruginosa*, tanto CLSI como EUCAST eliminaron los puntos de corte para gentamicina, y amikacina solo presenta puntos de corte para foco urinario[62,63].

3.2.6 Plazomicina

Es un aminoglucósido sintético, resistente a las enzimas modificadoras de estos antibióticos, pero que puede ser afectado por metiltransferasas de ARNr. Presenta potente actividad contra *Enterobacterales* pero menor contra *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Es una alternativa terapéutica frente a ITU complicada, pielonefritis y podría considerarse para neumonía[58].

4 RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS

Se reconocen tres tipos de mecanismos de resistencia a β -lactámicos: 1) resistencia enzimática mediada por β -lactamasas; 2) modificación del sitio blanco (PBPs); 3) alteraciones en la permeabilidad y eflujo[64].

4.1 Modificación del sitio blanco

El mecanismo más notorio de alteración en las PBPs es el de la metilino resistencia en *S. aureus*. Este involucra la adquisición de una nueva PBP, denominada PBP2a (codificada por el gen *mecA*), la cual presenta menor afinidad por los β -lactámicos y confiere resistencia a toda esta familia de antibióticos con excepción de las cefalosporinas de quinta generación[50,65].

Los genes que codifican las PBPs pueden sufrir modificaciones mediadas por la recombinación de ADN foráneo a través de transformación, originando genes en mosaico que codifican PBPs de menor afinidad. Esto ocurre en especies bacterianas que son naturalmente competentes como *S. pneumoniae*, *Streptococcus* spp. del grupo viridans, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

Las PBPs también pueden perder afinidad debido a mutaciones puntuales en los genes que las codifican, mecanismo que se ha descrito más frecuentemente en PBP5 de *Enterococcus faecium*, o en PBP3a/3b de *H. influenzae*. Finalmente, la sobreexpresión de PBP es un mecanismo muy poco frecuente[65].

4.2 Alteraciones en la permeabilidad y eflujo

Estos mecanismos tienen en común la capacidad de provocar una disminución neta de la concentración del antibiótico a nivel intracelular, lo cual puede ocurrir por dos mecanismos diferentes pero eventualmente complementarios, que involucran alteraciones en la expresión de porinas y de bombas de eflujo[50].

Las porinas son componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que consisten en canales de proteínas barril- β que permiten el ingreso de moléculas hidrofílicas menores de 600 Da, incluyendo algunos antibióticos, entre ellos los β -lactámicos[64]. Las mutaciones que generan cambios en los mecanismos de regulación de la expresión de estas estructuras, pueden producir porinas no funcionales o ausentes[50].

Las bombas de eflujo son proteínas transmembrana que expulsan activamente compuestos tóxicos a través de las envolturas celulares, entre ellos algunos antibióticos. Son particularmente importantes en Gram negativos ya que, junto con la baja permeabilidad de la membrana externa, los hacen naturalmente resistentes a varios antibióticos. Los transportadores de tipo RND (*resistance-nodulation-division*) son los más relevantes en Gram negativos de interés clínico, ya que su sobreexpresión contribuye a fenotipos de MDR[64]. La sobreexpresión de bombas de tipo AcrAB-TolC y MexAB-OprM en enterobacterias y *P. aeruginosa* respectivamente contribuyen a la resistencia a β -lactámicos[50].

Finalmente, las condiciones en las que se desarrollan las bacterias también pueden afectar su capacidad de resistir o tolerar la actividad de los antimicrobianos. Un ejemplo de esto es el desarrollo de biofilms (ver más adelante), que son capaces de tolerar la acción de los antibióticos, debido a factores relacionados con modificaciones del metabolismo bacteriano, así como la reducida permeabilidad de la matriz extracelular que forma parte de estas estructuras, mutaciones en genes relacionados con la expresión de β -lactamasas o con la impermeabilidad y eflujo entre otros[64,66].

4.3 Resistencia mediada por β -lactamasas

La producción de β -lactamasas es el mecanismo más relevante de resistencia a β -lactámicos en bacterias Gram negativas. El mecanismo por el cual inactivan a estos antibióticos consiste en la unión de la enzima al β -lactámico, la ruptura del enlace amida presente en el anillo β -lactámico del antibiótico, seguido de la adición de una molécula de agua al anillo abierto[50].

Las β -lactamasas pueden clasificarse en función de su estructura molecular en cuatro clases, de acuerdo a lo propuesto por Ambler (A, B, C y D)[67], o en grupos funcionales según su perfil de hidrólisis y su comportamiento frente a inhibidores (clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros)[59]. A su vez, en función de la estructura del sitio activo, las β -lactamasas de clase A, C y D se agrupan como serin- β -lactamasas, por la presencia de serina, mientras que las de clase B son metalo- β -lactamasas (MBLs) porque presentan Zn^{2+} [47]. En el caso de las serin- β -lactamasas, se unen a los β -lactámicos mediante puentes de hidrógeno y luego la enzima es acilada por un residuo de serina. La desacilación del complejo β -lactámico- β -lactamasa se da por la adición de una molécula de agua, que abre el anillo del antibiótico y lo libera inactivado, regenerando a la β -lactamasa activa.

En el caso de las β -lactamasas de clase B, también conocidas como metalo- β -lactamasas, requieren uno o dos Zn^{2+} para mediar el ataque nucleofílico del anillo β -lactámico, que provoca su hidrólisis e inactivación[59].

A continuación, se describirán las principales características de cada clase (resumidas en la [Tabla 1](#)), y más adelante se profundizará específicamente en las carbapenemasas.

Clasificación		Sustratos	Inhibidas por:				Ejemplos
Ambler: Sitio catalítico (espectro)	Bush-Jacoby-Medeiros: Sitio catalítico (espectro)		DBL	DBO	BOR	Otros	
A: Serina (variable)	2a: Serina (penicilinasas)	Penicilinas	+	+	+		Penicilinasas de Gram +
	2b: serina (penicilinasas)	Penicilinas y C1G	+	+	+		β -lactamasas de espectro ampliado (TEM-1, SHV-1)
	2br: serina (BLEE)	Penicilinas y C1G a C3G	+	+	+		β -lactamasas de espectro extendido (CTX-M, PER, derivadas de SHV y TEM)
	2br: serina (resistentes a DBL)	Penicilinas	-	+	+		TEM-30, SHV-27
	2c: serina (penicilinasas)	Penicilina carbenicilina	+	+	+		PSE (CARB)
	2f: serina (carbapenemasas)	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams	-	+	+		KPC, SME, NMC-A, GES-2
B: Metal (Zn^{2+}) (carbapenemasas)	3: Metal (carbapenemasas)	Mayoría de los β -lactámicos incluyendo carbapenems, excepto monobactams	-	-	-	EDTA, taniborbactam	NDM, VIM, IMP
C: serina (cefalosporinasas)	1: serina (cefalosporinasas)	Penicilinas y C1G a C3G	-	+	+	Cloxacilina	AmpC cromosómicas, CMY, DHA
D: serina (oxacilinasas)	2d: serina (oxacilinasas)	Penicilinas, cloxacilina, puede incluir C3G o carbapenems	-	+(*)	+(*)	NaCl	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23, OXA-48

Tabla 1. Clasificación de las β -lactamasas de acuerdo a los esquemas de Ambler y Jacoby-Bush-Medeiros. Adaptada de Bush K. & Bradford P. *Nat Microbiol Rev.* 2019;17(5):295-306[59]. (*)Inhibición variable. Abreviaturas: BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; C1G, cefalosporinas de primera generación; C3G, cefalosporinas de tercera generación; DBL, inhibidores derivados de β -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam); DBO, inhibidores tipo diazo-biciclo-octano (avibactam, relebactam, etc); BOR, ácido borónico y derivados (vaborbactam, etc).

4.3.1 β -lactamasas de clase A

La clase A de Ambler es la más numerosa, y está constituida por enzimas con diferentes espectros de acción que incluyen de penicilinasas a carbapenemasas. Dentro de las de espectro más estrecho, se

encuentran las penicilinasas de Gram positivos, incluyendo las estafilocócicas (grupo funcional 2a), y las penicilinasas de espectro ampliado que además de penicilinas pueden hidrolizar cefalosporinas de espectro estrecho (de primera generación), entre las que se encuentran enzimas como TEM-1, TEM-2 y SHV-1 halladas Gram negativos como en enterobacterias y *Neisseria* spp.[59,68]. Ambos grupos son inhibibles por IBL clásicos, avibactam y otros IBL de tipo DBO y boronato bicíclicos[59].

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) también pertenecen a la clase A y constituyen el grupo funcional 2be. Expanden su capacidad hidrolítica con respecto a los grupos anteriores hacia cefalosporinas de mayor espectro (2ª, 3ª y, algunos tipos, 4ª generación) y aztreonam, y son inhibibles por los mismos IBL. Las primeras BLEE derivaron de TEM-1,-2 y SHV-1, a partir de mutaciones en los genes *bla* que las codifican y amplían su espectro. Posteriormente surgen las cefotaximasas de tipo CTX-M, que rápidamente se diseminaron en *Enterobacterales* por vía horizontal. Otras familias relevantes incluyen GES, PER y VEB[59,68].

Otras enzimas derivadas de TEM y SHV constituyen el subgrupo 2br, que presentan modificaciones que confieren resistencia a ácido clavulánico, pero se mantienen susceptibles a cefalosporinas, en general incluyendo las de espectro estrecho[59].

Finalmente, las serin- β -lactamasas de clase A de mayor espectro son las carbapenemasas (llamadas también serin-carbapenemasas), y constituyen el grupo funcional 2f. Dentro de este grupo se destaca KPC por su amplia diseminación en *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Las serin-carbapenemasas pueden ser inhibidas por nuevos IBL como avibactam, vaborbactam y otros derivados de DBO y ácido borónico, pero no por IBL clásicos como ácido clavulánico y tazobactam[59].

4.3.2 β -lactamasas de clase B

Las β -lactamasas de la clase molecular B de Ambler integran el grupo 3 de la clasificación de Bush–Jacoby–Medeiros. Como se mencionó anteriormente, se destacan por presentar Zn^{2+} en el sitio activo, por lo que reciben el nombre de metalo- β -lactamasas (MBLs). Son fundamentalmente carbapenemasas, con un gran espectro de hidrólisis sobre la mayoría de los β -lactámicos con excepción de monobactams. Debido a la particular composición de su sitio activo, no son inactivadas por la mayoría de los IBLs, sino que su actividad se inhibe con quelantes de iones divalentes como EDTA o ácido dipicolínico[59,68], así como el nuevo IBL en desarrollo taniborbactam[61].

4.3.3 β -lactamasas de clase C

Las β -lactamasas de clase C de Ambler constituyen un grupo de enzimas conocido como AmpC y pertenecen al grupo funcional 1. Son fundamentalmente cefalosporinasas, con potente actividad sobre cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidime, cefotaxime y ceftriaxona, así como sobre cefamicinas (cefoxitina). Tienen menos actividad sobre penicilinas que sobre cefalosporinas y no son inhibibles por IBL DBL clásicos como ácido clavulánico. Pueden ser inactivadas por cloxacilina, avibactam y otros IBL de nueva generación. Estas enzimas pueden estar codificadas en cromosomas o en plásmidos de bacterias Gram negativas. Las AmpC cromosómicas son características de especies como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* y *P. aeruginosa*, y si bien su expresión basal es baja, puede aumentar por inducción por ampicilina, amoxicilina, imipenem o ácido clavulánico. Por otro lado, las AmpC plasmídicas, como CMY, ACT, DHA, suelen expresarse en niveles elevados de forma constitutiva[59,68].

4.3.4 β -lactamasas de clase D

Las β -lactamasas de clase D, conocidas como oxacilinasas (OXA), constituyen el grupo funcional 2d y están representadas por una gran cantidad de enzimas con variabilidad de sustratos. En general presentan buena actividad hidrolítica sobre oxacilina y cloxacilina, y algunas pueden hidrolizar penicilinas de mayor espectro, cefalosporinas (espectro similar a BLEE) o carbapenems. En general son inhibibles por cloruro de sodio, mientras que los IBL DBL y DBO presentan actividad variable[59,68].

5 CARBAPENEMASAS

Las infecciones por bacilos Gram negativos MDR y XDR se han convertido en uno de los principales desafíos a los que se enfrentan las instituciones de salud a nivel global, debido a las limitadas opciones terapéuticas y a su asociación con altas tasas de mortalidad y mayores costos económicos. Los microorganismos que más contribuyen a estos fenotipos son los resistentes a carbapenems, particularmente por producción de carbapenemasas, la cual ha aumentado gradualmente desde el 2005[9]. La producción de carbapenemasas constituye el principal mecanismo de resistencia a carbapenems en bacterias Gram negativas y se han diseminado ampliamente en los últimos 25 años[10].

Como se mencionó anteriormente, existen β -lactamasas con actividad carbapenemasa de las clases A, B y D[59], y su creciente prevalencia y diseminación se deben fundamentalmente a su asociación con elementos genéticos móviles (EGM) que permiten su movilización intracelular e intercelular[15,69,70].

En esta sección se abordarán las principales carbapenemasas de interés clínico y su epidemiología con énfasis en Sudamérica que además se resume en la Figura 4 que se encuentra al final de la sección. Luego se describirán los principales mecanismos y plataformas asociadas a la diseminación de genes codificantes de RAM, específicamente de carbapenemasas.

5.1 Carbapenemasas de clase A

Dentro de las carbapenemasas de clase A, KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) es la más ampliamente distribuida en todo el mundo[71]. Otras enzimas relevantes de este grupo incluyen GES (*Guiana extended spectrum β -lactamase*), IMI (*imipenem resistant*), NMC-A (*non-metallo carbapenemase*), SME (*Serratia marcescens*) y SFC (*Serratia fonticola carbapenemase*)[15].

5.1.1 KPC

A finales de los 90s - principios de los 2000s emergieron los primeros reportes de serin-carbapenemasas plasmídicas de tipo bla_{KPC} , que rápidamente se diseminaron entre *Enterobacteriales* de diferentes partes del mundo[10,50].

Además del amplio espectro de hidrólisis de estas enzimas, capaces de inactivar penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapenems, la presencia de bla_{KPC} suele acompañarse de determinantes de resistencia a otros grupos de antibióticos, dando lugar a perfiles de MDR e incluso PDR[50,71]. Como ya se mencionó, no son inhibibles por IBLs DBL, pero sí por la nueva generación de IBLs como avibactam, relebactam y vaborbactam. Sin embargo, desde la expansión del uso de ceftazidime-avibactam, se han descrito numerosas variantes de bla_{KPC} resistentes a la inhibición por avibactam, que, como consecuencia de esta ganancia de función pierden la capacidad de hidrolizar carbapenems[72].

En la base de datos de β -lactamasas (BLDB, <http://bldb.eu/>) se indica la existencia de 206 variantes de bla_{KPC} , mientras que en el catálogo de genes de referencia (RefGene, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/>) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) se reportan 194 (al 19 de febrero de 2024). Las variantes más frecuentemente reportadas y más diseminadas de bla_{KPC} son bla_{KPC-2} y bla_{KPC-3} [10,50]. A su vez, los reportes de nuevos alelos han aumentado drásticamente desde 2019, debido a la emergencia de variantes resistentes a ceftazidime-avibactam, derivadas sobre todo de bla_{KPC-2} y bla_{KPC-3} [71].

bla_{KPC-2} y bla_{KPC-3} han sido diseminados a nivel mundial fundamentalmente por cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes al complejo clonal CC258, sobre todo al ST258 de los clados I (asociado principalmente con bla_{KPC-2}) y II (asociado principalmente con bla_{KPC-3}). De todos modos, genes bla_{KPC} se han hallado frecuentemente asociados a otros secuenciotipos, así como en otras especies de *Enterobacterales*, y en *P. aeruginosa* [15,50]. Otros clones relevantes de *K. pneumoniae* asociados a la diseminación de estos genes incluyen ST11, predominante en China, ST512 prevalente en Italia y ST437 predominante en Brasil [71], a su vez los ST25, ST147 y ST512 se han descrito en varios países de Europa y las Américas [50]. Enzimas de tipo KPC se han descrito en varios clones de alto riesgo de *P. aeruginosa* con ST235, ST111, ST244, ST233, ST277 y ST654 [28].

La diseminación de KPC ha resultado en la pandemia más exitosa por microorganismos MDR, fundamentalmente gracias al éxito de diseminación y endemidad de *K. pneumoniae* ST258. KPC es endémica en países como Grecia, Israel, Colombia, Brasil, y varias regiones de Estados Unidos [15].

Particularmente en sudamérica, KPC se ha hallado en la mayoría de los países. El primer reporte fue un brote de *K. pneumoniae* portadora de bla_{KPC-2} en 2005 en Colombia, constituyendo el primer brote debido a carbapenemasas en el continente. A esto le siguió la emergencia de bla_{KPC-3} y una amplia diseminación de ambos en dicho país. En Argentina, *K. pneumoniae* ST258 productora de KPC-2 se diseminó en forma clonal, y en menor frecuencia se reportó en otras especies de *Enterobacterales*, al igual que KPC-3, y en *P. aeruginosa* asociada al ST654 [73]. Más recientemente se observó un cambio epidemiológico en este país debido a la diseminación de linajes más virulentos de *K. pneumoniae* hipermucoviscosa como ST11 y ST25, a la vez que emergió ST307 con bla_{KPC-3} [74]. En Brasil se ha reportado bla_{KPC-2} en varios clones de *K. pneumoniae* del CC11/258 como ST11, ST258, ST437 y ST340, pero también se ha reportado entre otros *Enterobacterales*, con gran prevalencia de *Enterobacter* spp. en el sur, *P. aeruginosa* y *P. putida*; mientras que bla_{KPC-3} es esporádico [73]. bla_{KPC-2} también se reportó en Venezuela, Chile, Ecuador, Perú y Uruguay; en estos dos últimos en asociación a *K. pneumoniae* ST258 [75,76], y más adelante genes bla_{KPC} se reportaron en *P. aeruginosa* de Ecuador [77] y Perú [78], mientras que bla_{KPC-3} se encontró en carne aviar en venta para consumo también en Perú [79]. Por otra parte, desde la introducción del uso de ceftazidime-avibactam en Argentina, se reportaron apariciones esporádicas y brotes por microorganismos portadores de genes bla_{KPC} codificantes de variantes resistentes a la actividad de avibactam como KPC-8, KPC-31 y KPC-115 (en *K. pneumoniae*) [80] y KPC-31 también en *P. aeruginosa* [81].

5.1.2 GES

No todas las enzimas de tipo GES tienen la capacidad de hidrolizar carbapenems. Las variantes que presentan un cambio en el aminoácido 170 de glicina a asparagina o serina con cadena polar no cargada son las que adquieren actividad carbapenemasa [70].

Actualmente tanto en la base de datos BLDB como en RefGene del NCBI se reportan 59 alelos de GES, de los cuales 20 y 22 se indican como carbapenemasas respectivamente (al 2 de marzo de 2024). Cabe

destacar que entre ambas bases existen algunas diferencias en los alelos que reportan como variantes carbapenemasa de *bla*_{GES}.

Los genes que codifican GES carbapenemasas son más frecuentes en *P. aeruginosa* y suelen hallarse en integrones de clase 1 como único cassette o en compañía de determinantes de resistencia a otros antibióticos como *aacA*, *aadA* o *aadB*[70].

Estos genes son poco frecuentes en la región, con la mayoría de los reportes en *P. aeruginosa* asociados a integrones de clase 1, y en menor medida en plásmidos de *Enterobacterales* y *A. baumannii*. *P. aeruginosa* productora de GES-2 y GES-5 se reportaron en Argentina y Brasil respectivamente, mientras que en este último también se detectó en *Enterobacterales* al igual que GES-16[73,75].

5.1.3 Otras carbapenemasas de clase A

Las primeras carbapenemasas de clase A en ser identificadas fueron SME, IMI y NMC-A en las décadas de los 80s-90s. Son especie-específicas, el gen *bla*_{SME} se ha detectado en el cromosoma de *S. marcescens*, mientras que *bla*_{IMI} y *bla*_{NMC-A} en el cromosoma de *E. cloacae* complex, y se caracterizan por conferir resistencia a carbapenems, pero mantienen sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro. Los reportes de estas enzimas han sido limitados, probablemente debido a que la mayoría de los laboratorios no las buscan activamente. Los reportes de estas carbapenemasas cromosómicas son esporádicos, con varios brotes reportados de *S. marcescens* con *bla*_{SME} en Estados Unidos y Canadá, y reportes crecientes después del 2010 en Reino Unido, otros países de Europa y Latinoamérica[50,68]. En Sudamérica, NMC-A se reportó en Argentina en el 2000 y luego en Colombia en 2009, mientras que SME-4 fue hallada en *S. marcescens* de Argentina y Brasil[75].

Por último, una nueva carbapenemasa fue descrita en Brasil en 2015 en *K. pneumoniae* designada como BKC-1 (*Brazilian Klebsiella Carbapenemase*). Esta serin-carbapenemasa de clase A presenta amplio espectro sobre todos los β-lactámicos excepto cefamicinas[73]. Más adelante en el mismo país se describió una nueva variante de esta carbapenemasa (BKC-2) en un aislamiento de *Enterobacter hormaechei* que también portaba *mcr-9.1*[82].

5.2 Carbapenemasas de clase B

Las carbapenemasas de clase B, también conocidas como metalo-β-lactamasas (MBL), son metaloproteínas dependientes de zinc. Presentan un espectro de hidrólisis amplio que incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenems, pero no monobactams. Además, a diferencia de varias serin-β-lactamasas, no son inhibibles por los IBL comerciales. Las MBL se dividen en tres subclases, B1, B2 y B3, pero desde el punto de vista clínico las más relevantes son las B1 como NDM, VIM e IMP[15,57].

5.2.1 IMP

Las primeras MBL que emergieron como un problema clínico fueron las de tipo IMP (*Imipenemase*)[57]. IMP-1 surgió en Japón en 1991 ocasionando una gran epidemia asociada a un plásmido que contenía *bla*_{IMP-1} en un integrón de clase 1, que inicialmente se diseminó entre *P. aeruginosa* y luego llegó a *Enterobacterales* y *A. baumannii*[15,70].

Las enzimas de tipo IMP presentan gran capacidad hidrolítica sobre imipenem, y algunas de sus variantes pueden presentar sustituciones que afectan la capacidad de hidrolizar penicilinas[57]. La base de datos BLDB reporta 102 variantes de *bla*_{IMP}, mientras que RefGene del NCBI presenta 98 (al 2 de marzo de 2024).

*bla*_{IMP-1} es el alelo más frecuente y presenta distribución mundial, mientras que *bla*_{IMP-9} y *bla*_{IMP-6} se encuentran más confinadas a China y Corea del Sur respectivamente[70]. De todos modos, IMP representa un problema sobre todo en Japón y Taiwán donde es endémica, y otros países del sudeste asiático, aunque cada vez son más frecuentes los reportes en oriente medio y Australia[50,57]. En general se encuentra formando parte de integrones de clase 1 convencionales o complejos[50,70]. En Sudamérica, al igual que en el resto del mundo, los reportes de *bla*_{IMP} son esporádicos. Varios alelos de *bla*_{IMP} se han reportado en *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. en Brasil. En Argentina, IMP-1 se halló en *Acinetobacter* spp., mientras que IMP-13 e IMP-16 se encontraron en *P. aeruginosa*, e IMP-8 en diversos *Enterobacterales*. Otros reportes de IMP en la región incluyen Perú, Venezuela y Colombia[73,75], y más adelante en Paraguay en *Acinetobacter* sp.[83] y Ecuador en varios bacilos Gram negativos[77].

5.2.2 VIM

VIM-1 (*Verona integron-encoded MBL*) fue hallada en Verona en 1996 en un aislamiento de *P. aeruginosa*, seguida del hallazgo de VIM-2 en 1997 en Marsella[15,70]. En la base de datos BLDB se encuentran reportados 86 alelos de *bla*_{VIM}, mientras que en RefGene son 84 (al 2 de marzo de 2024). Los genes *bla*_{VIM} suelen encontrarse incorporados como cassettes en integrones de clase 1 tanto convencionales como complejos (ver más adelante)[57,70].

Si bien *bla*_{VIM-1} fue hallada en *P. aeruginosa*, actualmente se encuentra más diseminada en *Enterobacterales* como *K. pneumoniae* y *E. cloacae*[50,57], mientras que *bla*_{VIM-2} es el alelo más frecuente en el mundo y se asocia sobre todo a *P. aeruginosa*[15,57]. VIM-1 es endémica en Grecia asociada con *K. pneumoniae* y *E. coli*, mientras que en otros países de Europa se han reportado brotes por *Enterobacterales* productores de VIM, entre ellos Italia[15,50]. Asimismo, la presencia de *bla*_{VIM-2} se ha asociado a clones de alto riesgo MDR/XDR de *P. aeruginosa* como ST111 y ST233 diseminados en varios países de Europa, Asia y América[29], además del emergente ST309[28].

En Sudamérica, los primeros reportes de *Pseudomonas* spp. con *bla*_{VIM-2} fueron en Venezuela y Chile, seguido de numerosos casos en Brasil, Colombia, Argentina[73] y Uruguay[84]. Otras variantes como *bla*_{VIM-8}, *bla*_{VIM-11} y *bla*_{VIM-36} se hallaron en *P. aeruginosa* en Colombia, Argentina y Brasil respectivamente, mientras que en *Enterobacterales* se reportaron *bla*_{VIM-24} en Colombia, *bla*_{VIM-2} y *bla*_{VIM-16} en Argentina[73,75]. Finalmente, en 2022 en Chile se reportó una nueva variante de VIM, VIM-80, en un aislamiento de *P. aeruginosa* del ST654, productor además de NDM-1[85].

5.2.3 NDM

NDM-1 (*New Delhi MBL*) fue descrito en 2008, en *K. pneumoniae* aislada de un paciente sueco que había recibido atención médica en Nueva Delhi, India[15,57]. Estudios retrospectivos indicaron que *bla*_{NDM-1} probablemente estuviese circulando en India desde al menos el año 2006[50,57].

Las bases de datos BLDB y RefGene reportan 62 y 60 alelos de *bla*_{NDM} respectivamente (al 2 de marzo de 2024). Actualmente *bla*_{NDM} se encuentra diseminado en todo el mundo, fundamentalmente en *Enterobacterales* pero también se ha hallado en otros Gram negativos. Generalmente se asocia a perfiles de MDR por su diseminación en conjunto con otros determinantes de resistencia[50].

La diseminación global de NDM no se ha asociado a clones particulares, sino que se relaciona con su presencia en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad[15,57]. Adicionalmente, si bien se han detectado brotes en ciertas áreas geográficas, se halló poca relación entre los aislamientos implicados, demostrando promiscuidad entre los elementos genéticos implicados en su transmisión. De todos modos, se han detectado brotes asociados a ciertos secuenciotipos como ST16 y ST11 de *K.*

pneumoniae, y ST101 y ST167 de *E. coli*[50], y se ha hallado también en otros clones epidémicos como *K. pneumoniae* ST147 y *E. coli* ST131[15].

bla_{NDM} es endémico en India y Pakistán, y presenta alta prevalencia en el subcontinente indio, península balcánica y oriente medio[15,50,70]. Asimismo, existe preocupación por su diseminación comunitaria a través de vías ambientales, sobre todo en países de bajos recursos, debido por ejemplo a su hallazgo en aguas corrientes de India[15].

En Sudamérica, se reportó por primera vez en Colombia por un brote nosocomial, al que le siguieron numerosos reportes tanto en *Enterobacterales* como en *A. baumannii* y *P. aeruginosa*[73]. NDM-1 se ha reportado en *Enterobacterales* y *Acinetobacter* spp. de Brasil, Colombia, Ecuador y Perú, y en *Enterobacterales* de Argentina, Venezuela, Chile y Uruguay, *Acinetobacter* spp. de Paraguay[73,75,86]. Adicionalmente en Ecuador también se describió en *P. aeruginosa*[77]. Otras variantes de NDM emergieron más recientemente en la región como NDM-5 en Argentina[87], NDM-7 en Brasil[88] y Chile[89], y NDM-9 en Colombia[90].

5.2.4 Otras MBL de subclase B1

Otras MBL adquiridas, ya sea asociadas a plásmidos o a otros EGM presentan más relevancia en zonas geográficas puntuales. Entre ellas se encuentra SPM-1 (*São Paulo MBL*) descubierta en 2002 en Brasil y confinada casi exclusivamente a este país. Se ha diseminado fundamentalmente a través de *P. aeruginosa* ST277[57,70], que representa un clon de alto riesgo endémico en Brasil[29]. A diferencia de otros genes de MBL, *bla_{SPM-1}* no se asocia a integrones de clase 1, sino que se ha reportado acompañado de *groEL* y flanqueado por dos *ISCR4*[70]. En la región, el único reporte de SPM-1 fuera de Brasil se dio en Chile, pero en un paciente que había recibido atención médica previamente en Brasil[91].

Por otra parte, DIM-1 (*Dutch imipenemase*), GIM (*German imipenemase*) y TMB-1 (*Tripoli MBL*) se han hallado en integrones de clase 1[57] y se han reportado algunos países de Asia y Europa[70]. Otras MBL adquiridas con reportes limitados o de relevancia local son FIM-1 (*Florence imipenemase*) en Italia, HMB-1 (*Hamburg MBL*) en Alemania y Estados Unidos, SIM (*Seoul imipenemase*) en China, CAM (*Central Alberta MBL*) en Canadá, AIM (*Australian imipenemase*) en Australia[70] y AFM (*Alcaligenes faecalis metallo*) en China[92].

Finalmente, también se destaca que las primeras MBL de subclase B1 descritas corresponden a enzimas codificadas en el cromosoma de bacterias como *Bacillus cereus* (BcII) y *Bacteroides fragilis* (CfiA/CcrA), y luego se describieron Bla2 de *Bacillus anthracis*, BlaB de *Elizabethkingia meningoseptica* entre otras[57].

5.2.5 MBL de subclase B2 y B3

Las MBL de subclase B2 y B3 son fundamentalmente enzimas codificadas en cromosomas de distintos taxones bacterianos. Las enzimas de tipo B2 son carbapenemasas estrictas, mientras que las B3 presentan mayor espectro, con algunas excepciones.

Las MBL B2 se encuentran sobre todo en microorganismos ambientales, como CphA en *Aeromonas hydrophyla* y PFM en *Pseudomonas* spp. y si bien no representan una amenaza del punto de vista clínico, se han reportado casos de *Aeromonas* spp. resistentes a carbapenems.

Se han descrito diversas MBL B3, entre las que se destacan L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*, GOB de *Elizabethkingia meningoseptica*, POM de *Pseudomonas otitidis*, entre otras. Tanto *S. maltophilia* como *E. meningoseptica* son patógenos oportunistas en los que la presencia de estas carbapenemasas podría cobrar relevancia clínica[57]. Adicionalmente, en 2018 en Austria se describió una nueva MBL

de subclase B3 designada como LMB-1 (*Linz MBL*). El segundo reporte de bla_{LMB-1} fue en Argentina en un aislamiento clínico de *Citrobacter freundii*, que presentó al gen en un plásmido de tipo IncA/C₂ [93].

5.3 Carbapenemasas de clase D

Dentro de las carbapenemasas de clase D de relevancia clínica, se pueden reconocer dos grupos, aquellas asociadas a *A. baumannii* y las derivadas de OXA-48 asociadas sobre todo a *Enterobacterales*[50].

En relación a las carbapenemasas descritas en *A. baumannii*, se destaca por un lado OXA-51, codificada en el cromosoma de varias especies de *Acinetobacter* spp. que puede conferir resistencia de alto nivel a carbapenems cuando se inserta corriente arriba *ISAba1* que aporta un promotor que induce su sobreexpresión. Por otro lado, existen OXA carbapenemasas adquiridas por vía horizontal como OXA-23, que es la más frecuente en *A. baumannii*, y otras como OXA-58, OXA-24/40 y OXA-143[50].

Sin embargo, la carbapenemasa de tipo OXA que ha cobrado más notoriedad e importancia clínica en los últimos años ha sido OXA-48 y sus derivadas OXA-162, -181 y -232 (agrupadas como OXA-48-like). Estas enzimas hidrolizan eficientemente penicilinas y carbapenems, pero se saltean las cefalosporinas, y no son inhibidas por la mayoría de los IBL comerciales, con excepción de avibactam[15,50]. Asimismo, es frecuente su asociación con BLEE, confiriendo resistencia a la mayoría de los β -lactámicos[15].

bla_{OXA-48} deriva de bla_{OXA-54} , un gen codificante de β -lactamasa presente en el cromosoma de *Shewanella oneidensis*[94], cuya diseminación horizontal se atribuye a su inserción en un transposón compuesto Tn1999 cuya estructura se comentará más adelante.

Las enzimas de tipo OXA-48 son endémicas en Turquía, y se encuentran ampliamente diseminadas en varios países de Europa Occidental y el Mediterráneo[50,94], y sobre todo OXA-181 que es la segunda carbapenemasa más prevalente en India[94].

En Sudamérica los reportes de OXA-48-like. Argentina ha reportado una amplia diseminación en *Enterobacterales* de OXA-163, pero excepcionalmente no presenta buena actividad hidrolítica sobre carbapenems. La variante OXA-370 se ha reportado en Brasil y Chile, pero también provoca leves aumentos en la CIM a carbapenems[94]. OXA-48 se ha registrado en Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador[75] y Uruguay[95,96]. Posteriormente Perú reportó *Enterobacterales* productores de OXA-48-like[97] y el primer aislamiento portador de OXA-181 de Latinoamérica[98], que también había sido reportado en Brasil previamente pero de un caso importado[99]. Argentina, además de la amplia diseminación de OXA-163, reportó posteriormente la emergencia de OXA-247, OXA-438[100] y OXA-232[101], y Colombia OXA-244[73].

5.4 Producción de múltiples carbapenemasas

En aislamientos nosocomiales de bacilos Gram negativos, especialmente en *Enterobacterales*, uno de los principales problemas clínicos es la producción de múltiples β -lactamasas. La co-producción de carbapenemasas y BLEE o AmpC es muy frecuente, y en los últimos 15-20 años comenzaron a reportarse los aún más preocupantes aislamientos productores de doble carbapenemasa.

Hasta el 2018 los reportes de productores de doble carbapenemasa fueron fundamentalmente en *K. pneumoniae* y otros *Enterobacterales*, que constituyeron sobre todo casos aislados o puntuales. Las combinaciones de enzimas más frecuentes fueron las de tipo NDM+OXA-48 y KPC+VIM, y en menor medida VIM+OXA-48 y KPC+NDM[50].

En Sudamérica, el primer reporte de dobles productores de carbapenemasas fue en Colombia en 2012 donde emergió *P. aeruginosa* productora de KPC+VIM. A esto le siguieron casos de *Pseudomonas* spp.

productoras de NDM+KPC o NDM+VIM en el mismo país, y de KPC+SPM en Brasil. Posteriormente también se hallaron *Enterobacterales* co-productores de KPC+NDM o KPC+VIM en Colombia, KPC-2+NDM-1 en Brasil y KPC-2+VIM-2 en Venezuela. En *Acinetobacter* spp. también se reportaron dobles productores de carbapenemasas, sobre todo combinaciones con OXA-23 y KPC, NDM, VIM, y otras OXAs en Colombia y Venezuela[75]. Particularmente en Uruguay se reportó la producción conjunta de OXA-23 y OXA-58 en aislamientos clínicos de *A. baumannii*[102].

Sin embargo, debido a los desafíos clínicos y asistenciales impuestos por la pandemia de COVID-19, los países pertenecientes a la Red Latinoamericana de Vigilancia de la RAM (ReLAVRA, OPS), reportaron un aumento en la incidencia de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas, así como la emergencia de nuevas carbapenemasas y de dobles productores de carbapenemasas[4].

Previo a 2019 los reportes de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas (EdPC) eran limitados como se mencionó más arriba, incluyendo además el primer reporte en el continente de *K. pneumoniae* productora de KPC+NDM+VIM. En Uruguay, se habían reportado 5 EdPC, representando menos del 1% de los EPC del período 2017-2019, situación similar en Colombia y Brasil donde los EdPC representaban menos del 2% de las EPC.

Durante la pandemia de COVID-19, en el período 2020-2021, se reportó en Argentina la emergencia de KPC+NDM en *K. pneumoniae* provenientes de 21 hospitales, algunos de los cuales producían KPC+IMP. También emergieron KPC+NDM y NDM+OXA-48-like en Paraguay, Perú y Ecuador. Mientras que en los países que ya habían reportado KPC+NDM la incidencia aumentó a más del doble de lo reportado en el período anterior, por ejemplo, en Uruguay representaron un 5,6% de las CPE, y en Colombia sucedió lo mismo con los triple productores[103].

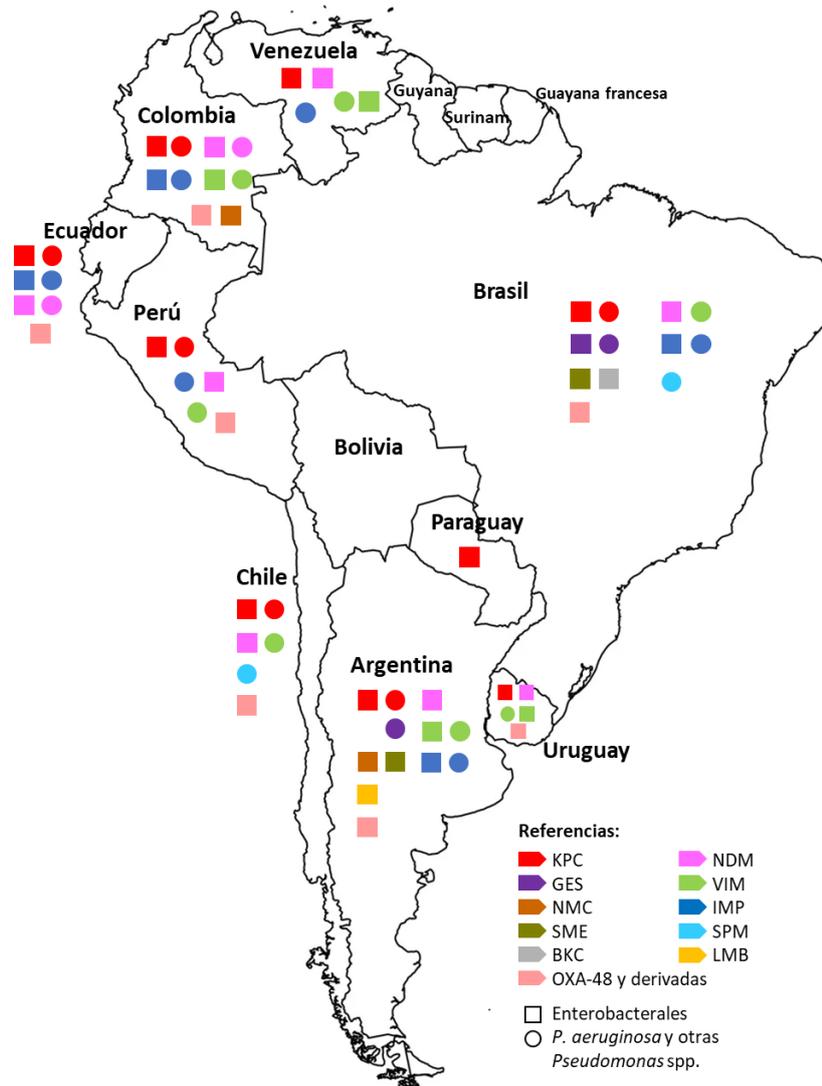


Figura 4. Esquema de las carbapenemasas reportadas en Sudamérica en *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* spp. Realizado con los datos incluidos en la Sección 5.

5.5 Elementos genéticos móviles implicados en la diseminación de RAM

Los elementos genéticos móviles (EGM) son segmentos de ADN que pueden moverse de un lugar a otro[104], ya sea de forma intracelular, es decir, dentro del genoma bacteriano (plásmido-cromosoma, plásmido-plásmido), o de manera intercelular (de una célula a otra)[69].

La mayoría de los EGM son elementos transponibles (secuencias de inserción y transposones), que pueden asociarse a diferentes genes y moverse por transposición a nuevas locaciones en el genoma, pero que no son autorreplicativos ni independientes[69,104]. Otros elementos relacionados son los integrones, que se asocian a genes de resistencia en forma de cassette y se mueven a través de recombinación sitio-específica. En general se encuentran múltiples copias de estos tipos de elementos en diferentes ubicaciones del genoma, por lo que pueden facilitar la recombinación homóloga[69].

Por otro lado, existen EGM encargados del intercambio intercelular, como los plásmidos y elementos integrativos conjugativos (ICE), mediante procesos de conjugación y movilización. Otros mecanismos de intercambio incluyen la transducción mediada por fagos, y la transformación que permite la incorporación de ADN extracelular[69].

5.5.1 Transposones

Los transposones son los EGM más frecuentes en el genoma bacteriano y pueden encontrarse tanto en el cromosoma como en plásmidos. Sus componentes básicos son uno o dos genes codificantes de una transposasa (*tnp*) e invertidos repetidos (IR) en ambos extremos. El mecanismo por el que se movilizan se denomina transposición y es mediado por la enzima transposasa, que reconoce tanto la secuencia de los IR como una secuencia blanco en el sitio donde se realizará la inserción. La secuencia blanco suele ser de 3 a 9 pb, y debido a su corta longitud y la baja especificidad de reconocimiento por la transposasa, el movimiento ocurre prácticamente de forma aleatoria[104].

Dentro de los mecanismos de movilización se destacan la transposición conservativa, que consiste en escindir al elemento de un sitio (donante) e insertarlo en otro (receptor); y la replicativa, en la que se genera una copia del elemento, ya sea por la formación de un cointegrado (transposición “*copy-and-paste*”) o a través de un intermediario doble hebra circular (transposición “*copy-out-paste-in*”)[69].

La transposición conservativa permite el movimiento dentro de una misma molécula o de una molécula a otra. En este evento, la transposasa se une a los IR en los extremos, realiza cortes y libera al transposón del sitio donante. Luego reconoce la secuencia blanco en el sitio receptor, introduce un corte escalonado, dejando extremos cohesivos, e inserta al transposón. Las simples hebras generadas por el corte son completadas por la maquinaria bacteriana, y por lo tanto la secuencia blanco queda duplicada en los extremos del transposón[104]. A estas duplicaciones se las conoce como repetidos directos (DR)[69].

En la transposición replicativa, la transposasa reconoce los IR y la secuencia blanco e introduce cortes escalonados en ambas. A través de estos extremos libres se genera un cointegrado en el que ambas moléculas permanecen unidas a través de monohebras del ADN del transposón. Luego la maquinaria celular sintetiza las hebras complementarias, duplicando al transposón, y generando un cointegrado de dobles hebras unidas por el mismo. Finalmente, una resolvasa separa el cointegrado por reconocimiento de dos secuencias de resolución interna (IRS o *res*) en ambas copias del transposón, entre las que realiza una recombinación que permite separar ambas moléculas[104].

5.5.2 Secuencias de inserción y transposones compuestos

Los transposones más simples y pequeños son las secuencias de inserción (IS - *insertion sequence*), que solo codifican la transposasa (genes *tnp*), en general a partir de dos marcos abiertos de lectura (ORF), y en los extremos presentan los IR izquierdo (IRL - *inverted repeat left*) y derecho (IRR - *inverted repeat right*) en relación a su orientación con respecto a la dirección de transcripción de *tnp* (Figura 5.a). Si bien las IS en general no movilizan genes accesorios, su inserción puede provocar la inactivación de un gen[69,104]. Adicionalmente, muchas IS presentan un promotor fuerte, que permite la expresión de un gen adyacente, un ejemplo de esto es la inserción de IS_{Aba1} corriente arriba de *bla*_{OXA-51} que confiere resistencia a carbapenems en *A. baumannii*[69]. Por otro lado, dos IS (iguales o relacionadas) pueden formar parte de un transposón compuesto y movilizarse como una unidad, junto con la región que ambas IS delimitan (Figura 5.b). De esta forma pueden movilizar genes determinantes de RAM[69,104]. Ambos tipos de transposón suelen movilizarse por transposición conservativa[104].

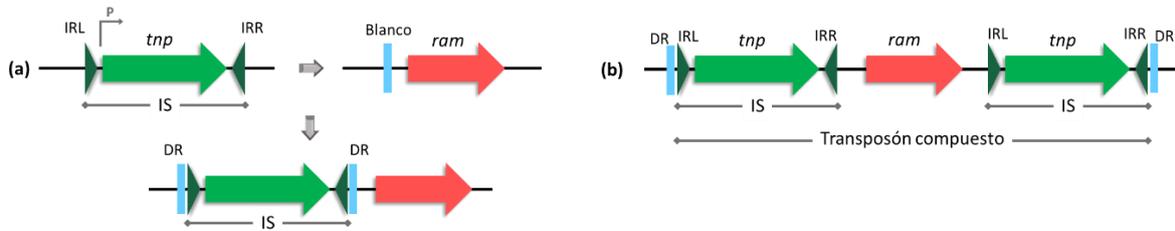


Figura 5. Estructura básica de **(a)** secuencia de inserción (IS); y **(b)** transposón compuesto, y su asociación con genes de resistencia. Abreviaturas: *tnp*, gen de la transposasa; *ram*, gen de resistencia a antibióticos; IRL, invertido repetido izquierdo; IRR, repetido invertido derecho; DR, repetido directo.

Algunos ejemplos de transposones compuestos relacionados con la movilización de carbapenemasas son Tn125 y Tn1999, asociados a la diseminación de *bla*_{NDM-1} y *bla*_{OXA-48} respectivamente. Habitualmente, el entorno de *bla*_{NDM-1} presenta la secuencia de inserción IS*Aba125* corriente arriba, ya sea completa o truncada, y que provee una región promotora; mientras que corriente abajo se encuentra el gen de resistencia a bleomicina *ble*_{MBL}. En ocasiones se pueden encontrar otros genes corriente abajo de *ble*_{MBL} como *trpF* (fosforibosil antranilato isomerasa), *tat* (proteína con dominio de secuencia señal para la vía de translocación de arginina), *dct* (proteína periplásmica de tolerancia a cationes divalentes), *groES-groEL* (chaperonina), e ISCR27. En *A. baumannii* esta estructura se encuentra en un transposón compuesto Tn125 (Figura 6), debido a la presencia de una segunda copia de IS*Aba125* corriente abajo de ISCR27, el cual sería el responsable de la transferencia de *bla*_{NDM} hacia plásmidos de amplio rango de hospedero[57].

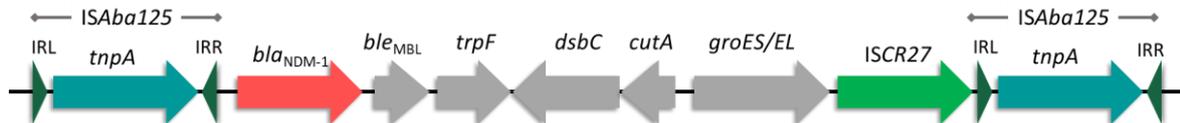


Figura 6. Estructura del transposón Tn125, uno de los entornos del gen *bla*_{NDM-1}. Este transposón compuesto está formado por dos copias de las secuencias de inserción IS*Aba125*.

Por otro lado, Tn1999 presenta dos copias de IS1999 flanqueando al gen *bla*_{OXA-48} (Figura 7), y se ha diseminado por su posterior asociación con plásmidos conjugativos, sobre todo de tipo IncL[50,94]. La presencia de Tn1999 en un plásmido conjugativo de tipo IncL en *K. pneumoniae* fueron claves para la diseminación de *bla*_{OXA-48} que ocurrió luego de su primer reporte en Turquía en 2001[15,94].

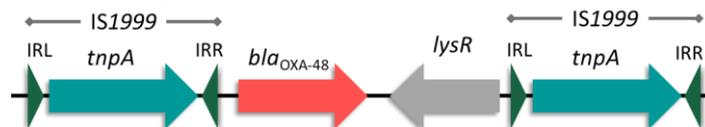


Figura 7. Estructura del transposón Tn1999, el entorno típico del gen *bla*_{OXA-48}. Se encuentra constituido por dos copias de la secuencia de inserción IS1999 flanqueando dicho gen.

Excepcionalmente, algunos tipos de IS pueden movilizar segmentos adyacentes. Un ejemplo de esto es IS*Ecp1* y otras IS relacionadas a la familia IS1380, que pueden formar unidades de transposición (Figura 8.a). Estas pueden utilizar IRL junto con una secuencia alternativa, en lugar de IRR, para moverse junto con un segmento de ADN adyacente, generando repetidos directos de 5 o 6 pb. Este mecanismo se ha visto implicado en la diseminación de genes *bla*_{CTX-M}[105,106].

Otras IS que se movilizan con un mecanismo alternativo son las de tipo IS91 y los elementos ISCR (secuencias de inserción con una región común), las cuales no presentan IR sino secuencias *oriIS* y *terIS* en los extremos del gen de la transposasa (Figura 8.b). Estos elementos se mueven por replicación círculo rodante, la cual inicia en *oriIS* y continúa hacia el resto del elemento, terminando generalmente en *terIS*. Sin embargo, en ocasiones *terIS* no es reconocida y la replicación procede en segmento de ADN adyacente, hasta que se reconoce una secuencia de terminación alternativa, similar a la original. Los elementos de tipo ISCR1 pueden movilizar genes de RAM y suelen asociarse a integrones de clase 1[105,106].

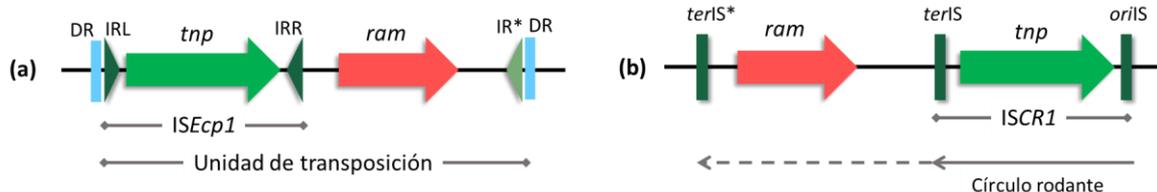


Figura 8. Estructura de (a) unidad de transposición basada en *ISEcp1*; y (b) *ISCR1* asociada a un gen de resistencia a antibióticos. Para *ISCR1* la flecha indica el sentido de la replicación círculo rodante. Abreviaturas: *tnp*, gen de la transposasa; *ram*, gen de resistencia a antibióticos; IRL, invertido repetido izquierdo; IRR, repetido invertido derecho; IR*, repetido invertido alternativo para *ISEcp1*; DR, repetido directo; *oriIS* y *terIS*, secuencias de origen y terminación de la replicación círculo rodante de *ISCR1*; *terIS**, secuencia de terminación alternativa para *ISCR1*.

5.5.3 Transposones complejos

Los transposones complejos también conocidos en la literatura como ‘*unit transposons*’, son elementos de mayor longitud que las IS. Se encuentran delimitados por IR, y presentan genes que codifican una transposasa (*tnpA*) y una resolvasa (*tnpR*), secuencias de resolución (*res*) y genes accesorios que pueden codificar distintas funciones, entre ellas RAM. Su movilización ocurre por transposición replicativa, mediada por la transposasa y resolvasa codificadas en el propio elemento, y genera DR de 5 pb[69].

Los genes determinantes de RAM se asocian frecuentemente a transposones de la familia Tn3 (sinónimo de Tn1 y Tn2). Los elementos de esta familia presentan IR de 38 pb, asignados IRL e IRR en relación a la dirección de transcripción de *tnpA* (Figura 9). Adicionalmente, no suelen insertarse más de una vez en la misma molécula o en la misma área (inmunidad de blanco), pero puede ocurrir recombinación homóloga entre elementos relacionados o entre secuencias de resolución (*res*), generando híbridos[69,107].

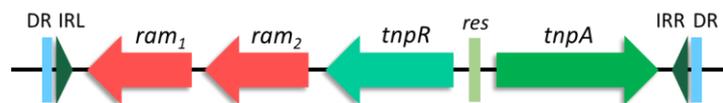


Figura 9. Esquema de un transposón complejo del subgrupo Tn3. Abreviaturas: *tnpA*, gen de la transposasa; *tnpR*, gen de la resolvasa; *ram*, genes de resistencia a antibióticos; IRL, invertido repetido izquierdo; IRR, invertido repetido derecho; DR, repetidos directos.

Un ejemplo de carbapenemasas diseminadas por este tipo de plataformas son *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3}, que particularmente en *K. pneumoniae* ST258 suelen localizarse en un transposón complejo basado en Tn3 denominado Tn4401[15,50]. Tn4401 consiste en una plataforma de aproximadamente 10 kb que contiene genes de la transposasa y resolvasa *tnpA* y *tnpR* respectivamente, dos secuencias de inserción *ISKpn7* e *ISKpn6* entre las cuales se ubica *bla*_{KPC} (Figura 10). Además, en función de variantes en la secuencia comprendida entre *ISKpn7* y *bla*_{KPC} se describen ocho isoformas (de a a h)[71], siendo

Tn4401a y Tn4401b las más diseminadas entre *Enterobacteriales*, mientras que Tn4401b es la única descrita en *P. aeruginosa*[70]. Otras variantes de KPC también se han hallado en Tn4401, mientras que *bla*_{KPC-2} en Asia también se ha asociado a otros EGM como Tn1721 e IS26[71].

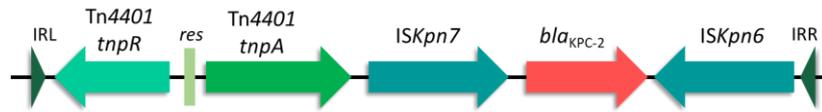


Figura 10. Esquema de Tn4401b, uno de los entornos del gen *bla*_{KPC-2}. Conformado por los genes codificantes de la transposasa (*tnpA*) y la resolvasa (*tnpR*), con *bla*_{KPC-2} flanqueado por dos secuencias de inserción *ISKpn7* e *ISKpn6*.

5.5.4 Integrones

Los integrones no son propiamente elementos transponibles, sino que actúan como sistemas de recombinación por su capacidad de capturar, acumular, reordenar y expresar segmentos de ADN conocidos como cassettes. En ocasiones, los integrones pueden asociarse a transposones que a su vez pueden insertarse en plásmidos conjugativos y de esta forma transferirse entre bacterias, aunque también pueden encontrarse incorporados al cromosoma[104,108]. Gracias a la capacidad de acumular cassettes génicos, frecuentemente determinantes de RAM, junto con la posibilidad de transferirse de una célula a otra por asociación a otros EGM, los integrones se encuentran entre los principales contribuyentes al problema de la MDR[69,108].

Los integrones presentan un gen *intI* que codifica una integrasa, expresada bajo el control de un promotor P_{int} ; un sitio de recombinación *attI*; y un promotor P_C , que permite la expresión de los genes cassette[108]. Por otro lado, los cassettes consisten en pequeños elementos (0,5 - 1 kb) conformados por en general por un único gen o máximo dos, que carecen de promotores para su expresión, y poseen un sitio de recombinación *attC*. Si no se encuentran incorporados en integrones, los cassettes pueden existir como moléculas circulares libres no replicativas[69,104].

La incorporación de cassettes a los integrones, involucra un evento de recombinación sitio-específica entre *attI* y *attC*, catalizada por la integrasa *IntI*. Los cassettes son insertados en una orientación que les permite la expresión de sus genes mediante el promotor P_C [69]. Si bien pueden insertarse numerosos genes, sólo los cassettes más cercanos al promotor P_C serán expresados, mientras que el resto pueden funcionar como reservorio de información, o pasar a ocupar posiciones más cercanas al promotor mediante procesos de reordenamiento[69,108].

Se reconocen diversos integrones en función de la secuencia de *intI*. Entre ellos, los de clase 1 son los más frecuentemente asociados a la diseminación de determinantes de RAM. Los integrones de clase 1 o In/Tn de clase 1 derivan de la asociación de Tn5053 con el módulo *intI1/attI1/P_C* y el cassette *qacE* dando lugar a Tn402 (Figura 11)[69]. En la mayoría, el módulo de transposición *tniABQC* de Tn402 ha sido reemplazado por el segmento conservado 3' (3'CS) conformado por los genes *qacEΔ1* (derivado de *qacE*) que codifica resistencia a amonios cuaternarios, y *sul1*, de resistencia a sulfonamidas. Por otro lado, el segmento conservado 5' (5'CS) consiste en *intI1/attI1/P_{int}/P_C*. Entre los segmentos 3'CS y 5'CS se encuentra el sitio de inserción de los diferentes genes cassette, denominada región variable (RV). Finalmente, conservan los IR de Tn5053/Tn402, designados IRi (corriente arriba de *intI1*) e IRt (corriente abajo de *tni*) (Figura 12.a). Otra configuración frecuente de In/Tn de clase 1, incluye la asociación de IS6100 corriente arriba de 3'CS (completo o parcial) flanqueado por IRT en sentido invertido[69,109].

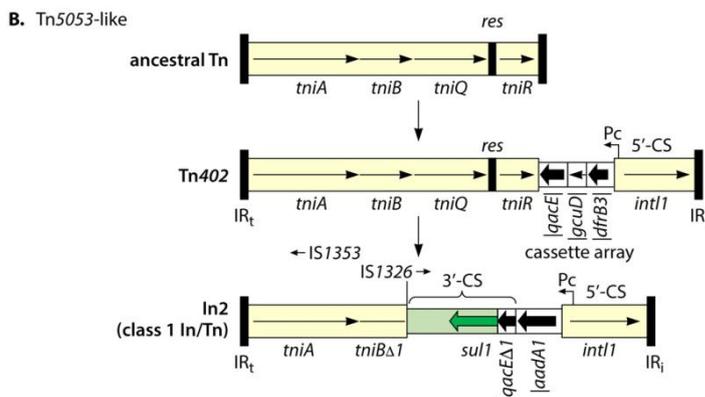


Figura 11. Evolución In/Tn de clase 1. Un Tn5053-like captura el tandem *int1-att1-Pc* y genes cassette, con *qacE* en la última posición, derivando en Tn402. Delecciones subsiguientes en la región *tni* y en *qacE*, y la inserción de *sul1* generan la típica estructura de 3'CS del integrón de clase 1 típico. Adaptado de Partridge SR et al. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4) [69].

Si bien muchos In/Tn de clase 1 perdieron las funciones de transposición, podrían ser movilizados por transposasas compatibles. Por ejemplo, inserción de *ISPa17* corriente arriba permite su movilización por la similitud de sus IR con *IR_i* e *IR_t*[69]. Elementos compatibles para la transposición de estos integrones incluyen miembros del subgrupo Tn21 de la familia Tn3, que podrían mediar en su incorporación a diferentes EGM como plásmidos e islas genómicas[109].

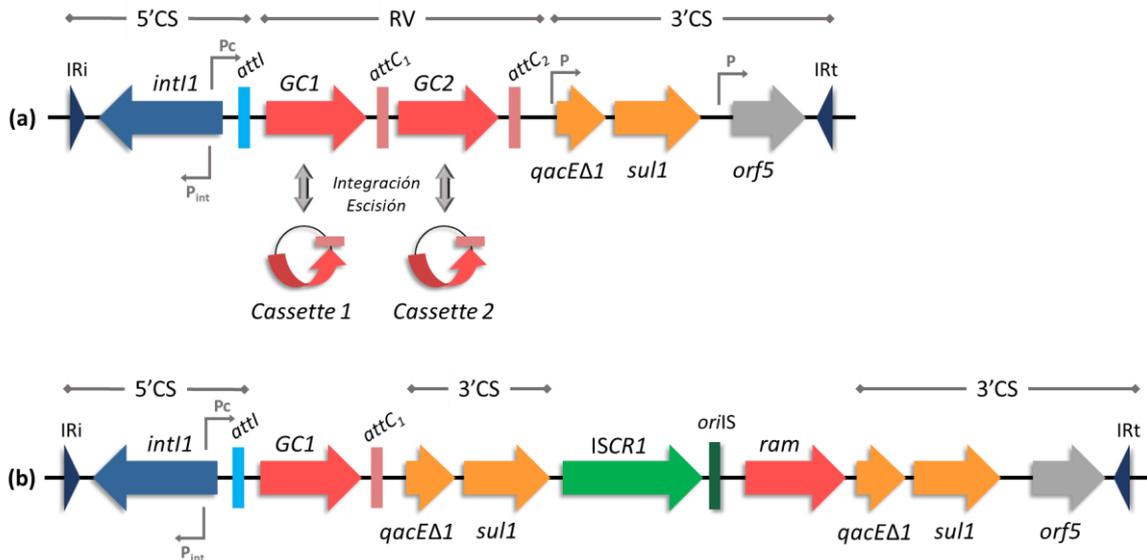


Figura 12. (a) Integrón clásico de clase 1 (o In/Tn de clase 1), comprendiendo el segmento conservado 5'CS, que contiene el gen de la integrasa (*int1*), con su sitio de recombinación (*attI*) y su promotor (P_{int}), así como el promotor para los genes cassette (P_c); el segmento conservado 3'CS contiene los genes *qacE Δ 1* y *sul1*, y *orf5*. Entre medio se encuentra la región variable (RV) que presenta genes cassette (GC), en general relacionados con resistencia a antimicrobianos, así como los sitios de recombinación *attC* correspondientes a cada uno. Los genes cassette pueden ser incorporados y escindidos por recombinación específica de sitio entre *attI* y *attC*. En los extremos se muestran los repetidos invertidos *IR_i* e *IR_t*. (b) Integrón complejo de clase 1 constituido por la incorporación de *ISCR1* asociado a un otro gen de resistencia (*ram*), lo cual provoca una duplicación parcial o total de 3'CS.

Los integrones de clase 1 también pueden encontrarse asociados a elementos *ISCR1* y sus genes asociados, cuya inserción genera una duplicación parcial de 3'CS. Estos elementos se conocen como integrones de clase 1 complejos y suelen portar genes determinantes de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, entre otros (Figura 12.b)[69]. Estos genes de RAM se ubican en lo que se denomina como región variable 2 (RV-2), que queda establecida entre *ISCR1* y la segunda copia de 3'CS. Curiosamente, si bien esta RV-2 se relaciona a 3'CS, los genes de RAM incluidos en ella no

presentan una estructura de genes cassette, y por el contrario se expresan a expensas de un promotor aportado por el propio *ISCR1*[110].

5.5.5 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circular autorreplicativas que portan información genética no esencial para el crecimiento y división bacteriana en condiciones normales[111]. Entre los genes que pueden presentar, se encuentran frecuentemente determinantes de RAM asociados a diferentes EGM[69].

Estos elementos extracromosómicos pueden tener tamaños variados, desde menos de 1 kb a cientos de miles de kb. Presentan un origen de replicación y pueden replicarse utilizando la maquinaria, energía y precursores celulares, y heredarse en forma vertical[69,111]. Esto determina el rango de hospedero, ya que algunos plásmidos pueden replicarse solo con la maquinaria de ciertos taxones (rango estrecho) y otros pueden hacerlo en varios grupos (rango amplio).

Los plásmidos además pueden ser transferidos por vía horizontal mediante conjugación o por movilización. Los plásmidos conjugativos o auto-transferibles suelen ser de mediano o gran tamaño debido a que poseen sistemas de genes necesarios para la conjugación. La región de transferencia (*tra*) codifica proteínas de un sistema de apareamiento que funciona como un sistema de secreción de tipo 4, incluyendo un pilus conjugativo, así como factores necesarios para la transferencia y la replicación del ADN. Los plásmidos de menor tamaño suelen ser no conjugativos, pero sí pueden ser movilizables por otro plásmido conjugativo de la misma célula[69].

Plásmidos similares o relacionados no pueden coexistir en la misma célula, esto se denomina incompatibilidad y es la base de la clasificación de familias plasmídicas[69,111]. Plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad presentan similitudes en sus sistemas de iniciación de replicación (Rep), lo que puede conducir a errores en el control de número de copias e incorrecta segregación en la progenie. Clásicamente, la identificación de grupos se realiza en base a un esquema de PCR, pero ha ido sufriendo modificaciones con la llegada de la secuenciación de genomas completos con lo cual actualmente sería más certero agruparlos por su homología[69].

En la diseminación de determinantes de RAM en *Enterobacterales*, se destacan plásmidos de diversos grupos de incompatibilidad como:

- IncC1 e IncC2 (antes IncA/C), que presentan islas de resistencia donde suelen localizarse genes de RAM como *rmtC*, *bla_{NDM}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{KPC}*;
- IncF, que presenta diferentes replicones (IIA, IC, IA, IB) pero también se pueden clasificar en función a las especies en las que frecuentemente se encuentran como FII (*E. coli*), FII_S (*Salmonella* spp.), FII_Y (*Yersinia* spp.), FII_K (*Klebsiella* spp.). Este grupo se destaca por portar genes de distintos grupos de CTX-M, sobre todo *bla_{CTX-M-15}* y *bla_{CTX-M-27}*, *bla_{KPC}* asociado a FII_K y *bla_{NDM}* a FII_Y;
- IncHI1/HI2: Asociado a *bla_{NDM}*, *bla_{CTX-M}* y *mcr-1*
- Complejo IncI (I1, I_Y, B/O, K, Z), con IncI1 frecuentemente en *E. coli* y *Salmonella* spp. con *bla_{CMY-1}*, *bla_{CTX-M-15}* y *bla_{CTX-M-1}*;
- IncI2: Asociado a la diseminación de diferentes tipos de *bla_{CTX-M}*, también de *bla_{KPC}* y *mcr-1*;
- IncL/M: Conformado por IncL, frecuentemente asociado con Tn1999 (*bla_{OXA-48}*); IncM1, relacionado con *bla_{KPC}*, *bla_{SHV}* y *bla_{FOX}*; e IncM2 donde se ha hallado *ISEcp1-bla_{CTX-M-β3}* y regiones de resistencia con Tn2 asociado a *armA*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP-4}*;
- Entre otros grupos se encuentran IncN1/N2, IncP, G, R, T, W, X, Y, Q y X(1 a 6), siendo estos dos últimos plásmidos de tamaño pequeño y movilizables[69].

Como se mencionó anteriormente, la diseminación horizontal de genes de carbapenemasas como *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, y grupo *bla*_{OXA-48} se ha asociado a diferentes grupos de incompatibilidad. En particular, *bla*_{KPC} se ha detectado en plásmidos de tipo IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR y ColE1, con predominio de IncF con replicón de tipo FII_K[71], en los cuales se han hallado fundamentalmente *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} en *K. pneumoniae* ST258[50]. Por otro lado, se cree que módulos derivados de Tn125 conteniendo *bla*_{NDM-1} fueron movilizados en múltiples eventos de transferencia, llegando a distintos tipos de plásmidos, como IncFII, IncX3 e IncC[57]. Finalmente, plásmidos de tipo IncL, en general de 60 a 70 kb de tamaño, son los más frecuentemente asociados a Tn1999, aunque otros tipos de plásmidos se han relacionado con la diseminación de *bla*_{OXA-48} y sus derivados, incluyendo IncA/C (*bla*_{OXA-204}), ColKP3, IncX3 (*bla*_{OXA-181/-232}), ColE2, IncF, IncN1 e IncT[94].

Por otro lado, en *Pseudomonas* spp., los genes de RAM se hallan más frecuentemente en islas genómicas que en plásmidos[69]. Se han descrito 14 grupos de incompatibilidad de plásmidos de *Pseudomonas* spp. (IncP-1 a IncP-14), aunque no existe hasta el momento un esquema de clasificación basada en replicones como para *Enterobacteriales*. Además, su clasificación es compleja debido a eventos de inserción, delección y cointegración, que dificultan la detección de una estructura core y concordancia filogenética[33]. Algunos de estos plásmidos presentan amplio rango de hospedero y se corresponden con grupos descritos en enterobacterias como como IncP-1 (IncP), IncP-3 (IncA/C), IncP-4 (IncQ) e IncP-6 (IncG)[33,69]. Por otro lado, los grupos IncP-2, 5, 7, 10, 12 y 13 presentan estrecho rango de hospedero y no pueden ser transferidos a *E. coli*[33]. Varios grupos plasmídicos de *Pseudomonas* spp. son frecuentes en aislamientos ambientales no asociados a genes de RAM, pero también se han hallado transportando genes de carbapenemasas incorporados en integrones de clase 1 asociados a elementos de la subfamilia Tn2[69].

6 Mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenems

Los mecanismos no enzimáticos asociados con resistencia a carbapenems incluyen la pérdida de porinas y sobreexpresión de bombas de eflujo[13], así como la combinación de estas alteraciones estructurales con la actividad de otras β -lactamasas como BLEE o AmpC[15].

Adicionalmente la formación de biofilms conforma un mecanismo de tolerancia que se comentará más adelante[16].

6.1 Reducción de la permeabilidad

Las porinas son canales inespecíficos que forman parte de la membrana externa de los Gram negativos, cuya función es el transporte pasivo de nutrientes y otras moléculas pequeñas e hidrofílicas, entre ellas algunos antibióticos[13]. La delección o desregulación de la expresión de estas porinas pueden conducir a cambios en su tamaño, número o propiedades electrostáticas, que pueden afectar la entrada de los carbapenems y por lo tanto conferir resistencia[16].

La alteración o pérdida de porinas combinada con la adquisición de BLEE o hiperproducción de AmpC cromosómicas inducibles o desreprimidas pueden conducir a resistencia a carbapenems. Esto se debe a que la afectación a nivel de las porinas puede retardar la difusión de los antibióticos a través de la membrana externa de los BGN a una velocidad lo suficientemente baja como para facilitar la acción enzimática de las BLEE o AmpC[15].

En *K. pneumoniae*, las mutaciones puntuales, delecciones o inserciones en los genes que codifican las porinas *OmpK35* y *OmpK36* se asocian con disminución de la susceptibilidad a ciertos antibióticos[16].

La inserción de los aminoácidos Gly115-Asp116 en el loop 3 de OmpK36 provoca una constricción del poro que atenúa la difusión de los carbapenems, y por lo tanto aumenta la CIM a estos antibióticos[16,64]. La inserción de secuencias como IS903, ISEc68 e IS1 en *ompk36* provocan una disminución en su expresión que también se asocia con resistencia a los carbapenems[16].

