



## PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Tesis de Maestría  
Área Biología, Subárea Microbiología

# Situación epidemiológica de carbapenemasas y caracterización de los plásmidos codificantes en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Lic. Lucía Cristóforo Sírtori

Orientadora: Dra. Virginia García Fulgueiras  
Co-Orientadora: Dra. Gabriela García Gabarrot

Lugar de ejecución: Laboratorio de Resistencia Antibiótica, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina & Unidad de Bacteriología, Departamento de Laboratorios, Ministerio de Salud Pública

Diciembre, 2024  
Montevideo, Uruguay

## **INDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1. Características de Enterobacterales.....	5
1.2. Características de los antibióticos más utilizados en infecciones por Enterobacterales .....	7
1.2.1. Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	7
1.2.1.1. Generalidades.....	7
1.2.1.2. Clasificación.....	7
1.2.1.2.1. Penicilinas.....	8
1.2.1.2.2. Cefalosporinas.....	8
1.2.1.2.3. Inhibidores de $\beta$ -lactamasas.....	9
1.2.1.2.4. Carbapenemes.....	10
1.2.1.2.5. Monobactámicos.....	10
1.2.1.3. Mecanismo de acción de $\beta$ -lactámicos.....	10
1.2.1.4. Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	11
1.2.1.5. Epidemiología.....	16
1.2.2. Aminoglucósidos.....	18
1.2.2.1. Generalidades.....	18
1.2.2.2. Mecanismo de acción.....	19
1.2.2.3. Mecanismos de resistencia.....	19
1.2.2.4. Epidemiología.....	20
1.2.3. Fosfomicina.....	21
1.2.3.1. Generalidades.....	21
1.2.3.2. Mecanismo de acción.....	21
1.2.3.3. Mecanismos de resistencia.....	21
1.2.3.4. Epidemiología.....	22
1.2.4. Colistina.....	23
1.2.4.1. Generalidades.....	23
1.2.4.2. Mecanismo de acción.....	23
1.2.4.3. Mecanismos de resistencia.....	24
1.2.4.4. Epidemiología.....	25
1.3. Caracterización de aislamientos y movilidad de mecanismos de resistencia.....	25
1.4. Identificación de clones por electroforesis en gel en campo pulsado.....	26
1.5. Diseminación de los mecanismos de resistencia.....	26

1.6. Epidemiología local y vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antimicrobianos $\beta$ -lactámicos (RAM) en Uruguay .....	27
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Objetivo general.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Material Biológico.....	31
4.2. Cepas de referencia utilizadas.....	31
4.3. Métodos.....	31
4.3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas.....	32
4.3.2. Reacciones de amplificación.....	32
4.3.3. Identificación y susceptibilidad antibiótica.....	34
4.3.4. Electroforesis en gel de campo pulsado.....	34
4.3.5. Movilidad de los mecanismos de resistencia.....	35
4.3.6. Determinación del tamaño de los plásmidos transferidos.....	36
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1. Caracterización de las cepas.....	37
5.2. Coproducción de carbapenemasas con $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M.....	40
5.3. Secuenciotipos exitosos y PFGE.....	40
5.4. Ensayos de conjugación.....	43
5.5. Tamaño plasmídico.....	44
5.6. Resultados <i>M. morganii</i> .....	45
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>
9.1. Protocolos.....	75
9.1.1. Protocolo de extracción de ADN.....	75
9.1.2. Protocolo para conservar cepas a -80°C.....	75
9.1.3. Protocolos y tablas de cebadores.....	76
9.1.4. Concentración inhibitoria mínima (CIM) a colistina.....	77
9.1.5. Concentración inhibitoria mínima a Fosfomicina.....	78
9.1.6. Protocolo de PFGE.....	79
9.1.7. Protocolo de conjugación.....	83
9.2. Reactivos, equipos y software.....	84

9.2.1. Reactivos.....	84
9.2.2. Equipos.....	84
9.2.3. Software.....	84
9.3. Tablas de cepas.....	85
9.3.1. Tabla de <i>E. coli</i> .....	85
9.3.2. Tabla de <i>K. pneumoniae</i> .....	86

## **RESUMEN**

El control de las enfermedades infecciosas presenta un desafío continuo, y en dicho control, una de las estrategias más utilizadas es el tratamiento antimicrobiano. Las infecciones hospitalarias aumentan las tasas de morbi-mortalidad de los pacientes, el tiempo de hospitalización y elevan los costos asociados a cuidados de salud.