Mutaciones en el gen que codifica la porina OmpC de *E. coli* pueden afectar la permeabilidad a los carbapenems[64]. Esto puede darse por mutaciones que producen cambios aminoacídicos específicos como D192G, que disminuye la expresión de la porina. También por duplicaciones de ciertos aminoácidos que provocan cambios en el campo electrostático del poro afectando su capacidad de interacción con los carbapenems. La pérdida o disminución de la expresión de OmpC en *E. cloacae* y *K. aerogenes* (antes *E. aerogenes*) también se asocia con la resistencia a carbapenems[112].

La inactivación o pérdida de la porina OprD en *P. aeruginosa* es un mecanismo clave en la resistencia a imipenem, y también disminuye la susceptibilidad a meropenem y otros grupos de antibióticos[33]. Modificaciones en el gen *oprD* de *P. aeruginosa* debido a mutaciones puntuales, corrimiento del ORF, codones stop prematuros o deleciones provocan modificaciones en la porina o incluso su pérdida, reduciendo o impidiendo el ingreso de los carbapenems, conduciendo a resistencia[113].

6.2 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son complejos proteicos transmembrana que pueden expulsar diferentes compuestos tóxicos hacia afuera de la célula, entre ellos antibióticos. Las bombas de la familia de tipo RND (*resistance-nodulation-division*) son las que principalmente se asocian con RAM en BGN[64]. Estas consisten en una proteína que atraviesa la membrana citoplasmática, una proteína de membrana externa (OMP) y un componente periplásmico que las conecta, formando un canal que conecta el citoplasma con el medio extracelular. Son capaces de exportar un amplio rango de sustratos desde el citoplasma o el periplasma en un proceso impulsado por fuerza protón motriz[113].

En enterobacterias, AcrAB-TolC es la bomba más asociada con resistencia a carbapenems. Su sobreexpresión debido a mutaciones al regulador AcrR, RarA, MarA o RamA se han asociado con disminución de la susceptibilidad o resistencia a carbapenems[16].

En *P. aeruginosa* la sobreexpresión de las bombas MexAB-OprM, MexXY-OprM y MexCD-OprJ son las más asociadas a resistencia a β -lactámicos[113]. En general confieren bajos niveles de resistencia, pero su relevancia clínica es mayor si se combina con otros mecanismos[114]. Mutaciones en la región reguladora de la expresión de MexAB-OprM provoca su sobreexpresión contribuyendo directamente a la resistencia a meropenem. Este mecanismo combinado con la pérdida de porinas y la desrepresión de su AmpC cromosómica se asocian con resistencia de alto nivel a carbapenems[70].

6.3 Otros mecanismos no enzimáticos

Mutaciones que alteran los niveles de expresión o la afinidad de la unión de las PBP también pueden contribuir a la resistencia a carbapenems, pero se trata de un mecanismo raramente observado en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*[13]. En *E. coli*, por ejemplo, se ha observado que mutaciones en los genes *mrdA* y *ftsI* que codifican para PBP2 y PBP3 respectivamente provocan una disminución en la susceptibilidad a carbapenems. Sin embargo, estas modificaciones por sí solas no confieren niveles de resistencia a carbapenems clínicamente relevantes, aunque podrían colaborar con otros mecanismos como la pérdida de porinas o producción de carbapenemasas[16].

7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE CARBAPENEMASAS

Determinar el mecanismo de resistencia a carbapenems puede tener un impacto directo en la elección del tratamiento. La instauración de un tratamiento antibiótico efectivo en forma temprana se asocia con menores períodos de estadía hospitalaria[13]. Diferenciar si un microorganismo es resistente a carbapenems debido a carbapenemasas o por un mecanismo no enzimático resulta crucial para el manejo de control de infecciones, debido a la tendencia a diseminarse y producir brotes de los organismos productores de carbapenemasas[9,11]. Además del impacto clínico, se debe tener en cuenta el alto impacto económico que suponen las infecciones por organismos productores de carbapenemasas, el cual ha sido ampliamente documentado con EPC, por lo que su detección temprana además de disminuir la estadía hospitalaria y morbimortalidad también supone una disminución en los costos asociados a los cuidados de la salud[9].

Dadas las limitadas opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones por microorganismos productores de carbapenemasas, detectar su presencia y clase de la misma permite seleccionar tratamientos individualizados, sobre todo teniendo en cuenta que las nuevas combinaciones de BL-IBL presentan actividad específica sobre algunas clases de enzimas[12].

La elección del método de detección de carbapenemasas depende de factores como la prevalencia y epidemiología local, eficiencia y performance de los métodos diagnósticos, costos[12,16], tiempo de respuesta, facilidad de uso y laboriosidad, flujo de trabajo, estado regulatorio, y necesidad de equipamiento, de preparación de reactivos y de personal capacitado[12]. Dado que ninguna técnica cubre todas los requisitos y necesidades del laboratorio clínico y de las instituciones de salud, generalmente se opta por la combinación de más de un método[12,16].

En general, se recomienda la búsqueda de carbapenemasas en aislamientos que sean no susceptibles a carbapenems[12,13,75], aunque las recomendaciones y metodologías pueden cambiar entre guías e instituciones, y se han modificado a lo largo de los años. Por ejemplo el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*) revisó y actualizó los puntos de corte de carbapenems en *Enterobacterales* en su edición del 2010, y recomendó no corregir la interpretación de susceptibilidad a estos antibióticos aunque se detectaran carbapenemasas[115]. Hasta la edición del año 2022, la confirmación de carbapenemasas en aislamientos de *Enterobacterales* o *P. aeruginosa* no susceptibles a uno o más carbapenems no era recomendada de rutina por estas guías, sino que se indicaba solo con fines epidemiológicos o de control de infecciones. Sin embargo, en la edición 33ª (2023) se incorporó la necesidad de identificación de carbapenemasas con fines terapéuticos[116]. La metodología recomendada por el CLSI para la confirmación de carbapenemasas en *Enterobacterales* era el test de Hodge modificado, que dejó de recomendarse en la edición del 2018, dado que se habían incorporado otros métodos más confiables[117]. En 2015 se comenzó a recomendar el uso del test bioquímico Carba NP para la confirmación de carbapenemasas en *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.[118], aunque para este último dejó de recomendarse en 2018[117]. En la edición de 2017 se incorporó también el método de inactivación de carbapenem modificado (mCIM-test¹ - *modified carbapenem inactivation method*) para *Enterobacterales*[119], y en el 2018 se amplía la recomendación para *P. aeruginosa* y se incorpora la variante con EDTA (eCIM-test) para la detección de MBL en *Enterobacterales*[117]. Actualmente la recomendación del CLSI es confirmar la presencia de carbapenemasas en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* no susceptibles (intermedio o resistente) a uno o más carbapenems mediante Carba NP,

¹ Se utilizará la abreviatura CIM-test para diferenciarla de la sigla "CIM" utilizada para Concentración inhibitoria mínima.

mCIM-test o con algún método molecular disponible en el laboratorio, y eCIM-test para *Enterobacterales* con mCIM-test positivo. En el caso de *Enterobacterales*, el indicador más sensible de la presencia de carbapenemasa es ertapenem y en general también se observa resistencia a al menos una cefalosporina de tercera generación. También se debe tener en cuenta que especies de la familia *Morganellaceae* suelen ser menos susceptibles a imipenem y por lo tanto este antibiótico no se tiene en cuenta en el tamizaje en este grupo[62] (Tabla 2).

Tabla 2. Puntos de corte de carbapenems y recomendaciones para *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* de acuerdo a la guía CLSI 2024 M100 [62].

	Puntos de corte CIM (mg/L) S I R	Puntos de corte DD (mm) S I R	Recomendación
<i>Enterobacterales</i>	Imipenem, meropenem, doripenem 1 2 4 Ertapenem 0,5 1 2	Imipenem, meropenem, doripenem 23 20-22 19 Ertapenem 22 19-21 18	I o R a por lo menos un carbapenem Confirmar EPC mediante CarbaNP o mCIM-test; mCIM+eCIM-test o métodos moleculares
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem, meropenem, doripenem 2 4 8	Imipenem, meropenem, doripenem 19 16-18 15	I o R a por lo menos un carbapenem Confirmar EPC mediante CarbaNP o mCIM-test o métodos moleculares

Abreviaturas: CIM, concentración inhibitoria mínima; DD, disco difusión; S, sensible; I, intermedio; R, resistente; EPC, enterobacteria productora de carbapenemasa; mCIM-test, método de inactivación de carbapenem modificado; eCIM-test, mCIM con EDTA.

Por otro lado, el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) recomienda el uso de los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF - *epidemiological cut-offs*) de meropenem y ertapenem como screening para la detección de carbapenemasas en *Enterobacterales*. En este caso, si bien ertapenem presenta mayor sensibilidad, su especificidad es menor debido a que aislamientos productores de BLEE o AmpC pueden ser resistentes a este antibiótico, fenómeno especialmente observado en *Enterobacter* spp. Un mejor balance entre sensibilidad y especificidad se observa con meropenem. Por otro lado, para *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., EUCAST no indica puntos de corte para screening, pero si se realizara la interpretación como con *Enterobacterales*, los ECOFF difieren en una o dos diluciones del punto de corte clínico, por lo que podrían usarse estos valores para sospechar de la presencia de carbapenemasa. En cualquiera de los casos, la recomendación de búsqueda de carbapenemasas es con fines de control de infecciones y con interés en salud pública, y no para categorización clínica de la susceptibilidad. En relación a los métodos recomendados para la confirmación de carbapenemasas en *Enterobacterales*, EUCAST recomienda discos o tabletas comerciales combinados con inhibidores (por ejemplo Rosco), test bioquímicos o colorimétricos como CarbaNP, BlueCarba o β -Carba, CIM-test, detección de hidrólisis de carbapenem por MALDI-TOF, y tests inmunocromatográficos. Sin embargo, para no fermentadores se indican los tests genotípicos como mejor alternativa, ya que ningún test fenotípico sería lo suficientemente específico. Los test de discos o tiras combinados con inhibidores u otros tests fenotípicos podrían mostrar mejor performance en *P. aeruginosa*[120] (Tabla 3).

Tabla 3. Puntos de corte de carbapenems, valores ECOFF y recomendaciones para la búsqueda de carbapenemasas en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa*, de acuerdo a las normas EUCAST[63,120].

	Puntos de corte CIM (mg/L) S R	Puntos de corte DD (mm) S R	ECOFF (tamizaje)	Métodos recomendados
<i>Enterobacterales</i>	Doripenem < 1 > 2 Ertapenem < 0,5 > 0,5 Imipenem < 2 ^(A) > 4 Meropenem < 2 > 8 ^(B)	Doripenem > 24 < 21 Ertapenem > 25 < 25 Imipenem > 22 ^(A) < 19 Meropenem > 22 < 16 ^(B)	Meropenem >0.125 mg/L o < 28 mm Ertapenem >0.125 mg/L o < 25 mm	Discos o tabletas combinadas con IBL, test bioquímicos, CIM-test, MALDI-TOF, LFIA
<i>P. aeruginosa</i>	Doripenem < 0,001 > 2 Imipenem < 0,001 > 4 Meropenem < 2 > 8 ^(B)	Doripenem > 50 < 22 Imipenem > 50 < 20 Meropenem > 20 < 14 ^(C)	Imipenem 4 mg/L o 17 mm ^(D) Meropenem 2 mg/L	Métodos genotípicos. Discos o tiras combinados con IBL para <i>P.</i>

	o 23 mm **	<i>aeruginosa</i>
^(A) <i>Morganellaceae</i> S ≤ 0,001 o ≥ 50 mm (a efectos de nunca informarse como sensible); ^(B) R > 2 o < 22 mm para focos meníngeos; ^(C) R < 22 mm para focos meníngeos. ^(D) No propuestos para tamizaje. Abreviaturas: CIM, concentración inhibitoria mínima; DD, disco difusión; S, sensible; R, resistente; CIM-test, método de inactivación de carbapenem; IBL, inhibidor de β-lactamasas; LFIA, inmunoensayo de flujo lateral (<i>lateral flow immunoassay</i>).		

Finalmente, en la región, la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos Malbrán” (ANLIS-Malbrán, Argentina) propone algoritmos de tamizaje un poco más complejos pero considerando puntos de corte en función del método de estudio de susceptibilidad, tanto manuales como automatizados (Tabla 4)². Asimismo, por ser el laboratorio de referencia regional, estos son los criterios de búsqueda que aplica el Laboratorio Nacional de Referencia del Ministerio de Salud Pública en Uruguay.

Tabla 4. Algoritmos de tamizaje para el estudio de carbapenemasas en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* según la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos Malbrán” (ANLIS-Malbrán).

	<i>Enterobacterales</i> Probable KPC o MBL	<i>Enterobacterales</i> probable OXA-48	<i>P. aeruginosa</i>
Disco difusión	IPM ≤ 22 mm o CZA R Proteeae MEM ≤ 22 mm	ETP ≤ 24 mm + PTZ ≤ 15 mm Proteeae FEP ≤ 24 + PTZ ≤ 20 mm	IPM = 6 mm + CAZ ≤ 22 mm ó MEM ≤ 23 + C/T ≤ 16 mm
VITEK	IMP ≥ 2 mg/L Proteeae MEM ≥ 2 mg/L	ETP ≥ 0,5 + PTZ ≥ 128 mg/L ó BLEE negativo + PTZ ≥ 128 mg/L	IMP ≥ 2 mg/L + MEM ≥ 1 + CAZ ≥ 16
Phoenix	IMP ≥ 2 mg/L Proteeae MEM ≥ 2 mg/L	ETP ≥ 0,5 + PTZ > 64 + FEP ≥ 16 mg/L	IMP ≥ 4 mg/L + CAZ ≥ 16 ó MEM ≥ 32 (Panel #500)
Sensititre	IMP ≥ 2 mg/L Proteeae MEM ≥ 2 mg/L o FOX > 16 mg/L	ETP ≥ 2 + PTZ ≥ 64 mg/L Proteeae PTZ ≥ 64 mg/L	N/A
Microscan	IMP ≥ 2 mg/L Proteeae MEM ≥ 2 mg/L	ETP ≥ 1 + PTZ ≥ 64 mg/L	IMP ≥ 4 mg/L + CAZ ≥ 16

Abreviaturas: IPM, imipenem; MEM, meropenem; CZA, ceftazidime-avibactam; FOX, ceftoxitin; ETP, ertapenem; PTZ, piperacilina-tazobactam; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; C/T; ceftolozane-tazobactam; BLEE, β-lactamasa de espectro extendido; N/A, no aplica.

7.1 Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos de búsqueda de carbapenemasas generalmente requieren del microorganismo aislado y no todos permiten detectar el tipo de carbapenemasa. En su mayoría se asocian a menores costos, pero pueden presentar problemas de sensibilidad y/o especificidad[12,13,75].

7.1.1 Métodos basados en cultivo

7.1.1.1 Pruebas dirigidas con inhibidores

Uno de los métodos más sencillos y económicos para distinguir entre carbapenemasas de clase A y B es el test de sinergia de doble disco utilizando IBL específicos (Figura 13). Entre ellos, los derivados de ácido fenil-borónico (PBA - *phenylboronic acid*) inhiben carbapenemasas de clase A, mientras que ácido dipicolínico (DPA - *dipicolinic acid*), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 2-mercaptopropiónico (2-MPA), o ácidos sulfamoil heteroarilcarboxílicos inhiben MBL[121–123]. El mejor indicador de carbapenemasas de clase A en enterobacterias es imipenem junto con PBA (sensibilidad 96%, especificidad 92%), cuya sensibilidad se ve afectada directamente por la distancia

² Disponibles en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/11/ALGORITMO-ETB-2021.pdf>
<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/11/ALGORITMO-PAE-2021.pdf>

entre los discos, mientras que falsos positivos pueden observarse en aislamientos productores de AmpC con pérdida de porinas. Para el caso de las MBL, EDTA sería mejor inhibidor para enterobacterias, mientras que para *P. aeruginosa* se observan resultados más confiables con 2-MPA (sensibilidad y especificidad cercanas al 100%) o DPA[122].

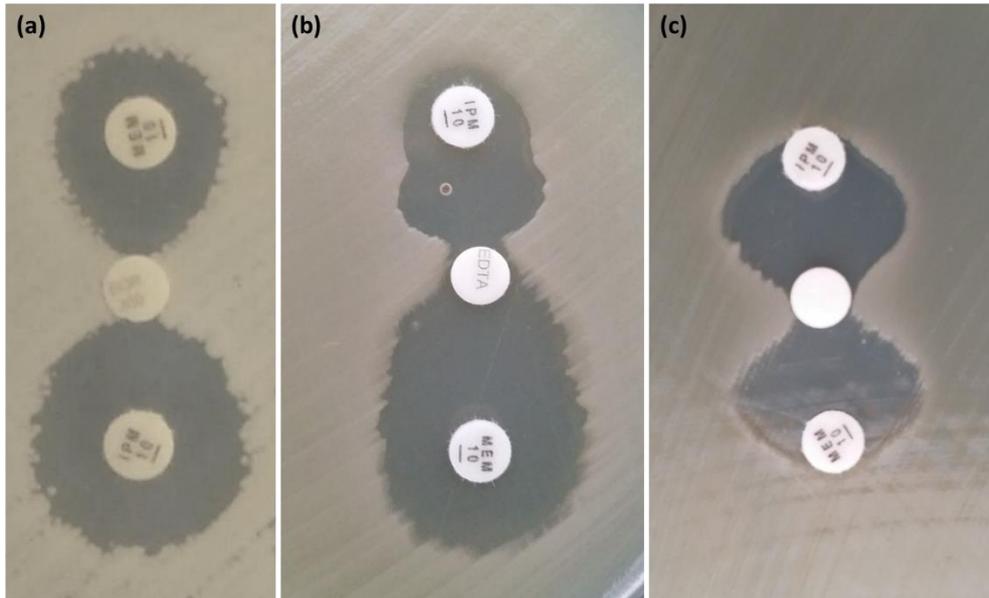


Figura 13. Ejemplos de sinergia positiva para entre meropenem (MEM) e imipenem (IPM) y (a) ácido fenil-borónico (BOR), indicando la presencia de una carbapenemasa de clase A; o (b, c) EDTA indicando la presencia carbapenemasas de clase B (MBL). Imágenes obtenidas en el LRA.

Una estrategia similar consiste en la evaluación de sinergias mediante el uso de discos combinados (carbapenem + IBL), que pueden realizarse tanto de forma casera como comercial, por ejemplo, los kit Rosco Sensitabs (Rosco Diagnostica)[12]. Estos kits difieren en los carbapenems e inhibidores que utilizan en *Enterobacterales* y no fermentadores. En el caso de los primeros, utilizan tabletas de meropenem 10 µg combinadas con DPA como inhibidor de MBL, PBA como inhibidor de carbapenemasas de clase A, pero también de AmpC, por lo que se agrega una tableta con cloxacilina (CLX), que inhibe específicamente a AmpC, evitando así falsos positivos por estas enzimas; también contienen un disco de temocilina a modo de screening de la presencia de OXA-48³ (Figura 14). Por otra parte, el kit para no fermentadores (*P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.) utiliza como indicador una tableta de imipenem 10 µg, que también se combina con DPA, PBA o CLX, e incluye también una con EDTA⁴. En este caso la tableta de cloxacilina contiene una carga de 3000 µg a diferencia de los 750 µg utilizados en las tabletas de *Enterobacterales*[124].

³ <https://www.rosco.dk/gfx/pdf/98006-10-15%20-%20Print%20Insert%202017.pdf>

⁴ <https://www.rosco.dk/gfx/pdf/98025%20-%20Print%20Insert%202017.pdf>

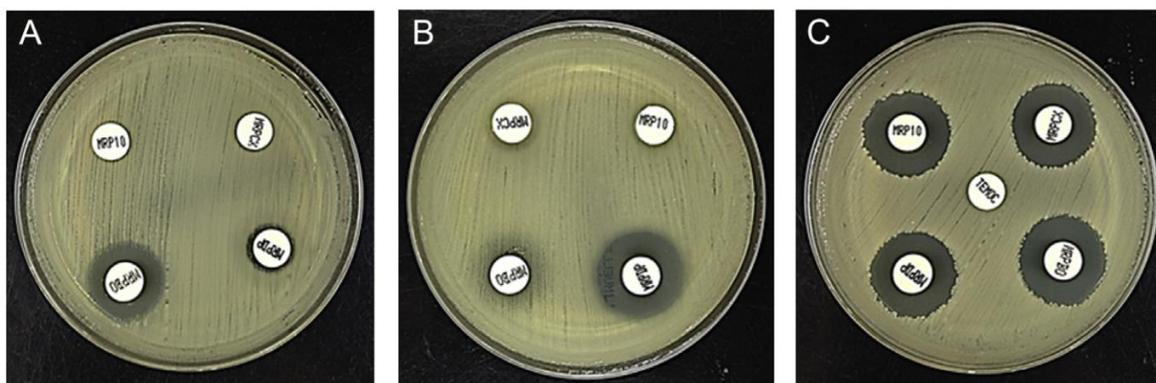


Figura 14. Resultado de *Rosco KPC+MBL confirmation kit*. **(A)** Detección de Carbapenemasa de clase A; **(B)** detección de carbapenemasa de clase B; **(C)** aislamiento sospechoso de OXA-48. Abreviaciones: MRP10, meropenem 10 µg; MRPCX, meropenem + cloxacilina; MRPBO, meropenem + ácido borónico; MRPDP, meropenem + ácido dipicolínico; TEMOC, temocilina 30 µg. Tomado de Aguirre-Quiñonero A & Martínez-Martínez L. *J Infect Chemother*. 2017; 23; 1-11 [125].

Otra alternativa comercial son las tiras de gradiente que combinan carbapenems con PBA o MBL para la detección de carbapenemasas de clase A o B respectivamente. Para la detección de KPC se han reportado valores de sensibilidad de 92% y especificidad 100%, mientras que para MBL 94% y 95% respectivamente[12]. Asimismo, la sensibilidad de detección de MBL es baja en aislamientos con CIM < 4 mg/L, y pueden observarse falsos positivos debido a la inhibición del crecimiento por EDTA en algunas bacterias[122] o por la presencia de carbapenemasas de tipo OXA[12].

La estrategia de pruebas con IBL específicos también se ha incorporado en un panel del sistema automatizado BD Phoenix (Becton Dickinson) conocido como “*CPO Panel*”. Se han reportado valores de sensibilidad y especificidad de 97% y 69% respectivamente[12]. Un estudio más reciente realizado en aislamientos de *K. pneumoniae* indicó sensibilidad (S) global de 98,8% y especificidad (E) de 86% en la detección de carbapenemasa (sin clasificar), aunque estos valores cambian al analizar por tipo de carbapenemasa: para clase A S 27% y E 98,5%; clase B S 86,7% y E 99,1%; y clase D S 91,8% y E 99,8%[126].

7.1.1.2 Test de Hodge modificado

El test de Hodge modificado consiste en realizar un inóculo estandarizado en agar Mueller-Hinton con la cepa *E. coli* ATCC 25922, colocar un disco de meropenem o ertapenem y realizar una estría lineal desde el borde del disco con la cepa problema. Esto se incuba y si la cepa problema es productora de carbapenemasa, hidroliza el antibiótico presente en el disco, disminuyendo su concentración y permitiendo que crezca el aislamiento sensible alrededor de la estría y más cerca del disco (Figura 15) Presenta valores de sensibilidad y especificidad de 93-98% y 91% para la detección de enterobacterias productoras de KPC[12], pero la sensibilidad baja considerablemente si se trata de otras carbapenemasas como MBL y OXA-48. Además, se observan falsos positivos en microorganismos productores de BLEE o AmpC con trastornos de impermeabilidad[9,11,12]. A pesar de ser sencillo y económico, y de requerir reactivos habituales en el laboratorio, los problemas asociados a su sensibilidad y especificidad, dificultades en su interpretación y la necesidad de incubación *overnight* para su lectura, así como el desarrollo de nuevas metodologías, hicieron que fuera removido de las recomendaciones del CLSI en 2018[11,12].

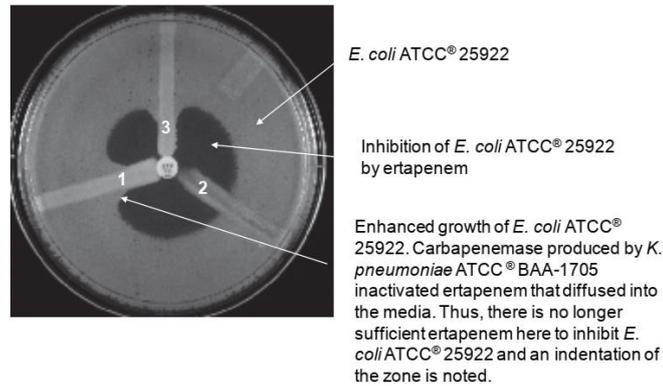


Figure 1. The MHT Performed on a Small MHA Plate.

(1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, positive result;
 (2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706, negative result;
 and (3) a clinical isolate, positive result.

Figura 15. Test de Hodge modificado. Estrías 1 y 3 corresponden con aislamientos productores de carbapenemasa, estría 2 a control negativo. Tomado de la guía CLSI M100-S25 (2015) [118].

7.1.1.3 Método de inactivación de carbapenem

El método de inactivación de carbapenem (CIM-test - *Carbapenem inactivation method*) surge como una alternativa a métodos como Hodge y CarbaNP (ver más adelante), destacándose por ser sencillo, de fácil interpretación y económico. Se propuso inicialmente como método de detección de carbapenemasas en *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*[127].

Consiste en realizar una suspensión bacteriana en agua, de un asa de 10 µL cargada de colonias, donde luego se coloca un disco de 10 µg de meropenem y se incuba 2 h a 35 °C. Luego, el disco incubado se coloca en una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con la cepa indicadora *E. coli* ATCC 25922 y se incuba al menos 6 h a 35 °C. El fundamento consiste en que, si el microorganismo problema produce carbapenemasa, la enzima hidroliza al antibiótico contenido en el disco permitiendo que la cepa de *E. coli* sensible a carbapenems logre crecer alrededor del disco. Sin embargo, si la cepa problema no tiene carbapenemasa, el disco de meropenem conserva su actividad y se observa un halo de inhibición de la cepa indicadora[127]. Este método mostró valores de sensibilidad de 91-94% y especificidad de 99-100%, destacándose por su sencillez y bajo costo (menos de USD 1 por determinación), además de utilizar materiales que se encuentran habitualmente en laboratorios de microbiología clínica. Su principal limitación recae en la dificultad para detectar enzimas con baja actividad hidrolítica como algunas MBL, pero sobre todo OXA-48[12].

Para mitigar dicho problema, surgió el CIM-test modificado (mCIM-test), puesto a punto inicialmente para *Enterobacteriales*. Con respecto al protocolo original, cambia a un inóculo de un asa de 1 µL (en vez de 10 µL) cargada en 2 mL de TSB (en lugar de agua) e incubación con el disco de meropenem durante 4 h en lugar de 2 h. Esta modificación del protocolo presenta mayor sensibilidad en la detección de aislamientos con OXA-48 manteniendo la alta especificidad de la técnica (100%)[128]. Posteriormente, este protocolo se evaluó en aislamientos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, con la única modificación de incluir un inóculo mayor (asa de 10 µL) donde exhibió valores de sensibilidad de 98% y 79,8% respectivamente, y especificidad de 95% y 52,9% respectivamente, demostrando una baja fiabilidad para su uso en *A. baumannii*[129].

El mCIM-test fue incluido para la detección de carbapenemasas en *Enterobacteriales* en las guías del CLSI de la edición 2017[119], y al año siguiente se incorporó la recomendación para *P.*

aeruginosa[117]. Otro cambio con respecto al protocolo original del CIM-test es que la interpretación depende del diámetro del halo de inhibición, en vez de presencia/ausencia de halo[128]. Actualmente el protocolo del CLSI indica como positivos valores diámetro de 6 a 15 mm o de 16 a 18 mm con colonias internas, indeterminados halos de 16 a 18 mm o ≥ 19 mm con colonias internas, y negativos con halos ≥ 19 mm[62] (Figura 16.a).

La principal desventaja del mCIM-test contra Carba NP (explicado más adelante) es la necesidad de incubación *overnight* para acceder al resultado, la cual se puede reducir, pero no menos de 6 h. También se ha señalado que la especificidad real podría ser menor a la reportada debido a falsos positivos en *E. cloacae* no productores de carbapenemasa[12].

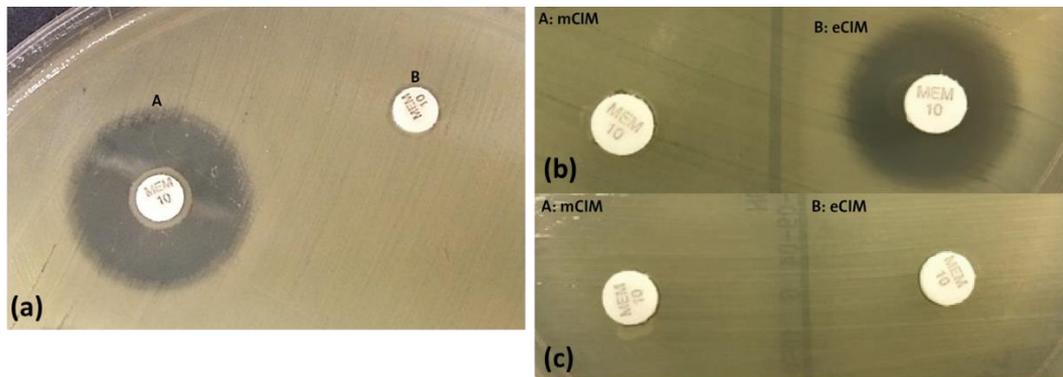


Figura 16. Test de inactivación de carbapenem modificado (mCIM-test). (a) Resultado de test convencional con un aislamiento sin carbapenemasa (A) y con carbapenemasa (B). (b) Resultado de mCIM/eCIM-test positivo. (c) Resultado de mCIM-test positivo y eCIM-test negativo. Tomado de guía CLSI M100-ED34:2024 [62].

Posteriormente, con el fin de detectar *Enterobacterales* productores de MBL, y diferenciarlos de los que producen serin-carbapenemasas, se desarrolló un mCIM-test con el agregado de EDTA (eCIM-test). Este método se realiza en paralelo al mCIM-test y agrega un tubo extra con 2 mL de TSB y 10 μ L de EDTA al 0,5 M, el cual se procesa de la misma forma. La presencia de MBL se evidencia cuando se observa una diferencia de ≥ 5 mm entre el disco incubado en TSB con EDTA versus el tubo sin EDTA (Figura 16.b-c)[130]. Este test se recomienda junto con mCIM-test para *Enterobacterales* a partir de la guía del 2018 del CLSI. Se han reportado falsos negativos debido a la coproducción de MBL con serin-carbapenemasas[12]. Se ha observado menor performance de eCIM-test en aislamientos de *P. aeruginosa* productores de VIM y *A. baumannii* productores de OXAs[9], y dificultades en la identificación de *P. aeruginosa* productora de IMP, aunque igualmente se alienta su uso en este microorganismo por su buena sensibilidad en la identificación de otras carbapenemasas[131].

Otras variantes del mCIM-test incluyen CIMTris, en el cual la incubación se realiza en buffer Tris-HCl 0,5 M para extraer las β -lactamasas en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, con sensibilidad de 98% y especificidad de 93%[12]. Por otro lado, el iCIM-test (*in-house mCIM*) varía en el uso de un asa cargada de 10 μ L para el inóculo en 400 μ L de TSB e incubación de 4 h. Este método mostró mejor sensibilidad para la detección de *A. baumannii* productores de carbapenemasas, fundamentalmente del tipo OXAs, así como buena sensibilidad y especificidad para EPC. Sin embargo, mostró menor performance para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* en comparación con CIM-test y mCIM-test[132].

7.1.1.4 Agares cromogénicos

El uso de agares cromogénicos permite la detección rápida de EPC como método de screening, fundamentalmente a partir de hisopados rectales. El agar comercial ChromID CARBA (bioMérieux) presenta sensibilidad de 92,4% y especificidad de 96,9%, y su uso sería costo-efectivo para screening

cuando la prevalencia de EPC supera el 0,3%[9]. Por otro lado, con el uso de CHROMagar mSuperCARBA se reportan sensibilidad y especificidad de 93-100% y 96-100%[133,134].

7.1.2 Métodos bioquímicos

Los métodos bioquímicos como Carba NP y sus derivados, se basan en el uso de indicadores de pH para evidenciar la hidrólisis de carbapenems[11].

7.1.2.1 Carba NP test

El Carba NP test permite determinar la hidrólisis *in vitro* de imipenem, a partir de extractos bacterianos (colonias en una solución de lisis), utilizando rojo fenol como indicador de pH. El principio consiste en que la hidrólisis de imipenem por carbapenemasas produce una disminución del pH, provocando un cambio de color del rojo al amarillo en el indicador[11,12] (Figura 17). Desde su desarrollo, ha sufrido varias modificaciones en el procedimiento, reactivos y presentación (inicialmente en microplaca, actualmente en tubos), que derivaron en una estandarización propuesta y actualmente recomendada por el CLSI[62,135]. A diferencia de los métodos basados en cultivo, Carba NP tiene la ventaja de ser un método rápido que arroja resultados en el día (máximo de 2 h, 15-30 minutos en algunas de sus variantes) y de aplicación conveniente en el flujo de trabajo del laboratorio clínico. Su principal limitación consiste en la necesidad de preparación de reactivos que pueden ser almacenados por poco tiempo (72 h luego de agregado el imipenem) y que la interpretación del cambio del color puede ser subjetiva[9,12]. Adicionalmente, comparado con mCIM-test es más costoso (USD 2 a 15 por determinación)[11].

En relación a su performance, el método estandarizado del CLSI en un estudio multicéntrico mostró sensibilidades globales de 72,6 a 89,1% y especificidades de 88,9 a 100%, con diferencias de rendimiento en *Enterobacteriales* (S 77,4 a 90%; E 85,7 a 100%) y no fermentadores (S 60 a 87,5%; E 100%). Si bien el desempeño global del test se evaluó como bueno para EPC, su sensibilidad se ve afectada por la dificultad de detectar aislamientos productores de OXA-48, mientras que en *A. baumannii* se presenta el mismo problema con la detección de OXAs asociadas a esta especie[135]. Otros estudios han mostrado resultados similares, con sensibilidades de 73 a 100% para la detección de EPC, con sensibilidad tan baja como 6% para detectar OXA-48; sensibilidad y especificidad de 98% en *P. aeruginosa*, y de 19% y 100% respectivamente en *A. baumannii*[12].

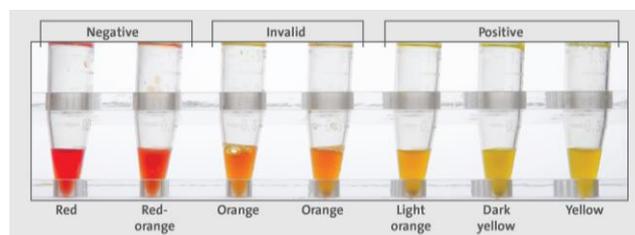


Figura 17. Resultados de Carba NP test. La presencia de color rojo indica un test negativo, anaranjado indica un test inválido y amarillo indica un resultado positivo (presencia de carbapenemasa).

Un protocolo modificado con buffer de lisis con 0,02% de bromuro de cetiltrimetilamonio y un pH inicial de pH 7,5 en vez de 7,8 mostró un aumento de la sensibilidad a 99%, versus 84% con Carba NP convencional, manteniendo una especificidad de 100%. Para OXA-48 también se observó un aumento de sensibilidad (71% vs. 56%), así como para *A. baumannii* (79% vs 21%). Con ambas versiones del test se reportaron falsos negativos en aislamientos mucoides[12]. Otro protocolo modificado, con el

agregado de Triton-X100 al buffer de lisis para realizar el test directamente sobre colonias, mostró un aumento de la sensibilidad de 98% vs. 84% de Carba NP convencional[11,136].

7.1.2.2 Variantes de Carba NP test

BlueCarba es una variante del test que utiliza azul de bromotimol como indicador de pH en lugar de rojo fenol, además de ser más económico y sencillo porque puede realizarse directamente a partir de colonia[11,12].

Otras variantes comerciales son β -Carba (Bio-Rad) y RAPIDEC CARBA NP (bioMérieux). En comparación, RAPIDEC CARBA NP presenta mayor sensibilidad y especificidad, con valores de 98% y 100% respectivamente, contra 65% y 90% de β -Carba en la detección de EPC, y además resultó mejor para detectar OXA-48[12,137].

También se han desarrollado derivados que combinan IBL para detectar el tipo de carbapenemasa producida. Este es el caso de NitroSpeed Carba NP, que utiliza nitrocefina como indicador y ertapenem como inhibidor de otras β -lactamasas sin actividad carbapenemasa. Además, incorpora avibactam como inhibidor de carbapenemasas de clase A y D, vaborbactam para inhibir a las de clase A y DPA para clase B. Para la detección de EPC mostró sensibilidad de 100% y especificidad de 97%, con resultados en menos de 15 minutos y categorización de 100% para carbapenemasas de clase A y D, y 97% para clase B[138]. En *Pseudomonas* spp. también mostró una buena performance, con 100% de especificidad y 99% de sensibilidad en la identificación de carbapenemasas de clase A y B, en un tiempo de respuesta de aproximadamente 30 minutos y USD 5 por aislamiento[139].

Específicamente para detectar carbapenemasas específicas de *A. baumannii* (derivadas de OXA-23, -40/-24, -58, -143) se desarrolló CarbAcineto NP, que utiliza un mayor inóculo y diferente procedimiento de lisis. Mostró una sensibilidad de 95% en comparación con 12% de Carba NP, aunque se observaron inconsistencias con aislamientos productores de OXA-51[12].

7.1.3 Métodos proteómicos: MALDI-TOF

Desde hace ya varios años, los equipos de espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) se utilizan en laboratorios de microbiología clínica para identificación bacteriana, por lo que el desarrollo de métodos para la detección de carbapenemasas surgen como una alternativa costo-efectiva cuando ya se cuenta con el equipo [11,12].

7.1.3.1 Detección de hidrólisis de carbapenems

El método de hidrólisis de carbapenems consiste en enfrentar un inóculo bacteriano con una solución de carbapenem, centrifugar y luego determinar la presencia de picos de los productos de hidrólisis del antibiótico a partir del sobrenadante por MALDI-TOF MS[12].

El primer protocolo propuesto se basó en la hidrólisis de meropenem incubado 3 h con el inóculo bacteriano, y mostró 96,67% de sensibilidad y 97,87% de especificidad para la detección de carbapenemasas en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa*[140–143]. A este le siguieron diversos protocolos y modificaciones, incluyendo pruebas de hidrólisis de ertapenem[144] e imipenem-cilastatina[145,146]. En general, la sensibilidad reportada en los diferentes estudios fue de 70 a 100%, con especificidades de 94 a 100%, con tiempos de incubación y respuesta de 1,5 a 4 h[12,147].

La baja sensibilidad, en general atribuida a la presencia de enzimas con baja actividad hidrolítica como OXA-48-like, fue mejorada en ensayos de hidrólisis de meropenem con el agregado de bicarbonato, donde se observó un aumento del 76 a 98%, manteniendo especificidades del 100%[148]. En el caso de detección de carbapenemasas en *A. baumannii* también se propusieron protocolos que implican lisis bacteriana o extracción enzimática para mejorar la sensibilidad. Asimismo, se han propuesto

protocolos con el agregado de IBL específicos para la detección de MBL o carbapenemasas de clase A[147].

Las principales dificultades asociadas a este método de hidrólisis se relacionan con la falta de estandarización, el requerimiento de preparación de reactivos y la necesidad de experiencia con el uso de MALDI-TOF MS, así como el requerimiento de setear el equipo en un rango y especificaciones diferentes a los utilizados de rutina para la identificación bacteriana[12].

Con el fin de estandarizar y automatizar el método de detección de hidrólisis de carbapenems, Bruker Daltonics desarrolló el kit de detección de resistencia *MBT STAR[®]-Carba IVD Kit* junto con un software de interpretación y categorización de los resultados (*MBT STAR[®]-BL IVD software*). La comparación de este kit contra protocolos caseros de detección de hidrólisis de imipenem para equipos Microflex LT (Bruker) como VITEK MS (bioMérieux) demostró buena reproducibilidad, con sensibilidad de 100% y especificidad de 98,2%[149]. La fiabilidad de MBL STAR[®]-Carba también fue evaluada directamente sobre hemocultivos positivos, además de una extensa colección de EPC, con 100% y 99,4% de sensibilidad respectivamente[150].

Más recientemente se desarrolló un método basado en la detección de un inóculo bacteriano incubado con una concentración de antibiótico que coincide con el punto de corte clínico directamente sobre la placa de MALDI-TOF MS, denominado DOT-MGA (prueba de crecimiento en microgota directo en el pocillo - '*direct-on-target microdroplet growth assay*'). Tras la incubación, se evalúan los espectros utilizando MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) y se interpreta si el microorganismo es susceptible o no al antibiótico utilizando como referencia el score de identificación bacteriana ($\leq 1,7$ y $\geq 1,7$ respectivamente). Este método demostró 100% de sensibilidad y especificidad para la detección de resistencia a meropenem en *K. pneumoniae* con inóculos a partir de colonia y 91,7% de sensibilidad y 100% de especificidad a partir de hemocultivos positivos[14].

7.1.3.2 Detección de biomarcadores

Un abordaje alternativo es la detección de picos como biomarcadores, directamente en el espectro obtenido a partir de colonia para identificación[12,147].

El primer biomarcador identificado fue un pico de m/z 11.109 en *K. pneumoniae* productores de KPC-3, correspondiente a una proteína codificada por el plásmido pKpQIL portador también del gen *bla_{KPC-3}* [12]. Este abordaje demostró tener buena sensibilidad y especificidad cuando el entorno del gen corresponde a la isoforma Tn4401a[147].

Otro biomarcador identificado es el pico de m/z 28.544 correspondiente a KPC-2 en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* portadores de *bla_{KPC-2}*, que fue identificado tanto a partir de colonia como de hemocultivos positivos[151].

La ventaja de los métodos que detectan biomarcadores es que reducen el tiempo de respuesta y su bajo costo, ya que utiliza el mismo abordaje que se realiza para identificación bacteriana[147,151].

7.1.4 Test inmunocromatográficos

Los test inmunocromatográficos o inmunoensayos de flujo lateral (LFIA - *lateral flow immunoassay*), se basan en la detección de epítopes de carbapenemasas por reacción antígeno-anticuerpo[11]. Consisten en una tira que contiene diferentes compuestos sobre los cuales los líquidos migran por capilaridad. La muestra se coloca en un pocillo, en general compuesto por celulosa, que la dirige hacia el panel del conjugado. El panel del conjugado contiene las moléculas marcadas que reaccionan con el analito target (si está presente) en la membrana de nitrocelulosa que forma la tirilla. Los compuestos que reaccionan con el conjugado se ordenan en líneas, siendo la primera o primeras (si

es un test para múltiples targets) la que captura el complejo de interés, mientras que la línea de control asegura que el flujo haya atravesado toda la tira. Todos los componentes se encuentran contenidos en un cassette de plástico que ejerce presión para mantener las diferentes capas en contacto estrecho, permitiendo el flujo eficiente, también facilita la manipulación y brinda seguridad al usuario, y permite localizar fácilmente las áreas de colocación de la muestra y de lectura[152].

Se han diseñado LFIA para la detección de una sola enzima (monoplex) o más de una (multiplex), de los cuales los multiplex son los que han tenido mayor desarrollo. Ejemplos de estos son las varias presentaciones de Coris BioConcept RESIST-3 (NDM, KPC, OXA-48), RESIST-4 (NDM, KPC, OXA-48, VIM) y RESIST-5 K.O.N.V.I. (NDM, KPC, OXA-48/-163, VIM, IMP) (Figura 18). También NG-CARBA-5 de NG Biotech y CP-5 de ERA-Bio que detectan NDM, KPC, OXA-48-like, VIM e IMP[152,153].

En un estudio comparativo entre NG-CARBA-5, RESIST-5 K.O.N.V.I., y CP-5 para la detección de carbapenemasas en *Enterobacterales*, el primero mostró mejor performance con sensibilidad de 99,3-100% y especificidad 86,7-93,8%, además de resultar más conveniente por su facilidad de uso y por estar compuesto por un único cassette (vs. dos de los otros)[153]. Asimismo, una versión posterior mejorada de RESIST-5 K.O.N.V.I. demostró un rendimiento similar a NG-CARBA-5, mejorando en la detección de VIM e IMP, y con mayor intensidad en las bandas, lo que dificultaba la lectura de la versión anterior[154]. En otro estudio NG-CARBA-5 mostró 98% de sensibilidad y 100% de especificidad sobre *Enterobacterales*, destacándose por su capacidad de detectar enzimas con baja actividad hidrolítica como OXA-48-like y por poder utilizarse directamente sobre muestras clínicas. Sin embargo, su performance fue menor con *P. aeruginosa*, fundamentalmente debido a la dificultad de detectar algunas variantes de IMP[155]. Asimismo, este test mostró dificultades para detectar variantes de KPC que confieren resistencia a ceftazidime-avibactam[156].

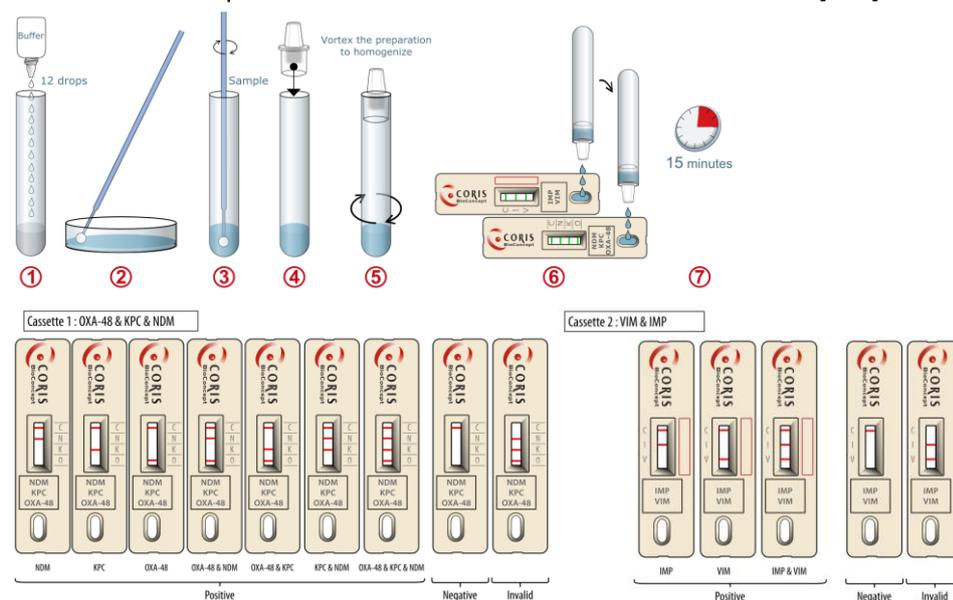


Figura 18. Procedimiento para búsqueda de carbapenemasas con el test inmunocromatográfico Coris K.O.N.V.I. Resultados esperados para el cassette 1 (OXA-48, KPC, NDM); y cassette 2 (VIM e IMP). Tomado de <https://www.intermed.be/en/professional-products/laboratory-diagnostics/microbiology/susceptibility-testing/coris-resist-5-o-k-n-v-i.html>

Más recientemente se desarrolló un LFIA específicamente para detectar carbapenemasas asociadas con *Acinetobacter* spp. como OXA-23, -40, -58 y NDM llamado RESIST ACINETO (Coris BioConcept) que tanto en su prototipo como en su evaluación posterior mostró 100% de sensibilidad y especificidad[157,158]. También se desarrolló un LFIA para detección de GES, que en su prototipo

demostró buena performance, a pesar de ser incapaz de diferenciar entre variantes BLEE y carbapenemasas[159].

Algunas limitaciones relacionadas con el uso de test inmunocromatográficos se relacionan con el volumen de muestra, que puede reducir la precisión del resultado e impactar en la sensibilidad del test. Por otro lado, dependen de la afinidad y especificidad de los anticuerpos, por lo que abarcar la diversidad de enzimas puede ser una limitante, pudiéndose perder resultados debido a mutaciones o nuevas variantes de las enzimas. Su implementación debe tener en cuenta el contexto epidemiológico y la prevalencia local. Mejoras en la sensibilidad son necesarias para aplicarlas directamente sobre muestras clínicas, así como el agregado de pretratamiento de las muestras para evitar interferencias, sobre todo en lo que respecta a la migración de la muestra por capilaridad[152].

7.2 Métodos genotípicos

Los métodos moleculares genotípicos permiten identificar genes específicos de RAM, en general con alta sensibilidad y especificidad, en relativamente poco tiempo[11,14]. En general son métodos más costosos que los fenotípicos, ya que requieren equipamiento y consumibles específicos, y algunos requieren también mayor experiencia técnica por parte del personal[14,57].

7.2.1 Métodos basados en amplificación

Los métodos basados en PCR han sido el *gold standard* por muchos años para la detección de genes codificantes de carbapenemasas y son los más frecuentemente utilizados actualmente[11,160]. Una limitante de estos métodos es que solo detectan genes previamente definidos, por lo que no pueden identificar nuevas variantes o nuevos mecanismos, con el riesgo de obtener falsos negativos debido a mutaciones[11,57], además de asociarse a mayores costos[14,138]. Sin embargo, una de las ventajas que los diferencian de varios métodos fenotípicos es que el resultado no se ve afectado por los niveles de expresión génica ni por enzimas con baja actividad catalítica[14].

Dentro de los métodos por PCR, los más clásicos son las PCR a tiempo final, cuyo resultado debe revelarse en electroforesis en geles de agarosa, y pueden emplearse para la búsqueda de un único gen o para varios genes en simultáneo[57,160]. Esto requiere un gran esfuerzo técnico relacionado con el diseño de cebadores específicos compatibles con el ciclado y con tamaños de amplicones lo suficientemente distintos. Esta técnica también permite la secuenciación de los amplicones para obtener información a nivel nucleotídico[57]. Un ejemplo desarrollado de PCR múltiple a tiempo final permite detectar 11 genes (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{AIM}*, *bla_{DIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{BIC}*, y *bla_{OXA-48}*) utilizando tres mix de reacción[160,161].

Por otro lado, la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) permite realizar la detección e incluso cuantificación del material amplificado en el mismo procedimiento, evitando el uso de electroforesis, lo cual reduce el tiempo hasta el resultado[57,160]. Las PCR en tiempo real caseras pueden diseñarse de la misma manera que las PCR a tiempo final, tanto simples como múltiples, y el uso de sondas marcadas con fluoróforos puede permitir multiplexar y aumentar la especificidad[57]. Diversos trabajos han reportado la alta sensibilidad de este abordaje para la detección de carbapenemasas de interés, tanto en *Enterobacterales* como en no fermentadores. Ejemplos de PCR múltiple en tiempo real que emplean sondas, incluyen diseños para la detección de *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* y *bla_{OXA-48-like}* [162], *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}* y *bla_{OXA-23-like}* [163], o un diseño de doble mix *bla_{KPC}* + *bla_{NDM}*, y *bla_{VIM}* + *bla_{OXA-48}* + *bla_{GES}* [164]. Por otro lado, se han propuesto diseños que emplean un solo canal de detección en lugar de sondas, donde los productos son diferenciados según curvas de melting. Ejemplos de estos incluyen el protocolo de Monteiro y cols. que busca simultáneamente *bla_{KPC}*,

*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GES} y *bla*_{OXA-48} [165]; el de Hofko y cols. que emplean dos mixes para la detección de *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM-2} y *bla*_{KPC} en uno, y *bla*_{OXA-48-like} y *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM} y *bla*_{VIM-1} en otro[166]; o el de Edwards et al. que detecta un total de 14 β-lactamasas en dos mixes, incluyendo *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, y *bla*_{OXA-48}, junto con otros nueve determinantes de BLEE y AmpC[167].

7.2.2 Plataformas comerciales

Varias plataformas comerciales para la búsqueda molecular de genes codificantes de carbapenemasas generalmente combinan PCR múltiple en tiempo real junto a hibridación con sondas marcadas con fluoróforos o microarrays, lo que permite aumentar la especificidad y detectar mayor número de genes[57,138]. Asimismo, varias de estas plataformas pueden ser utilizadas directamente sobre muestras clínicas, fundamentalmente hisopados rectales o hemocultivos positivos, e incluso muestras respiratorias[14].

Algunos ejemplos de plataformas comerciales son Xpert Carba-R (Cepheid), BD MAX Check Points CPO (Becton, Dickinson & co.), GenePOC/Revogene Carba C (Meridian), Check-MDR CT 103 (Check Points), BioFire FilmArray (bioMérieux), Unyvero (Curetis), que en su mayoría fueron diseñadas para detectar genes de las cinco carbapenemasas principales (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, y *bla*_{OXA-48}) en 50 min a 5 h[11,14,138]. En su mayoría presentan sensibilidad de 100% para la detección de genes codificantes de KPC, NDM y VIM, y un poco menor para la detección de variantes de OXA-48/-181 e IMP. Dado que requieren de la adquisición de equipamiento y kits específicos, su implementación resulta más costosa en términos económicos[14,138].

7.2.3 NGS y WGS

La aplicación de métodos de secuenciación masiva de próxima generación (NGS - *next generation sequencing*) así como la secuenciación de genomas completos (WGS - *whole genome sequencing*) aportan gran cantidad de información y permiten identificar diversos genes de RAM así como caracterizar genomas bacterianos en profundidad y detectar nuevos mecanismos de RAM[14,168]. Actualmente este abordaje se utiliza sobre todo en el área de la epidemiología e investigación en RAM, y existen diversas limitantes para su uso a nivel clínico, sobre todo en relación a los costos, falta de estandarización, laboriosidad, necesidad de personal especializado, entre otras[11,14,131].

Si bien las técnicas basadas en NGS pueden ser una herramienta valiosa en la microbiología clínica, aún no puede reemplazar los métodos convencionales, ya que existe evidencia insuficiente que apoye la posibilidad de inferir susceptibilidad antibiótica a partir de información obtenida por WGS y con esto guiar decisiones clínicas [14,168,169]. Esto se debe fundamentalmente a las dificultades de inferir perfiles fenotípicos a partir de información genómica, por ejemplo la resistencia a carbapenems puede resultar de la expresión de carbapenemasas o de la pérdida de porinas combinada con la producción de BLEE[169]. También surgen problemas de interpretación de RAM cuando los mecanismos implicados involucran la sobreexpresión de genes, cuya interpretación necesita información transcriptómica; o por la presencia de genes que están presentes pero no se expresan[168].

8 BIOFILMS

Los biofilms son comunidades microbianas embebidas en una matriz extracelular polimérica (EPS - *extracellular polymeric substances*)[17]. Clásicamente se postulaba que estos agregados bacterianos necesitaban de una superficie (biótica o abiótica) para formarse, pero nuevos modelos sugieren que los biofilms pueden encontrarse tanto adheridos como no adheridos a un sustrato. Esto se ha

demostrado incluso en infecciones que involucran la formación de biofilms tanto sobre superficies (generalmente implantes o dispositivos médicos) como no asociados a superficies (como infecciones respiratorias, de tejidos blandos o de heridas)[170]. Debido a ciertas características estructurales, físicas y químicas que se comentarán más adelante, las infecciones mediadas por biofilms suelen ser recurrentes o crónicas y frecuentemente difíciles de erradicar, fundamentalmente por exhibir tolerancia a los antibióticos[17].

8.1 Estructura y ciclo de formación de biofilms

El modelo clásico de formación de biofilm fue determinado inicialmente utilizando *P. aeruginosa*, y luego se extrapoló hacia otras especies. Consiste en una secuencia de cinco pasos que incluyen adherencia reversible e irreversible, dos etapas de maduración (I y II) y dispersión. Este proceso se encuentra altamente regulado por el segundo mensajero di-GMP-cíclico (di-GMPc), que en altas concentraciones favorece la formación de biofilm y en bajas concentraciones provoca dispersión y favorece el crecimiento en estado planctónico. También está regulado por otros segundos mensajeros, pequeños ARN y *quorum sensing*. Brevemente, los pasos involucran:

- Adherencia reversible: Consiste en un contacto inestable, que en el caso de los bacilos ocurre mediante la interacción de un polo bacteriano con la superficie.
- Adherencia irreversible: Se da un contacto más estable con la superficie en el cual las células bacterianas se adhieren por su eje longitudinal. Este contacto más estrecho desencadena una serie de cambios que incluyen el cese de la movilidad, la activación de genes involucrados en la síntesis de la matriz y genes asociados a RAM (β -lactamasas, fenazina, SagS y BrIR).
- Maduración: Se forman clusters compuestos por varias células embebidas en exopolisacárido (I), que luego maduran formando estructuras en forma de hongos o pilares llamadas microcolonias (II), entre las que pasan canales de fluidos. La estructura tridimensional del biofilm depende de moléculas de comunicación intercelular (como homoserin lactonas aciladas) y sistemas de dos componentes (TCS - *two component system*). Los biofilms maduros se encuentran rodeados de una matriz extracelular polimérica, compuesta por proteínas, polisacáridos y ADN extracelular.
- Dispersión: Ocurre cuando se degradan o pierden componentes de la matriz y las células abandonan el biofilm para volver a su estado planctónico. Este mecanismo también permite colonizar nuevos sitios e iniciar un nuevo ciclo de formación de biofilm[170–173] (Figura 19).

Si bien este se trata de un modelo intuitivo, tiene varias limitaciones y, por haberse determinado *in vitro*, no necesariamente refleja la complejidad del proceso de formación de biofilms en ambientes naturales, industriales o en el contexto de las enfermedades infecciosas. Tampoco considera sistemas abiertos en los que hay un influjo de nuevos colonizadores. Además, se ha observado que incluso para los microorganismos modelo, las condiciones de crecimiento tienen un efecto en el modelado y estructuración del biofilm[170].

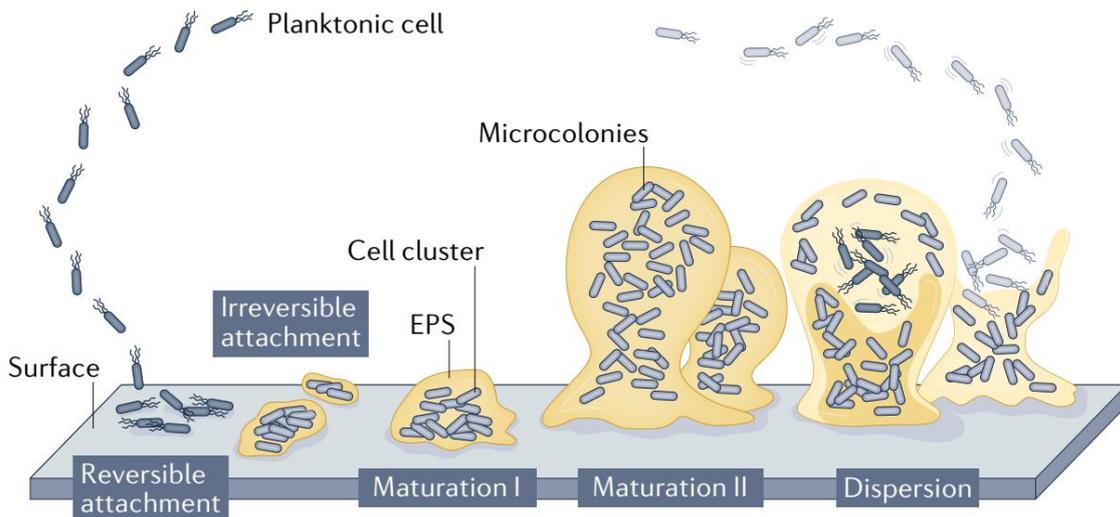


Figura 19. Modelo clásico de cinco pasos de formación de biofilm. El primer paso es la unión reversible de las bacterias a la superficie por el polo bacteriano o el flagelo, seguido de la unión longitudinal irreversible e inicio de la producción de componentes de la matriz (EPS). El biofilm madura en dos etapas, con la aparición de acúmulos embebidos en matriz (I) y formación de microcolonias (II). La dispersión se relaciona con la disminución y degradación de la matriz, que permite la dispersión celular, permitiendo comenzar un nuevo ciclo. Tomado de Sauer K. et al. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20:608–620 [170].

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que las bacterias pueden desarrollar biofilms independientemente de su adherencia a un sustrato, formando agregados, gránulos o flóculos, que se han encontrado tanto en la naturaleza como en el contexto de infecciones[170]. Se han propuesto cinco mecanismos para la formación de agregados:

- Desprendimiento de biofilms adheridos a superficies, debido a cambios en el cizallamiento hidrodinámico, reducción de nutrientes, abrasión física o agentes internos o externos de dispersión;
- Desarrollo en fase planctónica, donde las células en replicación en lugar de separarse se mantienen unidas por moléculas superficiales y/o producción de EPS;
- Auto-agregación o coagregación (entre bacterias de la misma o diferentes especies respectivamente) de células planctónicas que no se encuentran en fase de crecimiento, pero se agregan a través de adhesinas de superficie, y probablemente también polímeros del huésped (mucina, ADN);
- Agregación por depleción, donde la presencia de altas concentraciones de polímeros en solución induce la separación de fases, rodean y empujan a las células forzando su agrupamiento;
- Unión de bacterias a moléculas en fluidos del huésped a través de adhesinas de superficie[170].

A pesar de las diferencias en los mecanismos de formación de biofilms adheridos y no adheridos a superficies, existen características que son compartidas en ambos tipos de estructuras basadas en la agregación como característica distintiva. Entre estos, se encuentran la generación de microambientes, la exhibición de mayor tolerancia a los antibióticos, la presencia de una matriz de EPS, la exhibición de alteraciones fenotípicas sustanciales con respecto a las contrapartes planctónicas y la exhibición de patrones únicos de expresión génica.

Teniendo en cuenta estos aspectos, recientemente se ha propuesto un nuevo modelo que se acerca un poco más a la complejidad del proceso en sistemas naturales. Este modelo consiste en tres eventos básicos que son agregación, crecimiento y desagregación, que pueden reconocerse tanto en las etapas de formación de biofilms en superficies como en la formación de agregados (Figura 20). El modelo de tres pasos es más abarcativo, pudiendo reconocerse en diferentes escenarios tanto *in vivo* como *in vitro*, considera sistemas abiertos y la estructura independientemente de la especie y las condiciones de crecimiento[170].

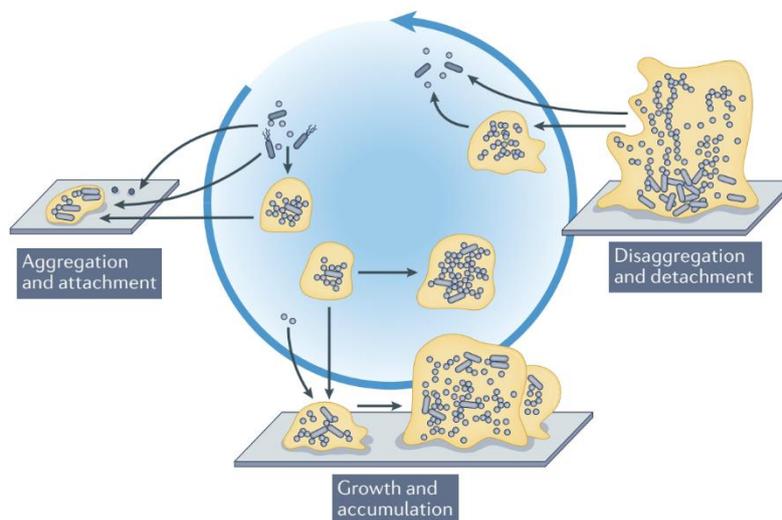


Figura 20. Modelo actualizado de la formación de biofilms en tres eventos principales, que considera tanto las comunidades adheridas a una superficie (por fuera del círculo) o no adheridas (dentro del círculo), y los posibles intercambios de uno a otro. Las etapas consisten en agregación y adhesión de las bacterias entre ellas o a una superficie biótica o abiótica; crecimiento y acumulación, donde las colonias bacterianas se expanden por crecimiento o reclutamiento de otras células; desagregación y desprendimiento, donde las bacterias abandonan el biofilm como agregados o células individuales. Tomado de Sauer K. et al. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20:608–620 [170].

8.2 Infecciones asociadas a biofilms

Como se mencionó anteriormente, los biofilms en el contexto de una infección pueden formarse tanto en superficies bióticas como abióticas, así como en secreciones o tejidos en forma de agregados no adheridos[17]. Estos biofilms suelen verse implicados en infecciones recurrentes y crónicas, habitualmente difíciles de erradicar[17,18], aunque recientemente se ha postulado que las diferencias entre las infecciones agudas y crónicas probablemente se relaciona con diferencias en la actividad metabólica de las bacterias más que en su capacidad de agregación. De todos modos, se reconoce que este tipo de infecciones conducen a estados de inflamación continua y a la destrucción gradual del tejido implicado[170].

Las infecciones que más frecuentemente se asocian con la formación de biofilms son aquellas donde los agregados se forman sobre la superficie de cuerpos extraños como diferentes tipos de dispositivos médicos. Entre ellas se destacan:

- colonización de catéteres intravasculares, que puede conducir a infecciones en el torrente sanguíneo;
- infecciones de prótesis articulares u otros dispositivos ortopédicos;
- infecciones de marcapasos o de válvulas cardíacas;

- infección del tracto urinario asociada a la colonización de sondas vesicales;
- neumonía asociada a la ventilación mecánica, debido al desarrollo de biofilms en el tubo endotraqueal (9-27% de los pacientes intubados)[17,18].

Dentro de las infecciones por biofilms en tejidos o secreciones se destacan:

- las infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, en la que las secreciones viscosas y la afectación mucociliar dificultan la remoción de bacterias aspiradas[17], observándose desarrollo de infecciones debido a biofilms hasta en un 80% de los pacientes[18];
- heridas crónicas como úlceras en pie diabético y úlceras por presión, de las cuales hasta un 60% se asocian con la formación de biofilms[18,20];
- infecciones en el paciente quemado, en los que la pérdida de la epidermis junto con la desnaturalización y coagulación de proteínas promueven la colonización microbiana y subsecuente infección[20];
- endocarditis, secuestros óseos, otitis media, sinusitis crónica, entre otras[17,18].

En presencia de factores predisponentes del hospedero, como la presencia de cuerpos extraños o alteraciones en ciertos órganos por patologías subyacentes, virtualmente todos los microorganismos que sean capaces de formar agregados con las propiedades de un biofilm podrían ser capaces de desarrollar una infección por biofilms. Entre ellos, los más frecuentes son *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y algunas especies de enterobacterias[17].

Dentro del grupo de los bacilos Gram negativos como *P. aeruginosa* y *Enterobacterales*, se asocian más frecuentemente a biofilms en infecciones urinarias asociadas a catéteres, neumonía asociada a ventilación mecánica, infección del tracto sanguíneo a partir de catéteres venosos, y heridas crónicas. *P. aeruginosa* además se destaca por su asociación frecuente con biofilms en pacientes con fibrosis quística, quemaduras y úlceras[17,20].

8.3 Resistencia y tolerancia a antibióticos en biofilms

Una de las características distintivas de los biofilms es que presentan tolerancia intrínseca a la acción de los antibióticos y en muchos casos también desarrollan resistencia[64]. Cabe destacar que estos dos conceptos, si bien en ocasiones se utilizan como sinónimos, no se tratan del mismo fenómeno. En el caso de la tolerancia, es un estado transitorio en que una población bacteriana sobrevive a concentraciones de antibiótico que serían letales en condiciones de crecimiento planctónico[17,174]. Mientras que una población resistente es aquella que no puede ser eliminada por concentraciones de antibiótico por encima del punto de corte de susceptibilidad, debido a la presencia de uno o varios mecanismos adquiridos por mutaciones o transferencia horizontal, y que se mantienen en las bacterias una vez dispersado el biofilm[17].

Dependiendo del microorganismo, el antibiótico y las condiciones de crecimiento las concentraciones mínimas para la inhibición o erradicación del biofilm pueden ser de 4 a 1000 veces mayores que los valores de concentración inhibitoria o bactericida mínima de las células planctónicas. Como consecuencia, el tratamiento de una infección producida por biofilms con dosis definidas por la CIM planctónica, aunque permita reducir el tamaño de la población, genera que las bacterias reanuden el crecimiento una vez finalizado el tratamiento, produciendo una infección persistente[17].

La tolerancia y resistencia dependen de múltiples factores relacionados principalmente con las características fisicoquímicas del biofilm, la presencia de heterogeneidad metabólica y subpoblaciones

bacterianas, patrones de expresión génica particular en el biofilm y las altas tasas de intercambio de información genética[35,64,174].

El desarrollo de mecanismos de tolerancia en biofilms comienza con la generación de gradientes de concentración de oxígeno, nutrientes y otros sustratos debido a diferencias en el transporte y consumo en la estructura tridimensional del mismo. En respuesta a este gradiente, se generan microambientes a los que las bacterias responden por regulación de su expresión génica o cambios en la actividad enzimática. De esta forma se generan diferentes estadios metabólicos dependiendo del estrato en que se encuentren, que pueden ir desde células metabólicamente activas, crecimiento lento, cese del crecimiento y dormancia. La exposición a antibióticos provoca el desarrollo de respuestas adaptativas con el consecuente desarrollo de tolerancia[174].

Dentro de los mecanismos de tolerancia, se destacan la presencia de matriz extracelular, heterogeneidad metabólica bacteriana y respuestas adaptativas. La matriz puede obstaculizar y enlentecer la penetración del antibiótico dentro del biofilm, dificultando su llegada al sitio blanco. Esto ocurre por interacciones fisicoquímicas entre componentes de la matriz (polisacáridos, ADN extracelular, etc) y las moléculas de antibióticos[17,175]. El retraso en la difusión del antibiótico en el biofilm también da tiempo para la activación de respuestas adaptativas relacionadas con la tolerancia. La matriz también puede ser un reservorio de enzimas que modifican antibióticos como β -lactamasas[17], y de bacteriófagos filamentosos que promueven la formación de estructuras cristalinas líquidas[35].

La distribución espacial heterogénea de oxígeno y nutrientes dentro del biofilm, favorece la aparición de subpoblaciones celulares, unas metabólicamente activas de crecimiento rápido en la interfase aire-líquido, y otras de células metabólicamente inactivas de crecimiento lento o no crecimiento en las capas más profundas. Esta baja actividad metabólica puede traducirse en una reducción de la producción de sitios blanco de antibióticos[17]. Asimismo, debido a respuestas adaptativas, surge una subpoblación de células *persisters* (o persistentes), que no se encuentran en división y pueden sobrevivir a altas dosis de antibióticos. Estas células pueden revertir a un estado de replicación activa cuando se restablecen las condiciones favorables de crecimiento, siendo una importante fuente de reinfección[176].

Las concentraciones heterogéneas de oxígeno y nutrientes generan condiciones estresantes para la población bacteriana, desencadenando respuestas adaptativas que contribuyen a la tolerancia. Dentro de estas, se incluye la respuesta restrictiva a la falta de nutrientes y hierro, que altera la fisiología celular. La acumulación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS) por ausencia de reductores o formadas por antibióticos, provoca estrés oxidativo y daño en el ADN, activando una respuesta SOS también implicada en la tolerancia.

La exposición a antibióticos puede inducir fenotipos de resistencia transitoria debido a respuestas adaptativas desencadenadas por una rápida regulación y expresión génica. Esto puede contribuir a la sobreexpresión o inducción de bombas de eflujo o β -lactamasas, o a modificaciones en el LPS, que se restablecen a sus niveles normales cuando desaparece la presión ejercida por el antibiótico[17]. Un ejemplo de gen que se activa específicamente en biofilms es *brlR* en *P. aeruginosa*, el cual codifica un activador transcripcional de bombas de eflujo como MexAB-OprM y MexEF-OprN[175].

El desarrollo de RAM se ve facilitado por los mecanismos de tolerancia. La mutagénesis en biofilm se ve favorecida por la presencia de poblaciones de crecimiento lento, *persisters*, y estrés adaptativo, que bajo presión antibiótica conduce a la selección de mutantes resistentes. Asimismo, debido a la limitada movilidad y la cercanía entre las células agregadas, se favorece el intercambio horizontal de genes a través de conjugación y transformación[17].

8.4 Estrategias para control y tratamiento de biofilms

Los niveles de tolerancia y resistencia a los antibióticos que exhiben los biofilms hacen que su control y erradicación sean un desafío clínico y un campo en constante desarrollo. Existen dos grandes tipos de abordajes, unos que buscan evitar la formación de biofilms, sobre todo buscando evitar la adherencia bacteriana, y otros que abordan su erradicación y eliminación[19,20].

En general, el manejo clínico de infecciones que involucran biofilms recae en el uso de antibióticos, y ocasionalmente el desbridamiento quirúrgico de la zona afectada, los cuales en general presentan resultados variables, por lo cual a lo largo de los años se han evaluado nuevas alternativas[177].

El uso de antibióticos convencionales para la erradicación de biofilms requiere altas concentraciones, que pueden tener efectos adversos en el paciente y no siempre logran ser alcanzadas en el sitio de infección cuando se administran por vía sistémica. Por ello se su administración por vía tópica o local es la preferida para el tratamiento de estas infecciones[177,178]. Un ejemplo de esto es el uso de antibióticos como tobramicina (sola o en combinación con fosfomicina, claritromicina o colistina), aztreonam o gentamicina nebulizados para que alcancen altas concentraciones a nivel pulmonar. La cobertura de tubos endotraqueales y catéteres venosos con antibióticos también se ha propuesto como estrategia para evitar la adherencia bacteriana y así prevenir la formación de biofilms. Ejemplos que demostraron eficacia en catéteres venosos son linezolid, daptomicina, y las combinaciones de rifampicina con minociclina o tigeciclina, minociclina con EDTA y trimetoprim-sulfametoxazol con heparina[178,179]. El recubrimiento de prótesis o implantes con antibióticos también permitiría prevenir la formación de biofilms, por ejemplo, prótesis articulares recubiertas con gentamicina, tobramicina o vancomicina, o combinaciones con rifampicina, claritromicina con daptomicina, ceftarolina y daptomicina o vancomicina y fosfomicina[178].

La combinación de antibióticos convencionales con otros agentes como N-acetilcisteína y desoxirribonucleasa I recombinante han demostrado actividad antibiofilm *in vitro*, así como combinaciones que inhiben la adherencia bacteriana como catequina, ácido protocatecúico y ácido vanílico[177].

Se han descrito numerosas alternativas al uso de antimicrobianos, o para utilizar como adyuvantes de estos, sin embargo, la mayoría se han explorado únicamente en modelos *in vitro*. Ejemplos de esto son enzimas que degradan la matriz del biofilm, quelantes de iones divalentes para desestabilizarla, compuestos de amonio cuaternario, y cubiertas de superficies con agentes que inhiban o dificulten la adherencia bacteriana[19]. En relación a la adherencia, también se han diseñado dispositivos médicos que, sin tener actividad antimicrobiana, dificultan la adherencia bacteriana, tal es el caso de dispositivos con superficies de plata, acero, titanio entre otros[19,180].

Varios productos naturales y derivados de plantas han demostrado propiedades antibiofilm o capacidad inhibitoria de *quorum sensing*. Entre ellos se destacan varios compuestos fenólicos y polifenólicos (flavonoides, taninos, quinonas, cumarinas), alcaloides (resperina, cafeína, berberina, quinolonas), y terpenos (timol, carvacol, saponinas)[20]. Polifenoles como curcumina, quercetina, resveratrol, ácido gallico, riboflavina, entre otros, no solo han demostrado actividad antimicrobiana y antibiofilm sino que también han sido estudiados como posibles fotosensibilizadores para terapias antimicrobianas fotodinámicas[181]. Las terapias inducidas por luz, como terapias fotodinámicas y fototérmicas, han sido evaluadas como estrategias para erradicar biofilms[179].

Otra estrategia que ha sido ampliamente explorada es el uso de nanopartículas y nanomateriales, que pueden causar daño a membranas e interactuar con componentes intracelulares como el ADN, ribosomas o enzimas, interrumpiendo procesos biológicos. Las nanopartículas pueden ser utilizadas

como vehículos para la administración de fármacos directamente al sitio de infección, y se ha demostrado la capacidad antibiofilm de combinaciones con antibióticos. También pueden utilizarse para recubrir materiales para impedir la adherencia de biofilms[20,179,180].

Otras estrategias antibiofilm incluyen el empleo de péptidos antimicrobianos[177,179], lípidos antimicrobianos, drogas anticancerígenas como mitomicina C y cisplatina[177], anticuerpos monoclonales, bacteriófagos[19,177], probióticos y CRISPR-Cas[19].

9 CONTEXTO

Como se mencionó anteriormente, KPC-2 fue la primera carbapenemasa detectada en Uruguay. A esto le siguieron los reportes de metalo-carbapenemasas de los tipos NDM-1 y VIM-2, y más tarde de OXA-48. Sin embargo, se desconocen los mecanismos de diseminación de estos mecanismos de resistencia en nuestro país.

Por otro lado, al igual que en escenarios similares de Latinoamérica, Uruguay se enfrenta a diversos desafíos relacionados con el abordaje terapéutico y diagnóstico de carbapenemasas. En este sentido, existen limitadas opciones para el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas y poco acceso a nuevos agentes antimicrobianos. A esto se le suman dificultades relacionadas a la detección y respuesta rápida desde el laboratorio sobre este tipo de microorganismos.

Finalmente, existe poca información sobre el efecto de antimicrobianos sobre biofilms formados por bacterias MDR, particularmente portadoras de carbapenemasas.

HIPÓTESIS

1. Los *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas en Uruguay presentan amplia diversidad genética y filogenética, y los genes que codifican carbapenemasas se encuentran en diferentes tipos de plataformas genéticas.
2. La combinación de ceftazidime-avibactam con aztreonam es más efectiva sobre microorganismos productores de carbapenemasas en comparación con cada agente por separado
3. Es factible adaptar métodos de identificación rápida de carbapenemasas basados en PCR en tiempo real y MALDI-TOF a la realidad y equipamiento disponible
4. El uso de ciertos antibióticos, tanto de forma individual como en combinación, puede erradicar biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Identificar y caracterizar bacilos Gram negativos resistentes a carbapenems a través de la incorporación de nuevos métodos diagnósticos, y determinar su comportamiento frente a antimicrobianos en biofilms

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar bacilos Gram negativos resistentes a carbapenems provenientes de aislamientos clínicos de instituciones de salud nacionales
2. Caracterizar los elementos genéticos móviles asociados a los principales mecanismos de resistencia presentes en los aislamientos estudiados
3. Implementar técnicas de diagnóstico de carbapenemasas en bacilos Gram negativos a través de MALDI-TOF y PCR en tiempo real
4. Estudiar la susceptibilidad a antimicrobianos en biofilms de bacilos Gram negativos multidrogo resistentes

ORIENTACIÓN PARA LA LECTURA

Este documento está dividido en tres capítulos. El primero hace referencia a los objetivos específicos 1 y 2, el segundo refiere al objetivo específico 3, y el tercero al objetivo específico 4.

Cada capítulo está estructurado en tres secciones numeradas: 1. Metodología; 2. Resultados; 3. Discusión.

CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES A CARBAPENEMS

1 METODOLOGÍA

1.1 Aislamientos

Se trabajó con aislamientos derivados al Laboratorio de Resistencia Antibiótica (LRA), en el marco de trabajos en colaboración con instituciones de salud públicas y privadas de Uruguay. Se estudiaron aislamientos provenientes tanto de muestras clínicas como de estudios de colonización que presentaban algún mecanismo de resistencia no identificado a carbapenems o a otros β -lactámicos. Simultáneamente a la recepción de los aislamientos, se recibían los resultados de identificación y susceptibilidad a antibióticos determinadas por métodos automatizados. En los casos necesarios se confirmó la identidad a nivel de especie mediante espectrometría de masas MALDI-TOF con el software MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Todos los aislamientos fueron conservados a -80°C en caldo LB con glicerol al 30%.

1.1.1 *Pseudomonas* spp.

Se estudiaron 48 aislamientos de *P. aeruginosa* y 8 de *P. putida* obtenidos en el marco de estudios de brotes o casos aislados de los centros: Hospital de Clínicas, Hospital Pasteur, Hospital Maciel, Hospital de Florida, Hospital Español y Centro Asistencial Médico del Este de Colonia (CAMEC) entre 2011 y 2022.

1.1.2 *Enterobacterales*

Se estudiaron 41 enterobacterias con sospecha de producir carbapenemasa provenientes del Hospital de Clínicas, Hospital Maciel y Centro Hospitalario Pereira Rosell, durante el período comprendido entre enero de 2012 y junio de 2018. Asimismo, se incluyeron tres aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de Colombia, obtenidos en 2016 y previamente caracterizados por nuestro grupo[182].

1.2 Estudios de susceptibilidad a antibióticos

Como se mencionó anteriormente, los aislamientos en su mayoría fueron derivados con su correspondiente informe del estudio de susceptibilidad a los antibióticos determinado en el laboratorio clínico mediante VITEK®2 Compact System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). Asimismo, en algunos aislamientos se realizaron estudios complementarios de susceptibilidad como se describe a continuación.

1.2.1 Antibiograma por disco difusión - Método de Kirby-Bauer

El método de disco-difusión se utilizó tanto para complementar o verificar la susceptibilidad a carbapenems, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, piperacilina-tazobactam, ceftazidime-avibactam y aztreonam, así como para la detección de sinergias como se detalla más adelante.

Se partió de cultivos frescos y monomicrobianos en TSA, a partir de los cuales se realizó una suspensión en suero fisiológico correspondiente a una turbidez de 0,5 de la escala MacFarland, ajustado mediante un turbidímetro. A partir de dicha suspensión se inoculó una placa de medio Mueller-Hinton agar con hisopo en tres direcciones para obtener un crecimiento confluyente, y posteriormente se colocaron los discos de papel de filtro impregnados con los antibióticos a

evaluar[118]. La incubación se realizó por 18 h a 35-37 °C y la medida de los halos de inhibición se interpretó de acuerdo a los puntos de corte del CLSI 2023[116], con excepción de gentamicina en *Pseudomonas* spp. que fue interpretado con los puntos de la guía CLSI 2022[183].

1.2.2 Test epsilométrico

La concentración inhibitoria mínima (CIM) para ceftazidime-avibactam y ceftolozane-tazobactam se determinó mediante tiras de gradiente comerciales (bioMeriéux, Marcy-l'Étoile, Francia). Para ello se realizó el mismo procedimiento descrito para el método de Kirby-Bauer, pero en lugar de discos se colocaron tiras con gradientes de concentración de cada antibiótico a estudiar de acuerdo a instrucciones del fabricante. La CIM correspondió al valor indicado por la tira en el sitio donde la elipse de inhibición corta con la misma, y se interpretó según las guías CLSI 2023[116].

1.2.3 Dilución en agar

El método de dilución en agar se utilizó para el estudio de la susceptibilidad a imipenem, meropenem, ceftazidime, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina y aztreonam.

En todos los casos se partió de soluciones de uso de 5210 mg/L de cada antibiótico, a partir de las cuales se prepararon diluciones seriadas de cada antibiótico en Mueller-Hinton agar, como indica el manual estándar del CLSI, desde 0,125 a 256 mg/L (cada placa por duplicado)[118].

A partir de cultivos frescos y monomicrobianos en TSA se prepararon suspensiones equivalentes a 0,5 McFarland de cada aislamiento a estudiar, a partir de las cuales se realizó una dilución 1/20 en suero fisiológico. Dichos inóculos se dispensaron en la placa de un multi-inoculador manual, con el cual se realizó la siembra de las placas de cada antibiótico en orden creciente. Antes y después de sembrar las placas con cada antibiótico, se inocularon placas de Mueller-Hinton sin antibiótico para utilizar como controles. La CIM fue definida como la menor concentración de la serie en la que no se observó crecimiento bacteriano tras la incubación por 20 h a 35-37 °C[184]. Se emplearon como controles de calidad con las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, y los resultados se interpretaron de acuerdo a las normas del CLSI 2023[116].

1.2.4 Sensititre

En aislamientos de *Enterobacterales* se determinó la CIM por el método comercial de microdilución en caldo Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se realizó un inóculo equivalente a 0,5 McFarland en agua estéril, con el cual se hizo la dilución correspondiente en caldo Mueller-Hinton con la cual se inoculó la microplaca. Las placas se incubaron por 18-20 h a 35-37 °C y la lectura de la CIM se realizó en forma manual con la caja de visualización *Sensititre Manual Viewbox* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

1.2.5 Evaluación de la efectividad de aztreonam con ceftazidime-avibactam

La evaluación de la efectividad *in vitro* de ceftazidime-avibactam (CZA) más aztreonam (ATM) se realizó para un grupo de aislamientos seleccionados en base a su perfil de susceptibilidad y producción de carbapenemasa. Se emplearon dos tipos de abordajes, uno cualitativo y otro cuantitativo.

Por un lado, se realizó un test de sinergia de doble disco basado en la técnica de Kirby-Bauer, el cual consistió en colocar discos de CZA y ATM a una distancia de 15 a 25 mm. Un agrandamiento del halo de inhibición de cualquiera de los antibióticos en el área entre ambos discos se interpretó como una sinergia positiva.

El segundo método utilizado para estudiar la efectividad de la combinación CZA más ATM consistió en determinar la CIM a CZA mediante E-test en medio Mueller-Hinton suplementado con 4 mg/L de ATM.

Estos valores se compararon con la CIM para CZA determinada previamente en Mueller-Hinton sin ATM.

La efectividad de la combinación de CZA más ATM se definió según los siguientes criterios (no excluyentes):

- 1) cuando el aislamiento fue susceptible a cualquiera de los dos antibióticos; ó
- 2) evidencia de sinergia positiva entre los discos de CZA y ATM por el método de Kirby-Bauer; ó
- 3) sinergia positiva evidenciada por el método cuantitativo de acuerdo al valor del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI). FICI se definió como:

$$FICI = \frac{CIM_{ATM/CZA}}{CIM_{ATM}} + \frac{CIM_{CZA/ATM}}{CIM_{CZA}}$$

donde $CIM_{ATM/CZA}$ y CIM_{ATM} representan la CIM a ATM en presencia y ausencia de CZA respectivamente (el primero fijado en 4 mg/L), mientras que $CIM_{CZA/ATM}$ y CIM_{CZA} representan la CIM a CZA en presencia y ausencia de ATM respectivamente. Valores de $FICI \leq 0,5$ se interpretaron como sinergia entre ambos agentes.

1.3 Caracterización fenotípica de carbapenemasas y BLEE

1.3.1 Tamizaje para sospecha de carbapenemasas

Se realizó un tamizaje basado en el algoritmo para la sospecha de presencia de carbapenemasas recomendado por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos Malbrán (Buenos Aires, Argentina) como se detalla en la [Tabla 5](#). Los microorganismos que cumplían con estos criterios fueron catalogados como sospechosos para la producción de carbapenemasa.

Tabla 5. Tamizaje fenotípico considerado para sospecha de producción de carbapenemasas.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacterales</i>
CIM por VITEK 2	IPM \geq 2 mg/L + MEM \geq 1 mg/L + CAZ \geq 16 mg/L	IPM \geq 2 mg/L + MEM \geq 1 mg/L
Halo por disco difusión	MEM \leq 23 mm + CAZ \leq 22 mm	IPM \leq 22 mm MEM \leq 23 mm para <i>Proteae</i>

Abreviaturas: CIM, concentración inhibitoria mínima; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidime

1.3.2 Detección fenotípica de carbapenemasas

Para la detección fenotípica de carbapenemasas de clase A y B, se realizaron test de sinergia de doble disco basados en la técnica de antibiograma de disco-difusión de Kirby-Bauer descrita previamente. Se utilizaron discos de imipenem (10 μ g) y meropenem (10 μ g) separados por 10 a 20 mm de los inhibidores ácido fenilborónico (APB) para la búsqueda de carbapenemasas de clase A, y EDTA para las de clase B. Un agrandamiento del halo de inhibición en el área entre los dos discos en forma de huevo o de cola de pescado se interpretó como un test de sinergia positivo y por tanto indicador de la presencia de carbapenemasas de clase A o B respectivamente [185,186].

En los aislamientos de *P. aeruginosa* que no presentaron sinergia con EDTA, se realizó el test comercial *KPC/MBL in P. aeruginosa / Acinetobacter* (Rosco Diagnostica, Albertslund, Dinamarca). Esto se debe a que el método de sinergia de doble disco con APB para detección de carbapenemasas de clase A en esta especie puede arrojar falsos positivos debido a la producción de su AmpC intrínseca. Este test se basa en el método de antibiograma de Kirby-Bauer, con el uso de tabletas, en lugar de discos, que combinan imipenem con inhibidores de carbapenemasas de clase A y B: APB como inhibidor de carbapenemasas de clase A y β -lactamasas de clase C, ácido dipicolínico (DPA) como inhibidor de carbapenemasas de clase B, y cloxacilina como inhibidor selectivo de β -lactamasas de clase C. Se consideró la presencia de carbapenemasa de clase A cuando los aislamientos presentaban una diferencia de ≥ 4 mm y < 3 mm en los halos formados alrededor de los discos de imipenem + ácido

borónico e imipenem + cloxacilina respectivamente, con respecto al disco de imipenem solo, de acuerdo a los criterios indicados por el fabricante⁵. En el caso de *Enterobacterales* también se confirmó la presencia fenotípica de carbapenemasas con el *KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit* (Rosco Diagnostica, Albertslund, Dinamarca), el cual utiliza los mismos inhibidores que el el mencionado para no fermentadores, pero emplea meropenem como indicador en lugar de imipenem. Este kit además agrega un disco de temocilina (30 µg) como tamizaje para la detección de OXA-48⁶.

Finalmente, en los aislamientos que en los que se sospechaba la presencia de carbapenemasas, pero los test fenotípicos no fueron concluyentes, se realizó el método de inactivación de carbapenem modificado (mCIM-test). A partir de aislamientos frescos en TSA, se cargó un asa de 10 µL con colonias aisladas del microorganismo problema y se resuspendieron en 2 mL de caldo TSB estéril. A la suspensión se le agregó un disco de 10 µg de meropenem y se incubó a 37 °C durante 4 h. Previo a finalizar el tiempo de incubación, se realizó un inóculo equivalente a 0,5 McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922 y se sembró con hisopo en tres direcciones en una placa de agar Mueller-Hinton según el protocolo estándar para la realización de antibiograma de Kirby-Bauer[184]. Con un asa estéril se tomó el disco de meropenem incubado en la suspensión bacteriana, se colocó sobre la placa previamente sembrada con la cepa ATCC y se incubó por lo menos 6 h a 37 °C. Se utilizaron los criterios del protocolo del CLSI para definir la presencia de carbapenemas, según los cuales la presencia de un halo de 6 a 15 mm indica la presencia de carbapenemasa, mientras que halos de ≥ 19 mm indican ausencia de carbapenemasa. En todos los ensayos se emplearon aislamientos con y sin carbapenemasa como controles positivo y negativo respectivamente, y un blanco que consistió en la incubación del disco de meropenem en caldo sin microorganismo[116].

1.3.3 Detección fenotípica de BLEE

Siguiendo la misma estrategia descrita anteriormente, la búsqueda de BLEEs se realizó mediante test fenotípico de sinergia de doble disco basado en técnica de antibiograma de Kirby-Bauer. Se utilizaron discos de amoxicilina-ácido clavulánico como inhibidores, separados por 15 a 20 mm de discos de ceftriaxona y ceftazidime o ceftazidime y cefepime (en productores de AmpC) en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* respectivamente. Adicionalmente, la detección de BLEE en aislamientos de *P. aeruginosa* se realizó mediante la aproximación estratégica de discos de imipenem y ceftazidime. En todos los casos, un agrandamiento del halo de los antibióticos se interpretó como un test de sinergia positivo compatible con la presencia de BLEE[187,188].

1.4 Extracción de ácidos nucleicos para estudios moleculares

A partir de aislamientos frescos y monomicrobianos en TSA se seleccionaron 3 a 5 colonias aisladas y se suspendieron en 200 µL de buffer TE-Tritón 1X (Tris-HCl 1 M; EDTA 0,1 M; Tritón 1%). Se realizó extracción de ácidos nucleicos por shock térmico, sometiendo las suspensiones bacterianas a 100 °C por 10 minutos, seguido de -20 °C por 5 minutos. Finalmente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos y se conservó el sobrenadante conteniendo los ácidos nucleicos bacterianos (fundamentalmente ADN). Todas las extracciones se conservaron a -20 °C y se utilizaron como molde en las diferentes PCR realizadas posteriormente.

⁵ <https://www.rosco.dk/gfx/pdf/98025%20-%20Print%20Insert%202017.pdf>

⁶ <https://www.rosco.dk/gfx/pdf/98006-10-15%20-%20Print%20Insert%202017.pdf>

1.5 Detección genotípica de carbapenemasas por PCR

Se realizó la búsqueda por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes codificantes de carbapenemasas de clase A (KPC, GES), clase B (NDM, VIM, IMP, GIM, SPM, SIM), y clase D (OXA-48) con los cebadores y condiciones detallados en la el [Anexo 1](#). Todas las reacciones se realizaron en agua ultrapura estéril, con los kits *Taq DNA Polymerase recombinant* y *dNTP Set 100 mM* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), en termocicladores Corbett CGI-96 Palm Cyclyer (Corbett Research, Oatley, Australia), Axygen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) o Multigene OptiMax (Labnet International, Edison, NJ, USA).

1.6 Búsqueda de otros determinantes de resistencia por PCR

1.6.1 Genes codificantes de BLEE

En los aislamientos con test de sinergia positivo para BLEE, se realizó la búsqueda de genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{PER-2} y *bla*_{GES}. En el caso de los genes codificantes de enzimas tipo CTX-M, se partió de un par de cebadores genéricos (PAN CTX-M) y en caso de positividad se procedió a determinar el grupo (1, 2, 3 o 4); adicionalmente, en caso de positividad para los grupos de CTX-M 3 y 4 se realizó la búsqueda de los genes *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CTX-M-9} respectivamente. Por otro lado, los cebadores para la amplificación de genes *bla*_{GES} son genéricos y permiten detectar variantes alélicas compatibles con fenotipos de BLEE o carbapenemasa, por lo que deben confirmarse por secuenciación (ver más abajo).

Las condiciones utilizadas para cada reacción, así como la información de los cebadores se presentan en el [Anexo 2](#). Los kits y termocicladores utilizados fueron los descritos anteriormente.

1.6.2 Genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos

Se buscaron los genes de resistencia a quinolonas de tipo *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC* y *aac(6′)-Ib-cr*, mientras que dentro de los genes que confieren resistencia a aminoglucósidos se buscó la presencia de genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S (RMTasas) de tipo *armA*, *npmA* y *rmtA-D*, y la acetilasa *aac(6′)-Ib* (o *aacA4*), según las condiciones indicadas en el [Anexo 3](#).

Para la detección de la variante *aac(6′)-Ib-cr*, se realizó la amplificación del gen *aac(6′)-Ib* y el producto de amplificación se sometió a digestión con la enzima BseGI. La mezcla de restricción consistió en 10 µL de volumen final con 2 U de enzima BseGI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con su correspondiente buffer Tango 1X y 2 µL del producto de amplificación. Esto se incubó durante 3 h a 55 °C y los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (al 2%), con el protocolo que se describe más adelante. Tras el revelado del gel, se consideró que el aislamiento presentaba la variante *aac(6′)-Ib-cr* si se observa una banda única de aproximadamente 482 pb, mientras que si se observan dos bandas de 209 y 272 pb presentaba la variante *aac(6′)-Ib*; la presencia de las tres bandas indica que el aislamiento contiene los dos tipos de alelos[189].

1.7 Caracterización de entornos genéticos por PCR

La presencia de integrones de clase 1 y 2 se determinó mediante la amplificación por PCR de los genes codificantes de sus integrasas (*intl1* e *intl2* respectivamente). En los aislamientos positivos para integrasa de clase 1 se caracterizaron adicionalmente sus regiones variables (RV) mediante amplificación y secuenciación con cebadores que hibridan en los segmentos conservados 5′ y 3′ (5′-CS y 3′-CS respectivamente) de dichas plataformas. También se diseñaron cebadores internos para el mapeo de los integrones, en base a la información obtenida por secuencias parciales ([Anexo 4](#)).

1.7.1 Entornos de *bla*_{NDM-1} en *Enterobacterales*

En el caso de los aislamientos de enterobacterias portadoras del gen *bla*_{NDM-1}, se realizó un mapeo de la plataforma genética portadora del gen, utilizando cebadores en su mayoría diseñados en base a la secuencia del plásmido de uno de los aislamientos, obtenida por secuenciación de genoma completo (WGS) (ver más adelante). En el [Anexo 5](#) se detallan los cebadores y condiciones empleadas.

1.8 Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TBE (Tris Base 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 25 mM, pH 8). Luego de la amplificación por PCR, a los productos se les adicionó 1X de buffer de carga (azul de bromofenol 0,25%; xylene cyanol 0,25%; glicerol 30%), y se cargaron en los pocillos correspondientes del gel, donde además se agregó un marcador de peso molecular de acuerdo a los tamaños esperados, de 100 a 1000 pb o de 200 pb a 10 kb (HyperLadder™ 100 bp o 10 kb respectivamente, Bioline-Meridian, Londres, UK).

Los geles, sumergidos en TBE, se sometieron a un campo eléctrico de 100-120 V en cubas de electroforesis, donde los fragmentos de ADN amplificados migraron de acuerdo a su tamaño. Finalmente, los geles se sumergieron en una solución de 0,5 mg/L de bromuro de etidio por 10 a 20 minutos, y las bandas correspondientes a los amplicones se observaron en un transiluminador UV.

1.9 Secuenciación de amplicones por método de Sanger

La identidad de los productos amplificados por PCR fue confirmada por secuenciación con el método de Sanger. Para ello, los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial Zymo DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA, USA) según las indicaciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN fueron determinados mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La secuenciación por el método de Sanger fue realizada por un servicio contratado.

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas con el programa Chromas Lite v.2.6.6 (Technelysium Pty Ltd) y se compararon por BLAST contra la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.10 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Las relaciones de clonalidad entre los aislamientos de *Pseudomonas* spp. fueron determinadas mediante PFGE siguiendo las recomendaciones de PulseNet para *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* (PNL05)[190] con algunas modificaciones que se describen a continuación:

A partir de aislamientos frescos en TSA se ajustaron suspensiones 8,4 McFarland en buffer TE (Tris 0,1 M; EDTA 0,1 M; pH8). Se mezcló 150 µL de cada suspensión con 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad Laboratories, Inc., Life Sciences Group, Hercules, CA, USA) al 1,5% (preparada en buffer TE; 1% SDS) y 0,5 g/L de Proteinasa K (Sigma Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Estas mezclas se dispusieron en moldes para formar bloques, los cuales una vez sólidos, se transfirieron a tubos con 2 mL de buffer de lisis celular (Tris 0,05 M; EDTA 0,05 M; N-Lauril sarcosina 1%) con 0,25 g/L de Proteinasa K, y fueron incubados 18 h a 56 °C en baño húmedo con agitación. Posteriormente, los bloques se sometieron a lavados cada 15 minutos, dos con agua de calidad molecular y tres con buffer TE, y finalmente fueron conservados en TE a 4 °C.

Para la restricción, se cortaron 2 mm de cada bloque y se colocaron en una solución de restricción conteniendo 15 U de enzima *SpeI* con su correspondiente buffer 1X (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA), y se incubaron a 37 °C por 18 h. Los fragmentos fueron dispuestos en un molde sobre el que se colocó agarosa de bajo punto de melting al 1% preparada en buffer TBE 0,5X (Tris base 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM; pH 8).

La cepa de *Salmonella* serovar Braenderup H9812 fue utilizada como control, siguiendo el mismo protocolo de acuerdo a las recomendaciones de PulseNet, digerida por 18 h a 37 °C, con 10 U de enzima *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en bloques al 1% de agarosa.

La corrida de campo pulsado se realizó en un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Inc., Life Sciences Group, Hercules, CA, USA), a 14 °C y 6 V/cm, con pulsos inicial y final de 4 y 40 s respectivamente, durante 20 h, en buffer TBE 0,5X. Los geles fueron teñidos por inmersión en 0,5 g/L de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV.

Los patrones de restricción fueron comparados utilizando el software BioNumerics v.6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), por cálculo del coeficiente Dice (optimización 1%, tolerancia 2%), y los dendrogramas fueron construidos utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Los aislamientos con similitud del 100% fueron considerados idénticos, y aquellos con $\geq 80\%$ de similitud fueron considerados clonalmente relacionados y por lo tanto agrupados en el mismo pulsotipo[191].

1.11 Multilocus sequence typing (MLST)

Los aislamientos de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* fueron tipificados por MLST siguiendo el esquema manual, en el caso de no haber sido secuenciados completamente.

Para ello se siguieron los esquemas correspondientes a cada especie disponibles en <https://pubmlst.org> que consiste en la amplificación por PCR y posterior secuenciación de fragmentos de 7 genes conservados en el genoma de cada especie (genes *housekeeping*), que se detallan en el Anexo 6.

A cada gen amplificado y secuenciado se le asignó su alelo correspondiente según la base de datos disponible en PubMLST, y con los siete alelos se definió el secuenciotipo (ST) de cada aislamiento.

1.12 Caracterización de plásmidos de *Enterobacteriales*

1.12.1 Conjugación

Los ensayos de conjugación se realizaron para los primeros 12 aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasa (EPC) del Hospital de Clínicas, recuperadas entre marzo de 2012 y diciembre de 2016. La cepa *E. coli* J53-2 (resistente a rifampicina, ornitina descarboxilasa negativa, inmóvil) fue empleada como receptora. Se partió de cultivos en TSA frescos y monomicrobianos de las cepas donantes y la receptora para realizar subcultivos en medio LB en fase exponencial, con incubación de 3 h a 37 °C en agitación. Las mezclas de conjugación consistieron en 0,2 mL de cada cepa donante en 2 mL de receptora, y fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

Los transconjugantes fueron seleccionados en medio LB agar (LBA) suplementado con ceftazidime 2 mg/L y rifampicina 150 mg/L (Sigma Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La identidad de los transconjugantes fue confirmada con la prueba bioquímica MIO (inmóvil, ornitina descarboxilasa negativa) y por la presencia del gen esperado según la cepa donante determinada mediante PCR[192]. En todos los casos se emplearon controles de viabilidad de las cepas donante y receptora en LBA sin antibiótico y con ceftazidime o rifampicina respectivamente, y se controló que ambas fueran incapaces de crecer en medio con ambos antibióticos combinados.

1.12.2 Determinación de grupos de incompatibilidad plasmídicos

Los grupos de incompatibilidad de los plásmidos portadores de carbapenemasa se determinaron por tipificación de replicones basada en PCR, utilizando como molde extractos de ADN de los transconjugantes. Se siguió el esquema de caracterización propuesto por Caratolli y cols.[193] y se completó con grupos de incompatibilidad descritos posteriormente[194–196]. Los grupos buscados y las condiciones de PCR se detallan en el [Anexo 7](#).

1.12.3 Estimación del tamaño plasmídico

Los tamaños plasmídicos se estimaron por PFGE de las cepas transconjugantes, siguiendo el protocolo de PFGE descrito anteriormente con las siguientes modificaciones: Los bloques fueron preparados en agarosa al 1% y digeridos con 1 U de nucleasa S1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durante 1 h a 37 °C[197]. La corrida electroforética se realizó a 14 °C y 6 V/cm, con pulsos inicial y final de 2,2 y 54,2 s respectivamente, durante 18 h. La cepa de *Salmonella* serovar Braenderup H9812 fue utilizada como control, digerida 18 h a 37 °C con 10 U de enzima *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en bloques al 1% de agarosa. El tamaño plasmídico se estimó en función de la altura de las bandas con respecto al control.

1.13 Secuenciación de genomas completos

1.13.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de los aislamientos seleccionados para secuenciación fue extraído utilizando *NZY microbial genomic DNA isolation kit* (NZYTech Genes & Enzymes, Lisboa, Portugal) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del ADN extraído se realizó con un fluorómetro Qubit® 3.0 utilizando kit *Qubit dsDNA HS assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Adicionalmente la calidad del ADN fue determinada mediante espectrofotometría con un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

1.13.2 Secuenciación de lectura corta

A partir del ADN genómico extraído se prepararon librerías con *Nextera XT DNA Library prep kit* y *Nextera XT index kit* (Illumina, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante en la guía de referencia #15031942 v06 de Illumina⁷. La concentración de las librerías se determinó con el fluorómetro Qubit® 3.0 utilizando un kit *Qubit dsDNA HS assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y el tamaño fue estimado utilizando *QIAxcel® Advanced Instrument* con el kit *QIAxcel DNA High Resolution* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las librerías fueron normalizadas a una concentración de 10 nM, se generaron pools de 10 librerías, y luego se desnaturalizaron de acuerdo a lo indicado por la guía de referencia #1000000002697 v09 de Illumina⁸. La secuenciación se realizó en un equipo Illumina MiniSeq con un *MiniSeq High Output reagent kit* (Illumina, San Diego, CA, USA) con lecturas 2 x 151 pb paired-end.

Las secuencias fueron optimizadas utilizando Trimmomatic v.1.2.14[198]. Los reads obtenidos fueron ensamblados con SPAdes v.3.11[199].

⁷ Disponible en: <https://support-docs.illumina.com/LP/NexteraXTRef/Content/LP/Nextera/XT/Protocol.htm>

⁸ Disponible en: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miniseq/miniseq-denature-dilute-guide-1000000002697-09.pdf

1.13.3 Secuenciación de lectura larga

Para este abordaje las librerías fueron preparadas con un kit de secuenciación rápido SQK-RAD004 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante⁹. Las librerías fueron cargadas en una *flow cell* R9.4.1 (FLOMIN106) y secuenciadas durante 8 h en un dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). El *basecalling* se realizó utilizando Guppy con un modelo de alta fidelidad integrado en el software MinKNOW v.4.1.22. La calidad de los datos generados fue evaluada con NanoPlot v.1.33.1, y se aplicó Filtlong v.0.2.0 para remover los reads de menos de 1000 pb y de menos de 93 en score de calidad.

El ensamble híbrido, utilizando los resultados de secuenciación de lectura corta y larga, se realizó con Unicycler v.0.4.8[200].

1.13.4 Análisis de secuencias

La predicción de genes de resistencia a antibióticos se realizó utilizando AMRFinderPlus v.3.11.18[201] y ABRicate v.1.01 (<https://github.com/tseemann/abricate/>) con la base de datos ResFinder[202]. ABRicate también fue utilizado para predecir genes codificantes de factores de virulencia, mediante la base de datos *Virulence Factors Database* (VFDB)[203].

Los secuenciotipos fueron determinados con MLST 2.0, y los serotipos de *P. aeruginosa* se definieron mediante PAST, ambas herramientas disponibles en el sitio del Center for Genomics Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/>). La caracterización de elementos asociados a secuencias de inserción y transposones se realizó utilizando la base de datos ISFinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>).

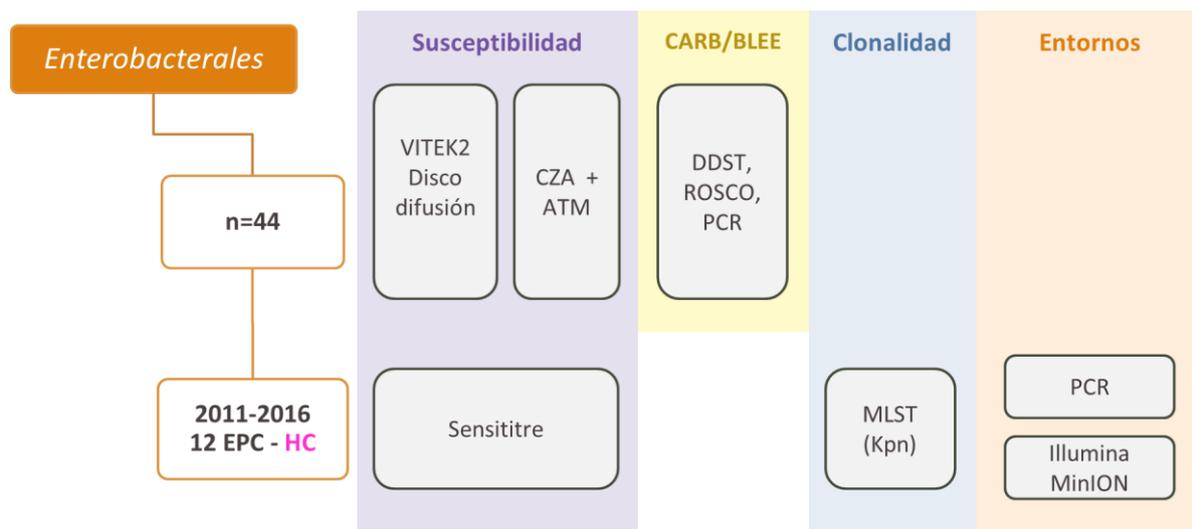
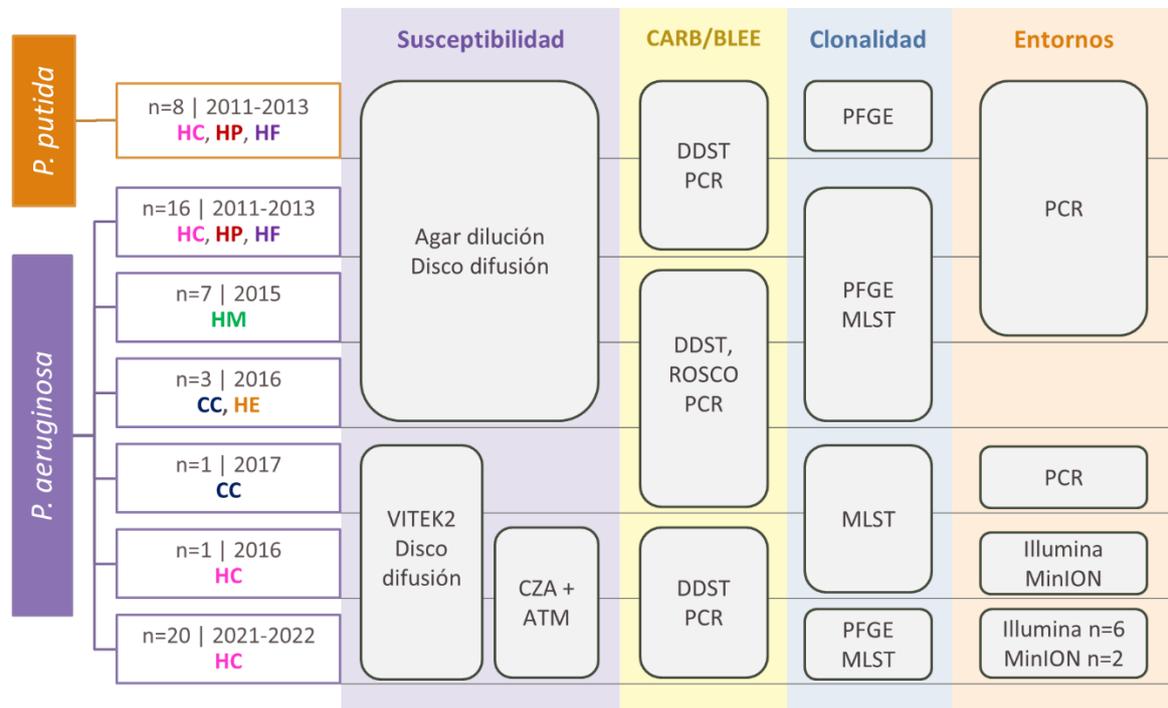
La anotación de secuencias se realizó utilizando RAST 2.0 (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*)[204], y curadas manualmente con el software Artemis v.18.2.0 (<https://github.com/sanger-pathogens/Artemis>)[205] o con Vector NTI v.11 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

La comparación con secuencias de acceso público se realizó con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), las figuras lineales fueron generadas en EasyFig v.2.1 utilizando BLAST v.2.2.18 (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>) y modificadas manualmente con Inkscape v.1.3 (<https://inkscape.org/>).

Algunas de las secuencias fueron depositadas en la base de datos pública GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El registro de nuevos integrones se realizó en la base de datos INTEGRALL [206], y los nuevos transposones fueron asignados por The Transposon Registry[207].

⁹ Disponible en: https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/rapid-sequencing-sqk-rad004/v/rse_9046_v1_revad_14aug2019

Los siguientes esquemas indican la metodología aplicada para determinación de susceptibilidad a los antibióticos, caracterización de carbapenemasas (CARB) y BLEE, relaciones de clonalidad y determinación de entornos genéticos, en los diferentes aislamientos incluidos en el trabajo (*).



(*) Abreviaturas: HC, Hospital de Clínicas; HP, Hospital Pasteur; HF, Hospital de Florida; HM, Hospital Maciel; CC, Centro Asistencial Médico del Este de Colonia (CAMEC); HE, Hospital Español; CZA, ceftazidime-avibactam; ATM, aztreonam; DDST, test de sinergia de doble disco; PFGE, electroforesis en gel de campo pulsado; MLST, *multilocus sequence typing*; Kpn, *Klebsiella pneumoniae*.

2 RESULTADOS

2.1 Caracterización microbiológica, susceptibilidad y mecanismos de resistencia

2.1.1 *Pseudomonas* spp

En el período comprendido entre 2011 y 2022 se caracterizaron un total de 48 aislamientos de *P. aeruginosa* y 8 de *P. putida*, cuya procedencia y características principales se detallan en la [Tabla 6](#). Dentro de este grupo, 20 *P. aeruginosa* provinieron de la UCI del Hospital de Clínicas y fueron recolectados entre agosto de 2021 y julio de 2022 en el contexto epidemiológico de un brote en la unidad. Este evento involucró a 20 pacientes, de los cuales se obtuvieron un total de 44 aislamientos. Para el estudio, se incluyó el primer aislamiento de cada paciente.

Tabla 6. Aislamientos de *Pseudomonas* spp. estudiados. Tipo de β-lactamasa producida, institución de origen, fecha y resultados de estudio de susceptibilidad por agar dilución, VITEK®2 o disco difusión.

ID	β-L	Origen Muestra	Fecha	CIM (mg/L) e interpretación CLSI 2023										DD ^(A)					
				IPM	MEM	CAZ	GM ^(B)	AK	CIP	FEP	ATM	PTZ							
<i>P. aeruginosa</i>																			
V2	VIM-2	HC	Herida Q	03/2011	64	R	4	I	16	I	1	S	1	S	1	I	S	S	I
60-2	VIM-2	HP	S/D	04/2011	64	R	4	I	16	I	1	S	1	S	1	I	S	S	R
11-15	VIM-2	HP	Herida PD	05/2011	64	R	4	I	64	R	> 64	R	32	I	128	R	I	R	R
356	VIM-2	HF	SR	11/2011	64	R	16	R	32	R	32	R	4	S	0,125	S	I	S	I
523	VIM-2	HF	SR	08/2012	64	R	16	R	32	R	4	S	8	S	0,125	S	S	S	I
663	VIM-2	HF	Orina	09/2012	64	R	16	R	64	R	2	S	2	S	0,125	S	I	S	I
213	VIM-2	HP	Herida PD	02/2013	64	R	4	I	128	R	64	R	8	S	128	R	I	R	R
926	VIM-2	HC	Orina	02/2013	> 64	R	16	R	16	I	32	R	32	I	128	R	R	R	R
149	VIM-2	HF	SR	03/2013	> 64	R	> 64	R	128	R	2	S	2	S	0,125	S	R	S	R
517	VIM-2	HF	SR	04/2013	64	R	16	R	64	R	32	R	8	S	0,5	S	S	S	R
559	VIM-2	HF	SR	05/2013	> 64	R	64	R	64	R	> 64	R	8	S	0,5	S	I	S	R
318	VIM-2	HF	SR	07/2013	64	R	16	R	128	R	> 64	R	8	S	0,125	S	R	S	R
782	VIM-2	HF	SR	07/2013	64	R	16	R	32	R	1	S	1	S	0,125	S	I	S	R
089	VIM-2	HF	SR	07/2013	64	R	16	R	32	R	32	R	8	S	0,125	S	I	S	R
794	VIM-2	HF	SR	11/2013	> 64	R	16	R	32	R	64	R	8	S	0,125	S	I	S	R
931	VIM-2	HF	SR	12/2013	> 64	R	16	R	64	R	32	R	4	S	0,125	S	I	S	R
1092	GES-1	HM	SR	10/2015	16	R	32	R	256	R	> 64	R	128	R	4	R	R	R	R
1099	GES-1	HM	SR	10/2015	16	R	32	R	256	R	> 64	R	128	R	4	R	R	R	R
1116	GES-1	HM	SR	10/2015	32	R	32	R	256	R	> 64	R	128	R	8	R	R	R	R
1118	GES-1	HM	SR	10/2015	16	R	32	R	128	R	> 64	R	64	R	4	R	R	R	R
1119	GES-1	HM	SR	10/2015	16	R	32	R	256	R	> 64	R	64	R	8	R	R	R	R
1117	-	HM	Liq. pleural	10/2015	16	R	32	R	64	R	2	S	4	S	0,5	S	I	R	R
1120	-	HM	Liq. pleural	10/2015	4	R	16	R	64	R	> 64	R	128	R	32	R	R	R	R
45098	KPC-2	CC	SR	03/2016	> 64	R	> 64	R	64	R	4	S	4	S	64	R	R	R	R
M1229	KPC-2	HE	SR	04/2016	> 64	R	> 64	R	64	R	4	S	4	S	64	R	R	R	R
M1261	KPC-2	HE	SR	05/2016	> 64	R	> 64	R	64	R	4	S	8	S	64	R	R	R	R
57763 ^(C)	GES-2	CC	HR	02/2017	≥ 16	R	8	R	32	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 4	R	R	I	R
Pa6415 ^(C)	VIM-2/ PER-1	HC	LCR	11/2016	≥ 32	R	1	S	≥ 256	R	4	S	≥ 64	R	1	I	R	R	I
<i>P. aeruginosa</i> Brote Hospital de Clínicas (n=20) ^{(C)(D)}																			
Pa873	VIM-2/ PER-1	HC	Asp. Tr	10/2021	8	R	4	I	≥ 256	R	≤ 1	S	≥ 64	R	0,125	S	R	R	R
HCPa01	PER-1	HC	San, Pcat	08/2021	≥ 16	R	8	R	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	32 I
HCPa02	PER-1	HC	SR, San, LB	08/2021	8	R	≤ 0,25	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,5	S	≥ 32	R	32 I
HCPa03	PER-1	HC	SR, San	08/2021	8	R	1	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	1	R	≥ 32	R	32 I
HCPa04	PER-1	HC	San	08/2021	2	S	0,5	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,5	S	≥ 32	R	8 S
HCPa05	PER-1	HC	SR, San, Pcat	10/2021	≥ 16	R	0,5	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	16 S
HCPa06	PER-1	HC	SR	10/2021	1	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,5	S	≥ 32	R	16 S
HCPa07	PER-1	HC	SR	10/2021	2	S	1	S	≥ 64	R	8	I	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	8 S
HCPa08	PER-1	HC	SR	12/2021	2	S	0,5	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	16 S
HCPa09	PER-1	HC	SR	01/2022	2	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	1	R	≥ 32	R	32 I
HCPa10	PER-1	HC	HC, SR	01/2022	2	S	0,5	S	≥ 64	R	8	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	16 S
HCPa11	PER-1	HC	SR	01/2022	2	S	0,5	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	16 S
HCPa12	PER-1	HC	Orina, San, SR	01/2022	2	S	2	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	≤ 0,06	S	≥ 32	R	16 S
HCPa13	PER-1	HC	Herida Q	01/2022	2	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	≤ 0,06	S	≥ 32	R	16 S

HCPa14	PER-1	HC	SR	02/2022	1	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≤ 0,06	S	≥ 32	R	R	32	I
HCPa15	PER-1	HC	SR, San	03/2022	2	S	1	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	R	16	S
HCPa16	PER-1	HC	LB	03/2022	2	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	R	16	S
HCPa17	PER-1	HC	SR, LB, orina, herida Q	03/2022	2	S	1	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	R	16	S
HCPa18	PER-1	HC	SR	04/2022	2	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	8	I	≥ 64	R	0,125	S	≥ 32	R	R	16	S
HCPa19	PER-1	HC	SR, Pcat	07/2022	2	S	≤ 0,25	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	≥ 4	R	≥ 32	R	R	16	S

<i>P. putida</i> ^(E)																					
829	VIM-2	HF	L. pleural	11/2011	>64	R	>64	R	32	R	32	R	0,5	S	256	R	S	I	I	I	I
166	VIM-2	HP	S/D	04/2012	>64	R	64	R	32	R	0,5	S	0,5	S	256	R	S	I	I	S	S
717	VIM-2	HP	S/D	05/2012	>64	R	64	R	>256	R	0,5	S	0,5	S	0,125	S	S	R	R	R	R
155	VIM-2	HF	Orina	07/2012	>64	R	>64	R	32	R	>64	R	8	S	0,125	S	I	I	I	R	R
144	VIM-2	HC	Orina	10/2012	>64	R	>64	R	64	R	32	R	8	S	0,125	S	R	R	R	I	I
621	VIM-2	HF	SR	11/2012	64	R	16	R	32	R	64	R	8	S	0,125	S	R	R	R	R	R
114	VIM-2	HP	Orina	02/2013	>64	R	>64	R	64	R	>64	R	0,5	S	256	R	I	I	I	R	R
189	VIM-2	HC	SR	12/2013	>64	R	64	R	64	R	>64	R	0,5	S	256	R	R	R	R	R	R

^(A)Resultados de disco difusión (DD), con excepción de cefepime y piperacilina-tazobactam en los aislamientos de la UCI del Hospital de Clínicas del período 2021-2022 que corresponden a valores CIM obtenidos con el sistema automatizado VITEK®2. ^(B)La susceptibilidad a gentamicina fue interpretada según puntos de corte CLSI 2022. ^(C)Los valores de CIM corresponden a resultados del sistema automatizado VITEK®2. ^(D)Se indican todas las muestras a partir de las que se obtuvieron aislamientos en cada paciente. ^(E)Identificación confirmada por MALDI-TOF.

Abreviaturas: β-L, tipo de β-lactamasa producida. HC, Hospital de Clínicas; HP, Hospital Pasteur; HF, Hospital de Florida; HM, Hospital Maciel; CC, CAMEC; HE, Hospital Español. Herida PD, pie diabético; S/D, sin dato; Herida Q, quirúrgica; SR, secreción respiratoria; Asp. Tr, aspirado traqueal; Pcat, punta de catéter; HR, hisopado rectal; LCR, líquido cefalorraquídeo; San, sangre; LB, lavado bronqueoalveolar. CIM, concentración inhibitoria mínima. IPM, imipenem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidime; GM, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; PTZ, piperacilina-tazobactam. R, resistente; S, sensible; I, intermedio.

Susceptibilidad a antibióticos

De los 56 aislamientos de *Pseudomonas* spp. estudiados, 73,2% fueron resistentes a imipenem, 57,1% a meropenem, 66,1% a cefepime, 94,6% a ceftazidime, 67,9% a aztreonam, 51,8% a piperacilina-tazobactam, 42,9% a gentamicina, 50% a amikacina y 35,7% a ciprofloxacina. Se destaca además que el grupo de antibióticos a los que fueron menos susceptibles fueron las cefalosporinas, con solo 12,5% de los aislamientos susceptibles a cefepime y ninguno sensible a ceftazidime (Tabla 7).

Tabla 7. Proporción de susceptibilidad (número de aislamientos y porcentaje) a antibióticos en el total de 56 *Pseudomonas* spp. estudiadas.

Antibiótico	Categoría							
	Resistente		Intermedio		No susceptible (R+I) ^(A)		Sensible	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Imipenem	41	73,2	0	0,0	41	73,2	15	26,8
Meropenem	32	57,1	5	8,9	37	66,1	19	33,9
Cefepime	37	66,1	12	21,4	49	87,5	7	12,5
Ceftazidime	53	94,6	3	5,4	56	100,0	0	0,0
Aztreonam	38	67,9	5	8,9	43	76,8	13	23,2
Piperacilina-tazobactam	29	51,8	12	21,4	41	73,2	15	26,8
Gentamicina	24	42,9	2	3,6	26	46,4	30	53,6
Amikacina	28	50,0	2	3,6	30	53,6	26	46,4
Ciprofloxacina	20	35,7	3	5,4	23	41,1	33	58,9

^(A)La categoría "No susceptible" incluye la suma de los aislamientos resistentes (R) e intermedios (I) a cada antibiótico.

Se detectaron un total de 22 perfiles únicos de no susceptibilidad (antibiotipos), definidos como el grupo de antibióticos estudiados a los que los aislamientos presentaron valores de CIM o medidas de halos de inhibición correspondientes a las categorías de resistente o intermedio. Los antibiotipos más frecuentes fueron IPM/MEM/FEP/CAZ/ATM/PTZ/GM/AK/CIP y FEP/CAZ/ATM/AK representados por 9 y 10 aislamientos de *P. aeruginosa*, seguidos de IPM/MEM/FEP/CAZ/PTZ/GM conformado por 6 *P. aeruginosa*, IPM/MEM/FEP/CAZ/ATM/PTZ/GM/CIP con un aislamiento de *P. aeruginosa* y 2 *P. putida*, IPM/MEM/FEP/CAZ/ATM/PTZ/CIP y IPM/MEM/FEP/CAZ/PTZ hallados en 3 *P. aeruginosa* cada uno, y

IPM/MEM/FEP/CAZ/ATM/PTZ/GM en 3 *P. putida*. Los restantes perfiles estuvieron representados por uno o dos aislamientos (Tabla 8).

De acuerdo a los perfiles observados y a las definiciones de Magiorakos et al., los antibiogramas IPM/MEM/FEP/CAZ/ATM/PTZ/GM/AK/CIP (9 *P. aeruginosa*) y IPM/MEM/FEP/CAZ/ATM/PTZ/GM/CIP (1 *P. aeruginosa* y 2 *P. putida*) se corresponderían con aislamientos extremadamente drogo-resistentes (XDR), mientras que todos los restantes serían multidrogo resistentes (MDR). Cabe destacar que para aplicar estas definiciones se consideraron seis de las ocho categorías de antimicrobianos activos propuestos por los autores, quedando por fuera fosfomicina y polimixinas. Por otro lado, estos dos perfiles, y uno adicional conformado por tres *P. aeruginosa* (IPM,MEM,FEP,CAZ,ATM,PTZ,CIP) podrían considerarse aislamientos con resistencia difícil de tratar (DTR), pero con la puntualización de que no se cuenta con la susceptibilidad a levofloxacina y que dos de los aislamientos son *P. putida* (Tabla 8).

Tabla 8. Perfiles de susceptibilidad (antibiogramas) en los 56 aislamientos de *Pseudomonas* spp. estudiados. Cada perfil se asocia a su clasificación según patrón de resistencia y a la enzima hallada en los aislamientos que componen cada uno.

Antibiótico									No. Pa Pp ^(A)	Perfil	Enzima (No. de aislamientos)
IPM	MEM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	GM	AK	CIP	9	XDR / DTR	VIM-2 (3); GES-1 (5); GES-2 (1); N (1)
IPM	MEM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	GM	CIP		1 2	XDR / DTR	VIM-2 (3)
IPM	MEM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	CIP			3	MDR / DTR	KPC-2 (3)
IPM	MEM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	GM			0 3	MDR	VIM-2 (3)
IPM	MEM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	AK			2	MDR	VIM-2/PER-1 (1); PER-1 (1)
IPM	MEM	FEP	CAZ	ATM	PTZ				1	MDR	N
IPM	MEM	FEP	CAZ	PTZ	GM				6	MDR	VIM-2 (6)
IPM	MEM	FEP	CAZ	PTZ					3	MDR	VIM-2 (3)
IPM	MEM	CAZ	ATM	PTZ	GM	CIP			0 1	MDR	VIM-2
IPM	MEM	CAZ	ATM	PTZ					0 1	MDR	VIM-2
IPM	MEM	CAZ	ATM	CIP					0 1	MDR	VIM-2
IPM	MEM	CAZ	PTZ	GM					1	MDR	VIM-2
IPM	MEM	CAZ	PTZ	CIP					2	MDR	VIM-2
IPM	MEM	CAZ	PTZ						1	MDR	VIM-2
IPM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	AK	CIP			2	MDR	VIM-2/PER-1 (1); PER-1 (1)
IPM	FEP	CAZ	ATM	PTZ	AK				1	MDR	PER-1
IPM	FEP	CAZ	ATM	AK					1	MDR	PER-1
FEP	CAZ	ATM	PTZ	GM	AK				1	MDR	PER-1
FEP	CAZ	ATM	PTZ	AK	CIP				1	MDR	PER-1
FEP	CAZ	ATM	GM	AK					2	MDR	PER-1 (2)
FEP	CAZ	ATM	AK	CIP					1	MDR	PER-1
FEP	CAZ	ATM	AK						10	MDR	PER-1 (10)

^(A)Número de aislamientos en cada antibiótico, indicando *P. aeruginosa* (Pa) y *P. putida* (Pp) separadas por una barra vertical cuando corresponde.

Abreviaturas: IPM, imipenem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; PTZ, piperacilina-tazobactam; GM, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina. XDR, extremadamente drogo-resistente; MDR, multidrogo resistente; DTR, difícil de tratar. N, ninguna β -lactamasa detectada.

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia

Entre los 56 aislamientos estudiados, 18 *P. aeruginosa* y 8 *P. putida* presentaron test de sinergia positivo entre carbapenems y EDTA, indicando la presencia de una carbapenemasa de tipo MBL (Figura 21.a). Adicionalmente, dos de ellos (Pa6415 y Pa873) también presentaron sinergia entre los discos de ceftazidime e imipenem, y amoxicilina-ácido clavulánico y ceftazidime y/o cefepime, indicando la presencia de una BLEE (Figura 21.b).

Por otro lado, cuatro aislamientos con test de sinergia con EDTA negativo, presentaron resultados de test de Rosco compatibles con la producción de carbapenemasa de clase A.

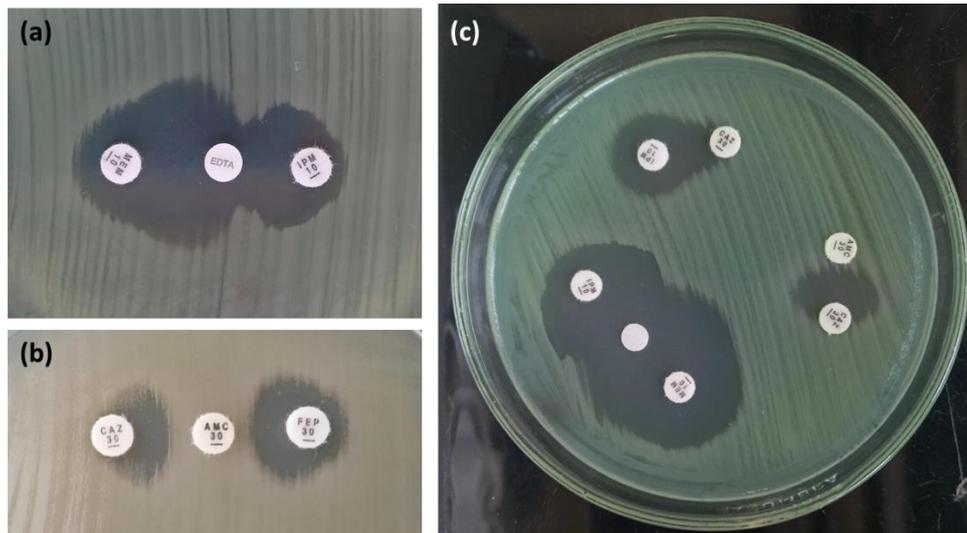


Figura 21. Resultados de test de sinergia positivos para (a) MBL, entre discos de imipenem (IPM) / EDTA / meropenem (MEM); (b) BLEE entre discos de ceftazidime (CAZ) / amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) / cefepime (FEP); y (c) MBL, y adicionalmente BLEE, entre discos de ceftazidime (CAZ) e imipenem, y entre ceftazidime y amoxicilina-ácido clavulánico (AMC). El disco sin rótulo en (c) corresponde a EDTA.

En relación a siete aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes del Hospital Maciel (2015) y obtenidos en el contexto de un posible brote, tanto el test de sinergia entre carbapenems y EDTA, así como el test de Rosco resultaron negativos. La ausencia de carbapenemasa se confirmó con mCIM-test, en el cual se determinaron halos de inhibición de 24-28 mm alrededor de los discos incubados con los siete aislamientos. De todos modos, debido a los perfiles de XDR y MDR exhibidos por estas cepas y por el contexto epidemiológico en el que se aislaron, se continuó con su caracterización. Cinco de los aislamientos presentaron test de sinergia positivo entre discos de amoxicilina-ácido clavulánico y ceftazidime/cefepime, y entre imipenem y ceftazidime, sugiriendo la presencia de BLEE, los dos restantes no exhibieron dicho fenotipo y fueron interpretados como no productores de β -lactamasa.



Figura 22. Resultados de test de sinergia positivos para BLEE, entre discos de ceftazidime (CAZ) y amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), y entre ceftazidime e imipenem (IPM).

Finalmente, los 20 aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de la UCI del Hospital de Clínicas, presentaron elevados niveles de resistencia a cefepime, ceftazidime y amikacina, y los primeros también a imipenem, por lo que se sospechó la presencia de carbapenemasas (Tabla 6). Sin embargo, solo uno de los aislamientos exhibió test de sinergia positivo con EDTA (Pa873), mientras que los 19 restantes no presentaron carbapenemasas. Los 20 aislamientos evidenciaron test de sinergia positivos entre ceftazidime/cefepime y amoxicilina-ácido clavulánico e imipenem, indicando la presencia de una BLEE (Figura 22). A pesar de no tratarse de microorganismos productores de carbapenemasa, de todos modos se continuó con el estudio de estas cepas debido al interés epidemiológico que representaban y por la posibilidad de tratarse de un mecanismo de resistencia emergente.

DetECCIÓN MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

En los 18 aislamientos de *P. aeruginosa* y 8 de *P. putida* que presentaron test de sinergia positivo con EDTA se amplificó por PCR el gen *bla*_{VIM}, cuya variante alélica detectada por secuenciación fue *bla*_{VIM-2}. Asimismo, en los dos aislamientos que además presentaron test fenotípicos compatibles con BLEE, también se halló el gen *bla*_{PER-1} (Tabla 6).

Por otro lado, en los cuatro aislamientos de *P. aeruginosa* con fenotipo compatible con carbapenemasa de clase A, se halló el gen *bla*_{KPC-2} en tres de ellos, y en el restante se amplificó *bla*_{GES}, cuya secuenciación reveló la presencia del alelo *bla*_{GES-2} correspondiente a una variante de GES carbapenemasa (Tabla 6).

En relación a los cinco aislamientos con test de sinergia positivos para BLEE provenientes del Hospital Maciel, la búsqueda por PCR resultó positiva para la presencia de *bla*_{GES}, cuya secuencia reveló la variante *bla*_{GES-1}, descrita como una variante de tipo BLEE que carece de actividad carbapenemasa. En concordancia con lo observado fenotípicamente, en los dos aislamientos con test de sinergia negativo no se encontró *bla*_{GES} por PCR. Finalmente, en los 20 aislamientos del período 2021-2022 provenientes de la UCI del Hospital de Clínicas que exhibieron test de sinergia positivo para BLEE se halló el gen *bla*_{PER-1}, y en uno de ellos también *bla*_{VIM-2} como se mencionó anteriormente (Tabla 6).

Estudios complementarios

Se realizaron estudios complementarios de susceptibilidad en los aislamientos portadores de *bla*_{PER-1} con y sin *bla*_{VIM-2} con respecto a la susceptibilidad a aztreonam y ceftazidime-avibactam.

Los dos aislamientos portadores de *bla*_{PER-1} y *bla*_{VIM-2}, Pa6415 y Pa873, fueron recuperados en la UCI del Hospital de clínicas en noviembre de 2016 y octubre de 2021 respectivamente. Ambos presentaron resistencia a ATM con valores de CIM > 256 mg/L, mientras que la CIM a CZA fue de 4 mg/L (sensible) para Pa6415 y 24 mg/L (resistente) para Pa873. En ambos casos, la determinación de la CIM a CZA en presencia de 4 mg/L de ATM se encontró cuatro veces por debajo de los valores de CZA solo, siendo de 1 y 6 mg/L respectivamente. Para ambos casos el FICI calculado resultó de 0,27 (teniendo en cuenta una concentración fija de ATM de 4 mg/L para la combinación), por lo que se demostró una sinergia entre ambos agentes. Asimismo, ambas cepas evidenciaron un test de sinergia positivo entre los discos de ATM y CZA (Figura 23).



Figura 23. Resultados de test de sinergia positivos entre discos de ceftazidime-avibactam (CTA) y aztreonam (ATM) en ambos aislamientos coproductores de VIM-2 y PER-1.

En relación a los 19 aislamientos de *P. aeruginosa* productores de PER-1, estudios complementarios de susceptibilidad demostraron resistencia a ceftolozane-tazobactam en todos los aislamientos, mientras que 14/19 fueron resistentes a ceftazidime-avibactam. La determinación de la CIM a CZA en Mueller-Hinton suplementado con 4 mg/L de ATM no evidenció una disminución de su valor con respecto a la CIM a CZA en Mueller-Hinton convencional, tampoco se evidenció sinergia entre los discos de CZA y ATM.

2.1.2 Enterobacterales

Se incluyeron un total de 44 *Enterobacterales* del cepario del laboratorio, de los cuales 32 pertenecieron a la familia *Enterobacteriaceae* y 12 a la familia *Morganellaceae*. A nivel de especie, 20 fueron *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Enterobacter cloacae*, 5 *Citrobacter freundii*, 4 *Proteus mirabilis*, 3 *Escherichia coli*, 2 *Providencia rettgeri*, 1 *Morganella morganii*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Enterobacter hormaechei* y 1 *Klebsiella aerogenes*.

Todos los aislamientos presentaron resistencia a carbapenems, y fenotipos de MDR/XDR (datos no mostrados). La búsqueda fenotípica de carbapenemasas reveló 33 aislamientos con sinergia con EDTA/DPA (Figura 24.a), indicando carbapenemasas de tipo MBL; 8 con sinergia con APB, indicando carbapenemasa de clase A (Figura 24.b), y dos aislamientos con ambos tipos de sinergia. Finalmente, un aislamiento no presentó ningún test de sinergia positivo, pero en el test de Rosco se observó un halo de resistencia a temocilina, indicando la presencia de una posible enzima de tipo OXA-48. Por otro lado, 18 aislamientos presentaron además test de sinergia compatible con la producción de BLEE, y tres con la producción de AmpC.

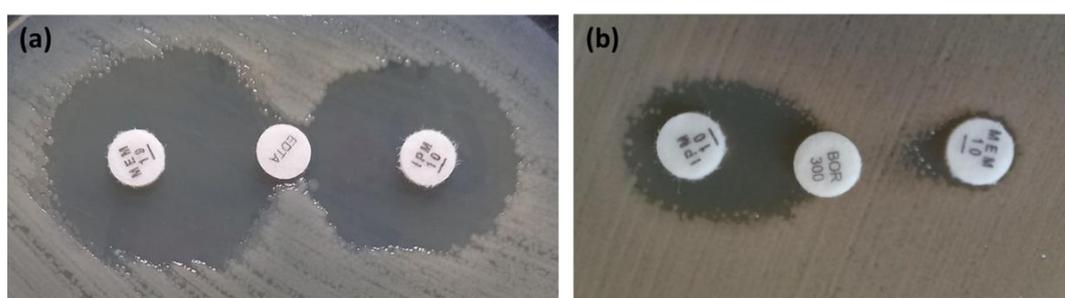


Figura 24. Sinergia positiva para (a) carbapenemasa de clase B, y (b) carbapenemasa de clase A. Abreviaturas: IPM, imipenem; MEM, meropenem; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; BOR, ácido fenil-borónico.