Dentro de los microorganismos aislados de infecciones nosocomiales, se destacan los bacilos Gram negativos que causan infecciones severas tanto a nivel comunitario como hospitalario. En este sentido, la OMS generó una lista de microorganismos a priorizar en la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. En esta lista, los *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y/o carbapenemes están entre los microorganismos de máximo interés. El principal mecanismo de resistencia en estos microorganismos a carbapenemes es la producción de enzimas carbapenemasas.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar enterobacterias productoras de carbapenemasas a nivel clínico de distintos centros de salud del país. Se realizó una caracterización fenotípica y genotípica de los distintos mecanismos de resistencia a antibióticos (RAM). Se caracterizaron los clones circulantes, secuenciotipos involucrados y la movilidad de los genes de RAM.

Se estudiaron aislamientos de *Escherichia coli* (N=11), *Klebsiella pneumoniae* (N=63) aislados en 2019 bajo el programa de vigilancia de cepas productoras de carbapenemasas del Ministerio de Salud Pública.

Se identificaron en *E. coli* ocho *bla*<sub>NDM-1</sub>, cuatro *bla*<sub>KPC-2</sub> y en *K. pneumoniae* 43 *bla*<sub>NDM-1</sub>, 20 *bla*<sub>KPC-2</sub> y una *bla*<sub>OXA-48</sub>. Dos cepas, una de *E. coli* y una de *K. pneumoniae*, presentaron doble carbapenemasa (*bla*<sub>NDM-1</sub> + *bla*<sub>KPC-2</sub>). El 11% de las cepas presentaron resistencia a colistina (todas ellas identificadas *K. pneumoniae*, sin la identificación de genes *mcr*) y el 5% a fosfomicina (principalmente en *E. coli*, mediado por *fosA3*), y 1% resistencia a aminoglucósidos (una *E. coli*, mediado por *rmtC*). En la caracterización de clones se encontró una gran diversidad en *K. pneumoniae* donde se detectaron 36 pulsotipos, con un pulsotipo mayoritario con ocho aislamientos. El secuenciotipo ST258 de *K. pneumoniae* se identificó en el 21% de los casos. En *E. coli* se encontraron seis pulsotipos y el pulsotipo mayoritario agrupaba cuatro aislamientos. El ST69 de *E. coli* se identificó en el 27% de las cepas. En los ensayos de movilidad de genes codificantes de carbapenemasas se encontró que el 81% se localizaban en plásmidos conjugativos (tamaño plasmídico, entre 55 y 670 Kb).

Se destaca el rol principal de la carbapenemasa codificada por *bla*<sub>NDM-1</sub> y la elevada presencia de este gen en plásmidos conjugativos. Se remarca la importancia de continuar con la vigilancia epidemiológica para conocer los mecanismos de resistencia circulantes y así poder optimizar los recursos terapéuticos disponibles.

**Palabras claves:** carbapenemasas, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, NDM, KPC.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La resistencia a los antibióticos en microorganismos de relevancia clínica representa una amenaza considerable para la salud global. No obstante, el control de esta resistencia, tanto a nivel local como internacional, continúa siendo un desafío significativo. La epidemiología asociada a la resistencia antibiótica es sumamente variada, dado que la aparición, selección y diseminación de microorganismos resistentes en las poblaciones humanas varía en función de los patógenos involucrados, los mecanismos de resistencia presentes y los contextos de transmisión (Rahbé et al., 2024).