Todas las carbapenemasas detectadas por métodos moleculares presentaron concordancia con los test fenotípicos. En 31 aislamientos se detectó el gen de bla_{NDM-1} , en 5 bla_{KPC-2} , en 3 bla_{KPC-3} , en 2 bla_{VIM-2} , en 2 $bla_{NDM-1}+bla_{KPC-2}$, y en 1 bla_{OXA-48} . Con respecto a las BLEE, 15 cepas presentaron el gen $bla_{CTX-M-15}$, y las tres restantes presentaron $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-9}$ y bla_{SHV-12} respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Características y resultados de susceptibilidad en 44 aislamientos de *Enterobacterales* y la cepa control *E. coli* ATCC 25922.

ID ^(A)	Especie	Muestra	CARB	BLEE/ AmpC	CIM MEM ^(B)	CIM IPM ^(B)	CZA ^(C) (mm)	CZA- ATM ddst	CIM ATM ^(B)	CIM CZA ^(B)	CIM CZA ^(B) + ATM 4	FICI
HI003	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	16 (R)	16	Positivo	≥ 256 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,016
HC11/HI004	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	20	Positivo	128 (R)	0,5 (S)	< 0,016	0,063
HI005	<i>E. cloacae</i>	Sangre	NDM-1	AmpC	≥16 (R)	≥16 (R)	16	Positivo	128 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,031
HI006	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	NDM-1	CTX-M-15	8 (R)	2 (I)	20	Positivo	128 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,031
HI007	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	20	Positivo	128 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,031
HC12/HI008	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	14	Positivo	64 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,063
HI009	<i>E. cloacae</i>	Sangre	NDM-1	AmpC	≥16 (R)	≥16 (R)	16	Positivo	64 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,063
HI010	<i>C. freundii</i>	Sangre	NDM-1	AmpC	≥16 (R)	≥16 (R)	20	Positivo	32 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,125
HI011	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	18	Positivo	128 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,031
HC7/HI012	<i>E. cloacae</i>	Sangre	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	17	Positivo	64 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,063
HI013	<i>K. pneumoniae</i>	L. peritoneal	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	14	Positivo	≥ 256 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,016
HC6/HI023	<i>K. aerogenes</i>	L. peritoneal	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	8 (R)	18	Positivo	128 (R)	R ^(D)		
HI024	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	17	Positivo	0,25 (S)	R ^(D)		
HC10/HI025	<i>E. cloacae</i>	Piel	NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	14	Positivo	64 (R)	R ^(D)		
HC1/HI026	<i>P. rettgeri</i>	LBA	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	10	Positivo	≤ 0,06 (S)	R ^(D)		
HI027	<i>E. coli</i>	LBA	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	20	Negativo	≤ 0,06 (S)	> 256 (R)		
HC3/HI028	<i>M. morganii</i>	Orina	NDM-1	-	4 (R)	≥16 (R)	20	Negativo	≤ 0,06 (S)	> 256 (R)		
HI029	<i>P. rettgeri</i>	Sangre	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	10	Negativo	≤ 0,06 (S)	R ^(D)		

HI030	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	18	Positivo	1 (S)	R ^(D)		
HC2/HI031	<i>C. freundii</i>	Orina	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	16	Negativo	0,5 (S)	R ^(D)		
HC9/HI032	<i>P. mirabilis</i>	Orina	NDM-1	CTX-M-2	≥16 (R)	≥16 (R)	17	Positivo	0,25 (S)	R ^(D)		
HI033	<i>C. freundii</i>	Hueso	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	14	Negativo	0,25 (S)	R ^(D)		
HI034	<i>E. coli</i>	L. peritoneal	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	20	Negativo	0,25 (S)	> 256 (R)		
HI035	<i>C. freundii</i>	Piel	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	15	Negativo	0,125 (S)	R ^(D)		
HI036	<i>E. coli</i>	S. respiratoria	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	18	Positivo	0,125 (S)	R ^(D)		
HI037	<i>E. cloacae</i>	Hueso	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	16	Positivo	0,125 (S)	R ^(D)		
HI038	<i>P. mirabilis</i>	Orina	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	17	Negativo	≤ 0,06 (S)	R ^(D)		
HI039	<i>P. mirabilis</i>	Sangre	NDM-1	-	16 (R)	≥16 (R)	24	Negativo	≤ 0,06 (S)	R ^(D)		
HI040	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	NDM-1	CTX-M-15	16 (R)	≥16 (R)	23	Positivo	128 (R)	R ^(D)		
HI041	<i>K. oxytoca</i>	Sangre	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	14	Positivo	0,25 (S)	R ^(D)		
HC5/HI042	<i>P. mirabilis</i>	Herida Q.	NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	32	Negativo	≤ 0,06 (S)	2 (S)		
HI001	<i>E. hormaechei</i>	Sangre	VIM-2	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	22	Positivo	64 (R)	4 (S)	< 0,016	0,067
HC4/HI022	<i>E. cloacae</i>	Sangre	VIM-2	CTX-M-9	≥16 (R)	≥16 (R)	20	Positivo	4 (S)	4 (S)		
HI014	<i>K. pneumoniae</i>	Pta. catéter	KPC-3	-	≥16 (R)	≥16 (R)	24	Positivo	≥ 256 (R)	1 (S)	< 0,016	0,032
HI015	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	KPC-3	SHV-12	≥16 (R)	8 (R)	26	Positivo	128 (R)	0,38 (S)	< 0,016	0,073
HI016	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	KPC-3	-	≥16 (R)	≥16 (R)	24	Positivo	64 (R)	0,75 (S)	< 0,016	0,083
HI019	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	KPC-2	-	≥16 (R)	≥16 (R)	23	Positivo	≥ 256 (R)	1 (S)	< 0,016	0,032
HI020	<i>C. freundii</i>	Orina	KPC-2	-	≥16 (R)	≥16 (R)	30	Positivo	128 (R)	1 (S)	< 0,016	0,047
HC8/HI021	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	KPC-2	-	≥16 (R)	≥16 (R)	28	Positivo	32 (R)	0,5 (S)	< 0,016	0,157
HI043	<i>K. pneumoniae</i>	S. respiratoria	KPC-2	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	26	Positivo	128 (R)	S ^(D)		
HI044	<i>K. pneumoniae</i>	Pta. catéter	KPC-2	-	≥16 (R)	≥16 (R)	24	Positivo	≥ 256 (R)	S ^(D)		
HI017	<i>K. pneumoniae</i>	Hisopado rectal	KPC-2/ NDM-1	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	17	Positivo	≥ 256 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,016
HI018	<i>K. pneumoniae</i>	S/D	KPC-2/ NDM-1	-	≥16 (R)	≥16 (R)	15	Positivo	≥ 256 (R)	> 256 (R)	< 0,016	0,016
HI002	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	OXA-48	CTX-M-15	≥16 (R)	≥16 (R)	26	Positivo	≥ 256 (R)	0,25 (S)	< 0,016	0,08
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	ATCC	-	-	0.12	0.03		Negativo	0.06	0.06	< 0,016 (ATM)	0,03 mg/L

^(A)Aislamientos en negrita (n=12) estudiados en mayor profundidad. ^(B)Concentración inhibitoria mínima (CIM) expresada en mg/L. Entre paréntesis se indica la interpretación según CLSI 2023. ^(C)Diámetro de disco difusión expresado en mm. ^(D)Susceptibilidad determinada por disco difusión. Abreviaturas: CARB, carbapenemasa; BLEE, β-lactamasa de espectro extendido; ddst, test de sinergia de doble disco. FICI, índice de concentración inhibitoria fraccional. MEM, meropenem; IPM, imipenem; CZA, ceftazidime-avibactam; ATM, aztreonam. R, resistente; S, sensible.

En relación a la susceptibilidad a CZA y ATM, 14/44 aislamientos presentaron resistencia a ambos agentes, 15/44 fueron resistentes a CZA y sensibles a ATM; 12 presentaron resistencia a ATM pero sensibilidad a CZA; y 3 exhibieron susceptibilidad a ambos agentes.

Dentro de los 33 productores de MBL (31 NDM-1 y 2 VIM-2), la sinergia de doble disco entre CZA y ATM resultó positiva en 23 aislamientos, independientemente de su perfil de susceptibilidad (Figura 25.a,d). Los 10 restantes presentaron test de sinergia negativos, pero exhibieron susceptibilidad a ATM y/o CZA.

En relación al perfil de resistencia, 15 aislamientos productores de MBL exhibieron resistencia a ATM. Entre ellos, en 12 se evidenció la presencia de *bla*_{CTX-M-15}, mientras que los 3 restantes presentaron test fenotípicos compatibles con la expresión de β-lactamasa de tipo AmpC. Además, seis aislamientos mostraron sensibilidad a CZA a pesar de producir MBL.

En 12 aislamientos productores de MBL seleccionados para determinar la CIM a CZA en presencia de una concentración fija de 4 mg/L de ATM, se observaron valores de CIM < 0,016 mg/L, independientemente del valor original de la CIM a CZA de los mismos (256, 4 y 0,5 mg/L). Los valores de FICI se ubicaron entre 0,016 y 0,125, demostrando una actividad sinérgica entre CZA y ATM (FICI < 0,5) (Figura 25.b-c, e-f).

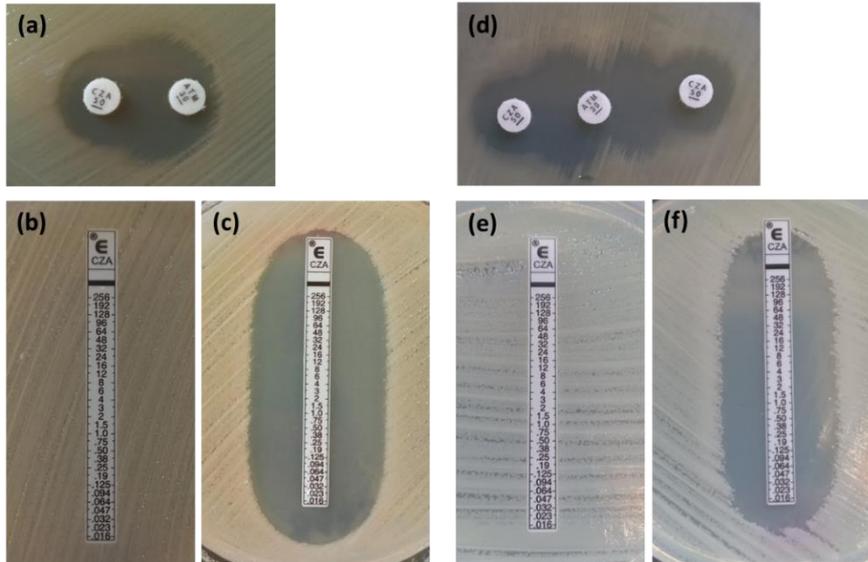


Figura 25. Sinergia de doble disco entre CZA y ATM (a, d), CIM a CZA (b, e) y CIM a CZA en agar Mueller-Hinton con 4 mg/L de ATM (c, f) en un aislamiento de *K. pneumoniae* portador de NDM-1 (a, b, c), un aislamiento de *K. pneumoniae* portador de NDM-1 + CTX-M-15 (d, e, f). Abreviaturas: CZA, ceftazidime-avibactam; ATM, aztreonam.

En relación a los 9 productores de serin-carbapenemasas (5 KPC-2, 3 KPC-3 y 1 OXA-48), todos fueron susceptibles a CZA y resistentes a ATM. En todos los casos el test de sinergia doble disco entre CZA y ATM fue positiva (Figura 26.a). La CIM a CZA en presencia de ATM 4 mg/L se determinó en siete aislamientos con CIM a CZA de 0,25 a 1 mg/L, y en todos los casos su valor fue $< 0,016$ mg/L. Los valores de FICI calculados se ubicaron entre 0,032 y 0,157, reflejando por lo tanto un efecto sinérgico de la combinación CZA más ATM (Figura 26.b-c).

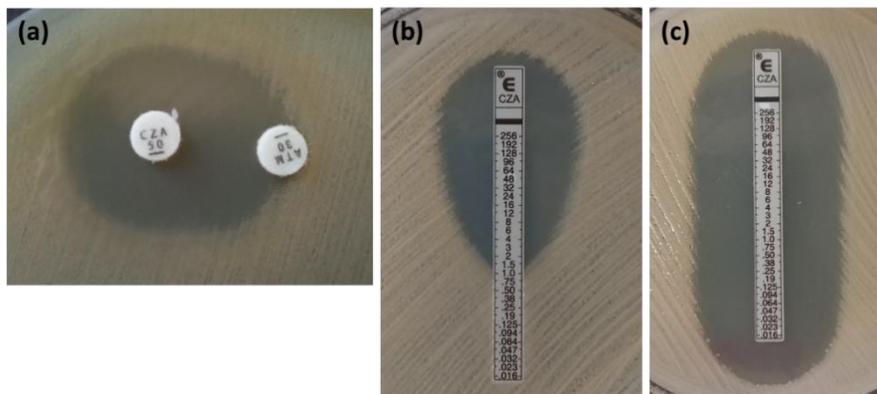


Figura 26. Sinergia de doble disco entre CZA y ATM (a), CIM a CZA (b) y CIM a CZA en agar Mueller-Hinton con 4 mg/L de ATM (c) en un aislamiento de *K. pneumoniae* portador de KPC-2.

Finalmente, las dos *K. pneumoniae* doble productoras de carbapenemasa (NDM-1 + KPC-2) presentaron valores de CIM a ATM y CZA ≥ 256 mg/L y exhibieron test de sinergia de doble disco positivos. Las CIM a CZA en Mueller-Hinton con ATM 4 mg/L fueron $< 0,016$ mg/L, y los valores de FICI de 0,016, demostrando sinergia entre ambos agentes.

En relación a la cepa control *E. coli* ATCC 25922, presentó valores de CIM a ATM de 0,06 mg/L, CZA de 0,064 mg/L y ceftazidime de 0,125 mg/L. Se observó que los valores de CIM a CZA y ceftazidime caían a 0,032 y $< 0,016$ mg/L respectivamente en presencia de 0,03 mg/L de ATM, lo cual equivale a una reducción de cuatro veces por debajo de la CIM en ambos casos.

Estudios adicionales

Un subgrupo de 12 aislamientos (señalados en negrita en la Tabla 9) fueron estudiados en mayor profundidad, por ser los primeros aislamientos portadores de carbapenemasas en el Hospital de Clínicas. Todos fueron obtenidos entre marzo del 2012 y diciembre del 2016, no presentaron relación

entre ellos ni se colectaron en el contexto de brotes. En su mayoría fueron aislados de infecciones nosocomiales, aunque cuatro se obtuvieron de los departamentos de emergencia o dermatología, sugiriendo un origen comunitario.

La determinación de susceptibilidad por Sensititre indicó que presentaban resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, piperacilina-tazobactam, amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, meropenem, aztreonam, ciprofloxacina, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Solo tres aislamientos fueron susceptibles a amikacina. Mientras que, en relación a colistina, cuatro aislamientos presentaron resistencia natural, mientras que los ocho restantes presentaron una CIM de ≤ 1 mg/L (intermedio según CLSI).

Diez de ellos fueron portadores de *bla*_{NDM-1}, incluyendo *P. mirabilis* (n=2), *E. cloacae* (n=2), *K. pneumoniae* (n=2), *P. rettgeri* (n=1), *C. freundii* (n=1), *M. morgani* (n=1) y *K. aerogenes* (n=1). Los dos aislamientos restantes fueron un *E. cloacae* productor de *bla*_{VIM-2}, y un *K. pneumoniae* productor de *bla*_{KPC-2}.

2.2 Relaciones de clonalidad

2.2.1 *Pseudomonas* spp. productoras de VIM-2

Los resultados de electroforesis en campo pulsado de las 16 *P. aeruginosa* portadoras de *bla*_{VIM-2}, mostraron tres clusters claramente diferenciados, dos de ellos formados por tres y dos aislamientos respectivamente (pulsotipos 1 y 3), y un tercero que contenía los 11 aislamientos provenientes del Hospital de Florida (pulsotipo 2) (Figura 27.a). En el caso de las 8 *P. putida* se observó mayor variabilidad en el resultado de PFGE, con solo dos aislamientos pertenecientes a un mismo pulsotipo (Figura 27.b).

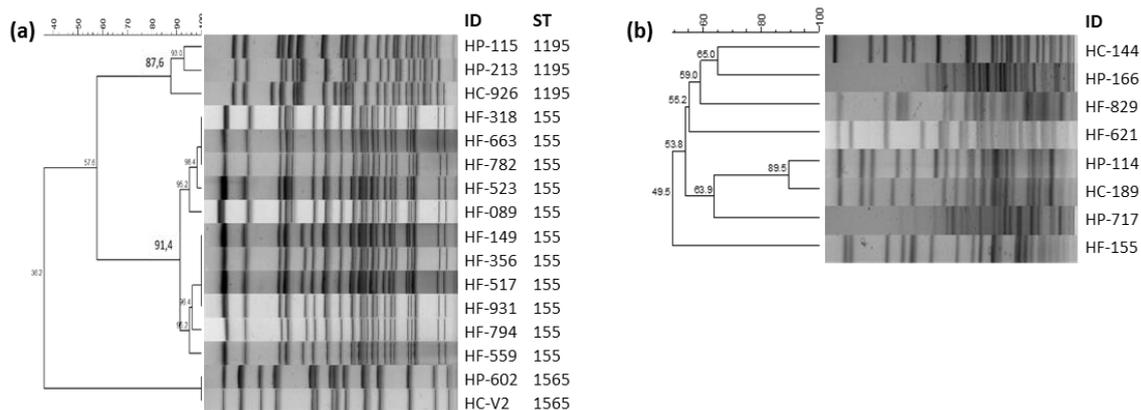


Figura 27. Resultado de PFGE de los aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* productores de *bla*_{VIM-2}. Dendrograma generado con el método UPGMA y coeficiente de similitud Dice (1% opti, 2% tol).

La tipificación mediante el esquema de MLST mostró que cada cluster observado en el PFGE se correspondía con un secuenciotipo diferente. Los aislamientos del pulsotipo I, provenientes uno del Hospital de Clínicas y dos del Hospital Pasteur, pertenecieron al ST1195. Por otro lado, los dos aislamientos del pulsotipo III, provenientes también de dichos hospitales, se agruparon en el ST1565, un nuevo secuenciotipo que fue descrito por primera vez en este trabajo. Finalmente, los aislamientos provenientes del Hospital de Florida (pulsotipo II) pertenecieron al ST155.

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* productoras de KPC y GES

Dentro de los aislamientos productores de serin-carbapenemasas, los tres productores de KPC-2 exhibieron patrones idénticos de PFGE (Figura 28), y pertenecieron al secuenciotipo ST654. Por otro lado, la cepa productora de GES-2 se caracterizó como ST179 dentro del esquema de MLST.

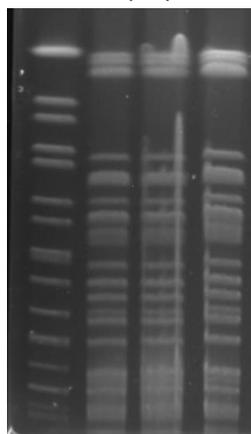


Figura 28. Resultado de PFGE de los tres aislamientos de *P. aeruginosa* portadoras de bla_{KPC-2} . Carril 1: *Salmonella* Braenderup; carriles 2 a 4: aislamientos 48098, M1229 y M1261 respectivamente.

Por otro lado, los resultados de PFGE demostraron > 90% de similitud entre los patrones de los aislamientos productores de GES-1, demostrando una estrecha relación clonal, mientras que los dos aislamientos bla_{GES} negativos no se encontraron clonalmente relacionados (similitud < 80%) (Figura 29). Las cinco cepas productoras de GES-1 pertenecieron al ST179 del esquema de MLST.

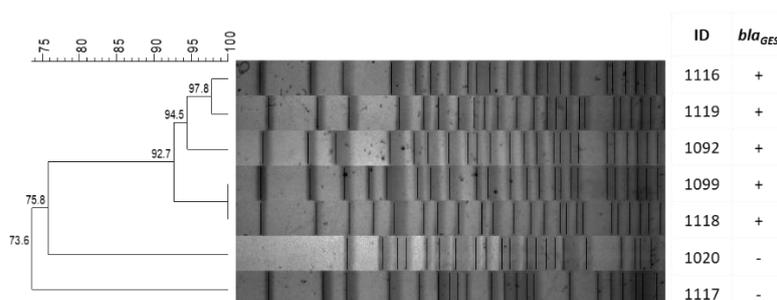


Figura 29. Resultado de PFGE y características de los aislamientos de *P. aeruginosa* portadores de bla_{GES-1} . Dendrograma generado con el método UPGMA y coeficiente de similitud Dice (1% opti, 2% tol).

2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* productoras de VIM-2 y PER-1

El análisis *in silico* de MLST a partir de los resultados de secuenciación de genomas completos, reveló que *P. aeruginosa* Pa6415 pertenecía al secuenciotipo ST463, coincidiendo con el resultado obtenido previamente por aplicación manual del esquema de MLST. Asimismo, se determinó su pertenencia al serotipo O4, y se destaca la presencia de los genes *exoS* y *exoU* (genotipo *exoS*+/*exoU*+), entre los más de 200 genes relacionados a virulencia encontrados por la base de datos *Virulence Finder*.

Por otro lado, el aislamiento Pa873 perteneció al secuenciotipo ST395 y serotipo O6. También presentó un importante arsenal de genes de virulencia, pero a diferencia de Pa6415, su genotipo fue *exoS*+/*exoU*-.

2.2.4 Brote de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de PER-1

Como se mencionó previamente, se estudiaron 20 aislamientos obtenidos en el transcurso de un brote de *P. aeruginosa* productora de PER-1 en la UCI del Hospital de Clínicas. Mediante PFGE se logró establecer la relación clonal entre 19 de ellos, observándose coeficientes de similitud > 80%. Además, en el árbol filogenético se identificaron dos sub-clusters formados por 9 y 10 aislamientos respectivamente, con coeficientes de similitud > 90% (Figura 30). El aislamiento restante (Pa873 previamente descrito) no estuvo clonalmente relacionado (dato no mostrado en la imagen de PFGE), y además de *bla*_{PER-1} presentó *bla*_{VIM-2}, y correspondió al secuenciotipo ST395.

Adicionalmente, cinco aislamientos fueron sometidos a secuenciación de lectura corta y uno también a secuenciación de lectura larga. Los resultados de análisis *in silico* indicaron su pertenencia al secuenciotipo ST309 y serotipo O11. Se identificaron más de 200 genes relacionados con virulencia, destacándose un genotipo *exoS*-/*exoU*+.

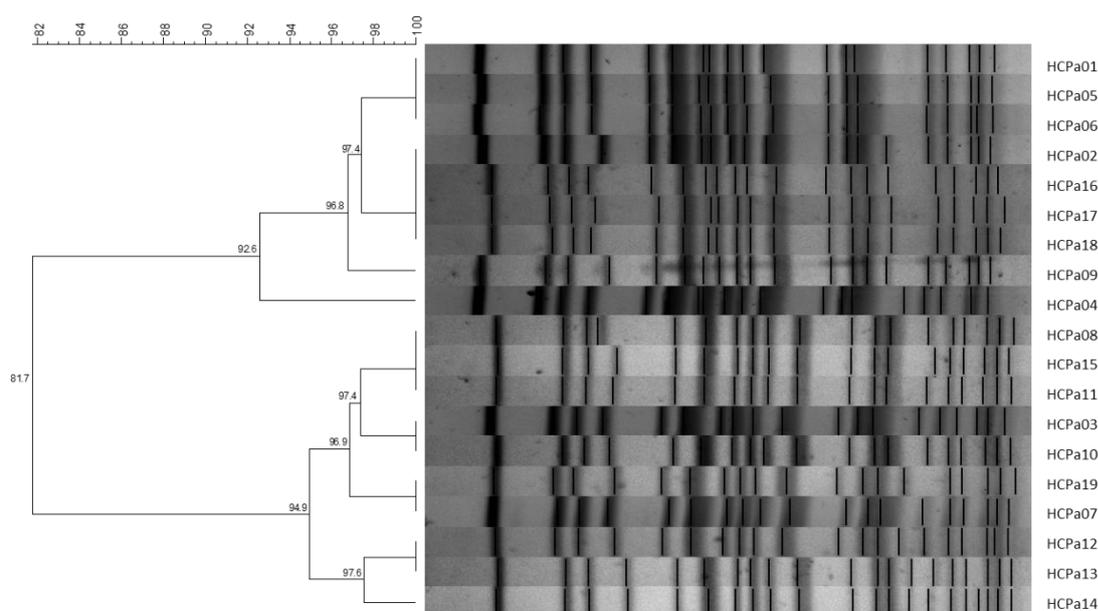


Figura 30. Resultado de PFGE de los 19 aislamientos de *P. aeruginosa* asociados a un brote en la UCI del Hospital de Clínicas. Dendrograma generado con el método UPGMA y coeficiente de similitud Dice (1% opti, 2% tol).

2.2.5 *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas

La determinación del secuenciotipo de los tres aislamientos de *K. pneumoniae* del subgrupo de 12 EPC del Hospital de Clínicas, se realizó mediante el esquema manual basado en PCR. Todos pertenecieron a secuenciotipos diferentes del esquema de MLST: ST11, ST14 y ST661.

2.3 Entornos genéticos de β -lactamasas y resistencias asociadas

2.3.1 *Pseudomonas* spp. productoras de VIM-2

En los 25 aislamientos de *Pseudomonas* spp. se amplificó el gen correspondiente a la integrasa de integrones de clase 1. En el caso de *P. aeruginosa* de los pulsotipos I y III (de instituciones de Montevideo), las regiones variables de los mismos presentaron a *bla*_{VIM-2} como único gen cassette (previamente registrado como In899). Mientras que las regiones variables de los aislamientos del pulsotipo II (Hospital de Florida), se encontró una nueva configuración de integrón de clase 1, conformada por 5'CS-*bla*_{VIM-2}-*aacA4*-*cmIA6*-*catB11*-3'CS, y que fue registrado como In1270. Por otro

lado, en *P. putida*, el integrón In899 se encontró en dos aislamientos del Hospital de Florida, mientras que In1270 se halló en 5 cepas, una proveniente de Florida, dos del Hospital Pasteur y dos del Hospital de Clínicas. Finalmente, un aislamiento obtenido del Hospital Pasteur presentó otra nueva configuración formada por 5'CS-*bla*_{VIM-2}-*bla*_{GES-7}-*aacA4*-*aacA7*-*aacA4*-3'CS, registrado como In1271 (Figura 31).

En ningún aislamiento se encontraron genes de tipo *qnr* (resistencia a quinolonas), ni genes codificantes de RMTasas (resistencia a aminoglucósidos). El único gen amplificado en todos los aislamientos fue *aacA4*, que como se mencionó anteriormente se encontró como cassette en los integrones de clase 1 In1270 e In1271, pero también se presentó en los aislamientos que tenían In899. En ningún caso se encontró la variante *aac(6')-Ib-cr* de este gen.

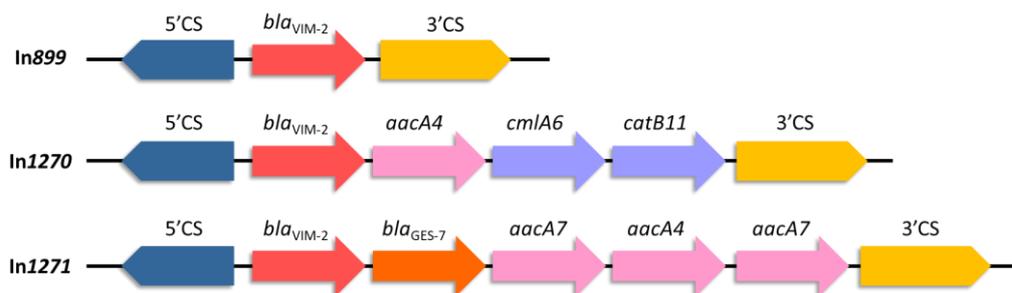


Figura 31. Integrones de clase 1 hallados en los aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* portadores de *bla*_{VIM-2}.

2.3.2 *Pseudomonas aeruginosa* productoras de KPC y GES

Tanto el aislamiento portador de *bla*_{GES-2} como los de *bla*_{GES-1} presentaron el gen de la integrasa de clase 1. Sin embargo, solo se pudo amplificar la región variable en el aislamiento con *bla*_{GES-2}, que presentó este gen junto con *aacA4* como cassettes en el mismo integrón con una configuración 5'CS-*bla*_{GES-2}-*aacA4*-3'CS.

Por otro lado, en los aislamientos con *bla*_{GES-1} se encontró este gen junto con *aacA4* asociados al extremo del 5'CS del integrón, pero no fue posible mapear el resto de la estructura (quedando solo 5'CS-*bla*_{GES-1}-*aacA4*-??). En estos casos, el extremo 3'CS no pudo ser dilucidado, ya que tanto las PCR con los cebadores específicos para la región variable como para la amplificación de *sul1* y *qacED1* arrojaron resultados negativos.

Ninguno de los aislamientos productores de KPC-2 o GES presentaron genes *qnr* ni de RMTasas.

2.3.3 *Pseudomonas aeruginosa* productoras de PER-1

Se realizó la secuenciación del genoma de los dos aislamientos de *P. aeruginosa* con VIM-2 y PER-1, así como de cinco aislamientos del brote de productoras de PER-1.

En ambas cepas coproductoras de VIM-2 y PER-1, se detectaron genes de resistencia a cinco familias de antibióticos, incluyendo aminoglucósidos (*aph(3')-VIa* [*aphA6*] y *aph(3')-IIb*); β-lactámicos (*bla*_{PER-1}, *bla*_{PAO}, y *bla*_{OXA-50-like}) incluyendo carbapenems (*bla*_{VIM-2}); fosfomicina (*fosA*); cloranfenicol (*catB7*); y sulfonamidas (*sul1*). Adicionalmente se encontró el pseudogen correspondiente a la β-lactamasa *bla*_{TEM-1B}, cuyo codón de inicio está truncado por la secuencia de inserción IS*Aba125*. Asimismo, en uno de los aislamientos (Pa6415) se encontraron dos genes adicionales de resistencia a aminoglucósidos (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*), y uno de resistencia a fluoroquinolonas (*qnrVC6*).

En ambos casos, los genes responsables de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, carbapenems, amikacina y fluoroquinolonas (solo en Pa6415) se hallaron localizados en regiones de

resistencia de 39,3 kb y 35,6 kb, caracterizadas por la inserción de múltiples elementos genéticos móviles en una secuencia de inserción *ISPa40* (familia Tn3), que se describe más adelante.

Por otro lado, en los aislamientos secuenciados del brote de *P. aeruginosa* productora de PER-1, se hallaron determinantes de resistencia a cinco familias de antibióticos, incluyendo aminoglucósidos (*aac(6')-II* [*aacA7*], y *aph(3')-IIb*); β-lactámicos (*bla*_{PER-1}, *bla*_{OXA-1035} y *bla*_{PDC-19a}), cloranfenicol (*catB7*); fosfomicina (*fosA*); y sulfonamidas (*sul1*). Adicionalmente, cuatro de las cinco cepas secuenciadas también tenían el gen de resistencia a quinolonas *qnrVC6*, el cual también se amplificó por PCR en otros siete aislamientos. Finalmente, cuatro aislamientos presentaron la variante alélica *crpP1* de la enzima modificadora de ciprofloxacina, y el restante tenía la variante *crpP*. El análisis en detalle del cromosoma de uno de los aislamientos (HCPa10) determinó que los genes responsables de la resistencia a cefalosporinas, amikacina y fluoroquinolonas se encontraban en una estructura de 43,3 kb que se describe a continuación.

2.3.4 Regiones de resistencia con *bla*_{PER-1}

Las regiones de resistencia de Pa6415 y Pa873 se encontraron flanqueadas por los invertidos repetidos izquierdo (IRL) y derecho (IRR) de la secuencia de inserción *ISPa40*. El gen de la transposasa de *ISPa40* se vio truncado dos veces por la inserción de otros dos transposones: *ISPu23* y Tn2. A su vez, Tn2 presentó a *bla*_{TEM-1b} como gen accesorio, cuyo codón de inicio (ATG) fue eliminado por la inserción del transposón complejo TnaphA6. Dicho transposón consiste en dos copias de *ISAb125*, con orientación directa, flanqueando al gen *aph(3')-Via*, codificante de una aminoglucósido-(3')-fosfotransferasa y que explica la resistencia a amikacina observada en ambos aislamientos. Dado que los componentes necesarios para la movilización de Tn2 se mantuvieron íntegros, *aph(3')-Via* podría ser movilizado tanto por TnaphA6 como por Tn2. Corriente abajo, se halló un tercer fragmento de *ISPa40*, constituido por el resto del gen de la transposasa (*tnpA*) y la secuencia completa del gen de la resolvasa (*tnpR*), así como las secuencias necesarias para la transposición, *resIII* y *resII*.

Adyacente a *tnpR* de *ISPa40*, se encontraron segmentos de 19,8 kb y 16,1 kb en Pa6415 y Pa873 respectivamente, flanqueados por los invertidos IRi e IRt, y que representan integrones de clase 1 derivados de Tn402. En Pa6415, esta estructura consistió en un integrón de clase 1 complejo derivado de In899 (*int11–bla*_{VIM-2}–*qacEΔ1–sul1*), seguido del elemento *ISCR1*, *qnrVC6* y una segunda copia de *ISCR1*, seguida de *bla*_{PER-1} y genes asociados, y nuevamente *qacEΔ1–sul1*. El módulo de movilización de Tn402 *tniCQBA-IRt* no se encontró completo, sino que en su lugar se hallaron un gen codificante de un transportador tipo AraJ de la familia MFS, seguido del gen de una transposasa de la familia Tn481, y el remanente de *tniA-IRt* de Tn402. Una estructura casi idéntica se encontró en Pa873, pero sin el tandem *ISCR1–qnrVC6*. Inmediatamente corriente abajo de IRt-Tn402, se halló la secuencia de inserción *ISPa17*. La similitud nucleotídica entre el IRi de Tn402 y el IRL de *ISPa17* sugiere que la estructura podría funcionar como una unidad de transposición basada en *ISPa17*, a través de la transposasa de esta IS. Esta teoría se sostiene con el hallazgo de repetidos directos (5'-CGCAG) detectados inmediatamente corriente arriba de IRi y corriente abajo de IRR. En consecuencia, estas putativas unidades de transposición fueron designadas como Tn7516 (22.020 pb) y Tn7517 (18.371 pb) en Pa6415 y Pa873 respectivamente (Figura 32).

Finalmente, corriente abajo de ambas unidades de transposición se encontraron los componentes restantes de *ISPa40*, conformados por *chrB1–chrA–sod* e IRL.

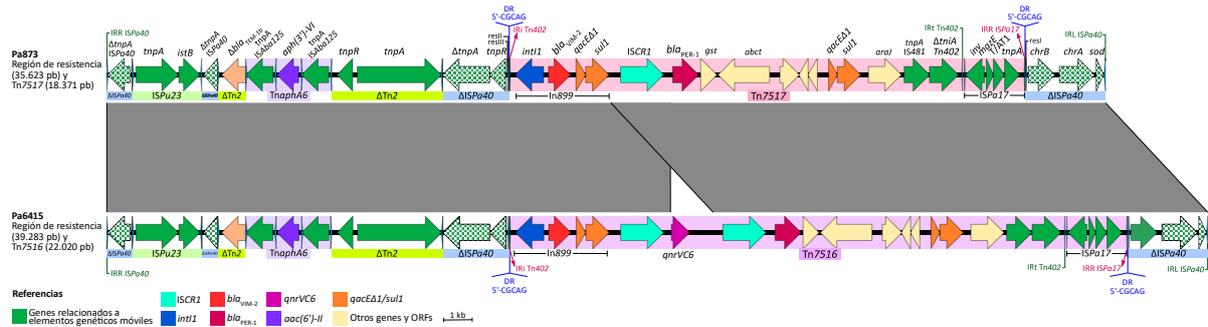


Figura 32. Mapa lineal de las regiones de resistencia Tn7517 y Tn7516 de *P. aeruginosa* Pa873 (No. acc. GenBank OP329418) y Pa6415 (No. acc. GenBank OP329419) respectivamente. Las regiones homólogas ($\geq 99\%$ de similitud) se muestran en barras grises. Los genes se encuentran representados por flechas y coloreados de acuerdo a sus funciones como se indica en la referencia.

Por otro lado, en HCPa10, tanto *bla*_{PER-1} como *qnrVC6* se hallaron formando parte de un integrón complejo de clase 1, conformado por el In/Tn de clase 1 *int1*–*aac(6')*–*ItrA*–*qacEΔ1*–*sul1*, seguido de una estructura en tándem con *ISCR1*–*qnrVC6*–*ISCR1*–*bla*_{PER-1}, finalizando en una segunda copia de *qacEΔ1*–*sul1*.

Corriente arriba y orientado de manera reversa, se encontró un transposón de la familia Tn3 denominado Tn4662, compuesto por los genes codificantes de su transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR*), tres sitios *res* (I, II y III), dos genes de un sistema toxina/antitoxina (*relE* y *relB*), y cuatro marcos abiertos de lectura (ORF) adicionales; todo flanqueado por sus respectivos repetidos invertidos (IRL e IRR). Adyacente a esta estructura se halló un fragmento de TnAs1 conformado por el gen truncado de la transposasa (Δ *tnpA*), el gen de la resolvasa (*tnpR*) y el sitio *res* RIII. Finalmente, corriente abajo del integrón complejo de clase 1, se encontró la secuencia de inserción *IS6100*, y luego una segunda copia de Tn4662 ubicada a 6,4 kb de distancia y orientada de forma directa. Flanqueando ambas copias de Tn4662, se encontraron los repetidos directos 5'-TACTC, delimitando toda la estructura que por lo tanto constituye un transposón compuesto, el cual fue designado como Tn7723. Adicionalmente, corriente arriba del primer repetido directo se hallan 979 pb de un gen codificante de un transportador de tipo MFS, mientras que corriente abajo del segundo repetido directo, se encuentran los restantes 228 pb de dicho gen (Figura 33).

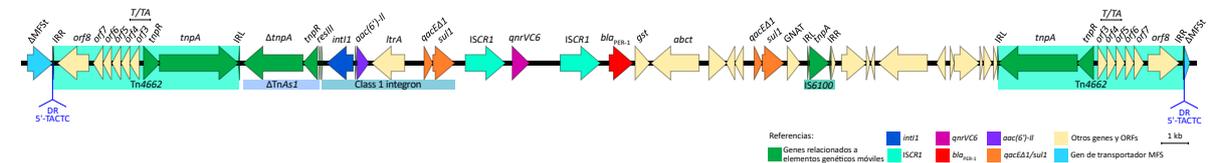


Figura 33. Mapa lineal del entorno de *bla*_{PER-1} y *qnrVC6* en *P. aeruginosa* HCPa10, conformado por el transposón compuesto Tn7723, delimitado por dos copias de Tn4662 y flanqueado por dos repetidos directos (5'-TACTC). Los genes se encuentran representados por flechas y coloreados de acuerdo a sus funciones como se indica en la referencia.

La comparación de estas regiones de resistencia en la base de datos GenBank utilizando BLAST, reveló que el arreglo que las tres presentan en común *ISCR1*–*bla*_{PER-1}–*gnt*–*abct*–*qacEΔ1*–*sul1*, ha sido ampliamente documentado en plásmidos y cromosomas de diferentes bacilos Gram negativos, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Enterobacteriales*, entre otros. Sin embargo, la asociación con *qnrVC6* a dicha estructura fue menos frecuente, habiéndose documentado en tres plásmidos de *P. aeruginosa* y uno de *Pseudomonadaceae*, y otro de *Acinetobacter johnsonii*.

A diferencia de estas estructuras, los elementos aquí descritos fueron encontrados en el cromosoma bacteriano. En todos los casos, la plataforma conteniendo a *bla*_{PER-1}/*qnrVC6* se encontró asociada corriente arriba a algún tipo de integrón de clase 1, formando un integrón complejo. En el caso del integrón de clase 1 de HCPa10 consistió en un nuevo rearrreglo de cassettes en su región variable (*aac(6')-II-ltrA*), y tanto su presencia como la de In899 (de Pa6415) no habían sido previamente descritas en esta plataforma. Por otro lado, en la porción final de la estructura, se encontraron diferentes elementos de la familia Tn3, que en el caso de HCPa10 fue IS6100, hallada también en otra estructura de la base de datos; y en Pa6415 fue IS481, que no fue encontrada en las otras regiones (Figura 34). Asimismo, ninguna de las plataformas halladas en la base de datos se asoció a ISPa17 o Tn4661.

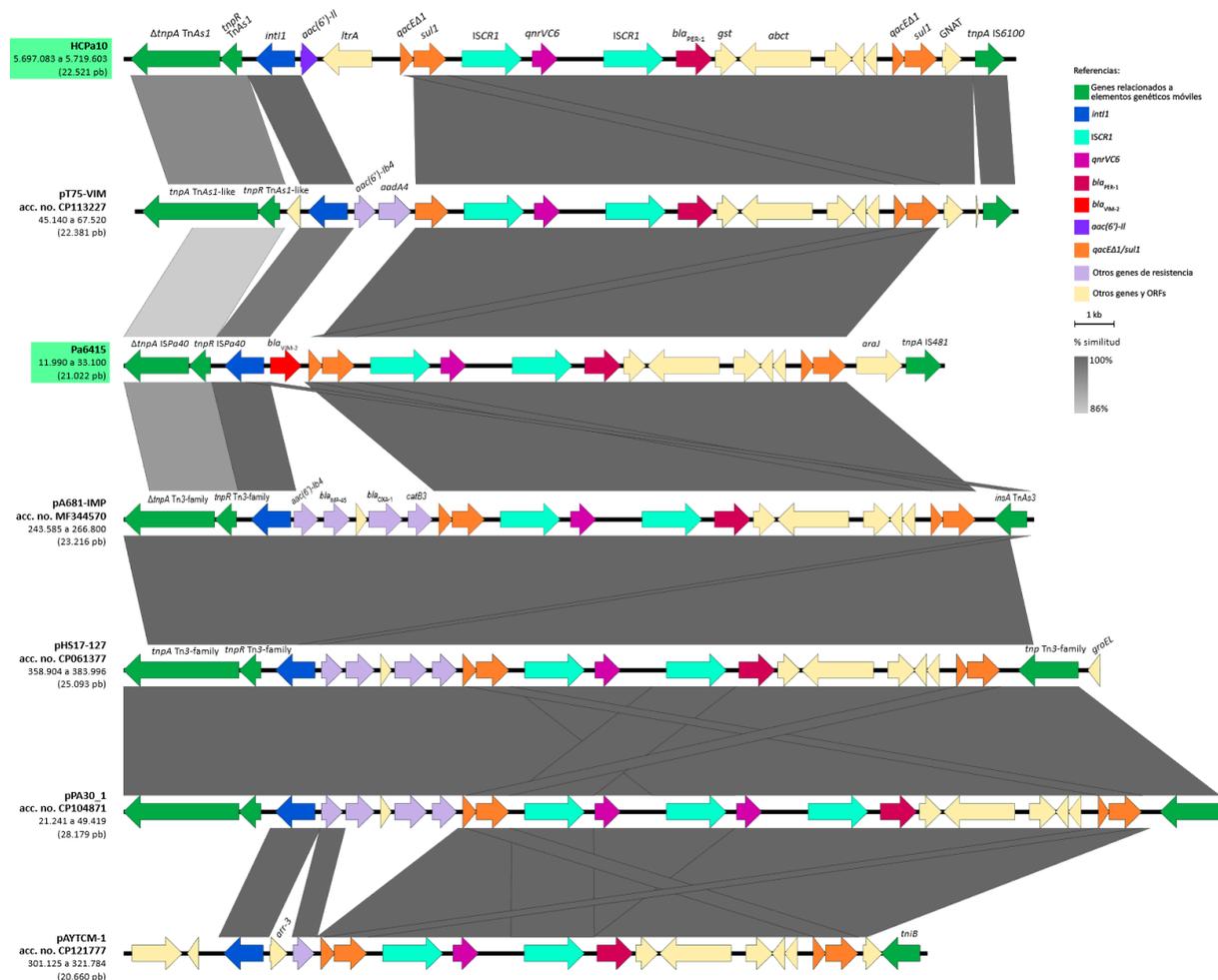


Figura 34. Comparación por BLASTn de la región de resistencia de HCPa10, conteniendo *bla*_{PER-1} y *qnrVC6*, con entornos similares reportados en GenBank. Los genes se encuentran representados por flechas y coloreados de acuerdo a sus funciones como se indica en la referencia. Los segmentos homólogos están representados con barras en tonos de gris de acuerdo a la identidad nucleotídica como se indica en la referencia.

Por otro lado, la presencia conjunta de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{PER-1} se encontró una sola vez en GenBank. El primer gen se halló formando parte de un integrón de clase 1 de configuración *int1-dfrB1-aac(6')-Ib-bla*_{VIM-2}-*qacEΔ1-sul1*; mientras que el segundo se asoció a ISCR1 y *qnrVC6* como se describe en este trabajo, pero presentando corriente arriba un integrón de clase 1 con *aac(6')-Ib4-aadA1* como genes cassette. Sin embargo, ambas plataformas estaban separadas por más de 80 kb en un plásmido de *Pseudomonadaceae* (GenBank acc. No. CP113227), indicando que, a diferencia de las estructuras aquí descritas, no forman parte de la misma región de resistencia.

Finalmente, el transposón *TnaphA6* (Pa873 y Pa6415) se encontró ampliamente documentado en la base de datos, en *Acinetobacter* spp. Sin embargo, la búsqueda restringida a *Pseudomonas* spp. evidenció que, si bien se encuentran descritos tanto *aphA6* como *ISAbA125* por separado, no hay registro previo de este transposón en dicho género bacteriano, representando otra estructura novedosa.

2.3.5 Enterobacterias productoras de carbapenemasa

Se caracterizaron entornos en los 12 aislamientos indicados en la [Tabla 9](#), correspondientes a los primeros portadores de carbapenemasas descritos en el Hospital de Clínicas, y cuyas características se detallan en la [Tabla 10](#). En 10 de ellos se encontraron integrones de clase 1 mediante PCR. En seis cepas productoras de NDM-1 se encontró el integrón In907 (5'CS-*aadB*-*bla*_{OXA-10}-*aadA1*-3'CS) ([Figura 35.a](#)), el cual en cuatro de ellas se asoció a *ISCR1-qnrVC6* formando un integrón complejo descrito por primera vez en este trabajo ([Figura 35.b](#)).

Por otro lado, un aislamiento presentó un integrón In35 (5'-CS-*aacA4*-*bla*_{OXA-2}-*orfD*-3'CS), y otro In27 (5'CS-*dfrA12*-*orfF*-*aadA2*-3'CS). El aislamiento portador de *bla*_{VIM-2} presentó este gen en un integrón descrito por primera vez en este trabajo, designado como In1687 (5'CS-*bla*_{VIM-2}-*dfrA7*-3'CS), y adicionalmente presentó un segundo integrón In293 (5'CS-*aacdB*-*aadA1*-3'CS). Finalmente, el aislamiento productor de KPC-2 presentó el integrón In183 (5'CS-*dfrA1*-3'CS) ([Figura 35.a](#); [Tabla 10](#)).

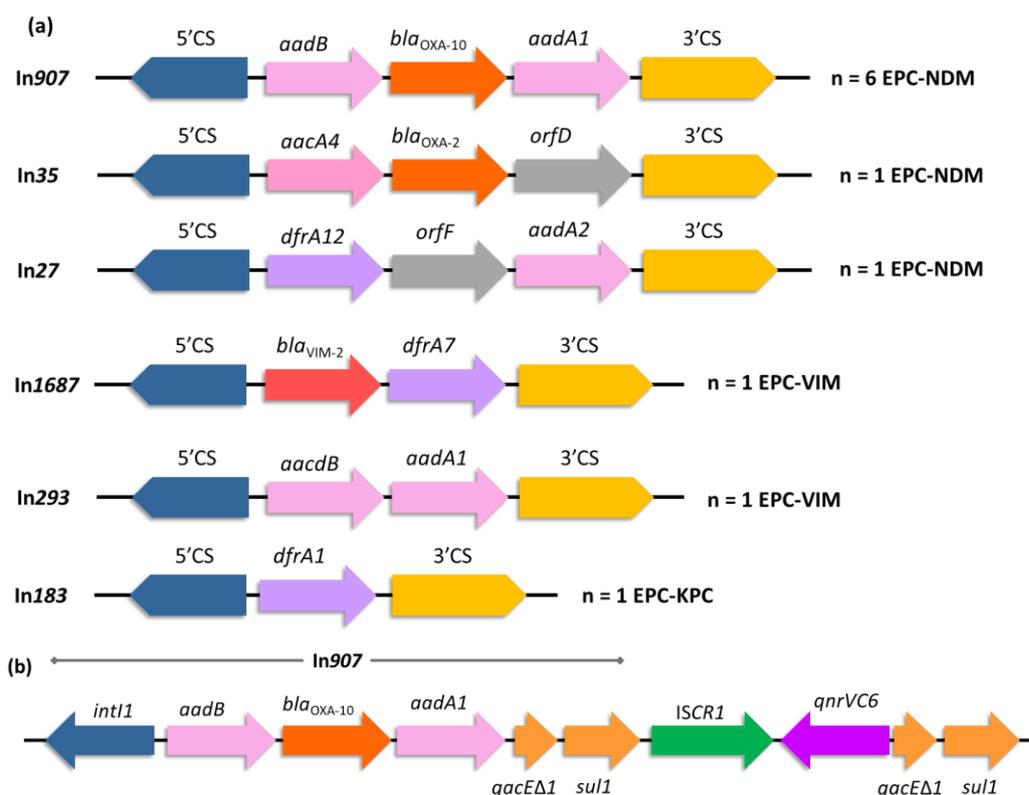


Figura 35. (a) Estructura de los integrones de clase 1 caracterizados en los aislamientos de EPC. **(b)** Estructura del integrón complejo de clase 1 derivado de In907 con la asociación de *ISCR1* y *qnrVC6*.

Adicionalmente se encontraron genes de resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos de tipo *aac(6')-Ib*, otros β-lactámicos como *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, y *bla*_{CTX-M-15}, y fluoroquinolonas como *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrD1*, además de *qnrVC6* ya mencionado ([Tabla 10](#)).

2.3.6 Caracterización de plásmidos y entorno genético de *bla*_{NDM-1}

En los ensayos de conjugación se obtuvieron nueve transconjugantes con genes codificantes de carbapenemasas. Mediante PFGE de los transconjugantes se hallaron cinco plásmidos de tipo IncC de 170-200 kb con *bla*_{NDM-1} y uno con *bla*_{VIM-2}; los restantes tres aislamientos, también portadores de *bla*_{NDM-1} presentaron un plásmido IncHI1 de 500 kb, dos IncC/IncM1 de 104 y 55 kb, y uno de 33 kb no tipificable respectivamente (Tabla 10).

A partir de la secuencia del plásmido de la cepa HC02, se logró ensamblar el entorno del gen *bla*_{NDM-1}, que consistió en una estructura de 15.802 pb conformada por un transposón compuesto, descrito por primera vez en este trabajo y designado como Tn6935. En ambos extremos del transposón se encuentran las secuencias de inserción *ISKox2-like*, ambas con orientación directa, y en cuyos extremos se presentaron los repetidos directos 5'-TGATT. Corriente arriba de *bla*_{NDM-1} se hallaron las secuencias de inserción *ISAbal4* e *ISAbal25*, y entre medio de ellas el gen de resistencia a amikacina *aph(3')-VI* (*aphA6*) (Figura 36).

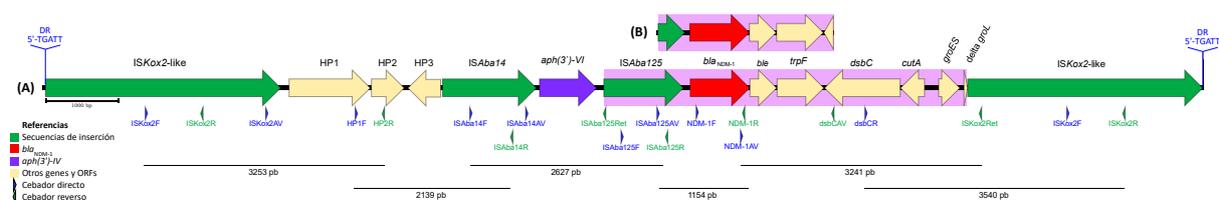


Figura 36. Tn6935 (entorno A de *bla*_{NDM-1}), y entrono B (corto). Abajo se indican los cebadores utilizados para mapeo por PCR y secuenciación por Sanger. Los genes se encuentran representados por flechas y coloreados de acuerdo a sus funciones como se indica en la referencia. La estructura conservada de Tn125 se encuentra resaltada en ambos entornos.

El mapeo por PCR en los demás aislamientos productores de NDM-1, reflejó que este entorno se encontraba en otros siete, incluyendo cuatro con plásmidos de 170-200 kb de tipo IncC, uno con IncHI1 de 500 kb, el IncC/IncM1 de 140/55 kb, el no tipificable de 33 kb y otro aislamiento en el que no se obtuvieron transconjugantes (Tabla 10).

El análisis por BLAST de Tn6935 contra la base de datos de GenBank demostró que el entorno inmediato de *bla*_{NDM-1} se encuentra ampliamente documentado, ya que se corresponde con parte de la plataforma originalmente involucrada en su diseminación, el transposón Tn125. Sin embargo, la presencia de *ISKox2-like* es nueva en esta plataforma.

Asimismo, el hallazgo de repetidos directos en los extremos de Tn6935, y su presencia en diferentes tipos de plásmidos, apoyan la suposición de que se trata de un transposón compuesto con capacidad de movilizarse.

Finalmente, la estructura completa de Tn6935 no pudo encontrarse en dos aislamientos con *bla*_{NDM-1}, en los que solo pudo ser mapeado por PCR un entorno corto conformado por Δ *ISAbal25*-*bla*_{NDM-1}-*ble*-*trpF*-*dsbC*.

Tabla 10. Características de los *Enterobacteriales* productores de carbapenemasa, incluyendo los genes y entornos determinados por PCR y la información complementaria de WGS.

ID	Fecha	Especie	CARB ^(A)	RV (5'CS-3'CS) ^(B)	In ^(C)	Otros genes de RAM ^(D)	Genes en Tc ^(D)	Plásmidos PCR/PFGE ^(E)	Entorno <i>bla</i> _{NDM-1} ^(D)	WGS ^(F)
HC1	03/2012	<i>P. rettgeri</i>	NDM-1	<i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	In907	<i>qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1, qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{TEM-1}	IncC 170 kb	Tn6935	IncC 199 kb
HC2	03/2012	<i>C. freundii</i>	NDM-1	<i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	In907	<i>qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1, qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{TEM-1}	IncC 200 kb	Tn6935	IncC 199 kb
HC3	08/2012	<i>M. morgani</i>	NDM-1	-	-	<i>qnrD1</i>	No Tc	No Tc	Tn6935	IncT 189 kb
HC4	12/2012	<i>E. cloacae</i>	VIM-2	<i>bla</i> _{VIM-2} - <i>dfrA7/aadB-aadA2</i>	In1687 In293	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aac(6')Ib-cr, qnrA1</i>	<i>bla</i> _{VIM-2} - <i>dfrA7, bla</i> _{TEM-1}	IncC 200 kb	-	N/A
HC5	02/2014	<i>P. mirabilis</i>	NDM-1	<i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	In907	<i>qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1, qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{TEM-1}	IncC 200 kb	Tn6935	IncC 199 kb
HC6	02/2015	<i>K. aerogenes</i>	NDM-1	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncHI1 500 kb	Tn6935	IncHI2/ IncC 500 kb
HC7	06/2016	<i>E. cloacae</i>	NDM-1	<i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	In907	<i>qnrVC, aac(6')Ib, bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')Ib-cr, qnrB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1, qnrVC, aac(6')Ib</i>	IncC-IncM1 104/55 kb	Tn6935	IncC 124 kb
HC8	07/2016	<i>K. pneumoniae ST11</i>	KPC-2	<i>dfrA1</i>	In183	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(6')Ib</i>	No Tc	No Tc	-	N/A
HC9	08/2016	<i>P. mirabilis</i>	NDM-1	<i>aac(6')Ib - bla</i> _{OXA-2} - <i>orfD (gcuD)</i>	In35	<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>aac(6')Ib</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	NT 33 kb	Tn6935	NT 61,6 kb
HC10	11/2016	<i>E. cloacae</i>	NDM-1	<i>dfrA12 - orfF (gcuF) - aadA2</i>	In27	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')Ib-cr, qnrA1, qnrB1</i>	No Tc	No Tc	B	N/D
HC11	12/2016	<i>K. pneumoniae ST14</i>	NDM-1	<i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	In907	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')Ib, aac(6')Ib-cr, qnrB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	IncC 200 kb	Tn6935	IncC 193 kb
HC12	12/2016	<i>K. pneumoniae ST661</i>	NDM-1	<i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1</i>	In907	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')Ib-cr, qnrA1, qnrB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>aadB - bla</i> _{OXA10} - <i>aadA1, qnrA1,</i>	IncC 170 kb	B	IncC 173 kb / Entorno ISCR1

^(A) Tipo de carbapenemasa; ^(B) genes en región variable (RV); ^(C) Integrón de clase 1; ^(D) caracterizados por PCR; ^(E) Grupo de incompatibilidad plasmídica (Inc) determinado por PCR y tamaño plasmídico estimado por PFGE; ^(F) Grupo de incompatibilidad y tamaño de plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} determinados por resultados de secuenciación de genomas completos (WGS). N/A, no aplica; N/D, no determinado

La posterior secuenciación del genoma completo de nueve aislamientos permitió obtener mayor información acerca de los plásmidos y los entornos de *bla*_{NDM-1}. Entre ellos se lograron confirmar tres plásmidos de tipo IncC de 199 kb, que presentaron más de 99% de identidad (aislamientos HC1, HC2 y HC5), y además portaron tanto Tn6935 como el integrón complejo In907 asociado a *qnrVC6*. Un cuarto plásmido similar se halló en el aislamiento HC11, pero de 193 kb de tamaño y sin In907, tal como se había determinado previamente por PCR.

Otro plásmido de tipo IncC se observó en el aislamiento HC7, el cual también presentó tanto Tn6935 como In907, pero su tamaño fue de 124 kb; en este aislamiento también se halló un plásmido de tipo IncM de 74 kb al cual no se le asociaron genes de RAM. En el aislamiento HC6, se confirmó un plásmido de 500 kb pero con grupos de incompatibilidad IncHI2/IncC de acuerdo a PlasmidFinder (en contraste al IncHI1 determinado por PCR), en el cual también se halló Tn6935 y los genes *bla*_{CTX-M-15} y *qnrB1*.

En relación al aislamiento que presentó un plásmido no tipificable de tamaño estimado por PFGE de 33 kb (HC9), por WGS se constató la presencia de tres plásmidos, uno de tipo IncC de 165 kb en el cual se hallaron *bla*_{CTX-M-2} y el integrón de clase 1 In35 (*aacA4–bla*_{OXA-2}). Los otros dos plásmidos, de 61,6 kb y 35,7 kb fueron no tipificables por PlasmidFinder, y Tn6935 fue hallado en el primero, mientras que el segundo no se asoció con genes de resistencia. Finalmente, el aislamiento HC3, en el cual no se obtuvieron transconjugantes, por WGS se halló un plásmido de tipo IncT de 189 kb en el cual se encontró Tn6935, mientras que el gen *qnrD* se ubicó en un plásmido de 3200 pb de tipo Col3M.

La secuenciación del aislamiento HC12, correspondiente a *K. pneumoniae* ST661, reveló la presencia de *bla*_{NDM-1} en un plásmido de tipo IncC de 173 kb, en el cual también se hallaron *qnrA1*, *aph(3')-Ia*, *dfrA12*, *cmlA5* entre otros genes de resistencia. También se identificaron otros tres plásmidos, uno de 123 kb de tipo IncFIK donde se hallaron *bla*_{CTX-M-15}, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrB1* entre otros; y dos plásmidos adicionales de 187 kb y 111 kb de tipo IncFIB en los cuales no se hallaron determinantes de resistencia de acuerdo a ResFinder. En este caso, el entorno de *bla*_{NDM-1} se había caracterizado parcialmente por PCR ya que este aislamiento no presentaba Tn6935 (entorno B en la [Figura 36](#)), por lo que su secuenciación permitió dilucidar esta estructura. Este aislamiento presentó una compleja región de resistencia de 42 kb que incluyó también la inserción de distintos elementos genéticos móviles. Particularmente *bla*_{NDM-1} se encontró asociado corriente arriba a un integrón de clase 1 con *dfrA12–aadA2* como genes cassette, y a una copia del elemento ISCR1, que se encontró truncando al gen *dsbC*. Adyacente a este se hallaron *trpF*, *ble*, *bla*_{NDM-1} y una porción de ISAbA125, truncada por la inserción de una segunda copia de ISCR1 asociada a un fragmento de *qacEΔ1* y *sul1*. Corriente abajo, se ubicó una tercera copia de ISCR1 asociada a *qnrA1*, *cmlA5* y *qacEΔ1–sul1*. Esta región presentó otros genes asociados a resistencia a antimicrobianos, incluyendo macrólidos [*mph(A)* y sus genes reguladores *mphR(A)* y *mrx*], aminoglucósidos [*aph(3')-Ia* (o *aphA1*)]; así como el operón *mer* de resistencia a mercurio (*merEDACPTR*). Además, se encontraron varias secuencias de inserción incluyendo dos copias de IS1R, IS4321-like e IS26, así como IS5075-like e IS6100 ([Figura 37](#)).

En análisis por BLASTn del entorno de *bla*_{NDM-1}, se encontraron reportes de su asociación con ISCR1 interrumpiendo la secuencia de *dsbC* y/o ISAbA125, y la presencia de integrones de clase 1 pero con genes cassette diferentes a los hallados en esta plataforma, indicando la novedad de la misma.

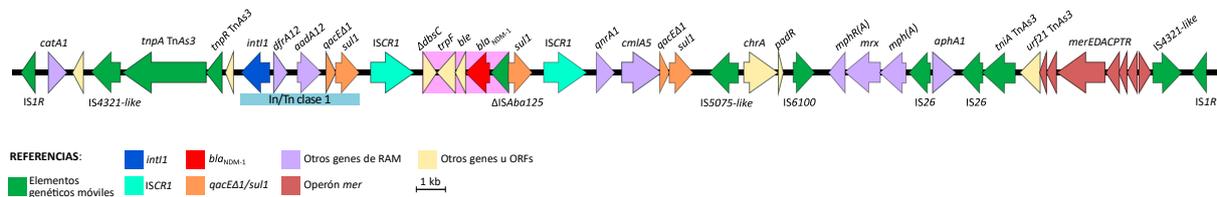


Figura 37. Entorno de *bla*_{NDM-1} en el aislamiento HC12 (*K. pneumoniae* ST661). Los genes se encuentran representados por flechas y coloreados de acuerdo a sus funciones como se indica en la referencia. El entorno conservado de *bla*_{NDM-1} se encuentra resaltado en rosado.

3 DISCUSIÓN

3.1 Efectividad de ceftazidime-avibactam y aztreonam

Los resultados obtenidos que demuestran efectividad de la combinación CZA-ATM contra EPC, concuerdan con reportes relacionados a tratamiento exitoso de infecciones por microorganismos productores de MBL ya sea con ATM más avibactam o ATM más CZA[208–210]. Sin embargo, los reportes son más limitados con respecto al estudio de efectividad de esta combinación en infecciones por microorganismos productores de serin-carbapenemasas[211].

En este sentido, se encontró que la combinación de CZA más ATM presentó un efecto sinérgico no solo sobre *Enterobacteriales* productores de MBL, sino también sobre productores de OXA-48, KPC-2, KPC-3 y productores de doble carbapenemasa. Un efecto sinérgico también se observó en los aislamientos de *P. aeruginosa* coproductores VIM-2 y PER-1, pero no en los productores de PER-1.

La combinación de CZA más ATM resultó efectiva en 44 aislamientos de EPC y dos *P. aeruginosa* productoras de MBL, ya sea por una sinergia positiva o por susceptibilidad a una de las dos drogas. Los valores de FICI para los 23 aislamientos analizados fueron menores a 0,5, alcanzando valores tan bajos como 0,016 incluso en coproductores de NDM-1 y KPC-2. Se destaca que los valores de FICI de las dos cepas de *P. aeruginosa* (0,27) fue mayor al observado para las EPC. Esto sumado a que en los aislamientos productores solo de PER-1 no se observó sinergia podría indicar la existencia de otros mecanismos que contribuyen a la resistencia en esta especie.

Por otro lado, incluso en aislamientos productores de KPC-2, KPC-3 y OXA-48, que usualmente exhiben susceptibilidad a CZA, su uso en combinación con ATM podría contribuir a la reducción de la cantidad de antibiótico administrado durante el tratamiento, o a garantizar resultados clínicos y/o microbiológicos favorables, previniendo recaídas. En este sentido, el uso de CZA para el tratamiento de microorganismos portadores de *bla*_{KPC} se ha asociado a la emergencia de variantes alélicas de KPC resistentes a esta combinación, como por ejemplo *bla*_{KPC-31}. La asociación de CZA con aztreonam podría obstaculizar la aparición de mutantes resistentes[212].

Por otro lado, dos *K. pneumoniae* y dos *P. mirabilis* productores de NDM-1, una *P. aeruginosa* y dos *Enterobacter* spp. productores de VIM-2 fueron susceptibles a CZA. Aunque estos resultados no son los esperados de acuerdo al perfil inhibitorio de avibactam, existen reportes previos de un número limitado de *Enterobacteriales* y *P. aeruginosa* productores de MBL y susceptibles a CZA[213]. Este perfil podría explicarse por la presencia de promotores débiles que afectan la expresión génica como ha sido previamente reportado[214]. Este punto resulta de interés, ya que en presencia de un microorganismo MDR, la producción de MBL no necesariamente excluye el uso de CZA, el cual podría convertirse en una opción terapéutica valiosa. Estudios en mayor profundidad con respecto a la expresión de estas enzimas son necesarios para determinar su nivel de implicancia en los perfiles observados.

Por otro lado, para la cepa control *E. coli* ATCC 25922 (no productora de β -lactamasa), se observaron descensos de 4 diluciones en la CIM de ceftazidime y CZA en combinación con 0,03 mg/L de ATM (equivalente a $\frac{1}{2}$ CIM). Khan et al. reportaron un efecto sinérgico negativo de ATM más CZA en esta cepa, sin embargo evaluaron concentraciones por encima de los valores de CIM reportados por CLSI[210]. En este sentido, los intentos de evaluación de concentraciones menores de ATM, como $\frac{1}{4}$ CIM (0,015 mg/L), no arrojaron resultados reproducibles (datos no mostrados), probablemente debido a problemas relacionados a la dilución de concentraciones tan bajas del antibiótico en un medio de cultivo sólido. Debido a esto, no se puede afirmar que los resultados obtenidos reflejen un efecto sinérgico entre ATM y CZA o ceftazidime, dado que, de acuerdo a la definición de FICI, se necesita una disminución por lo menos cuatro veces (o dos diluciones) por debajo de la CIM de ambos antibióticos para definir sinergia. Sin embargo, se destaca que hubo una disminución en la CIM tanto de CZA como de ceftazidime en presencia de ATM.

En relación al desempeño del test de sinergia de doble disco entre CZA y ATM, se observaron resultados positivos en 34 EPC y dos *P. aeruginosa*, incluso en aquellos aislamientos con CIM > 256 mg/L para ambos agentes. Los diez aislamientos restantes en los cuales no se observó sinergia, eran susceptibles a al menos uno de los antibióticos. El test de sinergia de doble disco supone un método sencillo, que puede realizarse con insumos disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos, y podría proporcionar información valiosa para guiar el tratamiento de infecciones con la combinación CZA-ATM, incluso en microorganismos clasificados como XDR o PDR. Cabe destacar, que la última edición de la guía del CLSI (M100 ED34:2024) propone un ensayo basado en la elución en caldo de discos de CZA y ATM como método provisional para evaluar susceptibilidad a la combinación de estos agentes en *Enterobacterales* y *Stenotrophomonas maltophilia*[62]. Estudios en mayor profundidad deberán realizarse para constatar la concordancia entre estos métodos.

Independientemente de la metodología elegida, la determinación de la susceptibilidad a CZA y ATM combinados resulta esencial, ya que supone una mejor opción terapéutica incluso para infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas. En este sentido, drogas alternativas como tigeciclina, colistina y aminoglucósidos se asocian con peores parámetros PK/PD, mayores efectos adversos y mayor mortalidad en comparación con los β -lactámicos[215–217].

A pesar de la falta de análisis *in vivo*, en este estudio se incluyeron diversas especies y se observaron resultados alentadores para el uso de CZA y ATM como una opción terapéutica. Sin embargo, la disponibilidad de CZA todavía es limitada en muchos países de bajos y medianos ingresos como en Latinoamérica. Particularmente en Uruguay, tanto CZA como ATM fueron recientemente registrados en el MSP (2024), pero no se han incorporado aún al formulario terapéutico de medicamentos (FTM), por lo que el acceso a estas drogas permanece restringido. La recolección de datos clínicos relacionados a la respuesta al tratamiento es muy limitada y de difícil acceso, sin embargo, en la medida que se dispongan datos clínicos generados de forma local, se podría mejorar el acceso a estos antibióticos en la región.

3.2 Carbapenemasas y diversidad clonal de *P. aeruginosa*

Los aislamientos de *P. aeruginosa* estudiados mostraron una estructura poblacional no clonal, con algunos secuenciotipos (ST) de MLST previamente catalogados como clones de alto riesgo o clones de relevancia internacional.

En relación a los productores de VIM-2, los ST descritos fueron diferentes para el departamento de Florida que para Montevideo. En Florida los aislamientos se encontraban clonalmente relacionados y pertenecieron al ST155. Este se ha propuesto como un clon intercontinental[218,219] y se ha

reportado varias veces en España asociado a carbapenemasas como *bla*_{VIM-2} [220], *bla*_{VIM-1} y *bla*_{IMP-8} [221], y en aislamientos no productores de carbapenemasas provenientes de pacientes con fibrosis quística[222] y de vegetales crudos[218]. ST155 también se reportó en Canadá, Francia, Australia[222], Senegal, Alemania, Brasil[219] y Corea del Sur, en este último asociado a *bla*_{GES-24} [223]. Los otros ST de *P. aeruginosa* productoras de VIM-2 provenientes de Montevideo, ST1195 y ST1565 no se encuentran asociados a ningún complejo clonal ni corresponden a variantes simples ni dobles de clones relevantes (de acuerdo a registros en www.pubmlst.org, al 8 de abril 2024). ST1195 fue descrito también en Argentina y la cepa a la que se lo asoció (PA7) se considera taxonómicamente atípica (*outlier*)[224].

Los aislamientos portadores de *bla*_{GES-2} y *bla*_{GES-1} pertenecieron al ST179, el cual fue previamente descrito asociado a MBLs como VIM-2 en Portugal[225], Japón[226] y Perú, y a variantes de IMP también en Perú (IMP-74 y -16)[227] y en País Vasco (IMP-13)[228]. Asimismo fue uno de los ST dominantes en aislamientos provenientes de piletas y sifones de un hospital dental universitario de Dublín[229].

Por otro lado, los tres aislamientos productores de KPC-2 pertenecieron al ST654, el cual es considerado dentro de la lista de los principales clones de alto riesgo de *P. aeruginosa*, y es uno de los responsables de la expansión de determinantes de VIM, IMP, NDM, KPC y GES[28,29]. La asociación de este clon con KPC-2 se ha reportado en Argentina[230] y Chile[231], y con otras serin-carbapenemasas como variantes de GES en Serbia (GES-5)[232,233] y Bulgaria (GES-5 junto con NDM-1). *P. aeruginosa* ST654 se ha asociado ampliamente a la diseminación de variantes *bla*_{VIM}, fundamentalmente *bla*_{VIM-2} en Tunes[234], Francia[235], Qatar, Emirato Árabes Unidos (junto con *bla*_{VIM-17} y *bla*_{VIM-48})[236], Rusia[237], Polonia (junto con *bla*_{VIM-4} y *bla*_{VIM-24})[238], Nepal[239] y Reino Unido[240]; y en menor medida con la diseminación de *bla*_{IMP} por ejemplo en Polonia[238] y Singapur[29], y *bla*_{NDM-1} como se ha descrito en Chile (en coproducción con *bla*_{VIM-80})[85], Reino Unido[240] y Serbia (solo o en coproducción con *bla*_{PER-1} o *bla*_{GES-5})[232].

En relación a los dos aislamientos coproductores de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{PER-1}, se encontraron asociados a dos secuenciotipos distintos (ST463 y ST395) que, si bien no se encuentran en el top 10 de clones de alto riesgo, se han propuesto como linajes internacionales relevantes o potenciales clones de alto riesgo[28,29,241,242]. ST463 presenta elevada prevalencia en China y se encuentra relacionado con la diseminación de *bla*_{KPC-2}, también se ha reportado como un clon hipervirulento debido sobre todo a su genotipo *exoU+*/*exoS+*, y a su asociación con elevada mortalidad asociada a infecciones del torrente sanguíneo[241,243–245]. Además de la diseminación de *bla*_{KPC-2}, el linaje ST463 se describió en aislamientos productores de variantes de KPC que confieren resistencia a ceftazidime-avibactam como KPC-90[246] y KPC-33[247], y en aislamientos con *bla*_{KPC-2} coproductores de otros determinantes de RAM como *bla*_{AFM-1} [245], *bla*_{OXA-246}, *bla*_{OXA-486}, *armA* y *qnrVC1* [248], *bla*_{IMP-45}, *bla*_{PER-1} y *qnrVC6*[244]. Fuera de China, se ha reportado sólo en Corea y asociado a la producción de IMP-6[249], y en el contexto de este trabajo. Cabe destacar, que este aislamiento (Pa6415) fue recuperado en el año 2016 en Montevideo, previo a que se detectara en China como un problema emergente, pero que de todas formas presenta las características previamente descritas en este clon, como la producción de carbapenemasa (en nuestro caso *bla*_{VIM-2}), el genotipo *exoU+*/*exoS+* y serotipo O4[241,248].

En relación al ST395, se ha descrito en aislamientos MDR/XDR hospitalarios, ambientales y de aguas residuales, en Francia[242,250,251], así como en cepas resistentes a carbapenems de Túnez[252], Francia y Alemania[253]. La asociación de ST395 con la producción de carbapenemasas se reportó en aislamientos clínicos de Grecia y Polonia portadores de *bla*_{VIM-2} en integrones de clase 1, pero como un clon minoritario en contextos de dominancia de ST235 y ST111[238,254].

Finalmente, con respecto al clon responsable del brote en la UCI del Hospital de Clínicas de *P. aeruginosa* portadora de *bla*_{PER-1}, los datos obtenidos por WGS indicaron la presencia del ST309 y serotipo O11. ST309 ha sido propuesto recientemente como un clon de alto riesgo, dada su amplia diseminación en varios continentes[253,255] y su asociación con la producción de VIM-2[28]. Este linaje fue identificado inicialmente en baja proporción como un clon minoritario en Grecia, perteneciente también al serotipo O11[256], y en Corea asociado con *bla*_{VIM-2} [249]. Reportes subsecuentes documentaron su diseminación clonal, incluyendo la colonización masiva y persistente de la línea de agua de una unidad de cuidados dentales en un Hospital Universitario de Francia[257], aislamientos MDR/XDR de niños con bacteriemia en México[258], aislamientos clínicos XDR en Estados Unidos[259], Filipinas[260] y Brasil[255], así como en colonizaciones intestinales y muestras ambientales de un centro de salud de larga estadía en Francia[253]. El resistoma del linaje ST309 incluye varios genes de resistencia en integrones de clase 1, incluyendo BLEE (*bla*_{GES-19, -20, -26}), carbapenemasas (*bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-15}), enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*aadA1*, *aacA4*, *aac(6')-II* y *aac(6')-33*) y genes de resistencia a fluoroquinolonas (*qnrVC1*)[255]. En nuestro caso, la BLEE detectada fue *bla*_{PER-1}, acompañada de *qnrVC6* en un integrón de clase 1 complejo, lo que implica nuevos componentes para el resistoma de este linaje.

Por otro lado, el serotipo O11 es uno de los más frecuentes en aislamientos de *P. aeruginosa* junto con O1 y O6[261], y ha sido frecuentemente reportado en clones de alto riesgo como ST235, ST357, ST308 y ST298[29]. Aislamientos pertenecientes al serotipo O11 se han reportado con elevada prevalencia en pacientes críticos[261], y se relaciona con peor pronóstico, mayores estadías hospitalarias y fenotipos más virulentos[262]. A su vez, se asocia frecuentemente con la producción de exotoxina ExoU, secretada por un sistema de secreción de tipo III, que es un factor de virulencia esencial para esta bacterias[263]. Los aislamientos aquí descritos pertenecen al serotipo O11 y presentan el gen *exoU*, además de presentar otras características de interés como genes de resistencia en elementos móviles, varios factores de virulencia y resistencia a nuevos antibióticos como ceftolozane-tazobactam. Cabe destacar además, que este brote persistió por al menos un año en la UCI, sugiriendo la presencia de una fuente ambiental como se documentó en estudios previos[253,257].

3.3 Carbapenemasas y diversidad en *Enterobacterales*

Las 12 EPC obtenidas del Hospital de Clínicas en el período 2012-2016 fueron aisladas de diferentes muestras y pertenecieron a distintas especies del orden *Enterobacterales*, tanto de las familias *Enterobacteriaceae* como *Morganellaceae*. Tal como se esperaba, la mayoría fueron de origen nosocomial, aunque cuatro aislamientos fueron obtenidos de pacientes atendidos en servicios de emergencia o dermatología. Esto indicaría una posible circulación de EPC a nivel comunitario como ya se ha reportado en otras regiones del mundo[264].

La carbapenemasa más frecuente en la colección fue NDM-1, encontrada en 10 aislamientos, mientras que VIM-2 y KPC-2 se hallaron en un aislamiento cada una. Teniendo en cuenta que en el período estudiado se obtuvieron 8364 aislamientos no duplicados de enterobacterias en el Hospital de Clínicas, la prevalencia de EPC sería de 0,14%. Esta es una proporción similar a la encontrada en otros países de América y Europa que han reportado una prevalencia relativamente baja de NDM[264]. Sin embargo, en Uruguay se ha observado un aumento progresivo de aislamientos resistentes a carbapenems desde 2016, según datos del Departamento de Laboratorio del Ministerio de Salud Pública (DLSP). Dichos datos, obtenidos entre 2011 y el primer semestre de 2021, indicaron además un aumento de aislamientos productores de NDM desde el 2015, la cual es la principal carbapenemasa

en Uruguay y la que tiene mayor distribución entre departamentos y en diferentes especies tanto de *Enterobacteriaceae* como *Morganellaceae*[265].

Asimismo, en la totalidad de los aislamientos estudiados (44 EPC) también se destacó una superioridad numérica en productores de NDM-1, de los cuales casi la mitad también producían BLEE, fundamentalmente de tipo CTX-M-15. CTX-M-15 es la variante dominante en Uruguay, y su diseminación plasmídica se asocia también a la de determinantes de resistencia a quinolonas como *aac(6′)-Ib-cr* y *qnrB*[266–268], asociación que también se observó en cuatro de los 12 aislamientos estudiados en detalle. La acumulación de estos genes de resistencia en aislamientos productores de carbapenemasa puede agregar complejidad a su abordaje y reducir las posibilidades de tratamiento.

Los aislamientos de *K. pneumoniae* estudiados pertenecieron a tres secuenciotipos diferentes: ST11, ST14 y ST661. ST11 corresponde a una variante de locus simple del mundialmente distribuido ST258 y pertenece al mismo complejo clonal (CC258). Este ST se ha asociado a la diseminación de varias carbapenemasas como NDM-1, VIM-2, OXA-48, KPC-2 y KPC-3, y es considerado un clon de alto riesgo[182,264,269]. Su asociación en este caso con *bla*_{KPC-2} difiere de reportes previos en nuestro país donde la diseminación de este gen se atribuye fundamentalmente al ST258[76]. Esto es consistente con observaciones en la región de un desplazamiento del ST258 por parte de ST11 y otros secuenciotipos como ST25 y ST307, que además de diseminar *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} se asocian con cepas más virulentas[74]. Asimismo, *K. pneumoniae* ST11 se halló previamente en Uruguay, asociado a *bla*_{CTX-M-2} en un aislamiento de origen pediátrico[267], mientras que el linaje fundador ST258 también se ha asociado a la diseminación de *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{SHV-5} [266,267].

Por otro lado, *K. pneumoniae* ST14 (CC292) es uno de los ST más frecuentemente asociados a NDM-1, y también es considerado de alto riesgo[264,270]. En Uruguay, la presencia del ST14 se reportó previamente en asociación con determinantes de BLEE como CTX-M-15, CTX-M-8 y SHV-2[267].

Finalmente, el tercer ST observado en *K. pneumoniae* fue ST661, el cual posteriormente se diseminó clonalmente en el Hospital de Clínicas entre el 2017 y 2018[271]. *K. pneumoniae* ST661 se ha reportado previamente en Italia y Reino Unido asociado a VIM-1 y KPC-2 respectivamente[272]. En el segundo caso, se detectó un brote con múltiples mecanismos de transmisión que involucraron diseminación clonal del ST661 portador de *bla*_{KPC-2}, diseminación plasmídica del gen en uno de sus clásicos entornos, *Tn4401a*, a otros secuenciotipos y especies, y transposición horizontal del mismo a otros plásmidos[273]. Más recientemente en México se identificaron aislamientos de *K. pneumoniae* ST661 portadoras de *bla*_{NDM-1} en un hospital terciario, en el contexto de un estudio de vigilancia de bacteriemias nosocomiales. Estos aislamientos no presentaron transconjugantes con *bla*_{NDM-1}, a diferencia de otros secuenciotipos donde dicho gen fue identificado en plásmidos de tipo IncFIIA e IncF[274].

3.4 Integrones de clase 1 en *P. aeruginosa*

*bla*_{VIM-2} es el determinante de carbapenemasa más frecuente en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y se encuentran frecuentemente incorporados como cassettes en integrones de clase 1 (también referidos como In/Tn de clase 1), presentes tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano[70,109,275]. Los reportes de aislamientos de *P. putida* MDR son cada vez más frecuentes, sobre todo productoras de MBL, y se ha sugerido que esta especie puede jugar un rol importante como reservorio de estos genes[109].

En este trabajo, *bla*_{VIM-2} se asoció a integrones de clase 1 en todos los casos, tanto en *P. aeruginosa* como *P. putida*. *bla*_{VIM-2} se presentó como único cassette (In899) en aislamientos de *P. aeruginosa* de

los dos hospitales de Montevideo y en *P. putida* del Hospital de Florida, mientras que In1270 (*bla*_{VIM-2}-*aacA4*-*cmlA6*-*catB11*) se encontró en ambas especies del Hospital de Florida y en *P. putida* de ambas instituciones de Montevideo. En este último caso, así como en un integrón de *P. putida* con *bla*_{VIM-2}-*bla*_{GES-7}-*aacA7*-*aacA4*-*aacA7* (In1271), se hallaron genes de resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos y cloranfenicol. La asociación de *bla*_{VIM-2} con otros cassettes génicos en integrones de clase 1 es muy frecuente, principalmente involucrando genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos del tipo *aacA*, *aadA* o *aadB*[70,275]. Finalmente, *bla*_{VIM-2} también se halló en integrones de clase 1 en los aislamientos coproductores de *bla*_{PER-1}, los cuales se discutirán más adelante.

Los hallazgos del mismo tipo de integrón en especies diferentes sugieren la posibilidad de eventos de transmisión horizontal interespecie como los que ya han sido documentados[109,220]. En este caso, los ensayos de conjugación de *bla*_{VIM-2} no arrojaron transconjugantes (datos no mostrados), por lo que este gen podría encontrarse tanto en el cromosoma como en plásmidos de estrecho rango de hospedero. Esto último impediría su transferencia a la cepa receptora *E. coli* J53-2 (resistente a rifampicina) utilizada.

Por otro lado, los genes *bla*_{GES} también fueron hallados en asociación con integrones de clase 1 o estructuras derivadas como se ha reportado previamente[70,276], junto con un gen de una acetiltransferasa de aminoglucósidos que otorga resistencia a amikacina (*aacA4*), que también se asocian frecuentemente a integrones[277]. En el caso de los aislamientos con *bla*_{GES-1} el extremo 3'CS no pudo ser dilucidado por no presentar los genes *sul1* ni *qacEΔ1*. Esto podría deberse a la presencia de una secuencia de inserción interrumpiendo este segmento, como por ejemplo se ha reportado frecuentemente IS6100[69,109], o a otro tipo de conformación más compleja.

3.5 Entornos de *bla*_{PER-1} en *P. aeruginosa* y nuevas plataformas de transposición

Los dos aislamientos coproductores de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{PER-1} presentaron estos genes en dos regiones de multi-resistencia nuevas embebidas en ISPa40. Esta secuencia de inserción pertenece a la familia de transposones Tn3, a la cual frecuentemente se asocian determinantes de RAM tanto en *Enterobacterales* como en *Pseudomonadales*[278]. Si bien no se trata de una IS frecuente, recientemente se describió la estructura parcial de un transposón complejo con *bla*_{VIM-2} en un aislamiento de *P. putida* (GenBank acc. No. MZ382913), que presenta similitud parcial con ISPa40[109].

ISPa40 se encontró interrumpida por múltiples transposones de diferentes familias, destacándose el transposón compuesto TnaphA6, y las dos unidades de transposición designadas como Tn7516 y Tn7517, debido a su relevancia clínica y novedad. Si bien TnaphA6 es un elemento genético bien caracterizado y conocido por su asociación con la resistencia a amikacina en *Acinetobacter* spp.[279], la ocurrencia del gen *aph(3')*-*Vla* en *Pseudomonas* spp. es poco usual[280]. En nuestro país, estudios previos han mostrado elevados niveles de resistencia a amikacina en aislamientos clínicos de *A. baumannii* productores de carbapenemasas (85%), mientras que aislamientos productores *bla*_{VIM-2} la resistencia a este antibiótico apenas alcanzaba el 10%[84,102]. La presencia de TnaphA6 en *Pseudomonas* spp. es novedosa y constituye una amenaza a los recursos terapéuticos, especialmente porque este transposón en teoría podría ser movilizado en forma independiente o asociado al transposón Tn2 al cual se asocia, dado que ambas estructuras conservan sus genes relacionados con la movilización.

Tn7516 y Tn7517 podrían ser definidos como unidades de transposición basadas en ISPa17, movilizadas por la transposasa de dicha IS que utiliza como invertido repetido alternativo al IRi del

In/Tn de clase 1 (Tn402-like) debido a la alta homología nucleotídica con su IRR. En este caso, en contraste con reportes previos[69,278], *ISPa17* se halló en dirección opuesta y corriente abajo del integrón complejo de clase 1, pero la presencia de repetidos directos de 5 pb flanqueando la estructura apoyan esta conjetura. Asimismo, estructuras similares se han relacionado a la movilización de otros genes codificantes de MBL como *bla_{IMP}*, donde *ISPa17* reconoce IRL e IRt para mediar la transposición[278].

Por otro lado, las unidades de transposición Tn7516 y Tn7517 presentaron dos genes de RAM que en conjunto podrían inactivar a todos los β-lactámicos. Es decir, *bla_{VIM-2}* confiere resistencia a carbapenems, cefalosporinas de amplio espectro y combinaciones con inhibidores incluyendo ceftazidime-avibactam, mientras que la expresión de *bla_{PER-1}* agregaría resistencia a aztreonam[281,282]. Adicionalmente, Tn7516 presentó el gen de resistencia a quinolonas *qnrVC6*, que podría explicar la resistencia a ciprofloxacina[283] exhibida por la cepa Pa6415, constituyendo el primer reporte de *bla_{VIM-2}*, *bla_{PER-1}* y *qnrVC6* en una misma plataforma.

Teniendo en cuenta el alto nivel de homología estructural entre las regiones de resistencia en las que se encuentran Tn7516 y Tn7517, se podría inferir que *ISCR1-qnrVC6* podría insertarse y escindir, vía replicación círculo rodante[106], en forma independiente de Tn7517, incrementando la habilidad de movilización de genes de RAM en la plataforma de *ISPa40*.

En relación a los aislamientos del brote de *P. aeruginosa*, la caracterización del entorno de *bla_{PER-1}* y *qnrVC6* en un aislamiento representativo reveló una plataforma con ambos genes en tándem con dos copias del elemento *ISCR1*. Este arreglo es similar al encontrado en los dos aislamientos con *bla_{VIM-2}* y *bla_{PER-1}* previamente descrito, con la diferencia de que en este caso el integrón complejo de clase 1 asociado presenta *aac(6')-II* y *ItrA* como genes cassettes. La asociación de *bla_{PER-1}* y *qnrVC6* movilizados por dos copias de *ISCR1* en tándem ha sido reportada junto con integrones de clase 1 cuyas regiones variables comprenden *aac(6')-Ib-IV*, *bla_{IMP-45}*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*[283] o *aac(6')-Ib4*, y *aadA1*. Por otro lado, el entorno de *bla_{PER-1}* asociado a *ISCR1* corriente arriba y a *gst-abct* corriente abajo se encuentra ampliamente reportado en GenBank y normalmente se asocia a diferentes estructuras móviles, entre ellas integrones de clase 1[284,285].

Corriente arriba del integrón de clase 1, las plataformas estudiadas y reportadas en GenBank se asociaron con algún elemento de la familia Tn3, en general representadas por el gen de la resolvasa y la secuencia completa o parcial del gen de la transposasa. Por otro lado, inmediatamente corriente abajo se hallaron genes derivados de diversas familias de transposones como IS6 e IS481 en nuestro caso, o Tn3. La presencia de IS6100 es característica de integrones derivados del linaje In4, cuya inserción corriente abajo de 3'CS puede eliminar parte o la totalidad de este segmento y separar el IRt del módulo[69,225], sin embargo en este caso IRt no fue encontrado.

Otro aspecto a destacar es que toda la región se encuentra delimitada por dos transposones Tn4662 orientados de forma opuesta. A su vez, la primera y segunda copia de estos transposones se encuentran flanqueados corriente arriba y corriente abajo respectivamente por repetidos directos de 5 pb, e interrumpiendo un gen de un transportador MFS. Esto sugiere que toda la estructura podría haberse movilizado como un transposón compuesto, el cual fue asignado como Tn7723. Este tipo de movilización se ha demostrado previamente en otras estructuras derivadas de la familia Tn3[107].

3.6 Plásmidos y entornos de *bla_{NDM-1}* en *Enterobacterales*

La diseminación de *bla_{NDM-1}* se asoció principalmente a plásmidos de tipo IncC, hallados en seis aislamientos portadores de Tn6935, uno con el entorno asociado a *ISCR1*, y uno adicional que además

presentó el grupo IncH12 tratándose probablemente de un cointegrado. Los plásmidos de tipo IncC son habituales en aislamientos MDR de diversas especies[286], y se encuentran frecuentemente involucrados en la diseminación de *bla*_{NDM-1}. Este tipo de plásmidos presentan distribución mundial y tienen amplio rango de hospedero, hallándose tanto en especies de *Enterobacteriaceae* como de *Morganellaceae* y *Vibrionaceae*[264]. Esto explicaría su hallazgo en especies diferentes de la colección estudiada e indicaría su diseminación horizontal.

Por otro lado, Tn6935 también fue hallado en un plásmido de tipo IncT, en el aislamiento de *M. morganii*. Los reportes de plásmidos de tipo IncT asociados a determinantes de RAM son escasos e incluyen un aislamiento de *P. rettgeri* con *bla*_{NDM-1} en Canadá, uno de *C. freundii* con *bla*_{OXA-181} en Francia, y un brote de *P. mirabilis* portador de *bla*_{CTX-M-2} en Japón[287,288]. El hallazgo de IncT en miembros de la familia *Morganellaceae* indicaría que se trata de plásmidos de estrecho rango de hospedero[287]. Esto explicaría por qué no se obtuvieron transconjugantes utilizando *E. coli* J53-2 como cepa receptora.

*bla*_{NDM-1} también se encontró en un entorno diferente de Tn6935, en asociación con *ISCR1* y a un integrón de clase 1 complejo. El entorno original de *bla*_{NDM-1}, conformado por Tn125, en *Enterobacterales* se encuentra frecuentemente truncado y se asocia a diversos mecanismos de inserción/delección, incluyendo la adquisición de elementos de tipo *ISCR*, integrones de clase 1 o secuencias de inserción[289]. Asimismo, se ha indicado que los elementos de tipo *ISCR1* serían los responsables de la movilización de *bla*_{NDM-1} en *Enterobacteriaceae*, en eventos que involucran tanto transposición círculo-rodante como recombinación homóloga[290]. En este caso, la presencia de *ISKox2-like* es novedosa para la plataforma de *bla*_{NDM-1} y, posteriormente a nuestro hallazgo fueron descritas estructuras similares asociadas a la secuencia completa o trunca de *ISKox2-like* en *Enterobacterales* de China, Argentina y Perú[291–293].

En definitiva, nuestros hallazgos sugieren que la diseminación de *bla*_{NDM-1} sería multifactorial, involucrando la transferencia horizontal de un plásmido exitoso de tipo IncC entre diferentes especies, así como la movilización del transposón compuesto Tn6935, y otros eventos de adquisición de genes y elementos móviles.

3.7 Comentarios finales

Según datos de vigilancia del Ministerio de Salud Pública, VIM-2 es la carbapenemasa de mayor relevancia en *Pseudomonas* spp. en nuestro país, mientras que serin-carbapenemasas como KPC y GES son infrecuentes[265,294]. Esta variante también es la más reportada en Europa, asociada a clones de alto riesgo como ST111, ST235 y ST233, este último también relevante en América [28,225], sin embargo en nuestro país no se han registrado estos clones. En relación a esto, cabe destacar que el hallazgo de ST654 y ST395 (ambos en aislamientos coproductores de VIM-2 y PER-1), considerados clones de alto riesgo se encontraron en casos puntuales y no se diseminaron clonalmente. Por otro lado, el linaje de riesgo ST309 no se asoció con la producción de carbapenemasas, aunque sí produjo un brote con una elevada mortalidad y ligado a un reservorio ambiental (datos recabados en una segunda etapa del estudio). Sin embargo, teniendo en cuenta estos antecedentes y el hallazgo de diversas plataformas genéticas posiblemente movilizables, se debe mantener la vigilancia de este tipo de clones para evitar su diseminación, así como la adquisición de nuevos determinantes de resistencia que puedan suponer eventos epidemiológicos severos.

Los aislamientos de *P. aeruginosa* estudiados presentaron perfiles de MDR, y algunos incluso XDR. Adicionalmente, y a pesar de no presentar ninguna carbapenemasa, una alta proporción de los aislamientos productores de PER-1 presentaron resistencia a ceftazidime-avibactam y todos fueron

resistentes a ceftolozane-tazobactam. La producción de PER-1 ha sido previamente asociada a la resistencia a estos agentes[233,295], a pesar de que el uso de CZA es restringido en nuestro país y ceftolozane-tazobactam aún no se encuentra disponible. Sin embargo, se ha sugerido que el uso de β -lactámicos “viejos” con actividad antipseudomonas como ceftazidime, cefepime y piperacilina-tazobactam podrían ejercer presión selectiva, contribuyendo a la emergencia de resistencia a estas nuevas drogas[296]. En este sentido, se destaca que tanto ceftazidime como cefepime son de los antibióticos más frecuentemente administrados en la UCI de donde se obtuvieron los aislamientos. Desde el punto de vista epidemiológico, cabe resaltar la presencia de bla_{PER-1} en *P. aeruginosa* como un caso singular de nuestro país dentro del continente americano. Si bien esta BLEE se ha detectado en bacilos Gram negativos no fermentadores fundamentalmente en Europa, hasta nuestros conocimientos ha sido reportada en las Américas únicamente en Uruguay y Chile[233,297,298]. Finalmente, a pesar de que la producción de BLEEs en *P. aeruginosa* es un fenómeno poco reportado, su presencia en un escenario con elevada frecuencia de MBLs, en nuestro caso bla_{VIM-2} , sumado a la capacidad de movilización de estos genes, constituye un riesgo de coselección y un llamado de atención a la emergencia de aislamientos difíciles de tratar.

Por otro lado, NDM-1 es la carbapenemasa más prevalente en *Enterobacterales* en Uruguay, y su prevalencia ha aumentado desde el año 2015[265,294]. Este hallazgo contrasta con otros países de Latinoamérica donde es más frecuente la presencia de enzimas de tipo KPC, siendo incluso endémica en países como Colombia y Brasil[15,73,75]. Sin embargo, no se debe despreciar que, de acuerdo a datos del MSP, el número de aislamientos de *Enterobacterales* portadores de KPC-2 aumentó en 2018 y luego sufrió un estancamiento, aunque manteniéndose en un bajo número de reportes en comparación con NDM.

Los hallazgos de este estudio, indican que la diseminación intrahospitalaria de bla_{NDM-1} se debería a varios fenómenos de movilización, ya sea por su transferencia horizontal en un plásmido exitoso de tipo IncC, su movilización por una plataforma móvil como Tn6935, y otros eventos que involucran diferentes elementos genéticos móviles como ISCR1. Cabe destacar que los aislamientos estudiados provenían de una sola institución y de un período en el que la detección de bla_{NDM-1} era esporádica, por lo que la consecuente diseminación de este gen en nuestro país puede haber involucrado otras plataformas genéticas, así como otros tipos de eventos, incluyendo la diseminación clonal.

CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS

1 METODOLOGÍA

1.1 Puesta a punto de PCR múltiple en tiempo real para detección de carbapenemasas

Se realizó la puesta a punto de un protocolo de PCR múltiple en tiempo real para la detección de carbapenemasas relevantes en nuestro medio, ya sea por su frecuencia como por la necesidad de vigilancia, a través de la adaptación de un protocolo previamente descrito por Monteiro y cols.[165].

1.1.1 Aislamientos

Para la puesta a punto de la PCR múltiple en tiempo real, se seleccionaron dos cepas caracterizadas en el marco de este estudio o del cepario del laboratorio, que fueran positivas para cada uno de los genes a buscar: *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}. En los casos que fuera posible, se intentó incluir géneros bacterianos diferentes. Por otro lado, se incluyeron cinco controles negativos, que incluyeron las cepas de control de calidad *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, la cepa de *E. coli* receptora para ensayos de conjugación resistente a rifampicina (J53-2), y dos aislamientos productores de BLEE (Tabla 11).

Tabla 11. Aislamientos utilizados como controles para la puesta a punto de la PCR múltiple en tiempo real para detección de carbapenemasas

Gen	Cepa	Especie	Alelo
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48 pos	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}
	HI002	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}
<i>bla</i> _{NDM}	HC1	<i>P. rettgeri</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
	HC11	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>bla</i> _{GES}	57763	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{GES-2}
	M631	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{GES-1}
<i>bla</i> _{VIM}	V2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}
	HC4	<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}
<i>bla</i> _{KPC}	45098	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
	HC8	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
Controles negativos	ATCC 25922	<i>E. coli</i>	-
	ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	-
	J53-2	<i>E. coli</i>	-
	Mez	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
	Cont. PER-1+	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{PER-1}

Para todas las cepas, se realizó extracción de ADN por shock térmico como se describió previamente en el capítulo 1.

Por otro lado, para evaluar el desempeño del método, una vez puesto a punto, se aplicó en 62 aislamientos seleccionados de las colecciones de este estudio y del cepario del laboratorio caracterizadas en el marco de otros proyectos. En total se analizaron 3 *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{OXA-48}; 17 *Enterobacterales* portadores de *bla*_{NDM-1}; 3 *P. aeruginosa*, 10 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii* y 1 *K. oxytoca* portadores de *bla*_{KPC-2}; 3 *K. pneumoniae* con *bla*_{KPC-3}; 1 *K. pneumoniae* productor de *bla*_{KPC-57}; 2 *K. pneumoniae* productores de *bla*_{KPC-2} + *bla*_{NDM-1}; 10 *P. aeruginosa*, 4 *P. putida* y 1 *E.*

hormaechei productores de *bla*_{VIM-2}; 1 *P. putida* productora de *bla*_{VIM-2} + *bla*_{GES-7}; 4 *P. aeruginosa* productoras de *bla*_{GES-1} y 1 de *bla*_{GES-7} (variantes no carbapenemasas). Asimismo, se incorporaron 15 aislamientos resistentes a carbapenems pero sin carbapenemasa, incluyendo seis *P. aeruginosa* y nueve *Enterobacterales* (Anexo 8).

1.1.2 Condiciones de PCR

La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 25 µL conteniendo 12,5 µL del kit comercial PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µL de ADN molde, y diferentes concentraciones de cebadores directo y reverso para cada gen a amplificar: *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC} (Tabla 12) como se indica a continuación:

- Mix A: 0,2 µM de cada primer (según protocolo de Monteiro y cols.)
- Mix B: 0,4 µM de cada primer
- Mix C: 0,2 µM de cada primer excepto KPC-F/-R con 1 µM

Tabla 12. Cebadores utilizados para la PCR múltiple en tiempo real, tamaño del amplicón y valor calculado de la T_m [165].

Gen	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del amplicón (pb)	T _m (°C) ^(A)
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	785	91,6
	KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC		
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-F	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	82	84
	NDM-R	ACACCAGTGACAATATCACCG		
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	CTATTACTGGCAGGGATCG	594	88,6
	GES-R	CCTCTCAATGGTGTGGGT		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177	81,6
	OXA-48-R	GTAAMRATGCTTGGTTCCG		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	90,3
	VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG		

^(A)T_m, Temperatura de melting del producto de amplificación

Las corridas se realizaron en un termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Alemania) con un programa para análisis de melting de alta resolución (HRM[®]) que incluyó una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C; 35 ciclos de desnaturalización (95 °C, 20 segundos), hibridación (55 °C, 45 segundos) y extensión (72 °C, 30 segundos); seguido de la construcción de una curva de melting entre 65 y 95 °C incrementando 0,1 °C por segundo y con adquisición de fluorescencia a 533 nm cada 1 segundo.

1.1.3 Análisis

El análisis de los resultados se realizó con el software RotorGene 6000 (Qiagen, Hilden, Alemania), con la obtención del gráfico de la derivada negativa de la fluorescencia ($-dF/dT$) en función de la temperatura, donde se observan las curvas cuyos picos corresponden a las temperaturas de melting (T_m) de los fragmentos amplificados correspondientes a cada gen, como se indicó en la Tabla 12.

Cada control se analizó por triplicado en tres corridas independientes, y se realizó el cálculo de la media y desvío estándar del valor de la T_m obtenido para cada pico en cada corrida. Asimismo, se realizó un promedio de los valores de T_m de cada uno de los aislamientos analizados posteriormente.

1.2 Puesta a punto de MALDI-TOF para detección de actividad carbapenemasa

Como metodología alternativa para la detección fenotípica de carbapenemasas, se puso a punto un protocolo de espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight*) para la identificación de productos de hidrólisis de meropenem, tomando como partida protocolos previamente reportados[140,141].

1.2.1 Aislamientos

Al igual que para la PCR en tiempo real, la puesta a punto de la técnica se realizó con controles positivos y negativos seleccionados de las colecciones caracterizadas o estudiadas en el marco de otros proyectos. Se emplearon siete aislamientos productores de carbapenemasas y cinco controles negativos, incluyendo cepas ATCC como se indica en la [Tabla 13](#).

Tabla 13. Aislamientos utilizados para la puesta a punto del método de detección de hidrólisis de meropenem por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Cepa	Especie	Enzima
HC1	<i>P. rettgeri</i>	NDM-1
HC11	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1
V2	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2
HC4	<i>E. cloacae</i>	VIM-2
45098	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2
HC8	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2
C17	<i>A. baumannii</i>	OXA-23/OXA-58
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	-
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	-
J53-2	<i>E. coli</i>	-
Mez	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15
M1117	<i>P. aeruginosa</i>	R carbapenems

Al igual que se realizó con la PCR en tiempo real, el método fue evaluado en 64 aislamientos productores de carbapenemasas seleccionados de las colecciones previamente descritas o del cepario del laboratorio correspondientes a otros proyectos. En total se analizaron 5 *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{OXA-48}; 17 *Enterobacterales* portadores de *bla*_{NDM-1}; 3 *P. aeruginosa*, 10 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii* y 1 *K. oxytoca* portadores de *bla*_{KPC-2}; 3 *K. pneumoniae* con *bla*_{KPC-3}; 1 *K. pneumoniae* productor de *bla*_{KPC-57}; 2 *K. pneumoniae* productores de *bla*_{KPC-2} + *bla*_{NDM-1}; 10 *P. aeruginosa*, 4 *P. putida* y 1 *E. hormaechei* productores de *bla*_{VIM-2}; 1 *P. putida* productora de *bla*_{VIM-2} + *bla*_{GES-7}; 1 *P. aeruginosa* productora de *bla*_{GES-2} (variantes carbapenemasa); 2 *A. baumannii* productores de *bla*_{OXA-23}, 2 *A. baumannii* productores de *bla*_{OXA-23} + *bla*_{OXA-58}. Se incluyeron también 15 aislamientos resistentes a carbapenems sin carbapenemasa identificada, y 8 aislamientos con otras β -lactamasas, incluyendo BLEE de tipo CTX-M-2, -8 y -9 (1 *P. aeruginosa* y 2 *K. pneumoniae* respectivamente) o GES-1 (3 *P. aeruginosa*), así como 2 *A. baumannii* resistentes a carbapenems pero productores solo de *bla*_{OXA-51} ([Anexo 8](#)).

1.2.2 Pruebas de estabilidad de meropenem

En primera instancia, se realizaron pruebas de estabilidad y visualización del espectro de la molécula de meropenem.

Para ello se prepararon soluciones de meropenem 0,1 M (Libra, Montevideo, Uruguay; Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en agua ultrapura estéril, o en buffer de reacción (Tris-HCl

20 mM; SDS 0,01%; pH7). Se dispensaron 50 μ L en tubos tipo Eppendorf y se incubaron 1, 2, 3 y 4 h a 37 °C para luego obtener los espectros como se detalla más abajo.

1.2.3 Preparación de las muestras

Partiendo de aislamientos frescos en TSA, se prepararon tres tipos diferentes de inóculos bacterianos:

- Inóculo A: Suspensión equivalente a 3 en la escala de MacFarland en buffer de suspensión celular (Tris-HCl 20 mM; NaCl 20 mM; pH7). Se tomó 1 mL de la suspensión y se centrifugó 3 minutos a 15.000 rpm. Se conservó el pellet para el siguiente paso.
- Inóculo B: Media asa (de 10 μ L) con colonias bacterianas, se resuspendieron directamente en 1 mL de buffer de suspensión celular, y se centrifugó 3 minutos a 15.000 rpm conservando el pellet.
- Inóculo C: Mismo procedimiento que el punto anterior pero con agua ultrapura en lugar de buffer de suspensión celular.

Los pellets obtenidos fueron mezclados con 50 μ L de buffer de reacción (Tris-HCl 20 mM; SDS 0,01%; pH7) conteniendo 0,1 mM de meropenem, y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. En paralelo se incubaron las soluciones con antibiótico sin microorganismos para utilizar como control. Pasado el tiempo de incubación, se volvió a realizar una centrifugación de 3 minutos a 15.000 rpm y se colocó 1 μ L del sobrenadante en una placa de metal de 96 pocillos para MALDI-TOF. Sobre cada pocillo se adicionó 1 μ L de la matriz compuesta por ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) 10 g/L en etanol al 50%. Lo mismo se realizó para tomar los espectros de meropenem a diferentes tiempos, pero sin el paso de centrifugación.

1.2.4 Obtención de espectros y análisis

Los espectros de meropenem y sus sales de sodio, así como de sus productos de hidrólisis, fueron obtenidos en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), en un rango masa/carga (m/z) de 200 a 600. El equipo fue operado en modo de ion positivo, con una frecuencia de láser de 60 Hz y 80% de rango. Se obtuvieron espectros en forma manual en por lo menos 5 posiciones dentro de un mismo pocillo. El análisis de los espectros se realizó con el software flexAnalysis v.3.4 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

La calibración se realizó utilizando los valores teóricos de la molécula de meropenem y sus dos sales de sodio: m/z 383,464, 405,443 y 427,422.

2 RESULTADOS

2.1 PCR múltiple en tiempo real para la detección de carbapenemasas

2.1.1 Puesta a punto

En primera instancia, se trabajó con controles positivos para verificar que se observaran los picos correspondientes a cada amplicón en la curva de melting. De las tres variantes del protocolo evaluadas, en la que contenía 0,2 μ M de cada cebador (Mix A) no se observaron los picos correspondientes a los controles positivos de KPC, mientras que en las dos variantes restantes (Mix B y C) se observaron picos correspondientes a los cinco genes evaluados. Las T_m registradas mostraron entre 1,01 y 1,78 $^{\circ}$ C de diferencia con los valores calculados para cada fragmento, pero mostraron concordancia con los genes previamente caracterizados por PCR convencional y secuenciación por Sanger. En el caso de los controles de *bla*_{OXA-48}, se observaron picos a $79,82 \pm 0,06$ $^{\circ}$ C, para *bla*_{NDM-1} de $82,68 \pm 0,14$ $^{\circ}$ C, para *bla*_{GES-2} y *bla*_{GES-7} de $87,07 \pm 0,05$ $^{\circ}$ C, para *bla*_{VIM-2} de $88,74 \pm 0,13$ $^{\circ}$ C y para *bla*_{KPC-2} de $90,60 \pm 0,19$ $^{\circ}$ C (Figura 38).

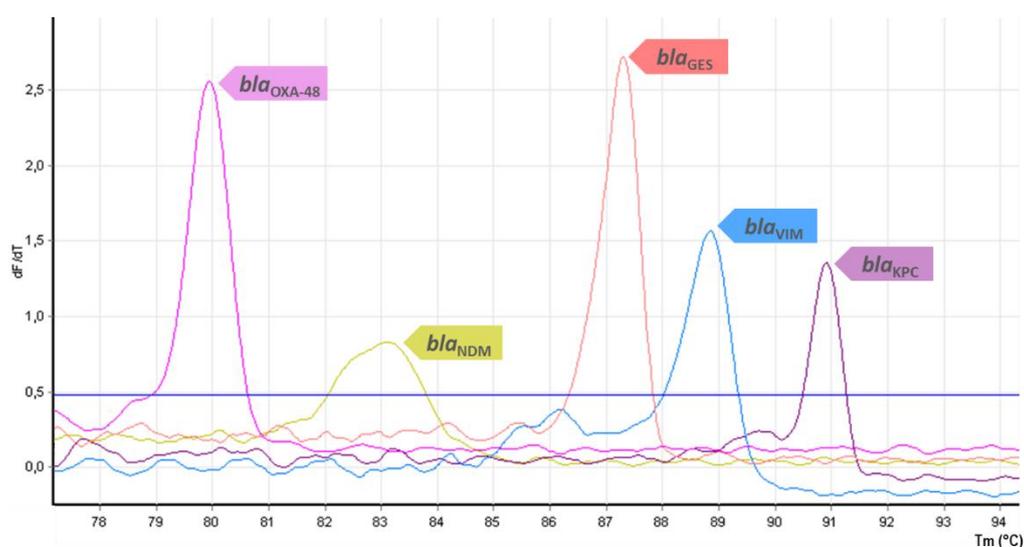


Figura 38. Resultado de puesta a punto de PCR múltiple a tiempo real. Se muestra una curva de melting correspondiente a cada gen amplificado.

2.1.2 Evaluación en aislamientos productores de carbapenemasas

De los 62 aislamientos evaluados posteriormente, se encontró una concordancia del 96,8% entre los genes detectados por este método y los genes previamente identificados por PCR y secuenciación por Sanger en cada uno. Los valores de T_m para cada uno de los genes buscados fueron $79,84 \pm 0,12$ $^{\circ}$ C para *bla*_{OXA-48}, $82,73 \pm 0,19$ $^{\circ}$ C para *bla*_{NDM-1}, $87,11 \pm 0,12$ $^{\circ}$ C para *bla*_{GES}, $88,76 \pm 0,12$ $^{\circ}$ C para *bla*_{VIM} y $90,67 \pm 0,19$ $^{\circ}$ C para *bla*_{KPC} (Figura 39.a-f). Los dos aislamientos en los que no se encontró una concordancia con el resultado esperado (3,2%) eran *K. pneumoniae* dobles productores de carbapenemasa *bla*_{NDM-1}/*bla*_{KPC-2}, en los que solo se detectó el pico correspondiente a *bla*_{NDM}, pero no el de *bla*_{KPC}, aun con las modificaciones en el protocolo realizadas con respecto a la concentración de cebadores para amplificar este último gen (Mix C).

En el caso de los picos para *bla*_{NDM-1} se detectó una intensidad menor que para la de los otros genes, que en algunos casos se asimiló más a una meseta, aunque de todos modos se logró observar el pico esperado (Figura 39.b). Por otro lado, para los genes *bla*_{VIM} y algunos *bla*_{GES} se observaron picos de

menor intensidad de 85,5 - 86 °C y 86,25 - 86,40 °C respectivamente (Figura 39.c,d), adyacentes al pico esperado que de todas formas se diferenció correctamente en ambos casos.

Finalmente, no se detectaron productos de amplificación ni picos compatibles con las T_m esperadas para las muestras correspondientes a los controles negativos.

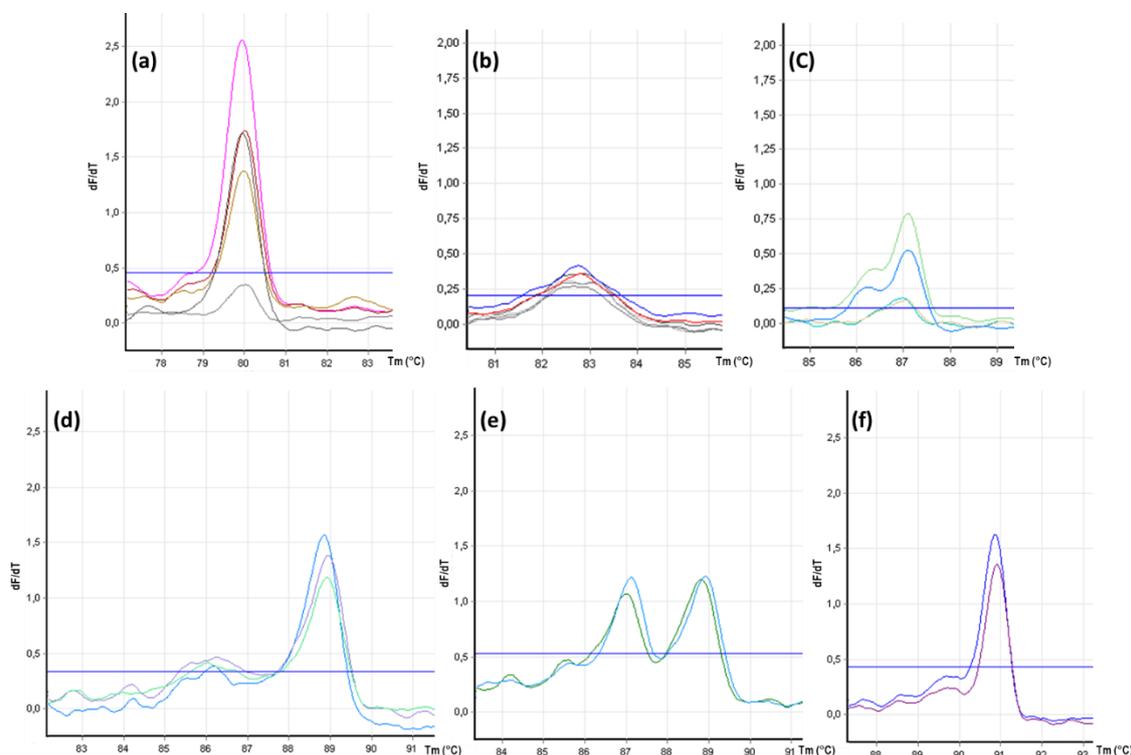


Figura 39. Ejemplo de resultados positivos en los aislamientos estudiados portadores de (a) *bla*_{OXA-48}; (b) *bla*_{NDM-1}; (c) *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2} o *bla*_{GES-7}; (d) *bla*_{VIM-2}; (e) *bla*_{GES-7} + *bla*_{VIM-2}, (f) *bla*_{KPC-2} o *bla*_{KPC-3}.

2.2 MALDI-TOF para la detección de actividad carbapenemasa

2.2.1 Detección del espectro de masas de meropenem

El primer paso de la puesta a punto de esta metodología fue comprobar la estabilidad de meropenem en el tiempo y en las condiciones de incubación, así como detectar los picos esperados de su espectro. En la solución de meropenem 0,1 mM en buffer de reacción se observaron los tres picos esperados correspondientes a la molécula de meropenem de m/z 384 ± 1 , y sus dos sales sódicas de 406 ± 1 y 428 ± 1 (Figura 40.a). Adicionalmente, en la solución preparada con meropenem para infusión intravenosa (Laboratorio Libra) se detectó un pico muy cercano a m/z 384 ± 1 , de m/z $380,5 \pm 0,2$, pero que no impidió la detección del correspondiente pico de meropenem (Figura 40.b). En cuanto a la solución de meropenem 0,1 mM en agua, se observó el pico correspondiente a dicha molécula, de m/z 384 ± 1 , así como el de m/z 406 ± 1 correspondiente a una de sus sales, aunque con menor intensidad, mientras que el pico correspondiente a la otra sal sódica (de m/z 428 ± 1) se observó con muy baja intensidad y en ocasiones no pudo ser distinguido (Figura 40.c). Los picos descritos para cada caso, se conservaron en los diferentes tiempos de obtención de espectros, es decir de 0 a 4 h.

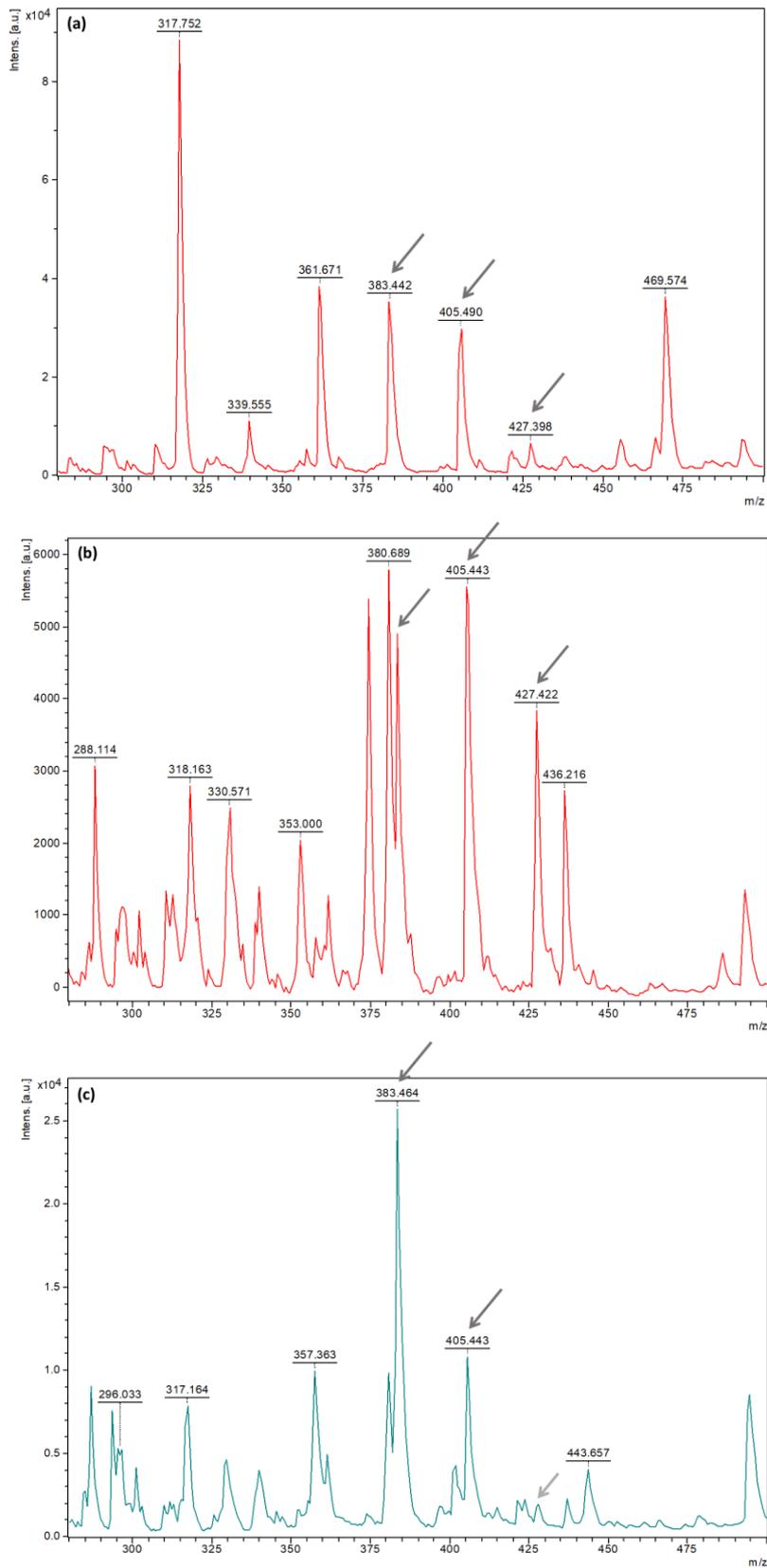


Figura 40. Espectro de meropenem 0,1 mM **(a)** marca Sigma preparado en buffer de reacción; **(b)** marca Libra preparado en buffer de reacción; y **(c)** marca Libra preparado en agua de calidad molecular. Las flechas indican los picos correspondientes a la molécula de meropenem ($m/z\ 384 \pm 1$) y sus dos sales de sodio ($m/z\ 406 \pm 1$ y 428 ± 1).

Dado que los tres picos esperados se observaron mejor en los espectros obtenidos con meropenem en buffer de reacción, se prosiguió a utilizar esta solución para los ensayos de hidrólisis.

2.2.2 Puesta a punto de ensayos de hidrólisis de meropenem

Tras la incubación de 2 h en buffer de reacción con meropenem del inóculo equivalente a una turbidez de 3 McFarland (inóculo A) de microorganismos productores de carbapenemasa, se observaron picos de m/z 358 ± 1 y 380 ± 1 , correspondientes a dos productos de hidrólisis de meropenem. También se evidenció el pico a m/z 446 ± 1 , y en baja intensidad m/z 424 ± 1 . Los picos esperados de m/z 402 y 468 ± 1 , correspondientes a otros productos de hidrólisis descritos en la bibliografía, no se observaron en la mayoría de los espectros. Cabe destacar que el pico de 380 ± 1 se observó también en el producto de incubación de la solución de meropenem solo y de microorganismos no productores de carbapenemasa, ya que se utilizó para estos casos la solución de meropenem para infusión (Libra). Adicionalmente, en los microorganismos productores de carbapenemasa se observó la desaparición total o parcial de los picos correspondientes a meropenem (m/z 384 ± 1) y sus dos sales sódicas (m/z 406 ± 1 y 428 ± 1). El espectro de los controles negativos presentó los picos esperados para la molécula de meropenem sola (Figura 41).

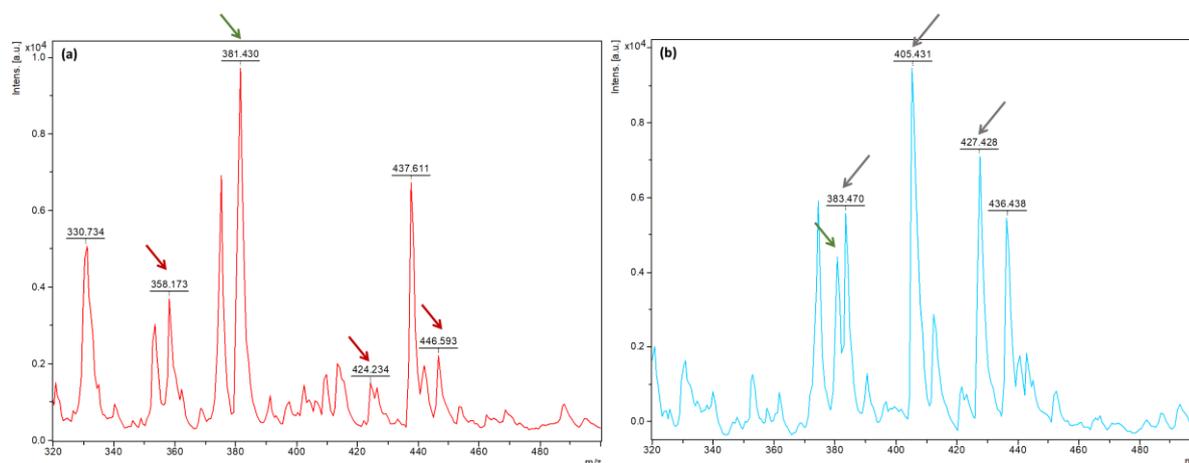


Figura 41. Espectros de masa de ensayos de hidrólisis de meropenem con el inóculo A (3 McFarland en buffer de suspensión celular). **(a)** *K. pneumoniae* productora de NDM-1. Las flechas rojas indican los picos correspondientes a productos de hidrólisis de meropenem (m/z 358 ± 1 ; 424 ± 1 ; 446 ± 1). **(b)** *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15. Las flechas grises indican los picos correspondientes a la molécula de meropenem y sus sales sódicas (m/z 384 ± 1 ; 406 ± 1 ; 428 ± 1). En ambas gráficas se indica el pico de m/z 380 ± 1 observado en los espectros del meropenem de la marca Libra.

En una segunda instancia se intentó poner a punto un protocolo simplificado, utilizando un inóculo más rápido de preparar, al emulsionar directamente media ansada cargada con colonias en buffer de suspensión celular (inóculo B). En este caso, los espectros correspondientes a microorganismos productores de carbapenemasas presentaron un pico de m/z 358 ± 1 de baja intensidad, dos de alta intensidad de m/z 380 ± 1 y 374 ± 1 , y en algunos casos también se evidencia uno de m/z 445 ± 1 . En la mayoría de los casos se observó la desaparición de los picos correspondientes a las sales sódicas de meropenem de m/z 406 ± 1 y 428 ± 1 , mientras que el correspondiente a la molécula de meropenem, de m/z 384 ± 1 , en algunas muestras se conservó en baja intensidad cercano al correspondiente a su hidrólisis de m/z 380 ± 1 . Al igual que en el caso anterior, la incubación con controles negativos resultó en espectros de similares características a los de la molécula de meropenem sola sin presencia de picos correspondientes a productos de hidrólisis (Figura 42).

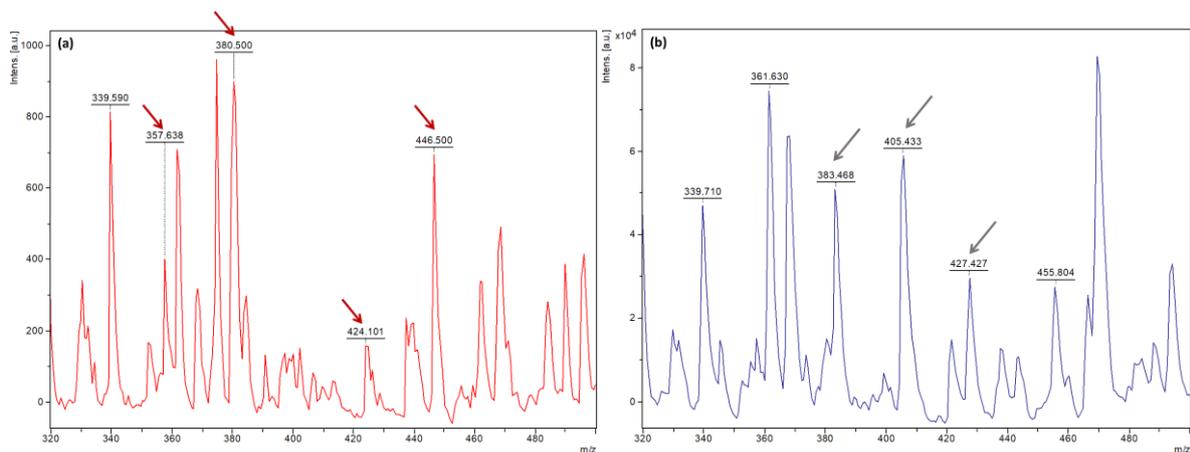


Figura 42. Espectros de masa de los ensayos de hidrólisis de meropenem con el inóculo B (suspensión de colonias directo en buffer de suspensión celular). **(a)** *K. pneumoniae* productora de NDM-1. Las flechas rojas indican los picos correspondientes a productos de hidrólisis de meropenem (m/z 358 ± 1 ; 380 ± 1 ; 424 ± 1 ; 446 ± 1). **(b)** *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15. Las flechas grises indican los picos correspondientes a la molécula de meropenem y sus sales sódicas (m/z 384 ± 1 ; 406 ± 1 ; 428 ± 1).

Finalmente, cuando el inóculo se realizó en agua (inóculo C), los espectros fueron observados fueron con menor claridad, aunque para los microorganismos productores de carbapenemasa se observaron los picos correspondientes a los productos de hidrólisis de m/z 358 ± 1 , 380 ± 1 , y en algunos 445 ± 1 . Al igual que en el caso anterior, se observó la desaparición de los picos de m/z 406 ± 1 y 428 ± 1 , pero no completamente del de 384 ± 1 (Figura 43).

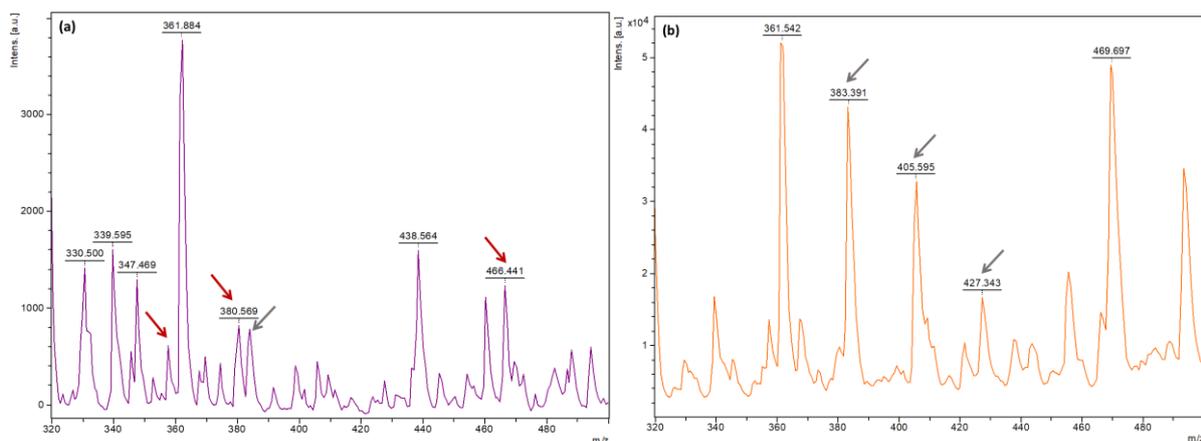


Figura 43. Espectros de masa de los ensayos de hidrólisis de meropenem con el inóculo C (suspensión de colonias directo en agua). **(a)** *K. pneumoniae* productora de NDM-1. Las flechas rojas indican los picos correspondientes a productos de hidrólisis de meropenem (m/z 358 ± 1 ; 380 ± 1 ; 446 ± 1), también se indica con una flecha gris el pico correspondiente a la molécula de meropenem (m/z 384 ± 1). **(b)** *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15. Las flechas grises indican los picos correspondientes a la molécula de meropenem y sus sales sódicas (m/z 384 ± 1 ; 406 ± 1 ; 428 ± 1).

2.2.3 Ensayos de hidrólisis de meropenem

Se evaluó el protocolo simplificado (inóculo B), tomado colonias directamente con el ansa y emulsionado en buffer de suspensión celular, en 64 aislamientos productores de carbapenemasa y 23 no productores. Los resultados fueron consistentes con lo observado en la puesta a punto para los 58 aislamientos productores de NDM-1, KPC, VIM-2, OXA-23 y OXA-58 (90,6%). Dado que se utilizaron indistintamente las dos formulaciones de meropenem, los espectros fueron diferentes para ambos casos, pero consistentes con la puesta a punto. Los aislamientos productores de carbapenemasa

presentaron espectros con picos correspondientes a la hidrólisis de meropenem de m/z 358 ± 1 y/o 380 ± 1 , y también de m/z 446 ± 1 observados previamente. Adicionalmente, en algunos casos también se evidenciaron picos de m/z 375 ± 1 , 424 ± 1 o 468 ± 1 . Esto se acompañó de la desaparición total o parcial de los picos correspondientes a meropenem y sus sales sódicas. En particular, el pico de m/z 384 ± 1 permaneció unido y con baja intensidad al de m/z 380 ± 1 , fundamentalmente en los ensayos realizados con la formulación de la marca Sigma (Figura 44).

En relación a los seis aislamientos restantes, en los cinco productores de OXA-48 (7,8%) se detectó la presencia concomitante tanto de picos correspondientes a meropenem como a sus productos de hidrólisis. Para el único aislamiento productor de GES carbapenemasa (GES-2) no se observaron productos de hidrólisis. Estudios posteriores de este aislamiento revelaron que un test de inactivación de carbapenem negativo a pesar de presentar una variante alélica de GES carbapenemasa (Figura 44). En los espectros de los 23 aislamientos no productores de carbapenemasa utilizados como controles negativos no se registraron picos correspondientes a productos hidrólisis de meropenem, y presentaron espectros similares al de meropenem incubado solo.

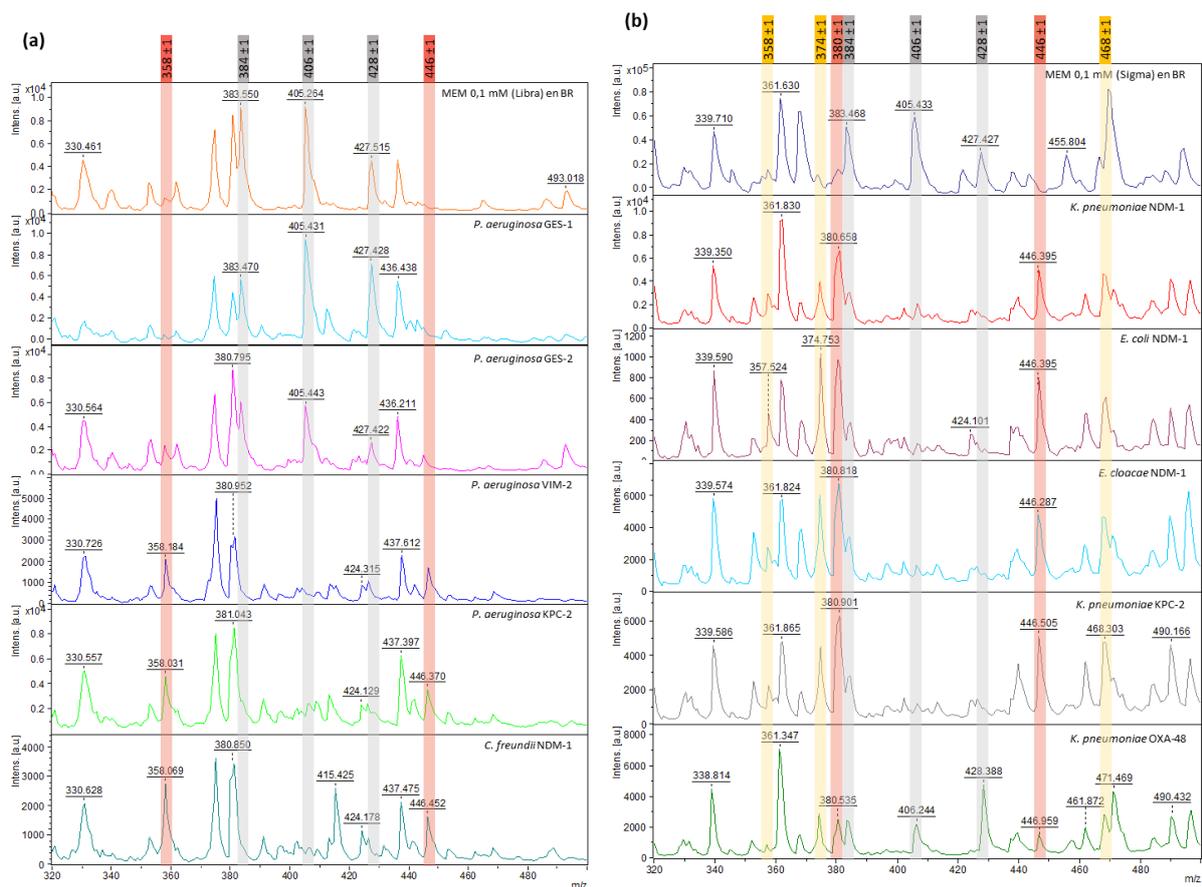


Figura 44. Ejemplos de espectros obtenidos por MALDI-TOF de test de hidrólisis de meropenem, realizados con la formulación (a) marca Libra, y (b) marca Sigma. En ambos casos las barras verticales indican los picos esperados para la molécula de meropenem y sus sales sódicas (gris), picos de los productos de hidrólisis observados en todos los espectros estudiados (rojo), y picos de menor intensidad o encontrados en algunos casos (amarillo). Los valores correspondientes de masa/carga (m/z) se indican en la parte superior.

3 DISCUSIÓN

3.1 PCR múltiple en tiempo real

En 62 aislamientos productores de carbapenemasa evaluados, se observó una concordancia del 96,9% en los genes detectados por la PCR múltiple en tiempo real versus los genes previamente caracterizados por PCR convencional. La única discordancia se detectó en los dos aislamientos portadores de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{NDM-1}, en los que solo se detectó el segundo gen. La concordancia fue del 100% para el resto de los aislamientos productores de NDM, VIM, KPC, GES y OXA-48.

Las T_m observadas presentaron entre 1,01 y 1,78 °C de diferencia con respecto a los valores calculados para cada amplicón. Esto podría deberse a que el kit utilizado para la amplificación fue un MasterMix de SYBR Green convencional y no uno específico para análisis de melting de alta resolución (HRMA), como *Type-it HRM PCR Kit* (Qiagen) utilizado en el protocolo inicialmente descrito por Monteiro y cols.[165]. La nueva generación de marcadores de ADN saturantes, como LC-Green®, Syto9® o EvaGreen®, fueron desarrollados para evaluar de forma más precisa variaciones en una secuencia. Estos logran detectar incluso polimorfismos de nucleótido único (SNP - *single nucleotide polymorphism*), ya que presentan mejores propiedades saturantes que permiten diferenciar pequeños cambios en la T_m [299,300]. Si bien la detección de variantes alélicas no es el objetivo del método puesto a punto en este estudio, el uso de un marcador saturante podría haber ayudado a reducir el desvío estándar y a obtener valores de T_m más cercanos a los calculados para cada gen. De todos modos, se destaca que igualmente se detectaron los productos esperados según los resultados de PCR a tiempo final, por lo que igualmente se podrían utilizar kits convencionales de qPCR para este estudio, lo cual permitiría reducir costos.

Por otro lado, se observó la presencia de un segundo pico en las curvas correspondientes a *bla*_{VIM} y *bla*_{GES}, con una T_m menor a la correspondiente para cada gen, que podrían corresponder a dímeros de cebadores o uniones inespecíficas. De todos modos, la presencia de estos picos no impidió la detección de los productos amplificados para cada gen.

Finalmente, en el caso de los genes *bla*_{GES}, no se detectaron diferencias considerables entre las T_m correspondientes a las variantes *bla*_{GES-1} (BLEE) y *bla*_{GES-2} (carbapenemasa), o entre variantes de *bla*_{KPC}. En las T_m de los diferentes genes evaluados, incluso dentro del mismo alelo se observaron valores de desvío estándar de 0,12 - 0,19 °C, que se encuentran dentro de lo esperado según reportes previos de estudios similares[165–167].

El principal problema de la aplicación de esta técnica fue la imposibilidad de detectar *bla*_{KPC} en los dos aislamientos coproductores de NDM-1 y KPC-2. Su aplicación por lo tanto podría suponer una desventaja en un escenario de emergencia o aumento del número de EdPC como se ha reportado desde 2021 en Uruguay y en la región[103,265]. Sin embargo, se destaca que fue posible la detección de las tres carbapenemasas más relevantes actualmente en nuestro país, tanto en *Enterobacterales* como en *Pseudomonas* spp. Para resolver el problema de la detección de *bla*_{KPC} en EdPC se podrían diseñar cebadores alternativos o incorporar otros ajustes en las condiciones de corrida.

En este estudio se incluyeron mayor cantidad de aislamientos portadores de *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC} que de *bla*_{OXA-48} y *bla*_{GES}, debido a la escasa disponibilidad de cepas con los dos últimos genes. Además, la mayoría de los aislamientos productores de GES presentaban el gen *bla*_{GES-1}, correspondiente a una variante sin actividad carbapenemasa, lo cual es una debilidad de este trabajo. Para el caso de las variantes de GES, dado que no todas presentan actividad carbapenemasa, se suma la limitante de no poder discriminar entre estas y las variantes BLEE.

La principal ventaja de esta técnica es que permite evaluar la presencia de cinco familias de genes en una única reacción de PCR, evitando el paso de electroforesis y reduciendo tanto el tiempo de manipulación como el tiempo hasta el resultado.

Las plataformas automatizadas que permiten detectar genes determinantes de RAM, en ocasiones combinadas con la identificación de microorganismos y algunas con la posibilidad de realizarse a partir de muestras clínicas, son cada vez más utilizadas en el ámbito clínico. Sin embargo, la mayoría necesitan de equipamiento y kits específicos, lo cual supone elevados costos[14,160]. La incorporación de este método de PCR múltiple en tiempo real podría ser de utilidad en laboratorios de investigación o de referencia, e incluso en laboratorios clínicos que cuenten con termocicladores de tecnología abierta con posibilidad de personalizar métodos.

3.2 Hidrólisis de meropenem por MALDI-TOF MS

El uso de MALDI-TOF MS para el diagnóstico de RAM, específicamente para detección de carbapenemasas, fue propuesto como un método rápido y económico hace más de 10 años. Además, esta alternativa se ha presentado como una forma de darle una mayor utilidad a los equipos adquiridos por los laboratorios clínicos para identificación bacteriana[140,301].

En este estudio, se utilizaron dos formulaciones de meropenem, una de calidad molecular (Sigma, > 99% HPLC), y otra para infusión intravenosa (marca Libra). Si bien en los espectros de ambos casos se observaron los picos correspondientes a la molécula de meropenem y sus dos sales de sodio, el espectro de la formulación para administración intravenosa presentó un pico de m/z 380 ± 1 , que interfirió con la lectura de uno de los picos de hidrólisis de meropenem. El uso de ambas formulaciones se realizó en función de la disponibilidad de cada una en las diferentes etapas de los ensayos, y la puesta a punto se realizó para ambos casos. De todos modos, la puesta a punto y posterior evaluación con ambas preparaciones se destaca como un aspecto positivo ya que, desde el punto de vista de trasladar la metodología a otros laboratorios, el acceso a formulaciones puras puede implicar mayores costos y demoras relacionadas a la importación del producto.

En relación a los intentos de simplificación del protocolo de hidrólisis de meropenem, relacionados con evitar pasos de estandarización estricta del inóculo y preparación de buffers, se observó que es posible evitar el ajuste por turbidez realizando la suspensión bacteriana con un asa. Sin embargo, la sustitución del buffer de suspensión celular con agua de calidad molecular no sería recomendable ya que en el espectro obtenido los picos no resultaron del todo claros.

Debido a los numerosos picos que pueden detectarse en los espectros de hidrólisis de meropenem, Hrabák y cols. definieron un criterio para clasificar microorganismos productores de carbapenemasas que consiste en detectar la presencia del pico de m/z 358,5 o 380,5 y la ausencia de los picos de m/z 384,5 y 406,5[141]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos criterios pueden no aplicarse para todas las formulaciones del antibiótico (en el caso de dichos autores era de la marca AstraZeneca). Para nuestro caso en particular, se aplicaron dos criterios diferentes, uno para cada formulación del antibiótico utilizadas: en el caso de meropenem Libra, se consideró la observación de los picos de m/z 358 y 446 ± 1 , así como la desaparición de los tres picos de meropenem para la clasificación de un aislamiento como productor de carbapenemasa. Mientras que para la marca Sigma, se tomó en cuenta la aparición de al menos los picos de m/z 380 y 446 ± 1 , mientras que se consideró la desaparición parcial del pico de m/z 384 ± 1 siempre que se observase en menor intensidad que el de m/z 380 ± 1 y en concomitancia con la desaparición de los otros picos correspondientes a meropenem (m/z 406 y 428 ± 1).

En la evaluación de los 64 aislamientos productores de carbapenemasa, se encontró una concordancia del 90,6% con los resultados previamente obtenidos por PCR. El 100% de los aislamientos productores de NDM, VIM, KPC, OXA-23 y OXA-58 fueron clasificados como productores de carbapenemasa, mientras que las discordancias se observaron en los productores de OXA-48 y GES-2. En relación a los aislamientos portadores de *bla*_{OXA-48}, se observó la presencia concomitante de picos correspondientes a la molécula de meropenem intacta y de su hidrólisis. Este problema para la detección de carbapenemasas con baja actividad hidrolítica como las del grupo de OXA-48 se reportó previamente, y se ha demostrado que la adición de bicarbonato al buffer de reacción mejora la sensibilidad de la detección de productos de hidrólisis generados por estas enzimas[147,148].

Por otro lado, la no detección de la actividad carbapenemasa en el aislamiento de *P. aeruginosa* portadora del gen *bla*_{GES-2} podría atribuirse a problemas relacionados con la expresión de este gen o con su baja capacidad de hidrólisis. Por ejemplo, se ha demostrado que GES-2 presenta menor capacidad de hidrólisis de imipenem en comparación con GES-5[302]. Además, si bien desde el punto de vista estructural, *bla*_{GES-2} se clasifica como una carbapenemasa[59,303], otros autores clasifican a esta variante como una BLEE debido a sus propiedades catalíticas[304,305]. El posterior estudio de este aislamiento con mCIM-test arrojó un resultado negativo indicando ausencia de actividad carbapenemasa, lo cual concuerda con lo observado por MALDI-TOF (dato no mostrado).

En relación al traslado de esta metodología a los laboratorios clínicos, nos podemos enfrentar a varios problemas, algunos ya descritos en la bibliografía[12,306]. Desde el punto de vista práctico, la preparación de reactivos y buffers, el uso de matrices o calibradores alternativos y la necesidad de uso del equipo en un rango y configuración diferentes a las que se usan para identificación pueden verse como una dificultad a la hora de incorporar esta metodología a la rutina del laboratorio clínico. Asimismo, el manejo de los equipos por fuera de la configuración estándar, predeterminada para identificación, requiere personal entrenado en el uso de MALDI-TOF.

La falta de estandarización también es una debilidad de los métodos caseros de hidrólisis de carbapenems, tanto en la preparación de las muestras, material requerido, lectura e interpretación, la cual puede ser una dificultad extra por la falta de criterios claros para la categorización de los espectros y la subjetividad en la lectura de los mismos. Este problema ha sido abordado mediante el desarrollo de kits y softwares, por ejemplo *MBT-STAR - Carba IVD kit y software* de Bruker[149], o más recientemente el software CLOVER BioSoft desarrollado para interpretación de espectros de hidrólisis de imipenem[306]. Sin embargo, aunque buscan acercarse a la estandarización y automatización deseadas, estas alternativas son más costosas y no brindan soluciones completamente exentas de los problemas previamente mencionados.

A pesar de las limitaciones mencionadas, la incorporación de esta metodología en nuestro contexto clínico puede resultar costo-efectiva, dado que varios laboratorios clínicos cuentan con el equipamiento necesario. Para ello, se debería trabajar en la capacitación del personal en el uso de MALDI-TOF MS y en el análisis e interpretación de espectros, sin descartar la posibilidad de buscar alternativas para automatizar el paso de análisis. La adquisición de buffers y soluciones de antibióticos comerciales podría disminuir el tiempo de manipulación y preparación de reactivos, como forma de facilitar la incorporación de la metodología al flujo de trabajo del laboratorio clínico.

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE BIOFILMS Y SU ERRADICACIÓN

1 METODOLOGÍA

1.1 Formación de biofilms

En una primera etapa se estudió la capacidad de formación de biofilms de diversos aislamientos, con el objetivo de seleccionar un subgrupo para los ensayos con antimicrobianos posteriores. Por su simplicidad y bajo costo, el modelo seleccionado fue el estático en placa de 96 pocillos con coloración con cristal violeta descrito por Pratt y Kolter[307] con algunas modificaciones como se detalla más adelante.

1.1.1 Aislamientos

Se seleccionaron 55 bacilos Gram negativos para determinar su capacidad de formación de biofilms y poner a punto la técnica para cada especie o grupo. Los aislamientos en su mayoría se seleccionaron de los descritos en el capítulo 1, y se incluyeron otros del cepario del laboratorio (ver detalle en [Anexo 8](#)). Se estudiaron un total de 30 *P. aeruginosa* productoras de *bla*_{VIM-2} (n=16), *bla*_{VIM-2} + *bla*_{PER-1} (n=2), *bla*_{KPC-2} (n=3), *bla*_{PER-1} (n=2), *bla*_{GES-2} (n=1), *bla*_{GES-1} (n=5), y una sin mecanismos de resistencia detectados. Se incluyeron también 9 *P. putida* portadoras de *bla*_{VIM-2}, y 16 *Enterobacterales* portadores de *bla*_{NDM-1} (n=11), *bla*_{VIM-2} (n=1), *bla*_{KPC-2} (n=1), *bla*_{KPC-3} (n=1), *bla*_{CTX-M-15} (n=1) y *bla*_{CTX-M-9} (n=1).

Si bien la mayoría de los aislamientos eran productores de carbapenemasa, también se incluyeron aislamientos productores de BLEE o sin un mecanismo de resistencia detectado, para utilizar como controles en los ensayos con antibióticos o para su estudio en mayor profundidad como en el caso de las *P. aeruginosa* productoras de PER-1 provenientes de un brote.

Adicionalmente, se determinó la capacidad de formación de biofilm por parte de las cepas ATCC *E. coli* 25922 y *P. aeruginosa* 27853, mientras que *P. mirabilis* BL2921 se utilizó como control de producción fuerte de biofilm a las 48 h.

1.1.2 Ensayos

Se partió de los aislamientos frescos en TSA a partir de los cuales se realizaron preinóculos por picadura del centro de una colonia aislada con un palillo estéril y emulsión en 200 µL de caldo LB dispuesto en una placa de 96 pocillos, que se incubaron a 37 °C por 24 h. De dichos preinóculos se realizaron alícuotas 1/10 en caldo LB (volumen final 200 µL), por triplicado para cada aislamiento, en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron 24 h o 48 h. Luego de la incubación, se realizó una determinación de densidad óptica (DO) a 600 nm (DO₆₀₀) para constatar el crecimiento bacteriano. Se removió el caldo conteniendo las células planctónicas, seguido de tres lavados a los pocillos con buffer fosfato salino (PBS). Los biofilms adheridos a las paredes y fondo de los pocillos de la placa fueron teñidos con una solución de cristal violeta al 1% durante 15 minutos. El exceso de colorante se removió con lavados con PBS, luego de los cuales las placas se dejaron secar y se solubilizó el cristal violeta con etanol 95% ([Figura 45](#))[307,308].

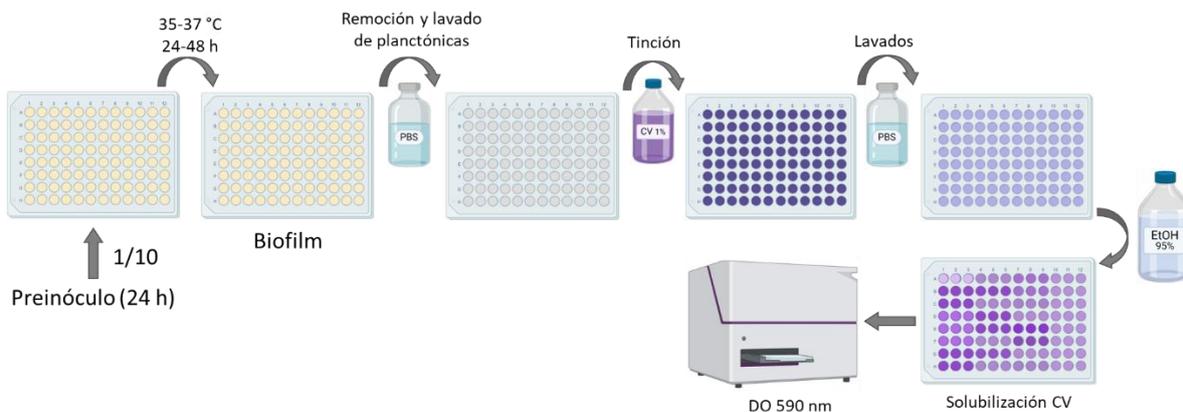


Figura 45. Procedimiento para el estudio de formación de biofilms en modelo estático con tinción de cristal violeta.

1.1.3 Lectura e interpretación

La biomasa de los biofilms fue cuantificada de acuerdo a la densidad óptica a 590 nm (DO_{590}) en un lector para microplacas.

Los valores de DO_{590} de los pocillos de control sin microorganismo (DO_C) fueron promediados y el valor obtenido fue restado a cada valor de DO_{590} de los pocillos con biofilm. Luego se promediaron los valores de DO_{590} de las réplicas correspondientes a cada aislamiento (DO_P). En función de la diferencia entre DO_C y DO_P se definieron cuatro categorías, de acuerdo a los criterios de Villegas y cols.[309]:

- no productor de biofilm cuando $DO_P \leq DO_C$
- productor débil de biofilm cuando $DO_C < DO_P \leq (2 \times DO_C)$
- productor moderado de biofilm cuando $(2 \times DO_C) < DO_P \leq (4 \times DO_C)$
- productor fuerte de biofilm cuando $(4 \times DO_C) < DO_P$

1.2 Actividad de antibióticos sobre biofilms de *P. aeruginosa*

Para estos ensayos se seleccionó un subgrupo de 15 *P. aeruginosa*, debido a su capacidad de formación de biofilm (moderado y fuerte), y en función de los genes de resistencia que presentaban y relaciones clonales. Se seleccionaron de las colecciones estudiadas 8 productoras de bla_{VIM-2} , 1 de $bla_{VIM-2} + bla_{PER-1}$, 2 productoras de bla_{PER-1} , dos de bla_{GES-1} , 1 de bla_{GES-2} , y 1 de bla_{KPC-2} (Tabla 14, Anexo 8). La cepa de control de calidad *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue utilizada como control de cepa fuerte formadora de biofilm.

Tabla 14. Aislamientos de *P. aeruginosa* seleccionados para evaluar la actividad de antibióticos sobre biofilms (datos de Tabla 6).

Cepa	β -lactamasa	CIM (mg/L) e interpretación CLSI 2023										DD ^(A)					
		IPM		MEM		CAZ		GM ^(B)		AK		CIP		FEP	ATM	PTZ	
V2	VIM-2	64	R	4	I	16	I	1	S	1	S	1	I	S	S	I	
60-2	VIM-2	64	R	4	I	16	I	1	S	1	S	1	I	S	S	R	
213	VIM-2	64	R	4	I	128	R	64	R	8	S	128	R	I	R	R	
926	VIM-2	> 64	R	16	R	16	I	32	R	32	I	128	R	R	R	R	
559	VIM-2	> 64	R	64	R	64	R	> 64	R	8	S	0,5	S	I	S	R	
089	VIM-2	64	R	16	R	32	R	32	R	8	S	0,125	S	I	S	R	
794	VIM-2	> 64	R	16	R	32	R	64	R	8	S	0,125	S	I	S	R	
931	VIM-2	> 64	R	16	R	64	R	32	R	4	S	0,125	S	I	S	R	
1116	GES-1	32	R	32	R	256	R	> 64	R	128	R	8	R	R	R	R	
1118	GES-1	16	R	32	R	128	R	> 64	R	64	R	4	R	R	R	R	
45098	KPC-2	> 64	R	> 64	R	64	R	4	S	4	S	64	R	R	R	R	
57763 ^(C)	GES-2	≥ 16	R	8	R	32	R	≥ 16	R	≥ 64	R	≥ 4	R	R	I	R	
Pa6415 ^(C)	VIM-2/ PER-1	≥ 32	R	1	S	≥ 256	R	4	S	≥ 64	R	1	I	R	R	I	
HCPa01	PER-1	≥ 16	R	8	R	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	0,25	S	≥ 32	R	32	I
HCPa12	PER-1	2	S	2	S	≥ 64	R	4	S	≥ 64	R	$\leq 0,06$	S	≥ 32	R	16	S

^(A)Resultados de disco difusión (DD), con excepción de cefepime y piperacilina-tazobactam en los aislamientos de la UCI del Hospital de Clínicas del período 2021-2022 que corresponden a valores CIM obtenidos con el sistema automatizado

VITEK®2. ^(B)La susceptibilidad a gentamicina fue interpretada según puntos de corte CLSI 2022. ^(C)Los valores de CIM corresponden a resultados del sistema automatizado VITEK®2.

Abreviaturas: CIM, concentración inhibitoria mínima. IPM, imipenem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidime; GM, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; PTZ, piperacilina-tazobactam. R, resistente; S, sensible; I, intermedio.

Se estudió la capacidad de disminuir la biomasa de biofilms previamente formados, por parte de diferentes antibióticos con actividad sobre *P. aeruginosa* o que según la bibliografía podían tener actividad antibiofilm. Para ello se utilizó el mismo modelo estático en placas de 96 pocillos descrito anteriormente, con un paso adicional.

Para cada aislamiento se prepararon 12 pocillos con biofilms (correspondiente a una fila de la placa), a partir de una dilución 1/10 de preinóculo en caldo LB como fue descrito anteriormente. Estos fueron incubados 24 h, luego de lo cual se realizó la remoción de células planctónicas y tres lavados con PBS. Sobre los biofilms adheridos a la pared y fondo de cada pocillo se adicionó caldo LB fresco con tres diluciones diferentes del antibiótico correspondiente o LB sin antibiótico para utilizar como control y poder comparar contra las condiciones ensayadas. Los antibióticos y concentraciones ensayados se detallan en la [Tabla 15](#). Los biofilms fueron incubados en estas condiciones durante 20 h más, luego de lo cual se procedió a remover y lavar con PBS las células planctónicas, teñir con cristal violeta y medir la DO₅₉₀ como se describió anteriormente ([Figura 46](#)). Cada condición fue ensayada por triplicado para cada aislamiento, en dos ensayos independientes.

Tabla 15. Concentraciones de antibióticos estudiadas en biofilms de la colección de 13 *P. aeruginosa*

Antibiótico	Concentraciones (mg/L)
Imipenem	0,5 - 1 - 2
	32 - 64 - 128
Meropenem	1 - 2 - 4
	16 - 32 - 64
Ceftazidime	4 - 8 - 16
	32 - 64 - 128
Amikacina	8 - 16 - 32
Gentamicina	4 - 8 - 16
Ciprofloxacina	0,5 - 1 - 2
	8 - 16 - 32
Rifampicina	1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128
Fosfomicina	32 - 64 - 128
	512 - 1024 - 2048
Azitromicina	16 - 32 - 64 - 128 - 256
	512 - 1024 - 2048

Para evaluar el efecto de los antibióticos sobre biofilms, se compararon los valores de DO₅₉₀ obtenidos para cada condición contra el control sin antibiótico mediante análisis simple de la varianza de Kruskal-Wallis con posterior comparación múltiple de Dunn para comparar pares de grupos. El análisis estadístico así como los gráficos fueron realizados en GraphPad Prism v.5.0.

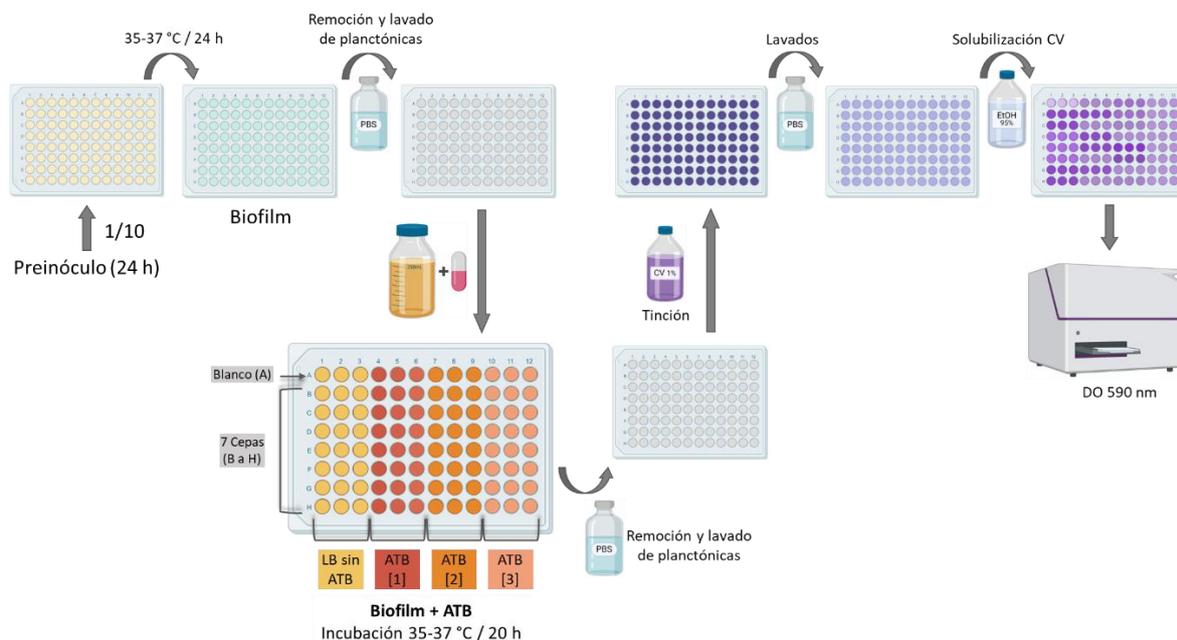


Figura 46. Procedimiento para el estudio de antibióticos sobre biofilms preformados de *P. aeruginosa*, en modelo estático con tinción de cristal violeta.

1.3 Actividad de combinación de antibióticos sobre biofilms de *P. aeruginosa*

1.3.1 Susceptibilidad a antibióticos combinados (*checkerboard*)

Para seleccionar las concentraciones de antibióticos a combinar para estudiar su actividad sobre biofilms, se determinó el efecto sinérgico de dos agentes en crecimiento planctónico. Para ello se empleó el método de tablero (*checkerboard*), basado en microdilución en caldo, en placas de 96 pocillos con fondo en U[310,311].

Para cada antibiótico a incluir en la combinación, se realizaron diluciones seriadas, en caldo Mueller-Hinton, cuatro veces por encima de la concentración final deseada, y se dispensaron 50 µL en cada pocillo de las placas en forma creciente en las filas (antibiótico A) y columnas (antibiótico B). De esta forma, cada pocillo contenía una combinación única de dos concentraciones de ambos antibióticos. Los pocillos A1 y H12 se dejaron sin antibióticos para utilizar como control de crecimiento y de esterilidad respectivamente. A su vez, la fila A y la columna 1 fueron constituidas por diluciones seriadas únicamente del antibiótico A y B respectivamente. Las combinaciones evaluadas fueron rifampicina 0,25 a 16 mg/L con meropenem 0,06 a 64 mg/L, amikacina 0,125 a 128 mg/L, gentamicina 0,03 a 32 mg/L o ciprofloxacina 0,03 a 32 mg/L.

El inóculo se preparó a partir de cultivos frescos de cada aislamiento, realizando una suspensión 0,5 McFarland en suero fisiológico, a partir de la cual se realizó una dilución 1/10. Las placas fueron sembradas con 100 µL de dicha dilución en cada pocillo, e incubadas 18-20 h a 37 °C. Luego se tomaron 10 µL del inóculo y se sembraron en agar Mueller-Hinton y MacConkey-Lactosa como control de crecimiento y pureza.

La lectura se realizó en forma manual, por observación de crecimiento turbidez o la formación de un botón en el fondo del pocillo, y se verificó en forma automatizada en un lector de microplacas mediante la determinación de la DO₆₀₀. Se leyó la CIM del antibiótico A (fila A) y del antibiótico B (columna 1), y luego la CIM de la combinación de ambos. Con estos datos se determinó el índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI), el cual se definió según: $FICI = \frac{CIM_{A/B}}{CIM_A} + \frac{CIM_{B/A}}{CIM_B}$, donde

CIM_{A/B} y CIM_A representan la CIM del antibiótico A en presencia y ausencia de B respectivamente, mientras que CIM_{B/A} y CIM_B representan la CIM del antibiótico B en presencia y ausencia de A respectivamente. Valores de FICI $\leq 0,5$ se interpretaron como una sinergia entre ambos antibióticos, $0,5 < FICI \leq 4$ como indiferente y $FICI > 4$ como combinación antagonista[310,311].

1.3.2 Evaluación de combinaciones de antibióticos sobre biofilms

Se eligieron concentraciones de cada antibiótico a ensayar en combinación de acuerdo a los resultados de *checkerboard* y teniendo en cuenta los valores de los puntos de corte del CLSI[116].

Las concentraciones ensayadas se muestran en la Tabla 16. Cada condición se estudió por triplicado según el modelo estático descrito anteriormente.

Las diferencias entre los tratamientos combinados versus cada antibiótico solo y el control sin antibiótico se compararon mediante test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn para comparar pares de grupos, como se mencionó anteriormente.

Tabla 16. Combinaciones de antibióticos evaluadas en biofilms

Colección de 13 <i>P. aeruginosa</i>
Rifampicina 4 mg/L + Amikacina 2 mg/L
Rifampicina 4 mg/L + Amikacina 16 mg/L
Rifampicina 8 mg/L + Amikacina 16 mg/L
Rifampicina 8 mg/L + Amikacina 32 mg/L
Rifampicina 16 mg/L + Amikacina 32 mg/L
2 <i>P. aeruginosa</i> productoras de PER-1 (brote)
Rifampicina 4 mg/L + Ciprofloxacina 0,5 mg/L
Rifampicina 4 mg/L + Meropenem 0,5 mg/L
Rifampicina 4 mg/L + Meropenem 2 mg/L
Rifampicina 4 mg/L + Gentamicina 0,5 mg/L
Rifampicina 4 mg/L + Gentamicina 2 mg/L
Rifampicina 4 mg/L + Amikacina 8 mg/L

1.4 Determinación de actividad de antibióticos combinados por método Calgary

En el marco de una pasantía realizada en el Dpto. de Biotecnología Médica de la Universidad de Siena, Italia, se realizaron ensayos de evaluación del efecto de fosfomicina con azitromicina en una selección de aislamientos de *P. aeruginosa*, utilizando el método Calgary®. Éste método consiste en la formación de biofilms en dispositivos Calgary, que son placas comerciales de poliestireno de 96 pocillos, cuyas tapas contienen espigas (*pegs*) que se introducen en los pocillos, en las cuales se forman los biofilms (Figura 47)[312,313].

Con este método se estudiaron 8 aislamientos de *P. aeruginosa*: 5 productores de VIM-2, y 3 productores de GES-1, GES-2 y KPC-2 respectivamente.

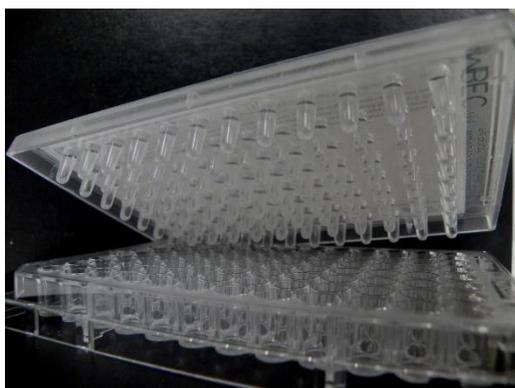


Figura 47. Dispositivo Calgary® conformado por una tapa con espaldas (*pegs*) donde se forman los biofilms, y una base que consiste en una placa de poliestireno de 96 pocillos. Imagen tomada de <https://innovotech.ca/product/mbec-assay-biofilm-inoculator-with-96-well-base/>

1.4.1 Determinación de la CIM a fosfomicina

En primera instancia se realizó la determinación de la susceptibilidad a fosfomicina a través del método de dilución en agar, el cual es el método de referencia. Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton con concentraciones seriadas de fosfomicina desde 512 a 0,125 mg/L, suplementadas con 25 mg/L de glucosa-6-fosfato.

El inóculo se preparó a partir de una dilución 1/20 de una suspensión equivalente a 0,5 McFarland de cada aislamiento, con el cual se sembró cada placa con 3 μ L utilizando una pipeta multicanal. Cada placa se realizó por duplicado y se sembraron al inicio y al final de la serie placas de Mueller-Hinton sin antibiótico para utilizar como controles de crecimiento. Las placas se incubaron 18-20 h a 35-37 °C. Se interpretó la CIM como la menor dilución en la cual no se evidenció crecimiento bacteriano[184].

1.4.2 Evaluación del efecto combinado de fosfomicina y azitromicina sobre biofilms

Se partió de una suspensión equivalente a 0,5 McFarland de cada aislamiento, de la cual se realizó una dilución 1/100 en TSB y cada uno se dispuso en 6 pocillos de 4 filas de una placa del dispositivo Calgary (4 cepas por dispositivo, cada condición por sextuplicado). Las placas se taparon con sus correspondientes tapas con *pegs*, y se incubaron 48 h a 35-37 °C en atmósfera húmeda. Los biofilms formados en los *pegs* fueron lavados 3 veces con PBS por inmersión en placas de 96 pocillos. Luego cada tapa fue colocada en una nueva placa conteniendo caldo Mueller-Hinton con azitromicina 20 mg/L, fosfomicina 600 mg/L (con glucosa-6-fosfato 25 mg/L), azitromicina 20 mg/L + fosfomicina 600 mg/L (con glucosa-6-fosfato 25 mg/L), y control sin antibiótico, cada condición dispensada en una fila completa. Los biofilms en estas condiciones fueron incubados nuevamente por 20-24 h a 35-37 °C en atmósfera húmeda. Luego de la incubación, los *pegs* fueron lavados nuevamente en PBS, sumergidos en una nueva placa con medio de recuperación (PBS-Tween 20 al 1%) y sometidas a sonicación a en alta frecuencia durante 5 minutos en baño húmedo. A partir de las placas de recuperación, se realizaron siete diluciones seriadas al décimo de cada fila por duplicado en PBS, a partir de las cuales se inocularon placas de TSA y se incubaron 24 h a 35-37 °C. Luego de la incubación se realizaron recuentos de las unidades formadoras de colonia (ufc), correspondientes a las bacterias que se encontraban formando parte del biofilm en cada *peg*.

Las concentraciones de fosfomicina y azitromicina ensayadas fueron fijadas en base a reportes previos en función de su administración aerosolizada e intravenosa respectivamente[314,315].

El análisis de los resultados se realizó en GraphPad Prism v.5.0, donde se calculó el \log_{10} de las ufc/peg para cada condición ensayada según la fórmula:

$$\log_{10}(ufc/peg) = \log_{10} \left\{ \left[\frac{N^{\circ} ufc/peg}{volumen\ plaqueado} \right] \cdot (factor\ de\ dilución) + 1 \right\}$$

Para cada aislamiento se graficó el $\log_{10}(\text{ufc/peg})$ determinado para cada una de las condiciones ensayadas. Las diferencias entre los tratamientos combinados versus cada antibiótico solo y el control sin antibiótico se compararon mediante test ANOVA y comparación múltiple de Bonferroni entre pares de grupos[312].

Para verificar que los microorganismos se encontraban viables al momento de agregar los antibióticos, se realizó en paralelo un segundo set de placas que fue leído a las 24 h de incubación del biofilm (equivalente al tiempo cero previo a la adición de antibióticos). Asimismo, para cada cepa se realizó un control del efecto de glucosa-6-fosfato para constatar que no tuviera un efecto en la capacidad de formación de biofilms.

1.5 Actividad de agentes antimicrobianos no clásicos sobre biofilms

Sobre el subgrupo de 13 aislamientos de *P. aeruginosa* y la cepa ATCC 27853, se realizó el análisis de capacidad de erradicar biofilms por parte de antimicrobianos no clásicos con posible actividad antibiofilm como resveratrol, quercetina y cloruro de decualinio.

1.5.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Para cada agente se realizó la determinación de la CIM mediante microdilución en caldo[184,316]. Partiendo de una solución conteniendo 20 g/L de resveratrol, quercetina o cloruro de decualinio (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se realizaron diluciones seriadas de cada uno de 4096 a 4 mg/L en caldo Mueller-Hinton, a un volumen final de 50 μL .

Como inóculo, se preparó una suspensión 0,5 McFarland de cada aislamiento, y se realizó una dilución 1/20 en suero fisiológico de los que se utilizaron 50 μL por pocillo para inocular la placa, con lo cual los antimicrobianos fueron diluidos al medio (concentraciones finales de 2 a 2048 mg/L).

A modo de controles, se dejó un pocillo sin inóculo para control del medio y las diluciones bacterianas fueron sembradas en Mueller-Hinton agar como control de crecimiento y contaminación, luego de sembrar las placas. Las placas se incubaron durante 18-20 h a 37 °C. Se interpretó como CIM a la menor concentración del agente en la que no se observó crecimiento ya sea por turbidez o por formación de un botón en el fondo del pocillo.

Dado que a altas concentraciones las moléculas ensayadas formaron precipitados que podían dificultar la lectura e interpretación de la CIM, se realizaron siembras de dichas diluciones en Mueller-Hinton agar, lo que permitió contrastar la lectura de la CIM con la concentración bactericida mínima (CBM).

1.5.2 Actividad sobre biofilms

La actividad sobre biofilms maduros fue determinada utilizando la misma metodología descrita anteriormente para el estudio de la actividad de antibióticos.

Las concentraciones ensayadas fueron 16, 32 y 64 mg/L de cloruro de decualinio y resveratrol, y 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mg/L de quercetina. Para cada aislamiento, cada condición se ensayó por triplicado en dos experimentos independientes. El análisis de los resultados se realizó como fue descrito anteriormente, comparando pares de condiciones mediante el test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn.

2 RESULTADOS

2.1 Formación de biofilm

De los 55 aislamientos de bacilos Gram negativos estudiados, 28 (50,9%) resultaron ser fuertes formadores de biofilm, 16 (29,1%) formaron biofilms moderados y 3 (5,5%) débiles, mientras que 8 (14,5%) fueron no formadores de biofilms (Figura 48.a).

De los 30 aislamientos de *P. aeruginosa*, 20 (66,7%) resultaron ser formadores fuertes de biofilm, 9 (30%) moderados y solo uno (3,3%) débil (Figura 48.b). Las cepas de *P. putida* demostraron menor capacidad de formación de biofilm, no hubo formadores fuertes, 3 aislamientos (33,3%) fueron formadores moderados, 1 (11,1%) débil y 5 (55,6%) no productores de biofilm (Figura 48.c). En cuanto a los aislamientos de *Enterobacterales*, 8 (50%) fueron fuertes productores de biofilm, 4 (25%) moderados, 1 (6,25%) débil y 3 (18,75%) no formadores de biofilm (Figura 48.d-e).

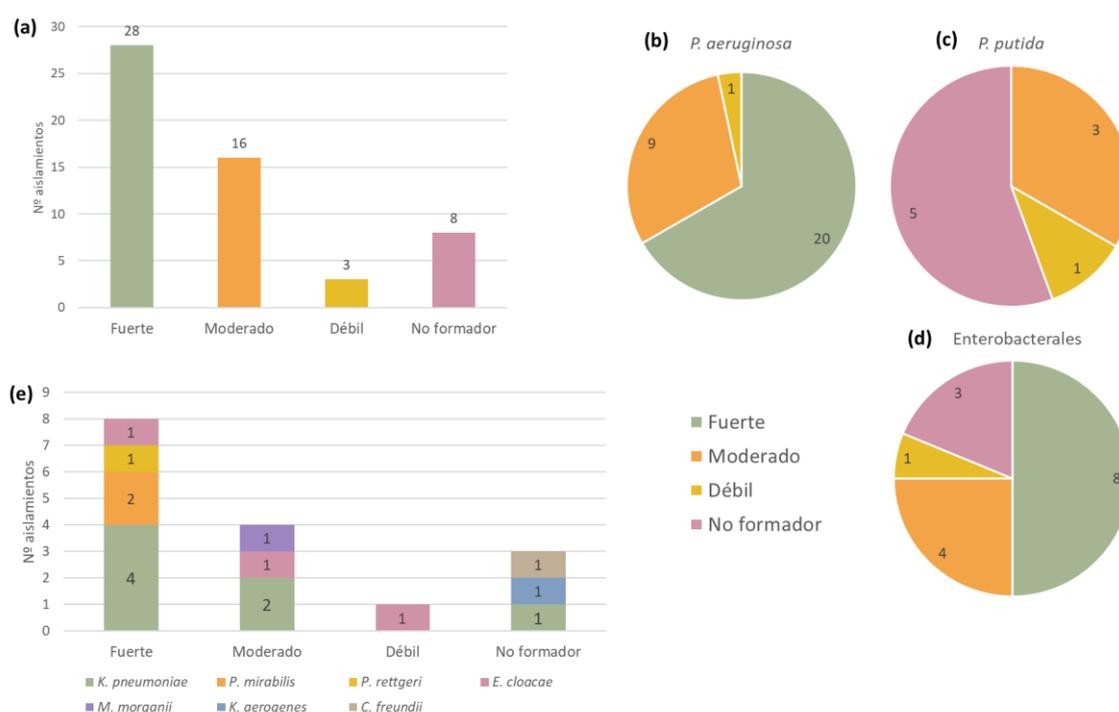


Figura 48. Número de microorganismos en las diferentes categorías de formación de biofilm (fuerte, moderado, débil, no formador). **(a)** Total de aislamientos estudiados; **(b)** *P. aeruginosa*; **(c)** *P. putida*; **(d)** *Enterobacterales*; **(e)** *Enterobacterales* separados por especie.

En relación al tiempo de formación de biofilm, se observó que los aislamientos de *P. aeruginosa* lograban formar biofilms a las 24 h de incubación, mientras que a las 48 h la biomasa disminuyó en la mayoría de los casos, incluso hasta quedar en la categoría de no formadores. Algo similar ocurrió con *P. putida*, aunque los no formadores de biofilm se mantuvieron en su categoría en ambos tiempos de lectura. Por último, los aislamientos de *Enterobacterales* necesitaron 48 h de incubación para formar biofilms maduros, aunque algunos formadores fuertes a las 48 h también lo fueron a las 24 h.

La cepa control *P. mirabilis* 2921 fue formadora fuerte de biofilm a las 48 h y débil a las 24 h, mientras que las ATCC resultaron fuerte formadora a las 24 y 48 h para el caso de *P. aeruginosa* 27853 y débil a las 48 h para el caso de *E. coli* 25922.

2.2 Actividad de antibióticos sobre biofilms de *P. aeruginosa*

Dentro del grupo de los β -lactámicos, imipenem, meropenem y ceftazidime no demostraron capacidad de disminuir significativamente la biomasa de biofilms, ya sea en concentraciones subinhibitorias como en concentraciones por encima de los valores del punto de corte de resistencia. Se observó que con imipenem a concentraciones mayores a 32 mg/L, meropenem a 64 mg/L y ceftazidime a 128 mg/L la media equivalente a la biomasa disminuyó, pero solo de manera estadísticamente significativa con meropenem (Figura 49.a-f).

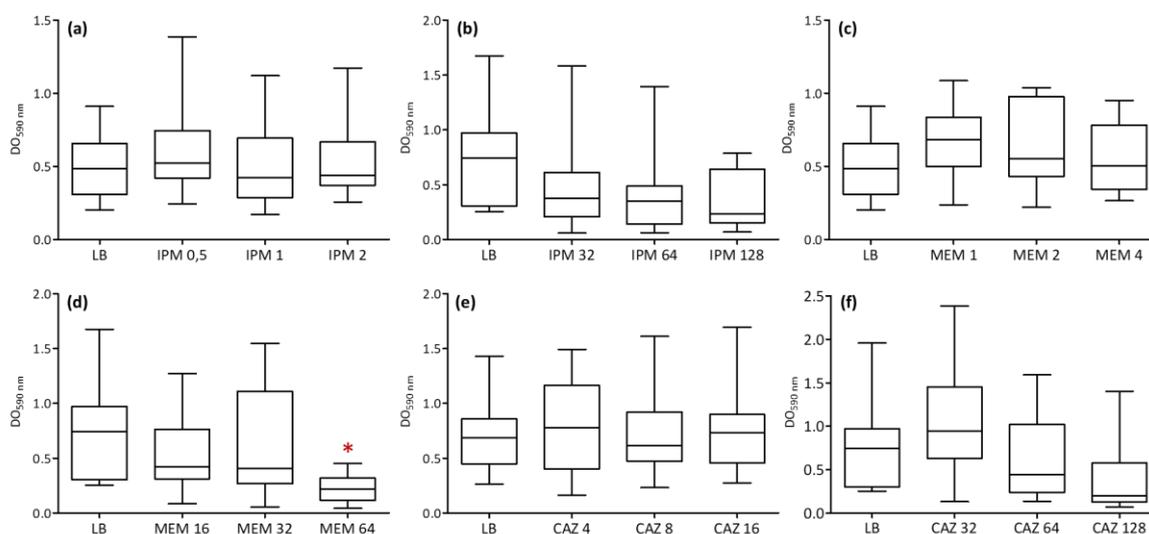
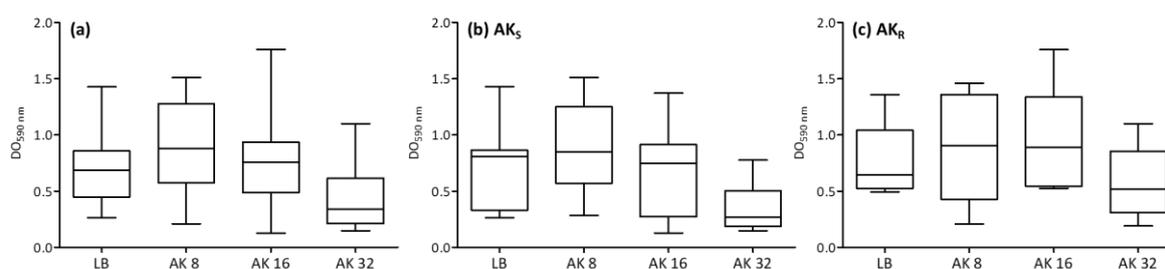


Figura 49. Efecto de (a,b) imipenem (IPM), (c,d) meropenem (MEM), y (e,f) ceftazidime (CAZ) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al blanco se representan con asteriscos.

Los aminoglucósidos gentamicina y amikacina tampoco mostraron una actividad significativa sobre la biomasa de biofilms, aunque el tratamiento con amikacina a 32 mg/L produjo una disminución en la media, pero no estadísticamente significativa, que en el análisis de los grupos de cepas sensibles y resistentes por separado se observó con más claridad en las primeras. El tratamiento con gentamicina 4 mg/L en aislamientos sensibles mostró un aumento no significativo en la media de la biomasa (Figura 50).



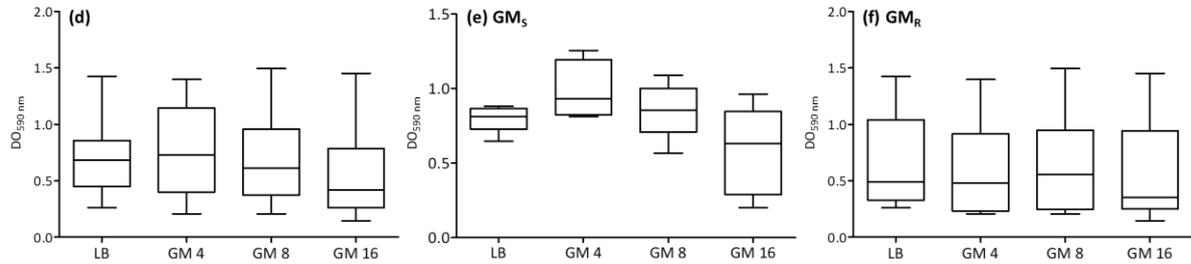


Figura 50. Efecto de (a,b,c) amikacina (AK), y (d,e,f) gentamicina (GM) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. Se muestran por separado los resultados para los aislamientos sensibles (subíndice S) y resistentes (subíndice R) a (b,c) amikacina (AK) y (e,f) gentamicina (GM). La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB).

Tampoco se observó un efecto de ciprofloxacina en ninguna de las concentraciones estudiadas, independientemente de la susceptibilidad de los aislamientos, observándose incluso aumento de la DO_{590} en algunos aislamientos (Figura 51.a-f). En relación al tratamiento con fosfomicina o azitromicina, tampoco se observaron efectos sobre los biofilms, a pesar de observarse un aumento de la media de la biomasa a las concentraciones más bajas, y una leve disminución a concentraciones mayores. Sin embargo, en ningún caso estos efectos resultaron estadísticamente significativos (Figura 52.a-e).

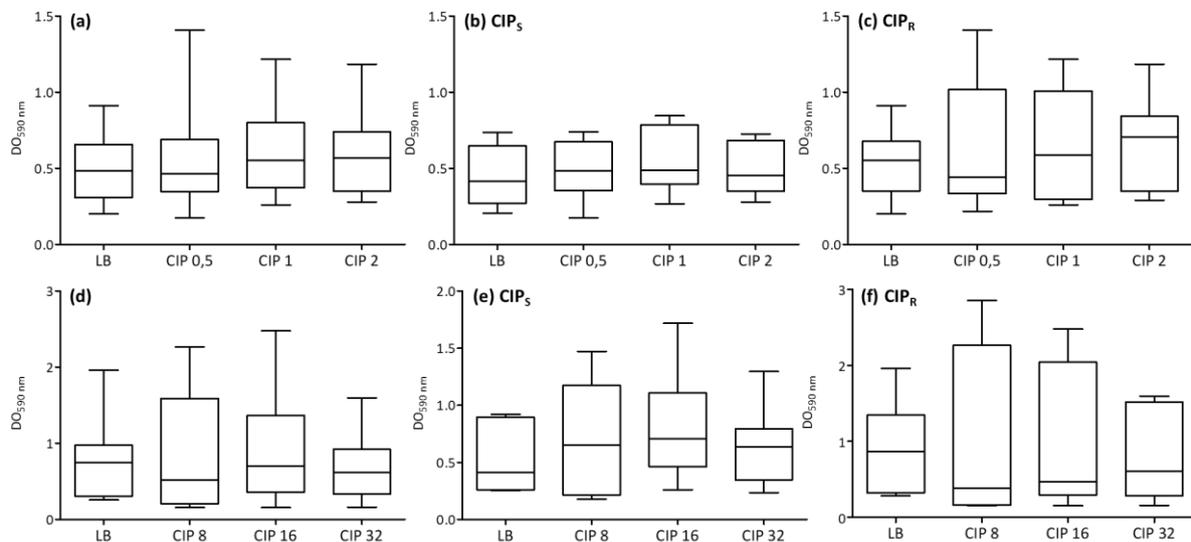


Figura 51. Efecto de ciprofloxacina (CIP) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. Se muestran por separado los resultados para los aislamientos (b,e) sensibles (subíndice S) y (c,f) resistentes (subíndice R). La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB).

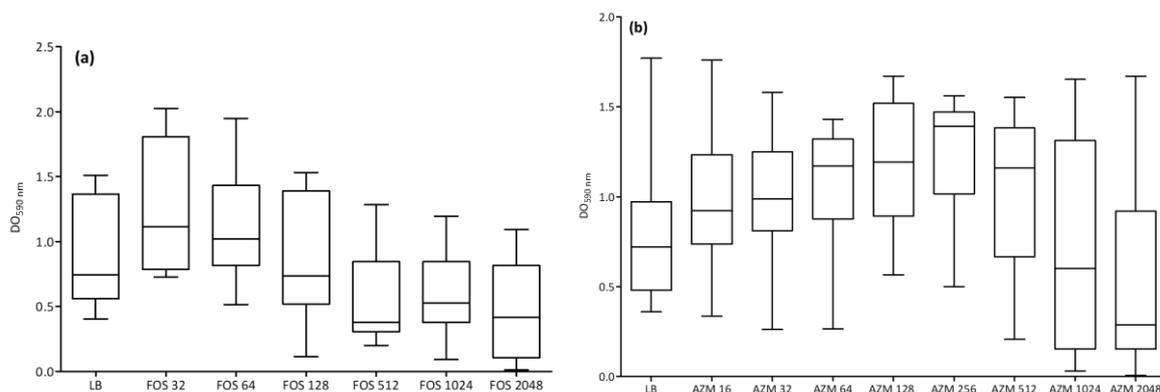


Figura 52. Efecto de **(a)** fosfomicina (FOS), y **(b)** azitromicina (AZM) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB).

Finalmente, rifampicina demostró disminuir la media de la biomasa de los biofilms a las concentraciones estudiadas, pero solo las concentraciones más elevadas (32, 64 y 128 mg/L) resultaron en un descenso estadísticamente significativo de los valores de DO_{590} (Figura 53).

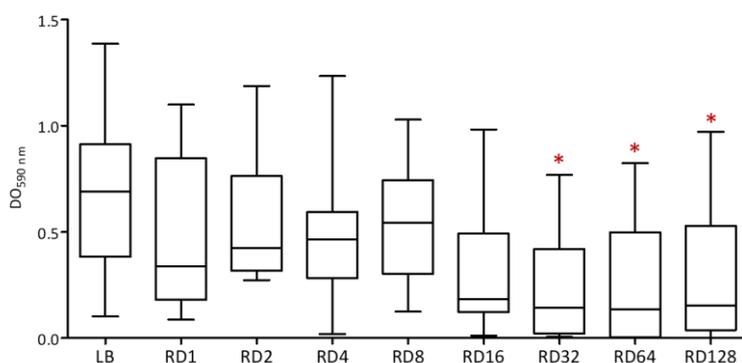


Figura 53. Efecto de rifampicina (RD). La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al blanco se representan con asteriscos.

2.3 Actividad de la combinación rifampicina y amikacina sobre *P. aeruginosa*

En los ensayos de estudio de sinergia por el método de checkerboard sobre los aislamientos de *P. aeruginosa*, la única combinación donde se observó sinergia en todos los aislamientos fue entre amikacina y rifampicina, mientras que las combinaciones de rifampicina con ciprofloxacina y gentamicina solo mostraron efectos sinérgicos en seis y tres aislamientos respectivamente. Por otro lado, no se observó sinergia entre rifampicina y meropenem en ninguna de las cepas estudiadas. En relación a las concentraciones en las que se observaron efectos sinérgicos, se encuentran rifampicina 0,5 mg/L con amikacina 2 mg/L, rifampicina 2 mg/L con amikacina 4 y 8 mg/L, y rifampicina 4 mg/L con amikacina 1 y 2 mg/L, siendo la última combinación la más frecuente y la que se utilizó como punto de partida para ensayar sobre biofilms.

Se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la biomasa de los biofilms cuando se utilizaron concentraciones de 32 mg/L de amikacina con 8 o 16 mg/L de rifampicina (Figura 54.a,d). Al estudiarse los aislamientos en dos grupos diferentes, los susceptibles a amikacina por un lado y los resistentes por otro, se evidenció que la disminución en la DO_{590} fue significativa del punto de vista estadístico sólo en el conjunto de cepas sensibles, mientras que en las resistentes, si bien se observa una disminución de la media, no resulta significativa (Figura 54.b-c,e-f).

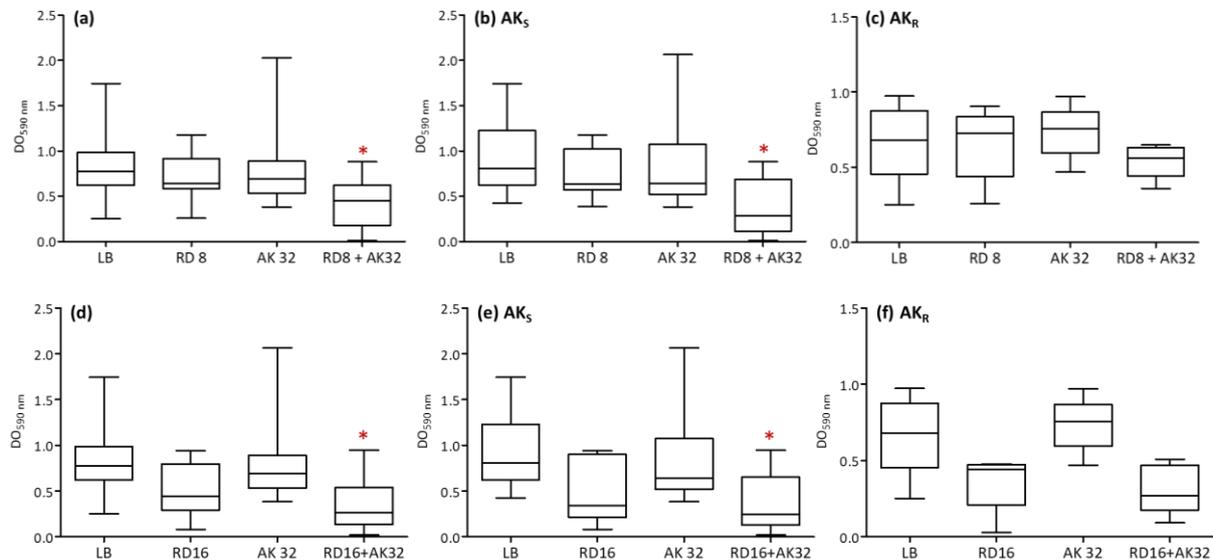


Figura 54. Efecto de rifampicina (RD) y amikacina (AK) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. RD 8 mg/L + AK 32 mg/L en (a) el total de los aislamientos, (b) sobre aislamientos sensibles a amikacina (AK_S), (c) sobre aislamientos resistentes a amikacina (AK_R). RD 16 mg/L + AK 32 mg/L en (d) el total de los aislamientos, (e) sobre aislamientos sensibles a amikacina (AK_S), (f) sobre aislamientos resistentes a amikacina (AK_R). Para cada caso se muestra el efecto combinado y de cada antibiótico por separado. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al blanco se representan con asteriscos.

Por otro lado, la combinación de rifampicina 4 mg/L con amikacina 2 mg/L no demostró tener capacidad de erradicar biofilms. Un aumento en las concentraciones, utilizando amikacina 16 mg/L con rifampicina 4 u 8 mg/L tampoco evidenciaron un efecto sobre los biofilms (Figura 55).

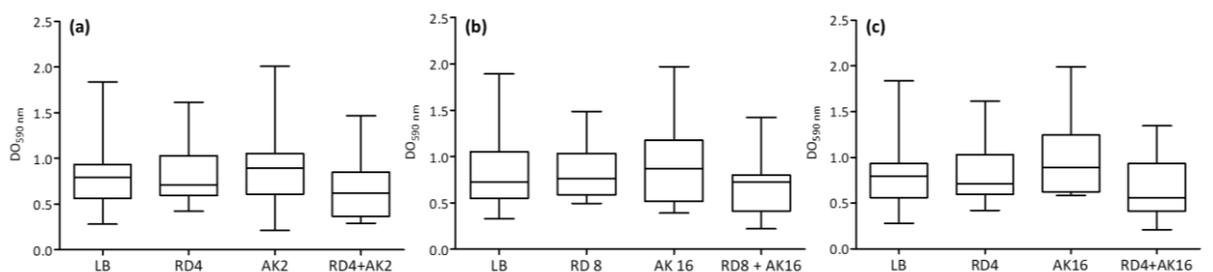


Figura 55. Efecto de rifampicina (RD) y amikacina (AK) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. (a) RD 4 mg/L + AK 32 mg/L; (b) RD 8 mg/L + AK 16 mg/L; (c) RD 4 mg/L + AK 16 mg/L. Para cada caso se muestra el efecto combinado y de cada antibiótico por separado. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB).

2.4 Actividad de la combinación fosfomicina y azitromicina sobre *P. aeruginosa*

En primera instancia se estudió la susceptibilidad a fosfomicina por el método de dilución en agar para un subconjunto de 8 *P. aeruginosa*. Cinco aislamientos tuvieron una CIM ≥ 128 mg/L (valor del ECOFF), mientras que los restantes mostraron valores de CIM de 16 y 8 mg/L.

Los resultados del estudio del efecto de la combinación azitromicina (AZM) 20 mg/L con fosfomicina (FOS) 600 mg/L fueron heterogéneos entre los aislamientos. Los ensayos a tiempo cero demostraron viabilidad bacteriana previa a la adición de antibióticos, mientras que no se observaron diferencias entre el recuento de células viables (\log_{10} ufc/peg) con y sin glucosa-6-fosfato, indicando que la misma no afecta la formación de biofilms.

En dos cepas con CIM a FOS > 512 mg/L no se observó disminución de biofilm con los antibióticos combinados ni por separado, e incluso se produjo un aumento del biofilm al enfrentarse con fosfomicina, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en una de ellas (Figura 56.a-b).

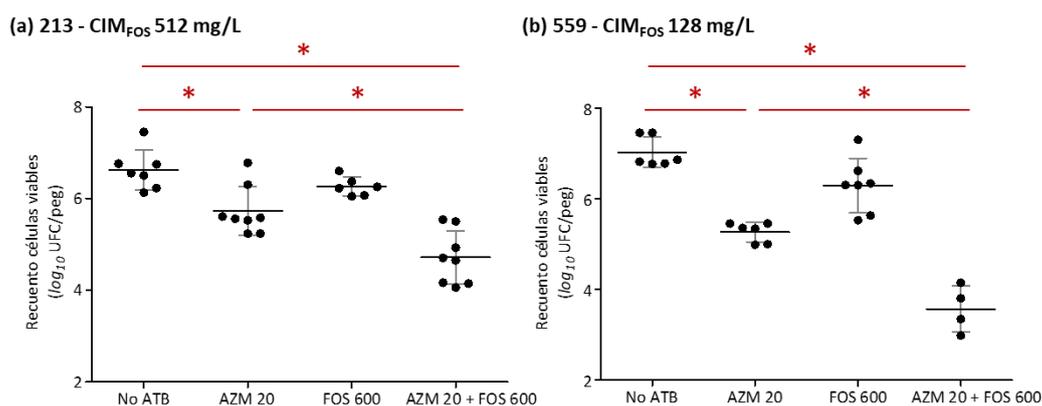


Figura 56. Efecto de azitromicina (AZM) y fosfomicina (FOS) solas y combinadas sobre biofilms de dos aislamientos con CIM a fosfomicina ($\text{CIM}_{\text{FOS}} > 512$ mg/L). La biomasa formando parte de los biofilms se representa como \log_{10} del promedio del recuento de células viables en cada peg para cada dilución (\log_{10} UFC/peg). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas entre ellas y con el control sin antibiótico (no ATB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes condiciones se marcan con asteriscos.

En otras dos (CIM a FOS 512 y 128 mg/L), se observó una disminución estadísticamente significativa del biofilm tanto con azitromicina sola como combinada con fosfomicina con respecto al control sin antibiótico. Además, se produjo una disminución significativa al comparar el efecto de azitromicina sola y combinada con fosfomicina, resultando por lo tanto en una disminución debida a ambos agentes juntos (Figura 57.a-b).

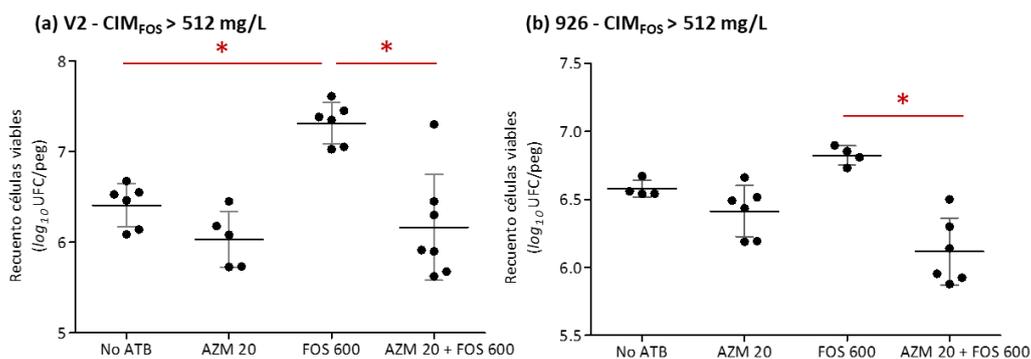


Figura 57. Efecto de azitromicina (AZM) y fosfomicina (FOS) solas y combinadas sobre biofilms de dos aislamientos con CIM a fosfomicina (CIM_{FOS}) de **(a)** 512 mg/L y **(b)** 128 mg/L. La biomasa formando parte de los biofilms se representa como \log_{10} del promedio del recuento de células viables en cada peg para cada dilución (\log_{10} UFC/peg). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas entre ellas y con el control sin antibiótico (no ATB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes condiciones se marcan con asteriscos.

Por otro lado, en otros dos aislamientos (CIM a FOS 256 y 16 mg/L) se observó una disminución de la biomasa del biofilm en el tratamiento con azitromicina y fosfomicina solos y en combinación, en comparación con el control sin antibiótico. Al comparar entre tratamientos, se observó que existe una diferencia significativa entre fosfomicina sola y combinada con azitromicina, pero no entre azitromicina sola y combinada, indicando que el efecto observado se debe a la actividad de azitromicina (Figura 58.a-b).

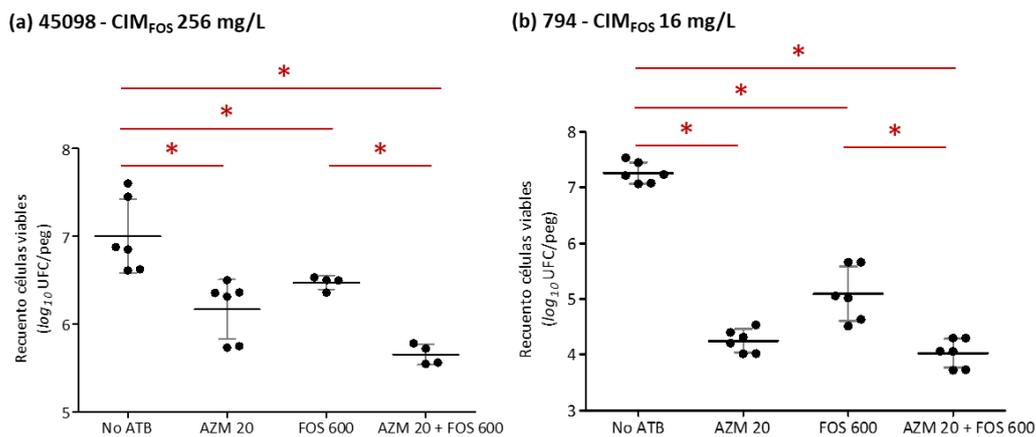


Figura 58. Efecto de azitromicina (AZM) y fosfomicina (FOS) solas y combinadas sobre biofilms de dos aislamientos con CIM a fosfomicina (CIM_{FOS}) de **(a)** 256 mg/L y **(b)** 16 mg/L. La biomasa formando parte de los biofilms se representa como \log_{10} del promedio del recuento de células viables en cada peg para cada dilución (\log_{10} UFC/peg). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas entre ellas y con el control sin antibiótico (no ATB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes condiciones se marcan con asteriscos.

Finalmente, en dos aislamientos (CIM a FOS 8 y 16 mg/L) se observó una disminución estadísticamente significativa en el tratamiento de azitromicina y fosfomicina por separado y en combinación con respecto al control sin antibiótico. Sin embargo, de forma similar al caso anterior, la comparación del efecto de fosfomicina sola y en combinación con azitromicina no resultó significativa, indicando que la azitromicina no agrega actividad adicional (Figura 59.a-b).

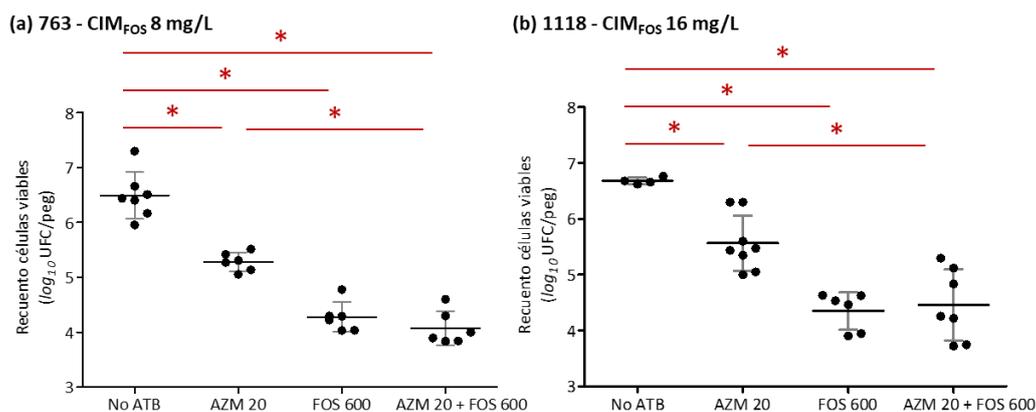


Figura 59. Efecto de azitromicina (AZM) y fosfomicina (FOS) solas y combinadas sobre biofilms de dos aislamientos con CIM a fosfomicina (CIM_{FOS}) de **(a)** 8 mg/L y **(b)** 16 mg/L. La biomasa formando parte de los biofilms se representa como log_{10} del promedio del recuento de células viables en cada *peg* para cada dilución (log_{10} UFC/*peg*). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas entre ellas y con el control sin antibiótico (no ATB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes condiciones se marcan con asteriscos.

2.5 Actividad de quercetina, resveratrol y cloruro de decualinio sobre biofilms

En primera instancia se realizó el estudio de susceptibilidad a las tres moléculas a evaluar en la colección de *P. aeruginosa* seleccionadas. Los valores de CIM para quercetina y cloruro de decualinio se encontraron entre 512 y > 1024 mg/L, mientras que los de resveratrol fueron ≥ 1024 mg/L. Por otro lado, los valores de CBM para los tres compuestos fueron > 1024 mg/L en todos los aislamientos. Las concentraciones de moléculas ensayadas en biofilm fueron menores a las reflejadas por los valores de CIM/CBM, debido a que a altas concentraciones se formaban precipitados. En ninguna de las condiciones ensayadas se observó una disminución de la biomasa de los biofilms, incluso con quercetina se observa un aumento en la media de la DO_{590} , aunque no resulta estadísticamente significativa (Figura 60).

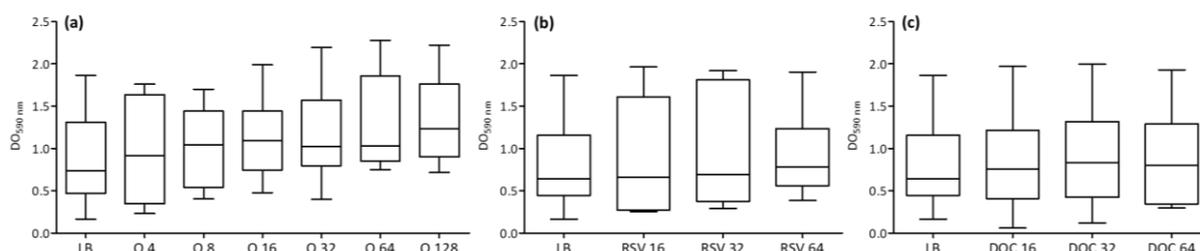


Figura 60. Efecto de **(a)** quercetina (Q); **(b)** resveratrol (RSV); y **(c)** cloruro de decualinio (DQC) sobre biofilms de *P. aeruginosa*. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB).

2.6 Efecto de antibióticos sobre biofilms de *P. aeruginosa* productoras de PER-1

2.6.1 Efecto de antibióticos combinados sobre células planctónicas

El efecto combinado de rifampicina con ciprofloxacina, meropenem, gentamicina y amikacina fue evaluado con la técnica de *checkerboard*, en dos aislamientos del brote de *P. aeruginosa* productora de PER-1 (HCPa01 y HCPa12).

Se observó un efecto sinérgico ($FICI \leq 0.5$) para todas las combinaciones excepto para ciprofloxacina con rifampicina. Meropenem 2 mg/L y rifampicina 4 mg/L resultaron sinérgicos para el aislamiento HCPa01 ($FICI = 0,5$), mientras que meropenem 0,06 y 0,5 mg/L fueron sinérgicos con rifampicina 2 y 4 mg/L respectivamente en el aislamiento HCPa12. En ambos aislamientos, gentamicina y rifampicina resultaron sinérgicos a 0,5 y 4 mg/L ($FICI = 0,375$), mientras que amikacina 8 mg/L exhibió sinergia con rifampicina 4 mg/L ($FICI = 0,375$). Además, HCPa12 demostró sinergia con amikacina 16 mg/L y rifampicina 0,5 mg/L ($FICI = 0,28$) (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados de ensayo de checkerboard para evaluar el efecto combinado de rifampicina con meropenem, gentamicina, amikacina o ciprofloxacina, en las cepas HCPa01 y HCPa12 potadoras de PER-1.

CIM ^(A)	HCPa01	HCPa12	CIM	HCPa01	HCPa12	CIM	HCPa01	HCPa12	CIM	HCPa01	HCPa12		
RD _S	16	16	RD _S	16	16	RD _S	16	16	RD _S	16	16		
MEM _S	8	2	GM _S	4	4	AK _S	64	64	CIP _S	0.25	0.06		
RD _C	4	2	4	RD _C	4	4	RD _C	4	4	0.5	RD _C	8	8
MEM _C	2	0.5	0.06	GM _C	0.5	0.5	AK _C	8	8	16	CIP _C	0.06	0.03
FICI ^(B)	0.5	0.375	0.28	FICI	0.375	0.375	FICI	0.375	0.375	0.28	FICI	0.74	1

^(A)CIM, concentración inhibitoria mínima (CIM) expresada en mg/L para cada antibiótico solo (sufijo S) y en combinación (sufijo C).

^(B)índice de concentración inhibitoria fraccional. Abreviaturas de antibióticos: RD, rifampicina; GM, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina.

2.6.2 Efecto de antibióticos solos y combinados sobre biofilms

La actividad de ciprofloxacina, meropenem, gentamicina, amikacina y rifampicina fue evaluada sobre biofilms maduros. Adicionalmente, se evaluaron las concentraciones que resultaron sinérgicas en el test de checkerboard, así como otras combinaciones de rifampicina con ciprofloxacina.

Rifampicina en concentraciones de 8 y 16 mg/L condujo a una reducción en la biomasa del biofilm de HCPa01, en comparación con el control sin antibiótico ($p < 0,05$), aunque este efecto no fue observado en HCPa12 (Figura 61.a-b).

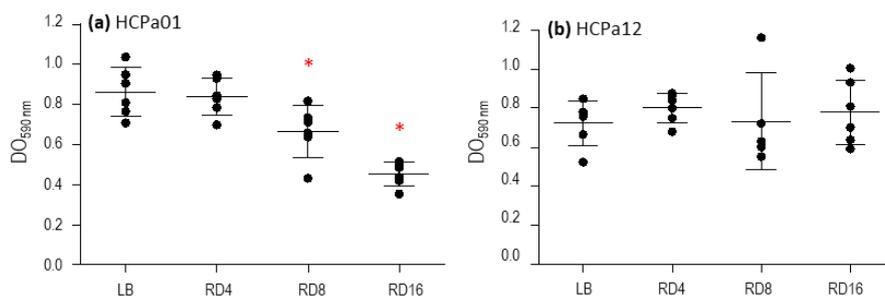


Figura 61. Actividad de rifampicina sobre biofilms maduros de 24 h de los aislamientos (a) HCPa01 y (b) HCPa12. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al blanco se representan con asteriscos.

El tratamiento con ciprofloxacina 0,25, 0,5 y 1 mg/L resultó en una reducción de la biomasa del biofilm ($p < 0,05$) en ambos aislamientos, así como la combinación entre ciprofloxacina 0,5 mg/L y rifampicina 4 mg/L, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo comparado con el de ciprofloxacina sola (Figura 62.a-b). En relación a meropenem, la biomasa del biofilm de HCPa01 disminuyó con 2 y 4 mg/L, mientras que en HCPa12 concentraciones de 0,5, 1, 2 y 4 mg/L produjeron un descenso en la biomasa comparada con el control sin antibiótico ($p < 0,05$). La combinación de meropenem 2 mg/L con rifampicina 4 mg/L también resultó en una reducción ($p < 0,05$) de la biomasa del biofilm en

comparación con el control sin antibiótico y con rifampicina sola en ambos aislamientos, así como con meropenem solo en el caso de HCPa01. La combinación de meropenem 0,5 mg/L con rifampicina 4 mg/L también mostró reducir la biomasa del biofilm de HCPa12, en contraste con el control sin antibiótico y con rifampicina sola, pero mostró un incremento comparado con meropenem 0,5 mg/L solo, aunque no estadísticamente significativo; mientras que dicha combinación no mostró efecto contra el biofilm de HCPa01 ([Figura 62.c-d](#)).

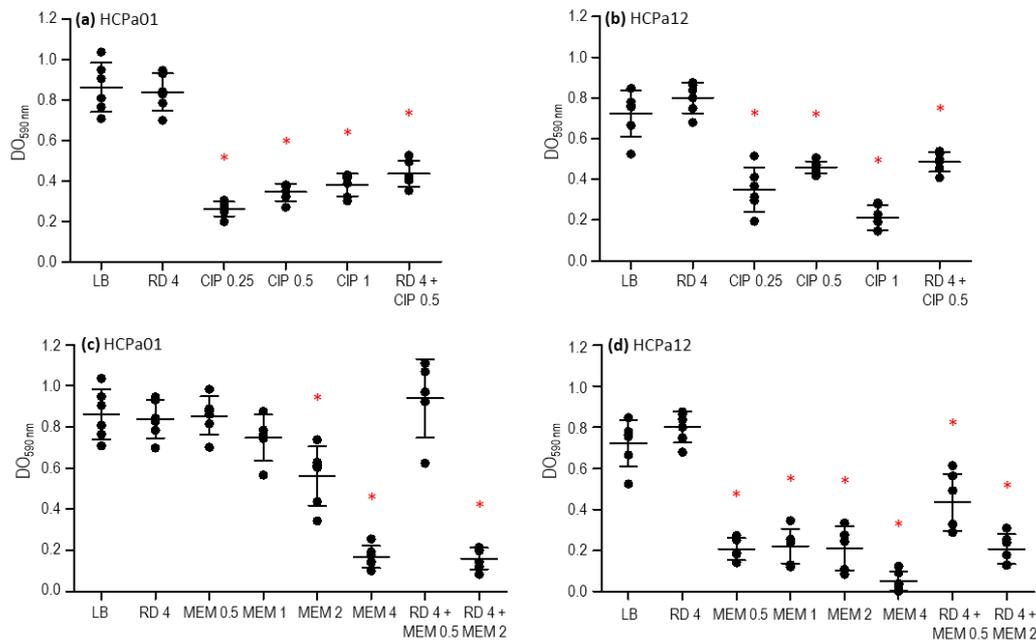


Figura 62. Actividad de antibióticos solos y en combinaciones sobre biofilms maduros de 24 h de los aislamientos HCPa01 y HCPa12. **(a,b)** ciprofloxacina (CIP) sola y combinada con rifampicina (RD); **(c,d)** meropenem (MEM) solo y combinado con RD. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm ($DO_{590\text{ nm}}$). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al blanco se representan con asteriscos.

Gentamicina 0,5, 1, 2 y 4 mg/L y amikacina 8, 16 y 32 mg/L no evidenciaron ningún efecto sobre los biofilms de los aislamientos. Las combinaciones de gentamicina 0,5 o 2 mg/L, y amikacina 8 mg/L con rifampicina 4 mg/L tampoco demostraron una reducción en la biomasa del biofilm. Por el contrario, se observó un incremento en la biomasa de HCPa12 con el tratamiento con 4 mg/L de rifampicina y 0,5 mg/L de gentamicina ([Figura 63.a-d](#)).

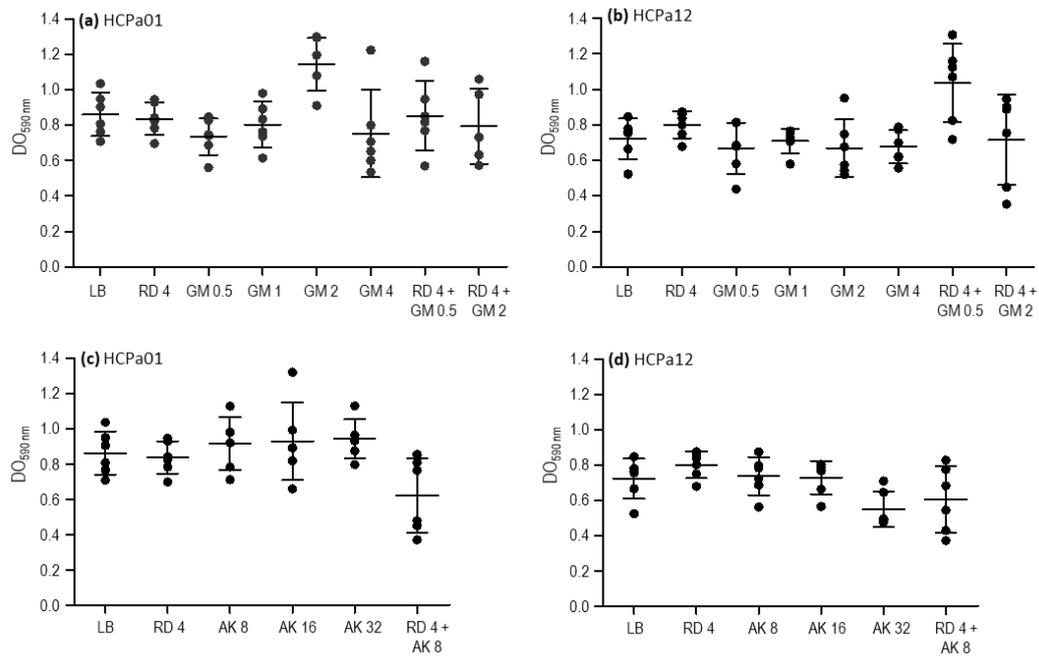


Figura 63. Actividad de antibióticos solos y en combinaciones sobre biofilms maduros de 24 h de los aislamientos HCPa01 y HCPa12. **(a,b)** Gentamicina (GM) sola y combinada con rifampicina (RD); **(c,d)** amikacina (AK) sola y combinada con RD. La biomasa formando parte de los biofilms fue estimada en función a la cantidad de cristal violeta unido y cuantificado según la densidad óptica a 590 nm (DO_{590 nm}). Las concentraciones evaluadas de cada antibiótico se expresan en mg/L en cada gráfico y fueron comparadas con el control sin antibiótico (LB).

3 DISCUSIÓN

3.1 Formación de biofilms

La mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* estudiados fueron formadores fuertes o moderados de biofilm (n = 29/30), mientras que solo uno produjo biofilm débil. La formación de biofilms es una de las características más importantes de la colonización y virulencia de esta especie[30,35], que además representa uno de los modelos más importantes en el campo de estudio de estas comunidades bacterianas[175], por lo que una alta proporción en formadores fuertes de biofilm era la esperada.

A diferencia de *P. aeruginosa*, los aislamientos de *P. putida* exhibieron menor capacidad de formación de biofilms, con una predominancia de no formadores (n = 5/9). Si bien no es de las especies más estudiadas en el ámbito clínico, la formación de biofilms en *P. putida* se encuentra caracterizada debido a su relevancia en la agricultura como promotor del crecimiento vegetal. Se ha observado que la formación de biofilms en esta especie se ve favorecida en las primeras etapas del crecimiento, cuando hay mayor disponibilidad de nutrientes, y que, dependiendo del medio en que se desarrolle, alcanza un máximo de desarrollo de la comunidad a las 4 a 6 h, luego de lo cual la biomasa comienza a decrecer[317]. Esto podría explicar por qué no se observaron más formadores de biofilms, ya que la determinación de la biomasa se realizó a tiempos estándar de 24 y 48 h.

En relación a los aislamientos de *Enterobacterales* incluidos se observó una distribución heterogénea en las capacidades de formación de biofilms. La mitad de los aislamientos fueron formadores fuertes (n = 8/16), entre los cuales cuatro fueron *K. pneumoniae*, dos productoras de NDM-1 y dos de KPC (KPC-2 y KPC-3), y dos *P. mirabilis* productores de NDM-1. Por otro lado, cuatro aislamientos fueron formadores moderados, entre los que también se encontraron dos *K. pneumoniae*, en este caso productoras de BLEE. Los tres aislamientos de *Enterobacter cloacae* se ubicaron en las tres categorías de formación de biofilms. El rol de los biofilms en infecciones causadas por *Enterobacterales* se ha estudiado más en algunas especies que en otras, por ejemplo, en *K. pneumoniae*, se trata de un factor asociado a la colonización de superficies de ventiladores mecánicos y catéteres, por lo que se les atribuye un importante rol en la patogenia de infecciones asociadas a catéteres venosos o urinarios, así como en la neumonía asociada a ventilación mecánica[38]. De manera similar, la formación de biofilms se ha relacionado con infecciones asociadas a catéteres urinarios y vasculares provocadas por *Enterobacter* spp.[318]. Finalmente, el mecanismo patogénico de las infecciones del tracto urinario por *P. mirabilis*, involucra la formación de biofilms cristalinos, asociados a los productos de la acción de su ureasa[45]. En el caso de los aislamientos estudiados, se desconoce el rol que pueda haber jugado la formación de biofilms en las patologías que originaron, pero se destaca que de 12 aislamientos formadores de biofilm fuerte o moderado, cinco fueron obtenidos de urocultivo y otros cinco de hemocultivos.

3.2 Efecto de antibióticos sobre biofilms de *P. aeruginosa*

El estudio del efecto de diferentes antibióticos anti-*Pseudomonas* sobre biofilms de *P. aeruginosa* mostró una pobre capacidad de erradicación de los mismos por la mayoría de los agentes.

La colección estudiada se conformó fundamentalmente por aislamientos resistentes a carbapenems, tanto productores de carbapenemasa como con otros mecanismos (entre ellos BLEE). Trabajos previos han demostrado una elevada capacidad de producción de biofilms entre aislamientos de *P. aeruginosa* MDR o productores de MBL[319–321].

Los β -lactámicos estudiados ceftazidime, así como los carbapenems imipenem y meropenem mostraron una leve disminución de la biomasa de los biofilms, que no resultó significativa y se dio a concentraciones muy elevadas. Esto se relaciona con reportes previos que indican que la concentración de β -lactámicos necesaria para erradicar biofilms de *P. aeruginosa* puede llegar a estar 1000 veces por encima de la CIM planctónica[175]. Por ejemplo, estudios en aislamientos con CIM de 1-2 mg/L a ceftazidime e imipenem mostraron que para la erradicación de biofilms con estos antibióticos eran necesarias concentraciones de ≥ 1024 mg/L[322].

Entre los mecanismos implicados en la tolerancia a estos antibióticos, se destaca la inactividad de los β -lactámicos sobre las células inactivas de los estratos más profundos del biofilm, la activación de respuestas adaptativas de estrés, así como por la inducción de la expresión de su AmpC cromosómica en presencia de estos antibióticos y debido a la liberación de β -lactamasas de células muertas hacia la matriz[17,175]. Esto provoca que, en el contexto del biofilm, algunos antibióticos como ceftazidime, pasen de ser tiempo dependientes a concentración dependientes, por lo que para poder superar la degradación enzimática se necesitarían concentraciones más elevadas del agente[175]. De todos modos, se ha reportado buena actividad de carbapenems sobre los biofilms de esta especie[323,324], y en PAO1 se ha reportado que concentraciones de ceftazidime por debajo de la CIM serían capaces de reducir el biofilm e inhibir genes relacionados a la adherencia y producción de matriz[325]. En nuestro caso, un mecanismo similar al descrito para AmpC podría estar involucrado en la expresión y liberación de otras β -lactamasas, como carbapenemasas y BLEE, contribuyendo a la resistencia en los biofilms estudiados, lo cual explicaría la discrepancia con otros trabajos.

En el caso de gentamicina, amikacina y ciprofloxacina, no se observó un efecto de disminución de la biomasa de los biofilms, y tampoco se observaron diferencias significativas del efecto en los aislamientos sensibles y resistentes a cada antibiótico, lo que indicaría la exhibición de mecanismos de tolerancia independientemente de los de resistencia. Uno de los mecanismos de tolerancia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas se relaciona con un escaso efecto en las capas profundas del biofilm donde se encuentran las células con baja actividad metabólica, debido a la baja actividad de sus blancos (escasa síntesis de proteínas y ADN respectivamente)[175]. La escasez de oxígeno en el interior del biofilm también puede relacionarse con la tolerancia a estos antibióticos, ya que el mecanismo de transporte de los aminoglucósidos es dependiente de oxígeno, y las fluoroquinolonas dependen de la formación de sustancias reactivas del oxígeno para su acción bactericida[17]. Por otro lado, Thöming y Häussler observaron que aislamientos de *P. aeruginosa* con mayores valores de CIM para tobramicina y ciprofloxacina requerían mayor cantidad de antibiótico para ser erradicados en biofilm. Sin embargo, esa no fue una relación lineal, ya que dependía en gran medida de las características de los aislamientos individuales, entre ellos los atributos de resistencia a cada antibiótico, indicando que la tolerancia está ligada a las características de cada cepa individual[326]. Cabe destacar que en dicho trabajo, las concentraciones de antibiótico que demostraron ser efectivas sobre biofilms fueron superiores a las evaluadas en nuestro caso, y que se encuentran muy por encima de los puntos de corte y de las concentraciones fisiológicas que pueden alcanzar estos antibióticos en la mayoría de los sitios anatómicos[62,327]. Asimismo, en relación al uso de aminoglucósidos en concentraciones por debajo de la CIM, los reportes del efecto en biofilms son contradictorios, por un lado se ha reportado una actividad inhibitoria y erradicadora de biofilms en la cepa control PAO1, así como actividad anti-virulencia, incluyendo factores relacionados con la formación de biofilms[328], sin embargo, también se ha indicado que concentraciones subinhibitorias de estos antibióticos serían capaces de inducir la formación de biofilms en *P. aeruginosa* y *E. coli*[325]. Por otro lado, en la cepa

ATCC 27853 las concentraciones reportadas para erradicación de biofilms son de 4 mg/L con ciprofloxacina y 2 mg/L con tobramicina[322]. Si bien fueron adquiridos con modelos de estudio diferentes, estos datos difieren de los obtenidos en este trabajo, ya que en aislamientos sensibles (CIM \leq 0,5 mg/L) no se observó un efecto reductor en la biomasa de los biofilms.

A pesar de ser un macrólido, la azitromicina presenta actividad anti-*Pseudomonas* e inmuno moduladora, por lo que se utiliza extensivamente en pacientes con fibrosis quística. Específicamente se ha destacado por su actividad antiinflamatoria, anti-virulencia y anti-biofilm, esta última debido a su capacidad de modular efectores relacionados con la regulación del biofilm como *quorum sensing*, di-GMPc y homoserin-lactona[329]. También se ha demostrado que este antibiótico en concentraciones sub-CIM previene la formación de biofilms de *P. aeruginosa*, inhibe la actividad de QS[315,325], reduce la biomasa de biofilms *in vitro* y, administrado tempranamente, reduce el daño local producido por quemaduras en modelo de ratón[330]. Sin embargo, también se ha sugerido que presenta un menor efecto sobre biofilms ya maduros, como por ejemplo en infecciones relacionadas a dispositivos médicos[331]. Esto último podría explicar el efecto observado en los aislamientos estudiados, donde las concentraciones estudiadas de azitromicina no disminuyeron la biomasa de los biofilms, sino que por el contrario, se observó aumento en la media de la misma, aunque no resultó estadísticamente significativa.

En el caso de fosfomicina sucede algo similar que con azitromicina, ya que se trata de un antibiótico que no se considera activo para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. De todos modos, se ha demostrado que alcanza elevadas concentraciones en biofilms debido a que las condiciones limitantes de oxígeno en este contexto favorecen la expresión del transportador del fármaco (glicerol-3-fosfato dependiente)[332]. Debido a su capacidad de penetración en biofilms, se ha reportado un efecto sinérgico antibiofilm de fosfomicina con otros antibióticos, entre ellos tobramicina[333] y fluoroquinolonas[334]. Asimismo, se ha reportado que concentraciones de fosfomicina de 300, 700 y 1500 mg/L son capaces de reducir la biomasa de biofilms de *E. coli*[335]. Por otro lado, también se ha indicado que concentraciones de 8 mg/L (sub-CIM) serían capaces de inhibir la formación de biofilms en aislamientos urinarios MDR de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp.[336]. Sin embargo, otros trabajos reportan concentraciones de inhibición de biofilms de *P. aeruginosa* de \geq 1024 mg/L, incluso en la cepa control ATCC 27853 (CIM 4 mg/L), y se presume que las concentraciones para erradicación de biofilms maduros serían mayores, debido al elevado inóculo y la posibilidad de emergencia de mutantes resistentes en este contexto[333]. Éste último podría ser el caso observado en este trabajo, ya que concentraciones elevadas de fosfomicina fueron incapaces de reducir la biomasa de los biofilms.

En este trabajo, también se evaluó la combinación de azitromicina con fosfomicina sobre biofilms de algunos aislamientos de *P. aeruginosa* pero con el método Calgary en lugar del modelo en placa coloreado con cristal violeta. Al estudiar cada cepa individual, se pudo observar que para los tres aislamientos con CIM a fosfomicina de 8 y 16 mg/L hubo una disminución significativa de la biomasa del biofilm, mientras que este efecto no fue evidente en los cinco aislamientos con CIM entre 128 y $>$ 512 mg/L. Por otro lado, azitromicina 20 mg/L redujo significativamente la biomasa del biofilm en tres aislamientos, uno de los cuales también mostró un efecto sinérgico entre este antibiótico y fosfomicina. Solo en dos de los ocho aislamientos estudiados se evidenció sinergia entre ambos agentes, indicando un importante componente individual en el comportamiento de los biofilms frente a estos agentes. Asimismo, las diferencias en el efecto observadas con el estudio de la totalidad de las cepas pueden deberse también a las diferencias entre los modelos de estudio.

Finalmente, rifampicina fue el único de los antibióticos ensayados que demostró actividad reductora en la biomasa de los biofilms de forma significativa a concentraciones de 32, 64 y 128 mg/L. Se destaca que los aislamientos estudiados presentaron CIM a rifampicina entre 8 y 16 mg/L, indicando que las concentraciones necesarias para exhibir un efecto sobre los biofilms se encuentran de 1 a 4 diluciones por encima de la misma. Estas concentraciones activas sobre biofilms de *P. aeruginosa* son similares a valores reportados de mínima concentración de erradicación de biofilms (MBEC) *in vitro* para *S. epidermidis* y *S. aureus* (32 y 64 mg/L respectivamente). Si bien no son concentraciones factibles de alcanzar *in vivo* en administración intravenosa del agente, son menores a las reportadas para otros antibióticos antiestafilocócicos (media de 1024 mg/L)[337], algo similar a lo observado con otros antibióticos en biofilms de *P. aeruginosa*[175,322].

Rifampicina es el antibiótico que ha demostrado mayor actividad sobre biofilms de *S. aureus*[338] y constituye una de las opciones para el tratamiento de infecciones periprotésicas articulares por Gram positivos[337]. Su eficacia para el tratamiento de biofilms de *S. aureus* en dispositivos ortopédicos, tanto en modelos animales como en estudios clínicos, se ha demostrado principalmente para infecciones tempranas, donde el inóculo aún es bajo y los biofilms son jóvenes, o posterior a un desbridamiento quirúrgico. Los tratamientos con rifampicina suelen ser prolongados y deben combinarse con otro agente activo, frecuentemente fluoroquinolonas, debido a la rápida aparición de cepas resistentes[337,339].

Los reportes del efecto de rifampicina sobre *P. aeruginosa* son más limitados ya que es un antibiótico que carece de efectividad sobre Gram negativos[340]. Sin embargo, la creciente prevalencia de esta bacteria como agente de infecciones periprotésicas y la demostrada buena actividad de rifampicina sobre biofilms ha despertado el interés en evaluarla como opción terapéutica. En este sentido, Laperche y cols. demostraron que la presencia de rifampicina en cemento óseo, puede inhibir la formación de biofilms de *P. aeruginosa*[341]. Sin embargo, no se han reportado trabajos que demuestren su actividad sobre biofilms constituidos.

La combinación de rifampicina con amikacina sobre biofilms producidos por la colección evaluada, mostró un efecto sinérgico entre concentraciones de 8 y 16 mg/L de rifampicina y 32 mg/L de amikacina. Al analizar por separado las cepas sensibles y resistentes a amikacina, se observó que el efecto fue significativo sobre la biomasa del biofilm del primer grupo, sugiriendo nuevamente que la tolerancia en biofilms puede ser afectada por componentes individuales, pero también por los mecanismos de resistencia presentes en cada aislamiento. Trabajos previos han demostrado que la rifampicina es capaz de potenciar la actividad de los aminoglucósidos en células planctónicas. Uno de los mecanismos propuestos para explicar esta sinergia es la actividad de rifampicina sobre el sistema de dos componentes AmgRS, involucrado en las respuestas de estrés en la superficie bacteriana y en la resistencia a aminoglucósidos, mediada por la inducción de MexXY. Sin embargo, Ma y cols. observaron una variabilidad individual en la potenciación de la susceptibilidad a aminoglucósidos por parte de rifampicina, sugiriendo la presencia de otros mecanismos subyacentes[342].

3.3 Evaluación de combinaciones con rifampicina en aislamientos individuales

Los dos aislamientos de *P. aeruginosa* productores de PER-1 seleccionados para la evaluación individual del efecto de antibióticos combinados con rifampicina exhibieron diferencias entre las formas de crecimiento planctónica y en biofilm. Meropenem y ciprofloxacina en forma individual demostraron habilidad de reducir la biomasa de los biofilms, en el caso del primero incluso en

concentraciones por debajo de la CIM. Sin embargo, la asociación de rifampicina no agregó un efecto adicional. Gentamicina y amikacina tanto por separado como en combinación con rifampicina no presentaron un efecto significativo en la biomasa de los biofilms. Por el contrario, en células planctónicas, tanto estos aminoglucósidos como meropenem exhibieron sinergia con rifampicina. Como se mencionó anteriormente, la evidencia de eficacia de combinaciones con rifampicina es limitada para *P. aeruginosa*, a diferencia de especies como *S. aureus* o *S. epidermidis*[339], o incluso *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa donde se ha reportado eficacia *in vitro*[343]. Estudios previos sobre células planctónicas han mostrado buenos resultados *in vitro* de la combinación de rifampicina con imipenem en aislamientos MDR[344], así como una potenciación de la actividad de aminoglucósidos como se mencionó anteriormente[342]. Mientras que en biofilms se ha reportado sinergia de la combinación de rifampicina con colistina[340], o con fosfomicina[345], los cuales no fueron evaluados en este trabajo.

3.4 Efecto de otros agentes sobre biofilms de *P. aeruginosa*

Como alternativa al uso de antibióticos, se han estudiado diversas alternativas para el tratamiento o disrupción de biofilms. Entre estas se encuentran diversos productos naturales o derivados de plantas, como compuestos polifenólicos solos o como fotosensibilizadores para terapia fotodinámica[181], así como compuestos de amonio cuaternario, péptidos antimicrobianos, bacteriófagos, entre otros[177]. En este trabajo se evaluó el efecto de tres compuestos sobre biofilms preformados de *P. aeruginosa*. Uno de los agentes evaluados fue quercetina, que es un flavonol derivado de plantas. Este compuesto ha demostrado capacidad anti-biofilm en varios microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus mutans*, *E. coli*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*. En la mayoría de los casos se trata de una actividad inhibitoria de la formación de biofilms a concentraciones por debajo de la CIM, aunque también se ha evaluado a concentraciones elevadas (250-500 mg/L), mientras que los reportes de capacidad de erradicación o efecto sobre biofilms preformados se encuentra menos reportada[346]. Específicamente en *P. aeruginosa*, trabajos previos han indicado que la actividad antimicrobiana de la quercetina es limitada, con elevadas CIM reportadas de 500 mg/L en cepas clínicas y PAO1[347]. Valores de CIM y CBM similares o mayores se hallaron en la colección estudiada, confirmando esta afirmación. Por otro lado, las concentraciones de quercetina capaces de inhibir la formación de biofilms reportadas son variadas, 8 a 64 mg/L[348], 16 mg/L[349] y 250-500 mg/L[347], y el mecanismo subyacente propuesto es la inhibición de efectores del sistema de *quorum sensing* que regula el establecimiento del biofilm[349,350]. Los estudios de erradicación o reducción de biofilms preformados reportan la efectividad de quercetina cuando se combina con otros compuestos como antibióticos[350] o nanopartículas de cobre[351]. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo reflejan que quercetina a concentraciones sub-CIM por sí sola no sería capaz de disminuir la biomasa de biofilms ya establecidos.

Por otro lado, se determinó la actividad de resveratrol sobre biofilms, la cual tampoco presentó un efecto sobre la biomasa a las concentraciones estudiadas. La CIM a resveratrol de los aislamientos de *P. aeruginosa* estudiados en todos los casos fue ≥ 1024 mg/L, coincidiendo con valores reportados previamente por otros autores de CIM superiores a 512 y 1000 mg/L[352–354]. Este agente polifenólico ha sido ampliamente estudiado como posible antimicrobiano, pero en patógenos Gram negativos las CIM reportadas superan los 200 mg/L indicando una limitada actividad antimicrobiana, atribuida probablemente a la baja penetración del agente a través de la membrana externa y/o a su

expulsión por bombas de eflujo. Sin embargo, se le atribuyen también propiedades anti-biofilm y anti-virulencia[352], y particularmente en *P. aeruginosa* se ha destacado por ser un efectivo inhibidor de *quorum sensing*[353].

De forma similar a lo hallado en este trabajo, reportes previos no hallaron un efecto significativo de resveratrol a concentraciones sub-MIC sobre biofilms preformados, y tampoco capacidad de inhibir su formación[354,355]. Sin embargo, sí se reportó un efecto sinérgico con polimixina B o aminoglucósidos, tanto de inhibición de la formación de biofilms como de reducción de la biomasa de biofilms preformados[353,354]. De estos trabajos se destaca que, si bien las concentraciones de resveratrol que mostraron sinergia se encuentran por debajo de la CIM, son muy elevadas para alcanzarse de forma sistémica debido a su baja biodisponibilidad[352,354].

Finalmente, con respecto al compuesto de amonio cuaternario cloruro de decualinio, al igual que para los anteriores no se observó un efecto sobre biofilms de la colección de *P. aeruginosa*. En este caso, la evidencia relacionada con su actividad antimicrobiana se limita casi exclusivamente a patógenos productores de vaginosis bacteriana como *Atopobium vaginae*, otras especies del género *Atopobium* spp., *Gardnerella* spp., y otros patógenos vaginales como *Candida* spp.[356,357]. Asimismo, se ha reportado su capacidad de erradicar biofilms de *Gardnerella* spp. a concentraciones menores a la CIM planctónica (reportada en 128-256 mg/L)[357]. Más recientemente, se propuso a este agente como un inhibidor de la respuesta SOS y de la liberación de ADN inducido por esta respuesta de estrés, el cual se propone como un mecanismo de prevención de la formación de biofilms[358].

3.5 Comentarios finales

El tratamiento de infecciones que involucran biofilms es un desafío clínico que se ha investigado desde varias aristas, no siempre con respuestas concluyentes. En general, hay un acuerdo en que el uso de antibióticos para el tratamiento de las mismas requiere de elevadas concentraciones y exposiciones prolongadas, lo cual frecuentemente no es posible debido a los efectos adversos que esto implica[325]. Ligado a esto, la eficacia del tratamiento antibiótico de infecciones que involucran biofilms no puede predecirse a partir de valores de CIM planctónica[326], de hecho la tolerancia es independiente de la resistencia planctónica, y ambos fenómenos actúan de forma compleja en el contexto del biofilm[359].

La complejidad del fenómeno de tolerancia, y la variabilidad en las respuestas biológicas tanto especie- como cepa-dependientes, impiden generar consensos en relación a la efectividad de los antimicrobianos en biofilms. Un ejemplo de esto es la demostración de que bajas dosis de antibióticos en el sitio de infección pueden permitir la selección de mutantes aumentando el riesgo de inducción de producción de biofilms[325].

Otro problema que dificulta la comprensión de este fenómeno se relaciona con la disponibilidad de modelos que permitan estudiar la susceptibilidad en biofilms. Si bien existen métodos estandarizados para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos en bacterias planctónicas, la situación no es la misma para su evaluación en biofilms[322,359]. En teoría, cualquier sistema o modelo de estudio de biofilms se podría utilizar para definir susceptibilidad, sin embargo existen algunos métodos comerciales diseñados específicamente para ello, como Calgary® (MBEC test), BiofilmChip, BioFlux System o micro-reactores, los cuales ofrecen varias ventajas pero a mayores costos[359].

En este trabajo, se utilizó el método de microplaca y tinción con cristal violeta, que se trata de la técnica más utilizada para el estudio de biofilms debido a su simplicidad, relativa rapidez y alto rendimiento. Sin embargo, se han documentado importantes limitaciones de esta técnica,

relacionadas con su repetibilidad (dentro de un mismo laboratorio) y reproducibilidad (en diferentes laboratorios)[360]. Se ha indicado también la existencia de heterogeneidad entre pocillos, debido a la manipulación, diferencias en el inóculo y variaciones en el crecimiento bacteriano, que pueden afectar el resultado final. Esto sumado a que la cuantificación por cristal violeta es una estimación de la biomasa, pero no permite determinar viabilidad ni modificaciones en el número de unidades formadoras de colonia, y puede sobreestimar la cantidad de biofilm adherido[359,361]. Otros métodos de cuantificación en el modelo de microplaca como la determinación de células vivas y muertas por microscopía láser confocal o la remoción del biofilm adherido y posterior recuento de las unidades formadoras de colonias también presentan varias limitaciones[361].

Hasta el momento, continúa la discusión sobre la validez de los métodos de estudio de susceptibilidad en biofilms, dado que los modelos *in vitro* no pueden emular la complejidad del contexto de las infecciones. Los datos que arrojan resultan poco representativos de la verdadera actividad del antibiótico *in vivo*, y se ha propuesto que no serían mucho mejores que los brindados por la susceptibilidad planctónica[359].

No existe una correlación clara entre la susceptibilidad y la capacidad de formar biofilms. Algunos autores han reportado mayor capacidad de formación de biofilms en clones exitosos de *P. aeruginosa* MDR/XDR como ST111, 175 y 235, pero otros trabajos no reportaron diferencias entre cepas MDR y no-MDR[359]. Asimismo, Ma y cols. establecieron que existiría una relación entre la formación de biofilms y la resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, tras la observación de mayor inducción de citotoxicidad en modelos de infección mediada por biofilms de aislamientos resistentes a carbapenems en comparación con cepas sensibles[362].

Cabe destacar, que el efecto tanto de antibióticos como de otros compuestos se evaluó sobre biofilms preformados, a diferencia de la mayoría de los reportes que evalúan la capacidad de inhibición de la formación de biofilms, lo cual puede explicar las discordancias respecto a otros trabajos. Asimismo, la mayoría de los fármacos ensayados no mostraron un efecto reductor de la biomasa de los biofilms, sugiriendo la actuación de mecanismos de tolerancia que impiden su acción. Tampoco se descartan posibles efectos debido al gran inóculo bacteriano que se encuentra en el biofilm al adicionar los fármacos.

Por otro lado, el método de cristal violeta implementado, si bien es sencillo, económico y permite evaluar varios aislamientos en simultáneo con sus respectivas réplicas, presenta como principal limitación la imposibilidad de determinar la viabilidad de las bacterias en el biofilm. Asimismo, si bien entre réplicas experimentales se conservaba el efecto de los tratamientos, se observaron diferencias cuantitativas, mostrando la heterogeneidad experimental previamente reportada como una de las debilidades de este método.

La no implementación de otros métodos se debió a su alto costo, accesibilidad (fundamentalmente por no ser comercializados en nuestro país como Calgary), y a su elevada demanda para ser implementados en un número relativamente grande de aislamientos.

Teniendo en cuenta las limitaciones metodológicas y que se trabajó con aislamientos MDR, así como el desafío que supone *P. aeruginosa* como patógeno productor de biofilms, será necesaria la implementación de métodos complementarios que permitan comprender mejor los resultados obtenidos y el rol de las drogas estudiadas sobre los biofilms de esta especie.

CONCLUSIONES

En este estudio se abordaron diferentes aspectos de la resistencia a carbapenems en bacilos Gram negativos. Estos incluyen la diseminación y emergencia carbapenemasas y otros mecanismos de resistencia asociados, su diagnóstico, y los desafíos asociados a su tratamiento, particularmente relacionados a la formación de biofilms.

Se destaca que en la colección estudiada se hallaron clones de alto riesgo o linajes relacionados a ellos. En el caso de *P. aeruginosa* estos clones fueron vinculados tanto a aislamientos puntuales como a la producción de un brote hospitalario como fue el caso de ST309. Sin embargo, la diseminación de *bla*_{VIM-2}, que es la carbapenemasa más frecuente en Uruguay asociada a esta especie, no se relacionó con este tipo de clones, en contraste también con lo descrito en Sudamérica y otras regiones.

Si bien el objetivo principal se encontraba centrado en microorganismos productores de carbapenemasas, en el transcurso del trabajo surgieron dos brotes intrahospitalarios por *P. aeruginosa* MDR no productores de carbapenemasas sino de BLEEs como GES-1 y PER-1, que igualmente fueron incluidos por su relevancia epidemiológica y por tratarse de mecanismos emergentes. En el caso particular de los productores de PER-1, no solo se trató de un clon de alto riesgo, sino que también se asoció a resistencia a nuevas combinaciones como ceftazidime-avibactam y ceftolozane-tazobactam. La circulación de este tipo de aislamientos en un escenario con predominancia de *bla*_{VIM-2}, no solo agrega dificultades para el abordaje terapéutico de las infecciones que ocasionan, sino que también pueden favorecer eventos de diseminación horizontal de genes y su incorporación a plataformas de multi-resistencia como las descritas en este trabajo.

Además, los aislamientos con diferentes carbapenemasas o BLEE fueron capaces de formar biofilms, los cuales pueden jugar un importante rol en la permanencia de *P. aeruginosa* MDR/XDR en reservorios ambientales y en su diseminación nosocomial, así como dificultar su tratamiento.

Por otro lado, los *Enterobacteriales* estudiados fueron productores principalmente de NDM-1, en concordancia con los reportes de vigilancia nacional que indican una predominancia de esta carbapenemasa en dicho grupo bacteriano. La producción de NDM no solo se asocia a cepas MDR/XDR, la coproducción de BLEE y de determinantes de resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, sino que también confiere resistencia a ceftazidime-avibactam, una de las últimas alternativas terapéuticas para el tratamiento de microorganismos productores de carbapenemasas, con excepción de MBL. Sin embargo, este agente demostró ser efectivo *in vitro* al combinarse con aztreonam, un β -lactámico que no puede ser hidrolizado por las MBL. Este efecto sinérgico se demostró también en aislamientos productores de otras carbapenemasas como KPC-2, KPC-3, OXA-48 y VIM-2. Estos resultados son alentadores, dado que los β -lactámicos son una mejor opción terapéutica que otras alternativas como colistina, tigeciclina o aminoglucósidos, debido a sus menores efectos adversos y mejores parámetros PK/PD.

En la institución estudiada, la diseminación de *bla*_{NDM-1} se debió probablemente a diferentes eventos, incluyendo la transferencia horizontal (intercelular) de un plásmido exitoso de tipo IncC, la movilización intracelular de un transposón compuesto que puede haber sido incorporado a diferentes tipos de plásmidos, y la asociación del gen con elementos genéticos como *ISCR1* y su consecuente incorporación a otros tipos de plataformas genéticas de multi-resistencia. Asimismo, en un período posterior se registró una diseminación clonal por *K. pneumoniae* ST661, coexistiendo con otras especies productoras de NDM-1. Resultados de estudios con aislamientos posteriores y obtenidos con herramientas genómicas revelarán si todos estos mecanismos siguieron siendo los responsables de la diseminación y permanencia de *bla*_{NDM-1} en el Hospital Universitario.

Se destaca además el hallazgo de estructuras en común entre aislamientos de *P. aeruginosa* y *Enterobacterales* provenientes de la misma institución, como el gen de resistencia a quinolonas *qnrVC6* incorporado en integrones de clase 1 y asociado a *ISCR1*, o el gen de resistencia a aminoglucósidos *aphA6* asociado a *ISAbA125*. Más estudios serán necesarios para comprender la dinámica de movilización de estos genes y si éstas comparten vías entre ambos grupos bacterianos.

Desde el punto de vista diagnóstico, se logró poner a punto dos metodologías rápidas para la detección de carbapenemasas con una perspectiva traslacional de aplicación a la realidad de los laboratorios locales. En los últimos años, los laboratorios clínicos han adquirido equipamientos como espectrómetro de masas MALDI-TOF para identificación bacteriana, o termocicladores para PCR en tiempo real con diversas aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, los cuales se popularizaron más en el contexto de la pandemia por COVID-19. La posibilidad de utilizar este tipo de tecnologías permitiría sacar mayor provecho de los recursos disponibles y reducir costos, sobre todo teniendo en cuenta que pueden realizarse con protocolos caseros y reactivos genéricos, en lugar de kits comerciales que en general son de mayor costo.

Sin embargo, desde un punto de vista práctico, el traslado de estos métodos no está exento de desafíos, sobre todo relacionados a la falta de estandarización y a la necesidad de personal entrenado en el uso de estas tecnologías.

El estudio de la actividad de diferentes antibióticos sobre biofilms establecidos, mostró escasa o ninguna capacidad de erradicación. Esto puede deberse a diversas razones, no excluyentes entre ellas. Por un lado, la acción de mecanismos de tolerancia en conjunción con los mecanismos de resistencia de los aislamientos estudiados. Por otro lado, el modelo de estudio no permite determinar viabilidad celular de las bacterias en biofilm, por lo que la estimación de la biomasa no necesariamente es un indicador de microorganismos vivos.

Además, se observaron diferencias con otros trabajos que sí reportaron actividad antibiofilm, tanto de antibióticos como de otros compuestos como derivados de fenoles y amonios cuaternarios, incluso a concentraciones subinhibitorias. Esto pudo deberse que la mayoría de los reportes estudiaron la capacidad de inhibición de la formación de biofilms, mientras que en este caso se estudió el efecto sobre los biofilms ya establecido, lo que implica un mayor inóculo bacteriano de partida y la acción de otros mecanismos de tolerancia diferentes a los que se activan en las primeras etapas de formación. Asimismo, en contraste con este trabajo, la mayoría de los estudios de antimicrobianos sobre biofilms se han realizado en aislamientos sensibles, entre ellos las cepas de referencia PAO1 y ATCC 27853.

Dentro de los antibióticos estudiados, rifampicina fue el que mostró capacidad de disminución de la biomasa de los biofilms tanto solo como en combinación. Sin embargo, se encontraron diferencias de este efecto entre aislamientos individuales, así como en relación al efecto sobre crecimiento planctónico. Será necesario estudiar en mayor profundidad el rol de este antibiótico como erradicador de biofilms, así como su interacción con otros agentes.

PERSPECTIVAS

Con los métodos incorporados y la experiencia adquirida durante el transcurso de este trabajo, se espera continuar el trabajo de apoyo diagnóstico a las instituciones de salud vinculadas al grupo de trabajo, así como seguir aportando datos a la epidemiología local. En particular, se espera optimizar las metodologías de diagnóstico de carbapenemasas para su futura aplicación en otros laboratorios diagnósticos y de vigilancia. Asimismo, se espera continuar con la identificación de plataformas genéticas que implicados en la diseminación de mecanismos de resistencia relevantes para el ámbito local.

Por otro lado, se tiene previsto el desarrollo de dos nuevas líneas de investigación. Una de ellas vinculada al desarrollo de estrategias basadas en CRISPR-Cas para la inactivación de genes codificantes de carbapenemasas. Además, se pretende comenzar con el estudio de la terapia con fagos sobre bacilos Gram negativos multidrogo resistentes tanto en crecimiento planctónico como en biofilms.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629–55. DOI: 10.1016/s0140-6736(21)02724-0.
2. Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*. 2013 Mar 11;346(mar11 3):f1493–f1493. DOI: 10.1136/bmj.f1493.
3. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013 Dec;13(12):1057–98. DOI: 10.1016/s1473-3099(13)70318-9.
4. Pan American Health Organization. Antimicrobial Resistance, Fueled by the COVID-19 Pandemic. Policy Brief November 2021. 2022;(11):1–14. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55864>.
5. OMS. Plan de acción sobre la resistencia a los antimicrobianos. 2015;1–4. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/253721>.
6. Pan American Health Organization. Plan of action on antimicrobial resistance: Final report [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.paho.org/en/documents/cd59inf10-plan-action-antimicrobial-resistance-final-report>.
7. Coque TM, Cantón R, Pérez-Cobas AE, Fernández-de-Bobadilla MD, Baquero F. Antimicrobial Resistance in the Global Health Network: Known Unknowns and Challenges for Efficient Responses in the 21st Century. *Microorganisms*. 2023;11(4). DOI: 10.3390/microorganisms11041050.
8. Tacconelli E, Magrini N, Carmeli Y, Harbath S, Kahlmeter G, Kluytmans J, et al. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics. 2017; Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/who-ppl-short_summary_25feb-et_nm_who.pdf%0ahttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309909702221.
9. Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(March):1–19. DOI: 10.3389/fcimb.2022.823684.
10. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Oct;62(10). DOI: 10.1128/aac.01076-18.
11. Lee YL, Chen HM, Hii IM, Hsueh PR. Carbapenemase-producing *Enterobacterales* infections: recent advances in diagnosis and treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;59(2):106528. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106528.
12. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11):1–13. DOI: 10.1128/jcm.01140-18.
13. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S521–8. DOI: 10.1093/cid/ciz824.
14. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of multidrug-resistant *Enterobacterales*—from ESBLs to carbapenemases. *Antibiotics*. 2021;10(9):1–27. DOI: 10.3390/antibiotics10091140.
15. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 1):S28–36. DOI: 10.1093/infdis/jiw282.
16. Ma J, Song X, Li M, Yu Z, Cheng W, Yu Z, et al. Global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiol Res*. 2023;266(November 2022):127249. DOI: 10.1016/j.micres.2022.127249.
17. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(10):621–35. DOI: 10.1038/s41579-022-00682-4.
18. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(S1):S1–25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.
19. Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Aalink R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. Vol. 11, *Microorganisms*. 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11061614.
20. Damyanova T, Dimitrova PD, Borisova D, Topouzova-Hristova T, Haladjova E, Paunova-Krasteva T. An Overview of Biofilm-Associated Infections and the Role of Phytochemicals and Nanomaterials in Their Control and Prevention. *Pharmaceutics*. 2024;16(2). DOI: 10.3390/pharmaceutics16020162.
21. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance chaired by Jim O'Neill [Internet]. 2016. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_final_paper_with_cover.pdf.
22. Ikuta KS, Swetschinski LR, Aguilar GR, Sharara F, Mestrovic T, Gray AP, et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2022;400(10369):2221–48. DOI: 10.1016/s0140-6736(22)02185-7.
23. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008 Apr 15;197(8):1079–81. DOI: 10.1086/533452.
24. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant Bacteria: an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for

- Acquired Resistance. *Microbiology*. 2011;18(3):268–81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
25. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current*. 2013;114. DOI: cs239559-b.
 26. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):565–91. DOI: 10.1128/cmr.00116-14.
 27. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S565–75. DOI: 10.1093/cid/ciz830.
 28. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, Bešli Y, Bogaerts P, Cantón R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. *Clin Microbiol Infect*. 2024;30(4):469–80. DOI: 10.1016/j.cmi.2023.12.026.
 29. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(6). DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106196.
 30. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(FEB). DOI: 10.3389/fcimb.2017.00039.
 31. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):1–27. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1.
 32. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing *Enterobacterales* (ESBL-E), Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P). *Clin Infect Dis*. 2022;75(2):187–212. DOI: 10.1093/cid/ciac268.
 33. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44(July):100640. DOI: 10.1016/j.drup.2019.07.002.
 34. Azam MW, Zarrilli R, Khan AU. Updates on the Virulence Factors Produced by Multidrug-Resistant *Enterobacterales* and Strategies to Control Their Infections. *Microorganisms*. 2023 Jul 27;11(8):1901. DOI: 10.3390/microorganisms11081901.
 35. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Jun 17;33(3). DOI: 10.1128/cmr.00181-19.
 36. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Jan 22;8. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004.
 37. Gonzalez-Ferrer S, Peñalosa HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, et al. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Ottemann KM, editor. *Infect Immun*. 2021 Mar 17;89(4). DOI: 10.1128/iai.00693-20.
 38. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Sep;80(3):629–61. DOI: 10.1128/mmb.00078-15.
 39. Ma CY, Shi GY, Shi CS, Kao YC, Lin SW, Wu HL. Monocytic Thrombomodulin Triggers LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced Inflammatory Response. *J Immunol*. 2012 Jun 15;188(12):6328–37. DOI: 10.4049/jimmunol.1102266.
 40. Davin-Regli A, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*. 2015 May 18;6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00392.
 41. Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Emergence and Dissemination of Extraintestinal Pathogenic High-Risk International Clones of *Escherichia coli*. *Life*. 2022 Dec 10;12(12):2077. DOI: 10.3390/life12122077.
 42. Donnenberg M. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
 43. Laupland KB, Pasquill K, Steele L, Parfitt EC. Population-based study of *Morganella-Proteus-Providencia* group bloodstream infections. *J Assoc Med Microbiol Infect Dis Canada*. 2023 Sep 18;8(2):134–40. DOI: 10.3138/jammi-2022-0038.
 44. Drzewiecka D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol*. 2016 Nov 9;72(4):741–58. DOI: 10.1007/s00248-015-0720-6.
 45. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015 May 8;13(5):269–84. DOI: 10.1038/nrmicro3432.
 46. Liu H, Zhu J, Hu Q, Rao X. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *Int J Infect Dis*. 2016 Sep;50:10–7. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.07.006.
 47. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*. 2019;431(18):3472–500. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
 48. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Aug;6(8):a025247. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.

49. Jiao Y, Moya B, Chen MJ, Zavascki AP, Tsai H, Tao X, et al. Comparable Efficacy and Better Safety of Double β -Lactam Combination Therapy versus β -Lactam plus Aminoglycoside in Gram-Negative Bacteria in Randomized, Controlled Trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Jul;63(7). DOI: 10.1128/aac.00425-19.
50. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):1–37. DOI: 10.1128/cmr.00047-19.
51. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care.* 2020;8(1):1–13. DOI: 10.1186/s40560-020-0429-6.
52. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):149–67. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
53. Egan AJF, Errington J, Vollmer W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(8):446–60. DOI: 10.1038/s41579-020-0366-3.
54. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Feb 28;10(2):123–36. DOI: 10.1038/nrmicro2677.
55. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00128.
56. Lewis J, Bush K. Antimicrobial Agents. In: Jorgensen J, Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology.* 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 1171–211.
57. Bahr G, González LJ, Vila AJ. Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design. *Chem Rev.* 2021;121(13):7957–8094. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00138.
58. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Front Public Heal.* 2019;7(JUN):1–25. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00151.
59. Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(5):295–306. DOI: 10.1038/s41579-019-0159-8.
60. Butler MS, Henderson IR, Capon RJ, Blaskovich MAT. Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. *J Antibiot (Tokyo).* 2023;76(8):431–73. DOI: 10.1038/s41429-023-00629-8.
61. Tamma PD, Munita JM. The metallo- β -lactamases strike back: emergence of taniborbactam escape variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024;68(2):e0151023. DOI: 10.1128/aac.01510-23.
62. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 34th Edition.* CLSI supplement M100. PA: Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute. 2024.
63. EUCAST. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0 [Internet].* 2024. Disponible en: <http://www.eucast.org/>.
64. Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(5):280–95. DOI: 10.1038/s41579-022-00820-y.
65. Patel JB, Richter SS. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Jorgensen J, Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology.* 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 1212–45.
66. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322–32. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
67. Ambler R. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321–31. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049.
68. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–76. DOI: 10.1128/aac.01009-09.
69. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):1–61. DOI: 10.1128/cmr.00088-17.
70. Yoon EJ, Jeong SH. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2021;12(February). DOI: 10.3389/fmicb.2021.614058.
71. Ding L, Shen S, Chen J, Tian Z, Shi Q, Han R, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase variants: the new threat to global public health. *Clin Microbiol Rev.* 2023;36(4). DOI: 10.1128/cmr.00008-23.
72. Hobson CA, Pierrat G, Tenaillon O, Bonacorsi S, Bercot B, Jaouen E, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(9):1–18. DOI: 10.1128/aac.00447-22.
73. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(3):277–97. DOI: 10.1080/14787210.2017.1268918.
74. Cejas D, Elena A, Guevara Nuñez D, Sevillano Platero P, De Paulis A, Magariños F, et al. Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Sep;18:238–42. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.06.005.
75. García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19(2):197–213. DOI:

- 10.1080/14787210.2020.1813023.
76. Marquez C, Ingold A, Echevarría N, Acevedo A, Vignoli R, García-Fulgueiras V, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: Infection control and molecular characterization. *New Microbes New Infect.* 2014;2(3):58–63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/nmi2.40>.
 77. Acosta-España JD, Satán Salazar C, Suaste K, Luna C, Rodríguez-Morales AJ. Unmasking carbapenemases molecular patterns in Ecuador: An analysis of Gram-negative bacteria, 2014–2022. *New Microbes New Infect.* 2024 Jan;56:101211. DOI: 10.1016/j.nmni.2023.101211.
 78. Salvador-Luján G, Ramírez-Illescas J, Delgado-Flores M, Núñez-Llanos A, Mayta-Barrios M. Primer reporte de carbapenemasa tipo KPC en *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2021 Aug 11;38(3):474–5. DOI: 10.17843/rpmesp.2021.383.7044.
 79. Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, et al. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Front Microbiol.* 2021 Mar 2;12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.635871.
 80. Nicola F, Cejas D, González-Espinosa F, Relloso S, Herrera F, Bonvehí P, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Resistant To Ceftazidime-Avibactam Producing KPC-31 and the Novel Variant KPC-115 during COVID-19 Pandemic in Argentina. Rosato AE, editor. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21;10(6). DOI: 10.1128/spectrum.03733-22.
 81. Faccone D, de Mendieta JM, Albornoz E, Chavez M, Genero F, Echegorry M, et al. Emergence of KPC-31, a KPC-3 Variant Associated with Ceftazidime-Avibactam Resistance, in an Extensively Drug-Resistant ST235 *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Nov 15;66(11). DOI: 10.1128/aac.00648-22.
 82. Martins WMBS, Martins ER, de Andrade LK, Farzana R, Walsh TR, Toleman MA, et al. BKC-2, a New BKC Variant Detected in MCR-9.1-Producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Feb 17;65(3). DOI: 10.1128/aac.01193-20.
 83. Franco R, de Oliveira Santos IC, Mora MFM, López PVA, Alvarez VET, Arce FHO, et al. Genotypic characterization and clonal relatedness of metallo- β -lactamase-producing non-fermentative gram negative bacteria in the first 5 years of their circulation in Paraguay (2011-2015). *Brazilian J Microbiol.* 2023 Mar 24;54(1):179–90. DOI: 10.1007/s42770-022-00888-x.
 84. Papa-Ezdra R, Bado I, Cordeiro N, Gutierrez C, Hitateguy P, Seija V, et al. VIM-2-Producing *Pseudomonas* spp. in Uruguay: Sequence Types, Pulsotypes, and Class 1 Integrons Including New Variable Regions Featuring blaVIM-2 and blaGES-7. 2016;60(9):5620–2. DOI: 10.1128/aac.00388-16.
 85. Opazo-Capurro A, Morales-León F, Jerez C, Olivares-Pacheco J, Alcalde-Rico M, González-Muñoz P, et al. Isolation of an Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* exoS + /O4 Strain Belonging to the “High-Risk” Clone ST654 and Coproducer of NDM-1 and the Novel VIM-80. Vignoli R, editor. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct 26;10(5). DOI: 10.1128/spectrum.01439-22.
 86. Seija V, Medina Presentado JC, Bado I, Papa Ezdra R, Batista N, Gutierrez C, et al. Sepsis caused by New Delhi metallo- β -lactamase bla_{NDM-1} and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomicin and meropenem: Case report and literature review. *Int J Infect Dis.* 2015;30:20–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.09.010.
 87. Faccone D, Gomez SA, de Mendieta JM, Sanz MB, Echegorry M, Albornoz E, et al. Emergence of Hyper-Epidemic Clones of *Enterobacteriales* Clinical Isolates Co-Producing KPC and Metallo-Beta-Lactamases during the COVID-19 Pandemic. *Pathogens.* 2023 Mar 18;12(3):479. DOI: 10.3390/pathogens12030479.
 88. Rodrigues YC, Lobato ARF, Quaresma AJPG, Guerra LMGD, Brasiliense DM. The Spread of NDM-1 and NDM-7-Producing *Klebsiella pneumoniae* Is Driven by Multiclonal Expansion of High-Risk Clones in Healthcare Institutions in the State of Pará, Brazilian Amazon Region. *Antibiotics.* 2021 Dec 14;10(12):1527. DOI: 10.3390/antibiotics10121527.
 89. Veloso M, Arros P, Acosta J, Rojas R, Berríos-Pastén C, Varas M, et al. Antimicrobial resistance, pathogenic potential, and genomic features of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in Chile: high-risk ST25 clones and novel mobile elements. Lincopan N, editor. *Microbiol Spectr.* 2023 Oct 17;11(5). DOI: 10.1128/spectrum.00399-23.
 90. Saavedra SY, Bernal JF, Montilla-Escudero E, Arévalo SA, Prada DA, Valencia MF, et al. Complexity of Genomic Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Colombia Urges the Reinforcement of Whole Genome Sequencing-Based Surveillance Programs. *Clin Infect Dis.* 2021 Dec 1;73(Supplement_4):S290–9. DOI: 10.1093/cid/ciab777.
 91. Wozniak A, Rodríguez N, Alcalde-Rico M, Castillo C, García P. Primer aislado de *Pseudomonas aeruginosa* productora de Sao Paulo metalo-beta-lactamasa (SPM-1) en un paciente chileno. *Rev Chil infectología.* 2021 Oct;38(5):724–6. DOI: 10.4067/s0716-10182021000500724.
 92. Qin Y, Peng Y, Duan X, Song Z, Huang R, Rui Y. Characterization of bla_{AFM-1}-positive carbapenem-resistant strains isolated in Guangzhou, China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2023 May 17;22(1):40. DOI: 10.1186/s12941-023-00592-0.
 93. Dabos L, Rodríguez CH, Nastro M, Dortet L, Bonnin RA, Famiglietti A, et al. LMB-1 producing *Citrobacter freundii* from Argentina, a novel player in the field of MBLs. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 Feb;55(2):105857. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.11.014.
 94. Boyd SE, Holmes A, Peck R, Livermore DM, Hope W. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment

- Options, and Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Aug 16;66(8):1–25. DOI: 10.1128/aac.00216-22.
95. Araújo Pérez L, Ávila P, García Fulgueiras V, Papa-Ezdra R, Mota M, López M, et al. First Report of Plasmidic OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay (poster). In: ASM Microbe. 2020.
 96. Salazar C, Antelo V, Vieytes M, Dávila C, Grill F, Galiana A, et al. First detection and origin of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 harboring OXA-48 in South America. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022 Sep;30:480–4. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.08.005.
 97. Villanueva-Cotrina F, Condori DM, Gomez TO, Yactayo KM, Barron-Pastor H. First Isolates of OXA-48-Like Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in A Specialized Cancer Center. *Infect Chemother.* 2022;54(4):765. DOI: 10.3947/ic.2022.0135.
 98. Cuicapuza D, Alvarado L, Tocasca N, Aguilar D, Gómez-de-la-Torre JC, Salvatierra G, et al. First Report of OXA-181-Producing *Enterobacterales* Isolates in Latin America. Papp-Wallace KM, editor. *Microbiol Spectr.* 2023 Jun 15;11(3). DOI: 10.1128/spectrum.04584-22.
 99. Santos Tufic-Garutti S Dos, de Araújo Longo LG, Fontana H, Garutti LHG, de Carvalho Girão VB, Fuga B, et al. OXA-181 carbapenemase carried on an IncX3 plasmid in high-risk *Escherichia coli* ST167 isolated from a traveler returning from Sub-Saharan Africa to Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2022 Jan;102(1):115570. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115570.
 100. De Belder D, Ghiglione B, Pasteran F, de Mendieta JM, Corso A, Curto L, et al. Comparative Kinetic Analysis of OXA-438 with Related OXA-48-Type Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamases. *ACS Infect Dis.* 2020 Nov 13;6(11):3026–33. DOI: 10.1021/acscinfecdis.0c00537.
 101. Garcia JF, Nastro M, Dabos L, Campos J, Traglia G, Ocampo CV, et al. Molecular and Phenotypic Characterization of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Coproducing OXA-232 and MCR - 1.1 in Argentina. *Microb Drug Resist.* 2022 May 1;28(5):511–6. DOI: 10.1089/mdr.2021.0167.
 102. Bado I, Papa-Ezdra R, Delgado-Blas JF, Gaudio M, Gutiérrez C, Cordeiro NF, et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First *rmtC* Gene in the Species. *Microb Drug Resist.* 2018;24(7):1012–9. DOI: 10.1089/mdr.2017.0300.
 103. Romero Thomas G, Corso A, Pasterán F, Shal J, Sosa A, Pilonetto M, et al. Increased Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(11):E1–8. DOI: 10.3201/eid2811.220415.
 104. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Mobile DNA. *Molecular Biology.* 2019. 793–829 p. DOI: 10.1016/b978-0-12-813288-3.00025-2.
 105. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):820–55. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.
 106. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):912–35. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x.
 107. Nicolas E, Lambin M, Dandoy D, Galloy C, Nguyen N, Oger CA, et al. The Tn3-family of replicative transposons. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4):MDNA3-0060–2014. DOI: 10.1128/9781555819217.ch32.
 108. Richard E, Darracq B, Loot C, Mazel D. Unbridled Integrons: A Matter of Host Factors. *Cells.* 2022;11(6):1–22. DOI: 10.3390/cells11060925.
 109. Brovedan MA, Marchiaro PM, Díaz MS, Faccione D, Corso A, Pasteran F, et al. *Pseudomonas putida* group species as reservoirs of mobilizable Tn402-like class 1 integrons carrying *bla*_{VIM-2} metallo- β -lactamase genes. *Infect Genet Evol.* 2021;96(October):105131. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.105131.
 110. Quiroga MP, Arduino SM, Merkier AK, Quiroga C, Petroni A, Roy PH, et al. Distribution and functional identification of complex class 1 integrons. *Infect Genet Evol.* 2013 Oct;19:88–96. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.029.
 111. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Plasmids. In: *Molecular Biology.* Elsevier; 2019. p. 712–48. DOI: 10.1016/b978-0-12-813288-3.00023-9.
 112. Zhou G, Wang Q, Wang Y, Wen X, Peng H, Peng R, et al. Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms.* 2023;11(7). DOI: 10.3390/microorganisms11071690.
 113. Glen KA, Lamont IL. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens.* 2021;10(12). DOI: 10.3390/pathogens10121638.
 114. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics.* 2021;10(1):1–29. DOI: 10.3390/antibiotics10010042.
 115. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 20th Edition. CLSI supplement M100. PA: Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010.
 116. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 33rd Edition. CLSI supplement M100. PA: Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute. 2023.
 117. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th Edition. CLSI supplement M100. PA: Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.

118. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—twelfth edition. CLSI document M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2015.
119. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 27th Edition. CLSI supplement M100. PA: Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.
120. EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0 [Internet]. Giske CG, editor. EUCAST; 2017. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/pdfs/eucast_files/resistance_mechanisms/eucast_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf.
121. Norizuki C, Wachino JI, Jin W, Kimura K, Kawamura K, Nagano N, et al. Practical Agar-Based Disk Diffusion Tests Using Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids for Identification of Subclass B1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriales*. *J Clin Microbiol*. 2021;59(10):1–9. DOI: 10.1128/jcm.00761-21.
122. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(2):99–109. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.07.006.
123. Van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, 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):345–9. DOI: 10.1111/1469-0691.12322.
124. Pasteran F, Veliz O, Faccone D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T, et al. A simple test for the detection of KPC and metallo- β -lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Sep;17(9):1438–41. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03585.x.
125. Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Infect Chemother*. 2017 Jan;23(1):1–11. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.09.008.
126. Jonas D, Reuter S, Klassen S, Weber S, Buck M, Giani T, et al. Evaluation of the BD Phoenix CPO detect panel for prediction of Ambler class carbapenemases. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–9. DOI: 10.1038/s41598-021-92336-3.
127. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.
128. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. Ledebor NA, editor. *J Clin Microbiol*. 2017 Aug;55(8):2321–33. DOI: 10.1128/jcm.00193-17.
129. Simner PJ, Kristie Johnson J, Brasso WB, Anderson K, Lonsway DR, Pierce VM, et al. Multicenter evaluation of the modified carbapenem inactivation method and the carba NP for detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(1):1–10. DOI: 10.1128/jcm.01369-17.
130. Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method: A phenotypic method for detecting metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2019;57(5):1–9. DOI: 10.1128/jcm.01757-18.
131. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* –an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11(1):811–4. DOI: 10.1080/22221751.2022.2048972.
132. Howard JC, Creighton J, Ikram R, Werno AM. Comparison of the performance of three variations of the Carbapenem Inactivation Method (CIM, modified CIM [mCIM] and in-house method (iCIM)) for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriales* and non-fermenters. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;21:78–82. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.03.021.
133. Soria Segarra C, Larrea Vera G, Berrezueta Jara M, Arévalo Mendez M, Cujilema P, Serrano Lino M, et al. Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *New Microbes New Infect*. 2018;26:42–8. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.08.005.
134. Garcia-Quintanilla M, Poirel L, Nordmann P. CHROMagar mSuperCARBA and RAPIDEC® Carba NP test for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Feb;90(2):77–80. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.009.
135. Cunningham SA, Limbago B, Traczewski M, Anderson K, Hackel M, Hindler J, et al. Multicenter performance assessment of Carba NP test. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1954–60. DOI: 10.1128/jcm.00244-17.
136. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol*. 2015 Dec;53(12):3908–11. DOI: 10.1128/jcm.02032-15.
137. Mancini S, Kieffer N, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP and β -CARBA® tests for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;88(4):293–7. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.006.
138. Nordmann P, Sadek M, Demord A, Poirel L. NitroSpeed-Carba NP Test for Rapid Detection and Differentiation

- between Different Classes of Carbapenemases in *Enterobacterales*. *J Clin Microbiol*. 2020;58(9):1–8. DOI: 10.1128/jcm.00932-20.
139. Sadek M, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. using the NitroSpeed-Carba NP test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;99(3):115280. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115280.
 140. Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3222–7. DOI: 10.1128/jcm.00984-11.
 141. Hrabák J, Študentová V, Walková R, Žemličková H, Jakubů V, Chudáčková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50(7):2441–3. DOI: 10.1128/jcm.01002-12.
 142. Hrabák J. Detection of carbapenemases using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) meropenem hydrolysis assay. *Methods Mol Biol*. 2015;1237:91–6. DOI: 10.1007/978-1-4939-1776-1_9.
 143. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):927–37. DOI: 10.1128/jcm.05737-11.
 144. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3321–4. DOI: 10.1128/jcm.00287-11.
 145. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0031676.
 146. Lasserre C, De Martin L Saint, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al. Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2163–71. DOI: 10.1128/jcm.03467-14.
 147. Neonakis IK, Spandidos DA. Detection of carbapenemase producers by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; DOI: 10.1007/s10096-019-03620-0.
 148. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol*. 2015;53(5):1731–5. DOI: 10.1128/jcm.03094-14.
 149. Dortet L, Tandé D, De Briel D, Bernabeu S, Lasserre C, Gregorowicz G, et al. MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Comparison of the commercialized MBT STAR® -carba IVD kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC® CARBA NP. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(9):2352–9. DOI: 10.1093/jac/dky209.
 150. Cordovana M, Abdalla M, Ambretti S. Evaluation of the MBT STAR-Carba Assay for the Detection of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* and Hafniaceae with a Large Collection of Routine Isolates from Plate Cultures and Patient-Derived Positive Blood Cultures. *Microb Drug Resist*. 2020;26(11):1298–306. DOI: 10.1089/mdr.2019.0466.
 151. Figueroa-Espinosa R, Costa A, Cejas D, Barrios R, Vay C, Radice M, et al. MALDI-TOF MS based procedure to detect KPC-2 directly from positive blood culture bottles and colonies. *J Microbiol Methods*. 2019;159:120–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.02.020.
 152. Boutal H, Moguet C, Pommiès L, Simon S, Naas T, Volland H. The Revolution of Lateral Flow Assay in the Field of AMR Detection. *Diagnostics*. 2022;12(7):1–26. DOI: 10.3390/diagnostics12071744.
 153. Bernabeu S, Bonnin RA, Dortet L. Comparison of three lateral flow immunochromatographic assays for the rapid detection of KPC, NDM, IMP, VIM and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacterales*. *J Antimicrob Chemother*. 2022 Oct 28;77(11):3198–205. DOI: 10.1093/jac/dkac303.
 154. Bernabeu S, Bonnin RA, Dortet L. Comment on: Comparison of three lateral flow immunochromatographic assays for the rapid detection of KPC, NDM, IMP, VIM and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacterales*. *J Antimicrob Chemother*. 2023 Jan 5;78(1):314–7. DOI: 10.1093/jac/dkac381.
 155. Mendez-Sotelo BJ, López-Jácome LE, Colín-Castro CA, Hernández-Durán M, Martínez-Zavaleta MG, Rivera-Buendía F, et al. Comparison of Lateral Flow Immunochromatography and Phenotypic Assays to PCR for the Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria, a Multicenter Experience in Mexico. *Antibiotics*. 2023 Jan 6;12(1):96. DOI: 10.3390/antibiotics12010096.
 156. Gu D, Yan Z, Cai C, Li J, Zhang Y, Wu Y, et al. Comparison of the NG-Test Carba 5, Colloidal Gold Immunoassay (CGI) Test, and Xpert Carba-R for the Rapid Detection of Carbapenemases in Carbapenemase-Producing Organisms. *Antibiotics*. 2023 Feb 2;12(2):300. DOI: 10.3390/antibiotics12020300.
 157. Mertins S, Higgins PG, Thunissen C, Magein H, Gillemans Q, Mertens P, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow assay to rapidly detect OXA-23-, OXA-40-, OXA-58- and NDM-mediated

- carbapenem resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol*. 2023 Apr 12;72(4). DOI: 10.1099/jmm.0.001681.
158. Mancini S, Seth-Smith HMB, Kolesnik-Goldmann N, Hinic V, Roloff T, Imkamp F, et al. Evaluation of the RESIST ACINETO multiplex immunochromatographic assay for detection of OXA-23-like, OXA-40/58-like and NDM carbapenemase production in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2023 Nov 6;78(11):2771–4. DOI: 10.1093/jac/dkad253.
 159. Gonzalez C, Volland H, Oueslati S, Niol L, Legrand C, Francius L, et al. Evaluation of a new rapid immunochromatographic assay for the detection of GES-producing Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2023 May 3;78(5):1282–7. DOI: 10.1093/jac/dkad090.
 160. Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in *Enterobacterales* and Its Detection Techniques. *Microorganisms*. 2023;11(6):1–26. DOI: 10.3390/microorganisms11061491.
 161. Poirel L, Walsh TR, Cu villier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119–23. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
 162. Ellington MJ, Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Alvarez-Buylla A, Horner C, et al. Multicentre evaluation of a real-time PCR assay to detect genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Feb;47(2):151–4. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.11.013.
 163. Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P, Ghebremedhin B. Comparison of in-house and commercial real time-PCR based carbapenemase gene detection methods in *Enterobacteriaceae* and non-fermenting gram-negative bacterial isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017 Dec 10;16(1):48. DOI: 10.1186/s12941-017-0223-z.
 164. Yoshioka N, Hagiya H, Deguchi M, Hamaguchi S, Kagita M, Nishi I, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay for Six Major Carbapenemase Genes. *Pathogens*. 2021 Mar 1;10(3):276. DOI: 10.3390/pathogens10030276.
 165. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):906–9. DOI: 10.1093/jac/dkr563.
 166. Hofko M, Mischnik A, Kaase M, Zimmermann S, Dalpke AH. Detection of Carbapenemases by Real-Time PCR and Melt Curve Analysis on the BD Max System. Patel R, editor. *J Clin Microbiol*. 2014 May;52(5):1701–4. DOI: 10.1128/jcm.00373-14.
 167. Edwards T, Williams C, Teethaisong Y, Sealey J, Sasaki S, Hobbs G, et al. A highly multiplexed melt-curve assay for detecting the most prevalent carbapenemase, ESBL, and AmpC genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Aug;97(4):115076. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115076.
 168. Boolchandani M, D'Souza AW, Dantas G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nat Rev Genet*. 2019 Mar 18; DOI: 10.1038/s41576-019-0108-4.
 169. Ronholm J, Nasheri N, Petronella N, Pagotto F. Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Oct;29(4):837–57. DOI: 10.1128/cmr.00056-16.
 170. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(10):608–20. DOI: 10.1038/s41579-022-00767-0.
 171. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *J Bacteriol*. 2002 Feb 15;184(4):1140–54. DOI: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
 172. Ha DG, O'Toole GA. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: A *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microb Biofilms*. 2015;301–17. DOI: 10.1128/9781555817466.ch15.
 173. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. Ghannoum M, Parsek M, Whiteley M, Mukherjee P, editors. *Microbiol Spectr*. 2015 Apr 2;3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014.
 174. Stewart PS, White B, Boegli L, Hamerly T, Williamson KS, Franklin MJ, et al. Conceptual model of biofilm antibiotic tolerance that integrates phenomena of diffusion, metabolism, gene expression, and physiology. *J Bacteriol*. 2019;201(22):1–24. DOI: 10.1128/jb.00307-19.
 175. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front Microbiol*. 2019;10(MAY). DOI: 10.3389/fmicb.2019.00913.
 176. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(8):453–64. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42.
 177. Grooters KE, Ku JC, Richter DM, Krinock MJ, Minor A, Li P, et al. Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14(January):1–7. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1352273.
 178. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *Apmis*. 2017;125(4):304–19. DOI: 10.1111/apm.12673.
 179. Bari AK, Belalekar TS, Poojary A, Rohra S. Combination drug strategies for biofilm eradication using synthetic and natural agents in KAPE pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13(April):1–7. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1155699.
 180. Ribeiro SM, Felício MR, Boas EV, Gonçalves S, Costa FF, Samy RP, et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther*. 2016;160:133–44. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.02.006.
 181. Wang X, Wang L, Fekrazad R, Zhang L, Jiang X, He G, et al. Polyphenolic natural products as photosensitizers for

- antimicrobial photodynamic therapy: recent advances and future prospects. *Front Immunol*. 2023;14(October). DOI: 10.3389/fimmu.2023.1275859.
182. Garcia-Fulgueiras V, Zapata Y, Papa-Ezdra R, Ávila P, Caiata L, Seija V, et al. First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. 2020;52(3):211–6. DOI: 10.1016/j.ram.2019.10.003.
 183. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 32nd Edition. CLSI supplement M100. PA: Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute. 2022.
 184. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Vol. 32, Clinical and Laboratory Standards Institute document M07-A9. 2012.
 185. Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Buenos Aires | Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40(4).
 186. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(SUPPL. 1):19–28. DOI: 10.1016/s0213-005x(10)70004-5.
 187. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal Detection of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2523–9. DOI: 10.1128/jcm.42.6.2523.
 188. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla_{CTX-M-2}, bla_{GES-1} and bla_{GES-5}, bla_{IMP-1} and bla_{SPM-1} causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis*. 2012;12(1):176. DOI: 10.1186/1471-2334-12-176.
 189. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6′)-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3953–5. DOI: 10.1128/aac.00915-06.
 190. PulseNet International. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Code PNL05 [Internet]. 03/24/2013. 2013. Disponible en: https://pulsenetinternational.org/assets/pulsenet/uploads/pfge/pnl05_ec-sal-shigppfgeprotocol.pdf.
 191. Singh A, Goering R V., Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul;19(3):512–30. DOI: 10.1128/cmr.00025-05.
 192. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, et al. Characteristics of aac(6′)-Ib-cr Gene in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Chungnam Area. *Ann Lab Med*. 2009 Dec 1;29(6):541–50. DOI: 10.3343/kjlm.2009.29.6.541.
 193. 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):219–28. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
 194. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Dec;65(12):2518–29. DOI: 10.1093/jac/dkq347.
 195. Chen L, Chavda KD, Al Laham N, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, et al. Complete Nucleotide Sequence of a bla KPC -Harboring IncI2 Plasmid and Its Dissemination in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):5019–25. DOI: 10.1128/aac.01397-13.
 196. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*. 2012 Jul;68(1):43–50. DOI: 10.1016/j.plasmid.2012.03.001.
 197. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Anal Biochem*. 1995 Apr;226(2):235–40. DOI: 10.1006/abio.1995.1220.
 198. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
 199. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
 200. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(6):1–22. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
 201. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep*. 2021 Jun 16;11(1):12728. DOI: 10.1038/s41598-021-91456-0.
 202. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Dec 1;75(12):3491–500. DOI: 10.1093/jac/dkaa345.
 203. Chen L. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2004 Dec 17;33(Database issue):D325–8. DOI: 10.1093/nar/gki008.

204. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):206–14. DOI: 10.1093/nar/gkt1226.
205. Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, Barrell BG, et al. Artemis and ACT: Viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics.* 2008;24(23):2672–6. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn529.
206. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics.* 2009 Apr 15;25(8):1096–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp105.
207. Tansirichaiya S, Rahman MA, Roberts AP. The Transposon Registry. *Mob DNA.* 2019;10(1):1–6. DOI: 10.1186/s13100-019-0182-3.
208. Falcone M, Daikos GL, Tiseo G, Bassoulis D, Giordano C, Galfo V, et al. Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo- β -lactamase–Producing *Enterobacterales*. *Clin Infect Dis.* 2021 Jun 1;72(11):1871–8. DOI: 10.1093/cid/ciaa586.
209. Vázquez-Ucha JC, Alonso-García I, Guijarro-Sánchez P, Lasarte-Monterrubio C, Álvarez-Fraga L, Cendón-Esteve A, et al. Activity of aztreonam in combination with novel β -lactamase inhibitors against metallo- β -lactamase-producing *Enterobacterales* from Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2023 Apr;61(4):106738. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106738.
210. Khan A, Erickson SG, Pettaway C, Arias CA, Miller WR, Bhatti MM. Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Combination Therapy on Extensively Drug-Resistant Gram-Negative Organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Oct 18;65(11). DOI: 10.1128/aac.00846-21.
211. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, et al. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Aug;63(8). DOI: 10.1128/aac.00779-19.
212. Guzmán-Puche J, Pérez-Nadales E, Pérez-Vázquez M, Causse M, Gracia-Ahufinger I, Mendez-Natera A, et al. In vivo selection of KPC-94 and KPC-95 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients treated with ceftazidime/avibactam. *Int J Antimicrob Agents.* 2022 Feb;59(2):106524. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106524.
213. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Valente MLN de F, Luengas EL, Baudrit M, Quintana A, et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Latin America as part of the ATLAS global surveillance program, 2017–2019. *Brazilian J Infect Dis.* 2021 Nov;25(6):101647. DOI: 10.1016/j.bjid.2021.101647.
214. Papagiannitsis CC, Tzouveleki LS, Miriagou V. Relative Strengths of the Class 1 Integron Promoter Hybrid 2 and the Combinations of Strong and Hybrid 1 with an Active P2 Promoter. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jan;53(1):277–80. DOI: 10.1128/aac.00912-08.
215. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clin Microbiol Infect.* 2022 Apr;28(4):521–47. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.11.025.
216. Aslan AT, Akova M. The Role of Colistin in the Era of New β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Antibiotics.* 2022 Feb 20;11(2):277. DOI: 10.3390/antibiotics11020277.
217. Falcone M, Giordano C, Leonildi A, Galfo V, Lepore A, Suardi LR, et al. Clinical Features and Outcomes of Infections Caused by Metallo- β -Lactamase–Producing *Enterobacterales*: A 3-Year Prospective Study From an Endemic Area. *Clin Infect Dis.* 2024 May 15;78(5):1111–9. DOI: 10.1093/cid/ciad725.
218. Ruiz-Roldán L, Rojo-Bezarez B, Lozano C, López M, Chichón G, Torres C, et al. Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 23;22(23):12626. DOI: 10.3390/ijms222312626.
219. Cholley P, Ka R, Guyeux C, Thouvez M, Guessennd N, Ghebremedhin B, et al. Population Structure of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* from West and Central African Countries. Cloeckaert A, editor. *PLoS One.* 2014 Sep 4;9(9):e107008. DOI: 10.1371/journal.pone.0107008.
220. Juan C, Zamorano L, Mena A, Alberti S, Perez JL, Oliver A. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Mar 1;65(3):474–8. DOI: 10.1093/jac/dkp491.
221. Pérez-Vázquez M, Sola-Campoy PJ, Zurita ÁM, Ávila A, Gómez-Bertomeu F, Solís S, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244 carrying *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-8}, *bla*_{VIM-20} and *bla*_{KPC-2}. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 Jul;56(1):106026. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106026.
222. López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Mulet X, Cabot G, Moyá B, Figuerola J, et al. Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. Gulbins E, editor. *PLoS One.* 2013 Aug 12;8(8):e71001. DOI: 10.1371/journal.pone.0071001.
223. Hong JS, Choi N, Kim SJ, Choi KH, Roh KH, Lee S. Molecular Characteristics of GES-Type Carbapenemase-Producing

- Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Long-Term Care Facilities and General Hospitals in South Korea. *Microb Drug Resist*. 2020 Jun 1;26(6):605–10. DOI: 10.1089/mdr.2019.0302.
224. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, et al. Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. Ahmed N, editor. *PLoS One*. 2010 Jan 22;5(1):e8842. DOI: 10.1371/journal.pone.0008842.
 225. Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Brillhante M, Ramos H, Peixe L. Two decades of *bla*_{VIM-2}-producing *Pseudomonas aeruginosa* dissemination: an interplay between mobile genetic elements and successful clones. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Apr 1;73(4):873–82. DOI: 10.1093/jac/dkx517.
 226. Hishinuma T, Uchida H, Tohya M, Shimojima M, Tada T, Kirikae T. Emergence and spread of VIM-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Dec;23:265–8. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.09.010.
 227. Tickler IA, Torre JCGD La, Alvarado L, Obradovich AE, Tenover FC. Mechanisms of carbapenemase-mediated resistance among high-risk *Pseudomonas aeruginosa* lineages in Peru. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Dec;31:135–40. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.08.018.
 228. Gual-de-Torrella A, López-Causape C, Alejo-Cancho I, Rojo-Molinero E, Sanchez-García G, Cortés-Lara S, et al. Molecular characterization of a suspected IMP-type carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* outbreak reveals two simultaneous outbreaks in a tertiary-care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2023 Nov 4;44(11):1801–8. DOI: 10.1017/ice.2023.75.
 229. Moloney EM, Deasy EC, Swan JS, Brennan GI, O'Donnell MJ, Coleman DC. Whole-genome sequencing identifies highly related *Pseudomonas aeruginosa* strains in multiple washbasin U-bends at several locations in one hospital: evidence for trafficking of potential pathogens via wastewater pipes. *J Hosp Infect*. 2020 Apr;104(4):484–91. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.11.005.
 230. Cejas D, Elena A, González-Espinosa FE, Pallecchi L, Vay C, Rossolini GM, et al. Characterisation of *bla*_{KPC-2}-harbouring plasmids recovered from *Pseudomonas aeruginosa* ST654 and ST235 high-risk clones. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Jun;29:310–2. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.04.017.
 231. Wozniak A, Figueroa C, Moya-Flores F, Guggiana P, Castillo C, Rivas L, et al. A multispecies outbreak of carbapenem-resistant bacteria harboring the *bla*_{KPC} gene in a non-classical transposon element. *BMC Microbiol*. 2021 Dec 9;21(1):107. DOI: 10.1186/s12866-021-02169-3.
 232. Kabic J, Fortunato G, Vaz-Moreira I, Kekic D, Jovicevic M, Pesovic J, et al. Dissemination of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Serbian Hospital Settings: Expansion of ST235 and ST654 Clones. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 12;24(2):1519. DOI: 10.3390/ijms24021519.
 233. Torrens G, Van Der Schalk TE, Cortes-Lara S, Timbermont L, Del Barrio-Tofiño E, Xavier BB, et al. Susceptibility profiles and resistance genomics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from European ICUs participating in the ASPIRE-ICU trial. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(7):1862–72. DOI: 10.1093/jac/dkac122.
 234. Samuelsen Ø, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al. Molecular Epidemiology of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Norway and Sweden Shows Import of International Clones and Local Clonal Expansion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):346–52. DOI: 10.1128/aac.00824-09.
 235. Rojo-Bezarez B, Cavalié L, Dubois D, Oswald E, Torres C, Sáenz Y. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. *J Med Microbiol*. 2016 Apr 1;65(4):311–9. DOI: 10.1099/jmm.0.000225.
 236. Zowawi HM, Syrmis MW, Kidd TJ, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, et al. Identification of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in selected hospitals of the Gulf Cooperation Council States: dominance of high-risk clones in the region. *J Med Microbiol*. 2018 Jun 1;67(6):846–53. DOI: 10.1099/jmm.0.000730.
 237. Bocharova Y, Savinova T, Lazareva A, Polikarpova S, Gordinskaya N, Mayanskiy N, et al. Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and *oprD* alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Apr;55(4):105899. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105899.
 238. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Aug 12;76(9):2273–84. DOI: 10.1093/jac/dkab188.
 239. Takahashi T, Tada T, Shrestha S, Hishinuma T, Sherchan JB, Tohya M, et al. Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Nepal. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021 Sep;26:279–84. DOI: 10.1016/j.jgar.2021.07.003.
 240. Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. Detection and characterisation of 16S rRNA methyltransferase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from the UK and Republic of Ireland from 2003–2015. *Int J Antimicrob Agents*. 2022 Mar;59(3):106550. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106550.
 241. Hu Y, Peng W, Wu Y, Li H, Wang Q, Yi H, et al. A Potential High-Risk Clone of *Pseudomonas aeruginosa* ST463. *Front Microbiol*. 2021;12(May):1–8. DOI: 10.3389/fmicb.2021.670202.
 242. Petitjean M, Martak D, Silvant A, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb Genomics*. 2017 Oct

- 1;3(10). DOI: 10.1099/mgen.0.000129.
243. Hu H, Zhang Y, Zhang P, Wang J, Yuan Q, Shi W, et al. Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *P. aeruginosa* Sequence Type 463, Associated With High Mortality Rates in China: A Retrospective Cohort Study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(November):1–10. DOI: 10.3389/fcimb.2021.756782.
 244. Fang Y, Wang N, Wu Z, Zhu Y, Ma Y, Li Y, et al. An XDR *Pseudomonas aeruginosa* ST463 Strain with an IncP-2 Plasmid Containing a Novel Transposon Tn6485f Encoding *bla*_{IMP-45} and *bla*_{AFM-1} and a Second Plasmid with Two Copies of *bla*_{KPC-2}. Khursigara CM, editor. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1). DOI: 10.1128/spectrum.04462-22.
 245. Zhang P, Wu W, Wang N, Feng H, Wang J, Wang F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Sequence Type 463 Co-Producing KPC-2 and AFM-1 Carbapenemases, China, 2020–2022. *Emerg Infect Dis.* 2023 Oct;29(10):2136–40. DOI: 10.3201/eid2910.230509.
 246. Tu Y, Wang D, Zhu Y, Li J, Jiang Y, Wu W, et al. Emergence of a KPC-90 Variant that Confers Resistance to Ceftazidime-Avibactam in an ST463 Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain. TEO JWP, editor. *Microbiol Spectr.* 2022 Feb 23;10(1). DOI: 10.1128/spectrum.01869-21.
 247. Zhang P, Wang J, Li Y, Shi W, Cai H, Yang Q, et al. Emergence of *bla*_{KPC-33}-harboring Hypervirulent ST463 *Pseudomonas aeruginosa* Causing Fatal Infections in China. *J Infect.* 2022 Oct;85(4):e86–8. DOI: 10.1016/j.jinf.2022.07.011.
 248. Sun L, Guo H, Chen Y, He F, Xu J. Genomic and phylogenetic analysis of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST463 strain co-carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-246}, and *bla*_{OXA-486} in China. *J Glob Antimicrob Resist.* 2023 Jun;33:301–3. DOI: 10.1016/j.jgar.2023.04.011.
 249. Hong JS, Kim JO, Lee H, Bae IK, Jeong SH, Lee K. Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *Infect Chemother.* 2015;47(1):33. DOI: 10.3947/ic.2015.47.1.33.
 250. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouvez M, Talon D, Bertrand X, et al. Tracking Down Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Wastewater Network. Rohde H, editor. *PLoS One.* 2012 Dec 19;7(12):e49300. DOI: 10.1371/journal.pone.0049300.
 251. Slekovec C, Robert J, van der Mee-Marquet N, Berthelot P, Rogues AM, Derouin V, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected ICU patients: a French multicenter 2012–2013 study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 May 2;38(5):921–6. DOI: 10.1007/s10096-019-03519-w.
 252. Chairat S, Ben Yahia H, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Torres C, Ben Slama K. High prevalence of imipenem-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Burns Hospital in Tunisia: detection of a novel class 1 integron. *J Chemother.* 2019 Apr 3;31(3):120–6. DOI: 10.1080/1120009x.2019.1582168.
 253. Martak D, Gbaguidi-Haore H, Meunier A, Valot B, Conzelmann N, Eib M, et al. High prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* carriage in residents of French and German long-term care facilities. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(10):1353–8. DOI: 10.1016/j.cmi.2022.05.004.
 254. Papagiannitsis CC, Verra A, Galani V, Xitsas S, Bitar I, Hrabak J, et al. Unravelling the Features of Success of VIM-Producing ST111 and ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in a Greek Hospital. *Microorganisms.* 2020 Nov 28;8(12):1884. DOI: 10.3390/microorganisms8121884.
 255. Fonseca ÉL, Morgado SM, Caldart R V., Freitas F, Vicente ACP. Emergence of a VIM-2-producing extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* ST309 in South America: a comparative genomic analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2022;59(2). DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106507.
 256. Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED, et al. Spread of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clones in a University Hospital. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb;51(2):665–8. DOI: 10.1128/jcm.03071-12.
 257. Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. Clonal Selection Leads to Successive Waves of Contamination of Water in Dental Care Units. *Appl Env Microbiol.* 2015;81(21):7509–24. DOI: 10.1128/aem.01279-15.editor.
 258. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodríguez C, et al. Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol.* 2017;8(MAR):1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00313.
 259. Khan A, Tran TT, Rios R, Hanson B, Shropshire WC, Sun Z, et al. Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST309 Harboring Tandem Guiana Extended Spectrum β-Lactamase Enzymes: A Newly Emerging Threat in the United States. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(7):0–6. DOI: 10.1093/ofid/ofz273.
 260. Chilam J, Argimon S, Limas M, Masim M, Gayeta J, Lagrada M, et al. Genomic surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in the Philippines, 2013–2014. *West Pacific Surveill Response J.* 2021 Jun 30;12(2):4–18. DOI: 10.5365/wpsar.2020.11.1.006.
 261. Nasrin S, Hegerle N, Sen S, Nkeze J, Sen S, Permal-Booth J, et al. Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC Microbiol.* 2022;22(1):1–12. DOI: 10.1186/s12866-021-02427-4.
 262. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, François B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: Prevalence and clinical outcomes. *Crit Care.* 2014;18(1):1–9. DOI: 10.1186/cc13697.

263. Sánchez-Diener I, Zamorano L, Peña C, Ocampo-Sosa A, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, et al. Weighting the impact of virulence on the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(3):351–7. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.06.034.
264. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Mar 20;32(2). DOI: 10.1128/cmr.00115-18.
265. Lopez M. Caracterización de carbapenemasas en Uruguay 2011-2021. Universidad CLAEH; 2021.
266. Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, et al. CTX-M-15 in combination with *aac(6')-Ib-cr* is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;6:5–9. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.02.001.
267. García-fulgueiras V, Araujo L, Bado I, Cordeiro NF, Mota MI, Laguna G. Allodemic distribution of plasmids co-harboring *bla*_{CTX-M-15}/*aac(6')-Ib-cr/qnrB* in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum β -lactamases in Uruguay's paediatric hospital. *Integr Med Res*. 2017;9:68–73. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.01.008.
268. Vignoli R, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Bado I, Seija V, Aguerrebere P, et al. Extended-spectrum β -lactamases, transferable quinolone resistance, and virulotyping in extra-intestinal *E. coli* in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(1):43–52. DOI: 10.3855/jidc.6918.
269. Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Schneider I, Keuleyan E, et al. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Bulgarian hospitals – Interregional spread of ST11 NDM-1-producing *K. pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. 2019;69:61–7. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.01.013.
270. Azevedo PAA, Furlan JPR, Gonçalves GB, Gomes CN, Goulart R da S, Stehling EG, et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;18:74–9. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.01.025.
271. Ávila P, Outeda M, Papa-Ezdra R, Gadea P, Caiata L, Cabezas L, et al. Brote de *Klebsiella pneumoniae* productora de NDM en el hospital universitario en Uruguay. In: XIII Congreso Nacional de Microbiólogos y II Congreso Nacional de Biociencias (Póster). Montevideo; 2019.
272. Piazza A, Comandatore F, Romeri F, Brilli M, Dichirico B, Ridolfo A, Antona C, Bandi C, Gismondo MR RS. Identification of *bla*_{VIM-1} Gene in ST307 and ST661 *Klebsiella pneumoniae* Clones in Italy: Old Acquaintances for New Combinations. *Microb Drug Resist*. 2019;25(5):787–90. DOI: 10.1089/mdr.2018.0327.
273. Martin J, Phan HTT, Findlay J, Stoesser N, Pankhurst L, Navickaite I, et al. Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long- and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Nov 1;72(11):3025–34. DOI: 10.1093/jac/dkx264.
274. Toledano-Tableros JE, Gayosso-Vázquez C, Jarillo-Quijada MD, Fernández-Vázquez JL, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, et al. Dissemination of *bla*_{NDM-1} Gene Among Several *Klebsiella pneumoniae* Sequence Types in Mexico Associated With Horizontal Transfer Mediated by IncF-Like Plasmids. *Front Microbiol*. 2021 Mar 25;12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.611274.
275. Fortunato G, Vaz-Moreira I, Gajic I, Manaia CM. Insight into phylogenomic bias of *bla*_{VIM-2} or *bla*_{NDM-1} dissemination amongst carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2023;61(5):106788. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106788.
276. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol*. 2012;12(5):883–93. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.02.008.
277. Ramirez .S M, Tolmasky .E M. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat*. 2011;13(6):151–71. DOI: 10.1016/j.drug.2010.08.003.aminoglycoside.
278. Zhan Z, Hu L, Jiang X, Zeng L, Feng J, Wu W, et al. Plasmid and chromosomal integration of four novel *bla*_{IMP}-carrying transposons from *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and an *Enterobacter* sp. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):3005–15. DOI: 10.1093/jac/dky288.
279. Nigro SJ, Post V, Hall RM. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(7):1504–9. DOI: 10.1093/jac/dkr163.
280. Thacharodi A, Lamont IL. Aminoglycoside-Modifying Enzymes Are Sufficient to Make *Pseudomonas aeruginosa* Clinically Resistant to Key Antibiotics. *Antibiotics*. 2022;11(7). DOI: 10.3390/antibiotics11070884.
281. Poirel L, De la Rosa JMO, Sadek M, Nordmann P. Impact of Acquired Broad-Spectrum β -lactamases on Susceptibility to Cefiderocol and Newly Developed β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(4):1–6. DOI: 10.1128/aac.00039-22.
282. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(1):7–16. DOI: 10.1016/j.jgar.2013.01.005.
283. Zhang X, Wang L, Li D, Li P, Yuan L, Yang F, et al. An IncP-2 plasmid sublineage associated with dissemination of *bla*_{IMP-45} among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):442–9. DOI: 10.1080/22221751.2021.1894903.

284. Wu J, Xie L, Zhang F, Ni Y, Sun J. Molecular characterization of ISCR1-mediated *bla*_{PER-1} in a non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strain from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4293–5. DOI: 10.1128/aac.00166-15.
285. Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla*_{PER-1} gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1708–13. DOI: 10.1128/aac.49.5.1708-1713.2005.
286. Capitani V, Arcari G, Oliva A, Sacco F, Menichincheri G, Fenske L, et al. Genome-Based Retrospective Analysis of a *Providencia stuartii* Outbreak in Rome, Italy: Broad Spectrum IncC Plasmids Spread the NDM Carbapenemase within the Hospital. *Antibiotics.* 2023 May 22;12(5):943. DOI: 10.3390/antibiotics12050943.
287. Mataseje LF, Peirano G, Church DL, Conly J, Mulvey M, Pitout JD. Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 654 with *bla*_{NDM-1} Arrives in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Mar;60(3):1794–800. DOI: 10.1128/aac.02591-15.
288. 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 Apr;57(4):1965–7. DOI: 10.1128/aac.01297-12.
289. Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. Genomic Characteristics of NDM-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in Australia and Their *bla*_{NDM} Genetic Contexts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jan;60(1):136–41. DOI: 10.1128/aac.01243-15.
290. Girlich D, Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Integration of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jan 1;70(1):98–102. DOI: 10.1093/jac/dku371.
291. Zhang M, Yu Y, Wang Q, Chen R, Wang Y, Bai Y, et al. Conjugation of plasmid harboring *bla*_{NDM-1} in a clinical *Providencia rettgeri* strain through the formation of a fusion plasmid. *Front Microbiol.* 2023 Jan 4;13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1071385.
292. De Belder D, Martino F, Tijet N, Melano RG, Faccone D, De Mendieta JM, et al. Co-integrate Col3m *bla*_{NDM-1} - harboring plasmids in clinical *Providencia rettgeri* isolates from Argentina. Vignoli R, editor. *Microbiol Spectr.* 2023 Oct 17;11(5). DOI: 10.1128/spectrum.01651-23.
293. Cuicapuza D, Loyola S, Velásquez J, Fernández N, Llanos C, Ruiz J, et al. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriales* in a tertiary hospital in Lima, Peru. Andam CP, editor. *Microbiol Spectr.* 2024 Feb 6;12(2). DOI: 10.1128/spectrum.02503-23.
294. López M, Caiata L, Otero A, Mogdasy C. Carbapenemase surveillance in Uruguay: A ten year picture. In: World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (Póster). Punta del Este; 2022.
295. Ortiz De La Rosa JM, Nordmann P, Poirel L. ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7):1934–9. DOI: 10.1093/jac/dkz149.
296. Fournier D, Carrière R, Bour M, Grisot E, Triponney P, Muller C, et al. Mechanisms of Resistance to Ceftolozane/Tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Jan 20;65(2):1–15. DOI: 10.1128/aac.01117-20.
297. Zhu LJ, Pan Y, Gao CY, Hou PF. Distribution of Carbapenemases and Efflux Pump in Carbapenem-resistance *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Lab Sci.* 2020 Mar;50(2):241–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32366563>.
298. Pavez M, Troncoso C, Osses I, Salazar R, Illesca V, Reydet P, et al. High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* infection in intensive care units in southern Chile. *Brazilian J Infect Dis.* 2019;23(2):102–10. DOI: 10.1016/j.bjid.2019.03.002.
299. Vossen RHAM, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)-More than just sequence variant screening. *Hum Mutat.* 2009 Jun;30(6):860–6. DOI: 10.1002/humu.21019.
300. Erali M, Voelkerding K V., Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol.* 2008 Aug;85(1):50–8. DOI: 10.1016/j.yexmp.2008.03.012.
301. Yoon EJ, Jeong SH. MALDI-TOF mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. *Antibiotics.* 2021;10(8):1–13. DOI: 10.3390/antibiotics10080982.
302. Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E, Tzouveleki LS. Comparative Biochemical and Computational Study of the Role of Naturally Occurring Mutations at Ambler Positions 104 and 170 in GES β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov;54(11):4864–71. DOI: 10.1128/aac.00771-10.
303. Poirel L, Carrère A, Pitout JD, Nordmann P. Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2492–8. DOI: 10.1128/aac.00033-09.
304. Stewart NK, Smith CA, Frase H, Black DJ, Vakulenko SB. Kinetic and Structural Requirements for Carbapenemase Activity in GES-Type β -Lactamases. *Biochemistry.* 2015 Jan 20;54(2):588–97. DOI: 10.1021/bi501052t.
305. Frase H, Shi Q, Testero SA, Mobashery S, Vakulenko SB. Mechanistic Basis for the Emergence of Catalytic Competence against Carbapenem Antibiotics by the GES Family of β -Lactamases. *J Biol Chem.* 2009 Oct;284(43):29509–13. DOI: 10.1074/jbc.m109.011262.

306. Gato E, Anantharajah A, Arroyo MJ, Artacho MJ, Caballero J de D, Candela A, et al. Multicenter Performance Evaluation of MALDI-TOF MS for Rapid Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacterales*: The Future of Networking Data Analysis With Online Software. *Front Microbiol.* 2022 Jan 27;12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.789731.
307. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 1998;30(2):285–93. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x.
308. González MJ, Robino L, Iribarnegaray V, Zunino P, Scavone P. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. *Pathog Dis.* 2017 Jun 1;75(4). DOI: 10.1093/femspd/ftx053.
309. Villegas NA, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, et al. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Sci World J.* 2013;2013. DOI: 10.1155/2013/607258.
310. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 4th ed. Washington, DC, USA: ASM Press; 2016. p. 5.16.1-5.16.23. DOI: 10.1128/9781555818814.ch5.16.
311. Canut Blasco A, Collazos Blanco A, Díez Aguilar M, Morosini Reilly M, Rodríguez-Gascón A, Seral García C. Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. In: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2020. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento70.pdf>.
312. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: A miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc.* 2010;5(7):1236–54. DOI: 10.1038/nprot.2010.71.
313. MBEC™ Assay For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. Procedural Manual, Version 1.1. 2015.
314. Sime FB, Johnson A, Whalley S, Santoyo-Castelazo A, Montgomery AB, Walters KA, et al. Pharmacodynamics of aerosolized fosfomicin and amikacin against resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in a hollow-fiber infection model: Experimental basis for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(1):1–8. DOI: 10.1128/aac.01763-16.
315. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, et al. Azithromycin Blocks Quorum Sensing and Alginate Polymer Formation and Increases the Sensitivity to Serum and Stationary-Growth-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa* and Attenuates Chronic *P. aeruginosa* Lung Infection in Cftr – / – Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Oct;51(10):3677–87. DOI: 10.1128/aac.01011-06.
316. Broth Microdilution Test. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2016. p. 5.2.1.1-5.2.2.10. DOI: 10.1128/9781555818814.ch5.2.1.
317. Puhm M, Ainelo H, Kivisaar M, Teras R. Tryptone in Growth Media Enhances *Pseudomonas putida* Biofilm. *Microorganisms.* 2022 Mar 14;10(3):618. DOI: 10.3390/microorganisms10030618.
318. Reza A, Sutton JM, Rahman KM. Effectiveness of Efflux Pump Inhibitors as Biofilm Disruptors and Resistance Breakers in Gram-Negative (ESKAPEE) Bacteria. *Antibiotics.* 2019 Nov 19;8(4):229. DOI: 10.3390/antibiotics8040229.
319. Perez LRR, Antunes ALS, Freitas ALP, Barth AL. When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo-β-lactamase gene shows high ability to produce biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 May 4;31(5):711–4. DOI: 10.1007/s10096-011-1363-2.
320. Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DW da F, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian J Microbiol.* 2017;48(2):211–7. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.004.
321. Ghasemian S, Karami-Zarandi M, Heidari H, Khoshnood S, Kouhsari E, Ghafourian S, et al. Molecular characterizations of antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infection. *J Clin Lab Anal.* 2023 Feb 17;37(4). DOI: 10.1002/jcla.24850.
322. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):981–90. DOI: 10.1111/1469-0691.12651.
323. Haagensen J, Verotta D, Huang L, Engel J, Spormann AM, Yang K. Spatiotemporal pharmacodynamics of meropenem- and tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Dec 1;72(12):3357–65. DOI: 10.1093/jac/dkx288.
324. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):1915–22. DOI: 10.1128/jcm.42.5.1915.
325. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol.* 2020 Jan 9;10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02894.
326. Thöming JG, Häussler S. *Pseudomonas aeruginosa* Is More Tolerant Under Biofilm Than Under Planktonic Growth Conditions: A Multi-Isolate Survey. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Feb 28;12. DOI: 10.3389/fcimb.2022.851784.

327. Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
328. Khan F, Lee JW, Javaid A, Park SK, Kim YM. Inhibition of biofilm and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* by sub-inhibitory concentrations of aminoglycosides. *Microb Pathog.* 2020 Sep;146:104249. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104249.
329. Kumar M, Rao M, Mathur T, Barman TK, Joshi V, Chaira T, et al. Azithromycin Exhibits Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Rat Lung Infection Model. *Front Microbiol.* 2021 Apr 23;12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.603151.
330. Nichols DP, Caceres S, Caverly L, Fratelli C, Kim SH, Malcolm K, et al. Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. *J Surg Res.* 2013 Aug;183(2):767–76. DOI: 10.1016/j.jss.2013.02.003.
331. Soares A, Alexandre K, Etienne M. Tolerance and Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies and Therapeutic Perspectives. *Front Microbiol.* 2020 Aug 27;11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.02057.
332. Díez-Aguilar M, Cantón R. New microbiological aspects of fosfomycin. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32:8–18. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2019/05/02cantoneng.pdf>.
333. Oliver A, Díez-Aguilar M, Köksal E, Ekkelenkamp M, Cantón R, Morosini MI. Use of Calgary and Microfluidic BioFlux Systems To Test the Activity of Fosfomycin and Tobramycin Alone and in Combination against Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;62(1):e01650-17. DOI: 10.1128/aac.01650-17.
334. Pipitone G, Di Bella S, Maraolo AE, Granata G, Gatti M, Principe L, et al. Intravenous Fosfomycin for Systemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Antibiotics.* 2023 Nov 23;12(12):1653. DOI: 10.3390/antibiotics12121653.
335. González MJ, Da Cunda P, Notejane M, Zunino P, Scavone P, Robino L. Fosfomycin tromethamine activity on biofilm and intracellular bacterial communities produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. In: Pathogens and Disease. 2019. DOI: 10.1093/femspd/ftz022.
336. Pallam G, Agarwal G, Natarajan M, Mandal J, Surendran D, Parameswaran S, et al. In vitro effect of fosfomycin on multi-drug resistant gram-negative bacteria causing urinary tract infections. *Infect Drug Resist.* 2019 Jul;Volume 12:2005–13. DOI: 10.2147/idr.s207569.
337. Rottier W, Seidelman J, Wouthuyzen-Bakker M. Antimicrobial treatment of patients with a periprosthetic joint infection: basic principles. *Arthroplasty.* 2023 Mar 2;5(1):10. DOI: 10.1186/s42836-023-00169-4.
338. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS.* 2017 Apr 13;125(4):353–64. DOI: 10.1111/apm.12687.
339. Zimmerli W, Sendi P. Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections *In Vitro*, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Feb;63(2). DOI: 10.1128/aac.01746-18.
340. Armengol E, Kragh KN, Tolker-Nielsen T, Sierra JM, Higazy D, Ciofu O, et al. Colistin Enhances Rifampicin's Antimicrobial Action in Colistin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2023 Apr 18;67(4). DOI: 10.1128/aac.01641-22.
341. Laperche J, Barrett CC, Boduch A, Glasser J, Clippert D, Garcia DR, et al. Mechanically stable rifampin antibiotic cement inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm surface growth. *J Orthop Res.* 2024 Mar 4;42(3):547–54. DOI: 10.1002/jor.25720.
342. Mikalauskas A, Parkins MD, Poole K. Rifampicin potentiation of aminoglycoside activity against cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Dec 1;72(12):3349–52. DOI: 10.1093/jac/dkx296.
343. Kanj SS, Kanafani ZA. Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc.* 2011 Mar;86(3):250–9. DOI: 10.4065/mcp.2010.0674.
344. Hu YF, Liu CP, Wang NY, Shih SC. In vitro antibacterial activity of rifampicin in combination with imipenem, meropenem and doripenem against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect Dis.* 2016 Dec 24;16(1):444. DOI: 10.1186/s12879-016-1785-7.
345. Liu Y, Ma W, Li M, Wu J, Sun L, Zhao W, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of fosfomycin combined with rifampin against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol.* 2022 Dec 1;75(6):1559–68. DOI: 10.1111/lam.13822.
346. Memariani H, Memariani M, Ghasemian A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019 Sep 6;35(9):143. DOI: 10.1007/s11274-019-2719-5.
347. Vipin C, Mujeeburahiman M, Ashwini P, Arun AB, Rekha PD. Anti-biofilm and cytoprotective activities of quercetin against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Lett Appl Microbiol.* 2019;68(5):464–71. DOI: 10.1111/lam.13129.
348. Ouyang J, Sun F, Feng W, Sun Y, Qiu X, Xiong L, et al. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2016;120(4):966–74. DOI: 10.1111/jam.13073.
349. Ouyang J, Feng W, Lai X, Chen Y, Zhang X, Rong L, et al. Quercetin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via the *vfr*-mediated *lasIR* system. *Microb Pathog.* 2020 Dec;149:104291. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104291.

350. Vipin C, Saptami K, Fida F, Mujeeburahiman M, Rao SS, Athmika, et al. Potential synergistic activity of quercetin with antibiotics against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Lin YW, editor. *PLoS One*. 2020 Nov 6;15(11):e0241304. DOI: 10.1371/journal.pone.0241304.
351. Rohatgi N, Ganapathy D, Sathishkumar P. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using quercetin-mediated copper oxide nanoparticles incorporated in the electrospun polycaprolactone nanofibrous scaffold. *Microb Pathog*. 2023 Dec;185:106453. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106453.
352. Vestergaard M, Ingmer H. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(6):716–23. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015.
353. Zhou JW, Chen TT, Tan XJ, Sheng JY, Jia AQ. Can the quorum sensing inhibitor resveratrol function as an aminoglycoside antibiotic accelerant against *Pseudomonas aeruginosa*? *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(1):35–41. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.002.
354. Qi L, Liang R, Duan J, Song S, Pan Y, Liu H, et al. Synergistic antibacterial and anti-biofilm activities of resveratrol and polymyxin B against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot (Tokyo)*. 2022 Oct 23;75(10):567–75. DOI: 10.1038/s41429-022-00555-1.
355. Kolouchová I, Mařátková O, Paldrychová M, Kodeš Z, Kvasničková E, Sigler K, et al. Resveratrol, pterostilbene, and baicalein: plant-derived anti-biofilm agents. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(3):261–72. DOI: 10.1007/s12223-017-0549-0.
356. Mendling W, Palmeira-de-Oliveira A, Biber S, Prasauskas V. An update on the role of *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini review. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;(0123456789). DOI: 10.1007/s00404-019-05142-8.
357. Gaspar C, Rolo J, Cerca N, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A. Dequalinium Chloride Effectively Disrupts Bacterial Vaginosis (BV) *Gardnerella* spp. Biofilms. *Pathogens*. 2021 Feb 25;10(3):261. DOI: 10.3390/pathogens10030261.
358. Demjanenko P, Zheng S, Crane JK. SOS-Inducing Drugs Trigger Nucleic Acid Release and Biofilm Formation in Gram-Negative Bacteria. *Biomolecules*. 2024 Mar 8;14(3):321. DOI: 10.3390/biom14030321.
359. Coenye T. Biofilm antimicrobial susceptibility testing: where are we and where could we be going? Fang FC, editor. *Clin Microbiol Rev*. 2023 Dec 20;36(4). DOI: 10.1128/cmr.00024-23.
360. Allkja J, van Charante F, Aizawa J, Reigada I, Guarch-Pérez C, Vazquez-Rodriguez JA, et al. Interlaboratory study for the evaluation of three microtiter plate-based biofilm quantification methods. *Sci Rep*. 2021 Jul 2;11(1):13779. DOI: 10.1038/s41598-021-93115-w.
361. Kragh KN, Alhede M, Kvich L, Bjarnsholt T. Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*. 2019;1(100006 Contents):1–9. DOI: 10.1016/j.biofilm.2019.100006.
362. Ma Y, Aung TT, Lakshminarayanan R, Chua SL. Biofilm formation and virulence potential of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet Microbe*. 2023 Jul;4(7):e489. DOI: 10.1016/s2666-5247(23)00097-6.

ANEXOS

ANEXO 1. PCR para la búsqueda de carbapenemasas

Gen	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Ta*	REF	Control positivo			
						Nombre	Alelo	Especie	Origen/Referencia
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	AACAAGGAATATCGTTGATG	915 pb	50 °C	[1]	6300169	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[2]
	KPC-R	AGATGATTTTCAGAGCCTTA							
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GAAAAAGCAGCTGAGATCG	579 pb	52 °C	[1]	M631	<i>bla</i> _{GES-1}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Control de calidad cedido por MSP
	GES-R	CAACAACCCAACTTTAGGA							
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	TAGGAATTCACCATGTTCAAACCTTTGAGTAAGT	800 pb	55 °C	[3]	V2	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[4]
	VIM-R	ATAAAGCTTAGCTACTCAACGACTGAGCGA							
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	620 pb	56 °C	[3][5]	279	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>Providencia rettgeri</i>	Hospital de Clínicas, cepa caracterizada en LRA
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC							
<i>bla</i> _{IMP}	int/IMP	AGTCAGGTTTGGCAGATCCGT	703 pb	52 °C	[3]	CC IMP+	<i>bla</i> _{IMP-8}	<i>Enterobacter cloacae</i>	Control de calidad cedido por MSP
	IMP-R	GGTTTAACAAAACAACCACC							
<i>bla</i> _{SPM}	SPM-1 F	ATGAACTCACCTAAATCGAGAGCC	614 pb	60 °C	[3]	SPM-1 +	<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cedido por grupo del Dr. Gabriel Gutkind. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)
	SPM-1 R	AAACAGCAGTTTCTTCTTGCC							
<i>bla</i> _{GIM}	GIM-1 F	CTGTAGCGTTGCCAGCTTT	722 pb	56 °C	[3]	Sin controles positivos			
	GIM-1 R	TTAATCAGCCGACGCTTCAG							
<i>bla</i> _{SIM}	SIM-1 F	TATTCGGCACTTTAAATACCGCG	635 pb	62 °C	[3]	Sin controles positivos			
	SIM-1 R	GCCACAGTGAAATCGGAGACG							
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48 F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744 pb	50 °C	[6]	OXA-48 +	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cedido por el Dr. Juan Ayala. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid.
	OXA-48 R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC							

*Ta, temperatura de hibridación (*annealing*)

Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL)

- dNTPs 0,2 mM
- MgCl₂ 2 mM
- Cebadores directo (F) y complementario (R) 0,5 µM
- Taq polimerasa 0,625 U
- Buffer de Taq polimerasa 1X
- ADN molde 2,5 µL

Condiciones del ciclado

- Desnaturalización inicial
94 °C / 10 min
- 30 ciclos de:
- Desnaturalización 94 °C/1 min
 - Hibridación Ta* / 1 min;
 - Extensión 72 °C / 1 min
- Extensión final 72 °C / 10 min

ANEXO 2. PCR para la búsqueda de β-lactamasas de espectro extendido

Gen	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Ta*	REF	Control positivo			
						Nombre	Alelo	Especie	Origen/Referencia
<i>bla</i> _{PAN-CTX-M}	PAN CTX M F PAN CTX M R	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	543 pb	59 °C	[7]	Cualquiera de g1 a g4			
<i>bla</i> _{CTX-M-g1}	CTX-M-1 F CTX-M- AS R	CCCATGGTTAAAAAATCACTG CGTAGCCGGGCGCCAACGTGA	830 pb	54 °C	[7]	2RHC159	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>Escherichia coli</i>	[8]
<i>bla</i> _{CTX-M-g2}	CTX-M gr2 F CTX-M gr2 R	TTAATGATGACTCAGAGCATT GATACCTCGTCCATTTATTGC	875 pb	51 °C	[9]	2FHC096	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[8]
<i>bla</i> _{CTX-M-g3}	CTX-M gr3 F CTX-M gr3 R	ACCTGATTAACAATAATCCCAT ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC	514 pb	55 °C	[7]	E59	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>Escherichia coli</i>	[10]
<i>bla</i> _{CTX-M-g4}	CTX-M gr4 F CTX-M gr4 R	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG GTAAGCTGACGCAACGTCTG	473 pb	57 °C	[7]	4RHC112	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>Enterobacter cloacae</i>	[8]
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M-8 F CTX-M-8 R	TGAATACTTCAGCCACACG TAGAATTAATAACCGTCGGT	922 pb	50 °C	[11]	E59	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>Escherichia coli</i>	[10]
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-9-M F CTX-9-M R	ATGGTGACAAAGAGARTGCAA TTACAGCCCTTCGGCGATGAT	841 pb	60 °C	[8]	4RHC112	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>Enterobacter cloacae</i>	[8]
<i>bla</i> _{SHV}	SHV A SHV B	ATGATGAGCACCTTTAAAGTA ATTCGCTCGGCCATGCTCGC	620 pb	52 °C	[12]	836	<i>bla</i> _{SHV-2}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[13]
<i>bla</i> _{TEM}	OT3 OT4	ATGAGTATTCAAAATTTCCG CCACTGCTTAATCAGTGAGG	900 pb	52 °C	[12]	SE1101	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>Salmonella</i> Enteritidis	[14]
<i>bla</i> _{PER-1}	PER 1 F PER 1 R	GGGCTTAGGGCAGAAAGCTTTTTC AAGCTGTAGTTACTGCCTCGACGC	903 pb	48 °C	[15]	PER-1 +	<i>bla</i> _{PER-1}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepario del laboratorio
<i>bla</i> _{PER-2}	PER 2 F PER 2 R	TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG CAGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG	878 pb	48 °C	[12]	2RHC080	<i>bla</i> _{PER-2}	<i>Citrobacter freundii</i>	[8]

*Ta, temperatura de hibridación (*annealing*)

Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL)

- dNTPs 0,2 mM
- MgCl₂ 2 mM
- Cebadores directo (F) y complementario (R) 0,5 µM
- Taq polimerasa 0,625 U
- Buffer de Taq polimerasa 1X
- ADN molde 2,5 µL

Condiciones del ciclado

Desnaturalización inicial
94 °C / 10 min

30 ciclos de:

- Desnaturalización 94 °C/1 min
- Hibridación Ta* / 1 min;
- Extensión 72 °C / 1 min

Extensión final 72 °C / 10 min

ANEXO 3. PCR para la búsqueda de determinantes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos

Gen	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Ta*	REF	Control positivo				Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL) - dNTPs 0,2 mM - MgCl ₂ 2 mM - Cebadores directo (F) y complementario (R) 0,5 µM - Taq polimerasa 0,625 U - Buffer de Taq polimerasa 1X - ADN molde 2,5 µL Condiciones del ciclado Desnaturalización inicial 94 °C / 10 min 30 ciclos de: - Desnaturalización 94 °C/1 min - Hibridación Ta* / 1 min; - Extensión 72 °C / 1 min Extensión final 72 °C / 10 min
						Nombre	Alelo	Especie	Origen/Referencia	
<i>qnrA</i>	qnrA-F qnrA-R	ATTTCTCACGCCAGGATTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516 pb	53 °C	[16]	4RHC112	<i>qnrA1</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	[8]	
<i>qnrB</i>	qnrB-F qnrB-R	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG ACGACGCCTGGTAGTTGTCC	469 pb	52 °C	[17]	1RHC175	<i>qnrB4</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	[8]	
<i>qnrC</i>	qnrC-F qnrC-R	GGGTTGTACATTTATTGAATC CACCTACCCATTTATTTTCA	307 pb	50 °C	[18]	qnrC+	<i>qnrC1</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ceparío del laboratorio	
<i>qnrD</i>	qnrD-F qnrD-R	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAGCTGAAGCGCCTG	580 pb	51 °C	[19]	232	<i>qnrD1</i>	<i>Morganella morganii</i>	Este trabajo [3]	
<i>qnrS</i>	qnrS-F qnrS-R	ACGACATTCGTCAACCTGCAA TAAATTGGCACCTGTAGGC	417 pb	53 °C	[20]	qnrS+	<i>qnrS1</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ceparío del laboratorio	
<i>qnrVC</i>	qnrVC-F qnrVC-R	ATGGAAAAATCAAAGCAATT TTAGTCAGGAACAATGATTA	656 pb	46 °C	[21]	638	<i>qnrVC6</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	Este trabajo [15]	
<i>aac</i>	aac-F aac-R	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGT	481 pb	55 °C	[20]	475	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[13]	
<i>armA</i>	armA-F armA-R	TATGGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT TGTTGGATTCCCTTCTCCTTT	514 pb	54 °C	[22]	Sin controles positivos				
<i>rmtA</i>	rmtA-F rmtA-R	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	634 pb	58 °C	[22]	Sin controles positivos				
<i>rmtB</i>	rmtB-F rmtB-R	TCAACGATGCCCTCACCTC GCAGGGCAAAGGTAATCC	458 pb	56 °C	[22]	rmtB+	<i>rmtB1</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cedida por el Dr. V. Di Pilato. Universidad de Siena	
<i>rmtC</i>	rmtC-F rmtC-R	GCCAAAGTACTACAAGTGG CTCAGATCTGACCAACAAG	732 pb	56 °C	[22]	HCA30	<i>rmtC</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	[23]	
<i>rmtD</i>	rmtD-F rmtD-R	CAGTTGAAGCCAGCGGAACGC GCGCTCCATCCATTCCGAATAG	371 pb	66 °C	[22]	Mghi	<i>rmtD1</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Colección de la Dra. Inés Bado, tesis de doctorado	
<i>npmA</i>	npmA-F npmA-R	CTCAAACCAAGAAAGACGG GAAACATGGCCAGAAACTC	640 pb	52 °C	[22]	Sin controles positivos				

*Ta, temperatura de hibridación (*annealing*)

ANEXO 5. PCR para la caracterización del entorno de *bla*_{NDM-1}

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Ta*
ISKox2F	ATGCCAAGCAGGTAAAGGCT	3253	54 °C
HP2R	AGCGCCACTACCAAAGCAA		
HP1F	TGCTTACAGACACCAACCCA	2139	54 °C
ISAb14R	CACTGGTAAACTGGCTGCCT		
ISAb14F	GCCGCTTCAACCACAAAAGT	2627	54 °C
ISAb125R	CATCTCACGTCCACGGTCAT		
ISAb125AV	CGTGGACGTGAGATGTCAGA	1154	56 °C
NDM-1 R [5]	CGGAATGGCTCATCACGATC		
NDM-1AV	AGCATGATCGTGATGAGCCA	3241	54 °C
ISKox2Ret	CTGCTCAGCTTTGGTAAGAATTG		
dsbCR	CGCGCCTTACAGCCGAA	3540	53 °C
ISKox2R	GTGCCGCTACTGCGTTATTG		
Cebadores adicionales utilizados para secuenciación			Tm
ISKox2AV	AGTATCACCCGTTGCATGGC		60 °C
ISAb14AV	TGAAACGACCTCATTCGAGTCT		60 °C
ISAb125Ret	AGGTGGTTTATGTCGCACTTCA		60 °C
ISAb125F	GACGTAGACGTGGTCACAGAA		61 °C
NDM-1 f	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC		60 °C
dsbCAV	ACGCCTCTGTCGGAACAATC		60 °C
ISAb125AV	CGTGGACGTGAGATGTCAGA		60 °C

Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL)

- dNTPs 0,2 mM
- MgCl₂ 2 mM
- Cebadores directo (F) y complementario (R) 0,5 µM
- Taq polimerasa 0,1 U
- Buffer de Taq polimerasa 1X
- ADN molde 2 µL

Condiciones del ciclado

Desnaturalización inicial: 94 °C / 10 min

30 ciclos de:

- Desnaturalización 94 °C / 1 min;
- Hibridación Ta* / 1 min;
- Extensión 72 °C / 2 a 4 min

Extensión final 72 °C / 10 min

*Ta, temperatura de hibridación (*annealing*)

ANEXO 6. PCR para la tipificación por MLST de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*

Gen	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Ta*	REF	
<i>P. aeruginosa</i>						<p>Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - dNTPs 0,2 mM - MgCl₂ 2 mM - Cebadores directo (F) y complementario (R) 0,5 µM - Taq polimerasa 1 U - Buffer de Taq polimerasa 1X - ADN molde 2,5 µL <p>Condiciones del ciclo</p> <p>Desnaturalización inicial: 96 °C / 10 min</p> <p>35 ciclos de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Desnaturalización 96 °C / 1 min; - Hibridación Ta* / 1 min; - Extensión 72 °C / 1,5 - 2 min <p>Extensión final 72 °C / 10 min</p>
<i>acsA</i>	acsA-F acsA-R	ACCTGGGTACGCCTCGCTGAC GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	841 pb	68 °C	[25]	
<i>aroE</i>	aroE-F aroE-R	TGGGGCTATGACTGGAAACC TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	1053 pb	58 °C	[25]	
<i>guaA</i>	guaA-F guaA-R	CGGCCTCGACGTGTGGATGA GAACGCCTGGCTGGTCTTGTTGGTA	940 pb	62 °C	[25]	
<i>mutL</i>	mutL-F mutL-R	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	920 pb	63 °C	[25]	
<i>nuoD</i>	nuoD-F nuoD-R	ACCGCCACCCGTA CTG TCTCGCCATCTTGACCA	1042 pb	50 °C	[25]	
<i>ppsA</i>	ppsA-F ppsA-R	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG GGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG	989 pb	68 °C	[25]	
<i>trpE</i>	trpE-F trpE-R	GCGGCCAGGGTCGTGAG CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	791 pb	62 °C	[25]	
<i>trpE</i> (*)	trpE_sec F trpE_sec R	TTCAACTTCGGCGACTTCCA CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	483 pb	62 °C	Este trabajo	
	trpEn F trpEn R	CTGCGCTGTTCAATCCGAC TCACCGTTCTTGATCACCGC	557 pb	62 °C	Este trabajo	
<i>mutL</i> (*)	mutL-F (sec)	AGAAGACCGAGTTCGACCAT			Este trabajo	
<i>K. pneumoniae</i>						
<i>mdh</i>	mdh F mdh R	CCCAACTCGCTTCAGGTT CAG CCGTTTTTCCCAGCAGCAG	800 pb	62 °C	[26]	
<i>gpaA</i>	gapA F gapA R	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	650 pb	60 °C	[26]	
<i>pgi</i>	pgi F pgi R	GAGAAAAACCTGCCTGTA CTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	700 pb	55 °C	[26]	
<i>rpoB</i>	rpoB F rpoB R	GGCGAAATGGCWGAGAAACCA GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1100 pb	59 °C	[26]	
<i>phoE</i>	phoE F phoE R	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGA ACTGGTAGGTGAT	600 pb	50 °C	[26]	
<i>tonB</i>	tonB F tonB R	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTGCGCGGCTGRGCRGAGAG	500 pb	59 °C	[26]	
<i>infB</i>	infB F infB R	CTCGTGCTGGACTATATTCG CGTTTTAGCTCAAGAACTTC	450 pb	50 °C	[26]	

ANEXO 7. PCR para la determinación de grupos de incompatibilidad plasmídicos

Grupo	Primers	Secuencia	Tamaño	Ta	REF	Controles/Origen
Multiplex 1						
HI1	HI1-F HI1-R	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	58 °C	[27]	Multi 1. Mezcla de plásmidos de los tres grupos. Cepario del laboratorio, colección Dra. V. García-Fulgueiras
HI2	HI2-F HI2-R	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644			
I1	I1-F I1-R	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139			
Multiplex 2						
X	X-F X-R	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTAGC	376	58 °C	[27]	Multi 2. Mezcla de plásmidos de los tres grupos. Cepario del laboratorio, colección Dra. V. García-Fulgueiras
L/M	L/M-F L/M-R	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785			
N	N-F N-R	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559			
Multiplex 3						
FIA	FIA-F FIA-R	CCATGCTGTTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCGCGAG	462	58 °C	[27]	Multi 3. Mezcla de plásmidos de los tres grupos. Cepario del laboratorio, colección Dra. V. García-Fulgueiras
FIB	FIB-F FIB-R	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702			
W	W-F W-R	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCCT	242			
Multiplex 4						
Y	Y-F Y-R	AATTCAAACAACACTGTGCGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAATTT	765	58 °C	[27]	Multi 4. Mezcla de plásmidos de los tres grupos. Cepario del laboratorio, colección Dra. V. García-Fulgueiras
P	P-F P-R	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534			
FIC	FIC-F FIC-R	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	262			
Multiplex 5						
A/C	A/C-F A/C-R	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	58 °C	[27]	Multi 5. Mezcla de plásmidos de los tres grupos. Cepario del laboratorio, colección Dra. V. García-Fulgueiras
T	T-F T-R	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750			
FIIS	FIIS-F FIIS-R	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAACTTCAGC	270			

Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL)

- dNTPs 0,2 mM
- MgCl₂ 2 mM
- Cebadores directo (F) y complementario (R) 0,5 µM
- Taq polimerasa 0,625 U
- Buffer de Taq polimerasa 1X
- ADN molde 2,5 µL

Condiciones del ciclado

- Desnaturalización inicial: 94 °C / 10 min
30 ciclos de:
- Desnaturalización 94 °C / 1 min;
 - Hibridación 58 °C / 1 min;
 - Extensión 72 °C / 1 min
- Extensión final 72 °C / 10 min

PCR simples						Mezcla de reacción (Volumen final 25 µL)
F rep B	F-F F-R	TGATCGTTTAAGGAATTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	270	52 °C [27]	FrepB. Colección Dra. V. García	
K/B K	K/B-F K-R	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160	52 °C	K/B K. Colección Dra. V. García	
K/B B/O	K/B-F B/O-R	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	160	52 °C	K/B B/O. Colección Dra. V. García	
FII K	FII K-F FII K-R	TCTTCTCAATCTTGGCGGA GCTTATGTTGCACRGAAGGA	150	60 °C [28]	HT. Colección Dra. V. García	
FII	FII-F FII-R	CTGATCGTTTAAGGAATTTT CACACCATCCTGCACTTA	260	54 °C	Hro. Colección Dra. V. García	
Incl2	I2-repR-F I2-repA-R	TTACAGTGCAAGCTAAGTGCAG GATTCACGGTCCCATATCGT	615	55 °C [29]	Tc796 [30]	
IncX1	IncX1-F IncX1-R	GCTTAGACTTTGTTTTATCGTT TAATGATCCTCAGCATGTGAT	461	52 °C [31]	Sin controles positivos	
IncX2	IncX2-F IncX2-R	GCGAAGAAATCAAAGAAGCTA TGTTGAATGCCGTTCTGTCCAG	678	52 °C	Sin controles positivos	
IncX3	IncX3-F IncX3-R	GTTTTCTCCACGCCCTTGTTCA CTTTGTGCTTGGCTATCATAA	351	52 °C	Sin controles positivos	
IncX4	IncX4-F IncX4-R	AGCAAACAGGGAAAGGAGAAGACT TACCCCAAATCGTAACCTG	569	52 °C	Tf 51230 [30]	

ANEXO 8. Aislamientos incluidos en ensayos de formación de biofilms, y evaluados por PCR múltiple en tiempo real y MALDI-TOF MS

ID	Especie	Mecanismo	Biofilm	multi PCR	MALDI-TOF
OXA-48 +	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48		P	X
HI002	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48/CTX-M-15		P	X
S18	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48		X	X
S14	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48/CTX-M-15		X	X
MEM Kpn51	<i>E. coli</i>	OXA-48		X	X
HC1 / HI026	<i>P. rettgeri</i>	NDM-1	FB	P	P
HC11 / HI004	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	FB	P	P
HI010	<i>C. freundii</i>	NDM-1		X	X
HI033	<i>C. freundii</i>	NDM-1		X	X
HC7 / HI012	<i>E. cloacae</i>	NDM-1	FB	X	X
HC10 / HI025	<i>E. cloacae</i>	NDM-1	FB	X	X
HI036	<i>E. coli</i>	NDM-1		X	X
HI027	<i>E. coli</i>	NDM-1		X	X
HC6 / HI023	<i>K. aerogenes</i>	NDM-1	FB	X	X
HI041	<i>K. oxytoca</i>	NDM-1		X	X
HC12 / HI008	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	FB	X	X
HI011	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	FB	X	X
HI013	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1		X	X
HC3 / HI028	<i>M. morgani</i>	NDM-1	FB	X	X
1294	<i>M. morgani</i>	NDM-1		X	X
HC5 / HI042	<i>P. mirabilis</i>	NDM-1	FB	X	X
HC9 / HI032	<i>P. mirabilis</i>	NDM-1	FB	X	X
HC2 / HI031	<i>C. freundii</i>	NDM-1	FB	X	X
HI029	<i>P. rettgeri</i>	NDM-1		X	X
45098	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2	FB+A	P	P
1229	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2	FB		
1261	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2	FB		
HC8 / HI021	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	FB	P	P
M1224	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2		X	X
M1229	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2		X	X
M1261	<i>P. aeruginosa</i>	KPC-2		X	X
6300169	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
6501	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
3511	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
70504415	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
6210435A	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
6210435B	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
10300171	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
HI019	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
HI043	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
HI044	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2		X	X
0173-1	<i>K. oxytoca</i>	KPC-2		X	X
3128924	<i>C. freundii</i>	KPC-2		X	X
HI014	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3	FB	X	X
HI015	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3		X	X
HI016	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3		X	X
OPS276	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-57		X	X
HC4 / HI022	<i>E. cloacae</i>	VIM-2	FB	P	P
HI001	<i>E. hormaechei</i>	VIM-2		X	X
V2	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	P	P
926	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	X	X
60-2	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	X	X
213	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	X	X
11-15	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
356	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		

149	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
517	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
559	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	X	X
089	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	X	X
6415	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2 / PER-1	FB+A	X	X
873	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2 / PER-1	FB		
931	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A	X	X
782	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
663	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
318	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
523	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB		
794	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	FB+A		
179	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2		X	X
43	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2		X	X
51	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2		X	X
189	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB	X	X
531	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB	X	X
166	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB	X	X
829	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB	X	X
144	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB		
717	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB		
114	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB		
155	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB		
621	<i>P. putida</i>	VIM-2	FB		
HCPa01	<i>P. aeruginosa</i>	PER-1	FB+A		
HCPa12	<i>P. aeruginosa</i>	PER-1	FB+A		
57763	<i>P. aeruginosa</i>	GES-2	FB+A	P	P
M631	<i>K. pneumoniae</i>	GES-1		P	P
M1116	<i>P. aeruginosa</i>	GES-1	FB+A	X	X
M1118	<i>P. aeruginosa</i>	GES-1	FB+A	X	X
M1119	<i>P. aeruginosa</i>	GES-1	FB	X	X
M1121	<i>P. aeruginosa</i>	GES-1		X	X
M1092	<i>P. aeruginosa</i>	GES-1	FB		
M1099	<i>P. aeruginosa</i>	GES-1	FB		
805	<i>P. aeruginosa</i>	GES-7		X	X
HI017	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1/KPC-2		X	X
HI018	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1/KPC-2		X	X
717	<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2/GES-7		X	X
M1117	<i>P. aeruginosa</i>	R carba, brote GES		X	NP
C17	<i>A. baumannii</i>	OXA-23/OXA-58			P
J53-2	<i>E. coli</i>	RRD		NP	NP
Mez	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15		NP	NP
Med	<i>A. baumannii</i>	OXA-23/OXA-58			X
C100	<i>A. baumannii</i>	OXA-23			X
C73	<i>A. baumannii</i>	OXA-23			X
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	-		NP	NP
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	-		NP	NP
PaCTX-M-2+	<i>P. aeruginosa</i>	CTX-M-2			X
Dtz	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-9	FB		X
Mz	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	FB		X
C58	<i>A. baumannii</i>	OXA-51			X
C22	<i>A. baumannii</i>	OXA-51			X
PER-1+	<i>P. aeruginosa</i>			NP	
5653	<i>P. aeruginosa</i>	Resistentes a carbapenems, sin carbapenemasa			X
1620	<i>P. aeruginosa</i>			X	X
1026	<i>P. aeruginosa</i>			X	X
4528	<i>P. aeruginosa</i>			X	X
5814	<i>P. aeruginosa</i>			X	X
7879	<i>P. aeruginosa</i>			X	X
2020	<i>K. pneumoniae</i>			X	X

8950	<i>K. pneumoniae</i>	Resistentes a carbapenems, sin carbapenemasa		X	X
9122	<i>K. pneumoniae</i>			X	X
KpM	<i>K. pneumoniae</i>			X	X
2170	<i>E. cloacae</i>			X	X
329	<i>E. cloacae</i>			X	X
1734	<i>E. cloacae</i>			X	X
Muc	<i>E. cloacae</i>			X	X
2033	<i>E. aerogenes</i>			X	X

Aislamientos marcados con FB, utilizados para ensayos de formación de biofilm; FB+A utilizados para ensayos de formación de biofilm y evaluación de efecto de antibióticos; P, utilizados para puesta a punto como controles positivos; NP, utilizados para la puesta a punto como controles negativos; X, utilizados en la evaluación del método.

Referencias de Anexos

1. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jul;14(7):1178–80. DOI: 10.3201/eid1407.070826.
2. Marquez C, Ingold A, Echevarría N, Acevedo A, Vignoli R, García-Fulgueiras V, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: Infection control and molecular characterization. *New Microbes New Infect*. 2014;2(3):58–63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/nmi2.40>.
3. Seija V, Medina Presentado JC, Bado I, Papa Ezdra R, Batista N, Gutierrez C, et al. Sepsis caused by New Delhi metallo- β -lactamase *bla*_{NDM-1} and *qnrD*-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomicin and meropenem: Case report and literature review. *Int J Infect Dis*. 2015;30:20–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.09.010.
4. Gutierrez C, Bado I, Cordeiro N, Palacio R, Vignoli R. Resistencia a carbapenems y detección de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital de Clínicas. *Rev Uruguaya Patol Clínica*. 2011;48:7–12.
5. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How To Detect NDM-1 Producers. *J Clin Microbiol*. 2011 Feb;49(2):718–21. DOI: 10.1128/jcm.01773-10.
6. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, 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 Jan;51(1):369–72. DOI: 10.1128/jcm.02234-12.
7. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):4015–21. DOI: 10.1128/aac.00576-07.
8. Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, et al. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and *qnr* alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(5):453–8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042.
9. Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. Novel Class 1 Integron (InS21) Carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul;46(7):2257–61. DOI: 10.1128/aac.46.7.2257-2261.2002.
10. Vignoli R, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Bado I, Seija V, Aguerrebere P, et al. Extended-spectrum β -lactamases, transferable quinolone resistance, and virulotyping in extra-intestinal *E. coli* in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(1):43–52. DOI: 10.3855/jidc.6918.
11. Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):529–34.
12. Vignoli R, Cordeiro NF, García V, Mota MI, Betancor L, Power P, et al. New TEM-derived extended-spectrum β -lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar Derby isolates from Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(2):781–4. DOI: 10.1128/aac.50.2.781-784.2006.
13. García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(8):1725–9. DOI: 10.1093/jac/dkr222.
14. Bado I, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Betancor L, Caiata L, Seija V, et al. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*_{CTX-M-14} in South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):2132–4. DOI: 10.1128/aac.05530-11.
15. Bado I, Papa-Ezdra R, Cordeiro N, Outeda M, Caiata L, García-Fulgueiras V, et al. Detection of *qnrVC6*, within a new genetic context, in an NDM-1-producing *Citrobacter freundii* clinical isolate from Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;14:95–8. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.02.023.
16. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Feb;47(2):559–62. DOI: 10.1128/aac.47.2.559-562.2003.
17. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infect Dis*. 2008 Dec 22;8(1):68. DOI: 10.1186/1471-2334-8-68.
18. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, et al. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):1892–7. DOI: 10.1128/aac.01400-08.
19. 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 Feb;53(2):603–8. DOI: 10.1128/aac.00997-08.
20. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3953–5. DOI: 10.1128/aac.00915-06.
21. Li R, Lin D, Chen K, Wong MHY, Chen S. First Detection of AmpC β -Lactamase *bla*_{CMY-2} on a Conjugative IncA/C Plasmid in a *Vibrio parahaemolyticus* Isolate of Food Origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul;59(7):4106–11. DOI: 10.1128/aac.05008-14.

22. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1843–5. DOI: 10.1128/aac.01477-07.
23. Bado I, Papa-Ezdra R, Delgado-Blas JF, Gaudio M, Gutiérrez C, Cordeiro NF, et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First *rmtC* Gene in the Species. *Microb Drug Resist*. 2018;24(7):1012–9. DOI: 10.1089/mdr.2017.0300.
24. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, et al. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar;45(3):723–6. DOI: 10.1128/aac.45.3.723-726.2001.
25. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5644–9. DOI: 10.1128/jcm.42.12.5644-5649.2004.
26. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4178–82. DOI: 10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005.
27. 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):219–28. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
28. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Dec;65(12):2518–29. DOI: 10.1093/jac/dkq347.
29. Chen L, Chavda KD, Al Laham N, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, et al. Complete Nucleotide Sequence of a *bla*_{KPC}-Harboring IncI2 Plasmid and Its Dissemination in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):5019–25. DOI: 10.1128/aac.01397-13.
30. Papa-Ezdra R, Grill Diaz F, Vieytes M, García-Fulgueiras V, Caiata L, Ávila P, et al. First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr-1* in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;20. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.07.016.
31. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*. 2012 Jul;68(1):43–50. DOI: 10.1016/j.plasmid.2012.03.001.