A continuación, se mencionará las características del orden Enterobacterales, a los principales antibióticos utilizados para combatir infecciones a nivel humano por estos microorganismos, cuáles son los mecanismos de resistencia a antibióticos que desarrollan y la capacidad de diseminación de los genes de resistencia.

### **1.1. Características de Enterobacterales**

El orden de Enterobacterales es un grupo de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria (Adeolu et al., 2016). Rahn en 1937 fue el primero en proponer el nombre de Enterobacterias para este grupo de microorganismos (Farmer et al., 2010).

Es el grupo de agentes bacterianos que más impacto ha tenido tanto desde un punto de vista clínico como veterinario. Los integrantes de este orden tienen una distribución mundial, siendo un nicho común los intestinos de seres humanos y otros animales. En una primera instancia, este grupo se caracterizó originalmente por un conjunto de fenotipos uniformes, que incluían una reacción negativa a la tinción de Gram, buen crecimiento en medios artificiales, producción de ácido a partir de D-glucosa y producción de nitritos a partir de nitratos (Janda & Abbott, 2021).

Las enterobacterias representan el 80% de las infecciones provocadas por bacilos Gram negativos y representan un 50% de las bacterias clínicamente significativas en los laboratorios de microbiología clínica. También constituyen cerca del 50% de los microorganismos aislados de enfermedades que involucran sepsis, más del 70% de las infecciones de las vías urinarias y un porcentaje significativo de las infecciones intestinales (Mayhall, 2000).

El tratamiento frente a estas infecciones se ve cada vez más afectado debido a la producción de diferentes enzimas capaces de inactivar los antibióticos. *Klebsiella*

*pneumoniae* y *Escherichia coli* se encuentran entre las bacterias más relacionadas a resistencia de antibióticos en todo el mundo.

*K. pneumoniae*, un importante microorganismo capaz de presentar una amplia diversidad fenotípica y genética produce infecciones que son en su mayoría oportunistas y nosocomiales. Las enfermedades más comunes generadas por este microorganismo son neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones de heridas. *K. pneumoniae* es intrínsecamente resistente a la ampicilina debido a que posee en su genoma el gen *bla<sub>SHV</sub>*. Asimismo, la mayoría de los genes de resistencia presentados por este patógeno fueron adquiridos mediante la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos. Hay muchos factores por los cuales *K. pneumoniae* pueden causar infecciones, entre ellos, un subconjunto de factores de patogenicidad localizados en el cromosoma que son los que otorgan en gran medida los requisitos básicos para establecer infecciones oportunistas en huéspedes mamíferos (Wyres et al., 2020).

*E. coli* es una bacteria muy versátil que está ampliamente distribuida en diferentes ambientes. Según la clase de infecciones que producen, los aislamientos de *E. coli* patógenos se pueden dividir en *E. coli* diarreogénica (DEC) y en *E. coli* extraintestinal. Las DEC incluyen los patotipos *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (productora de toxina Shiga) (EHEC/STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), dependiendo del sitio de colonización del huésped, mecanismos de virulencia y los síntomas que presenta la infección (Gomes et al., 2016).

*E. coli* extraintestinal, es responsable de infecciones urinarias, sepsis, meningitis, bacteriemias, infecciones de sitio quirúrgico, entre otras (Quiñones et al., 2020). En particular cabe notar que *E. coli* uropatógena (UPEC) es responsable de más del 90% de las infecciones urinarias tanto hospitalarias como comunitarias, siendo el microorganismo más recuperado en las infecciones urinarias ambulatorias (Díaz-Velásquez et al., 2021).

Debido a la gravedad de las enfermedades producidas por estos patógenos, es esencial su aislamiento, identificación y pruebas de susceptibilidad antibiótica, especialmente a  $\beta$ -lactámicos ya que son los antibióticos más utilizados para esta clase de infecciones (Chávez et al., 2020).

## **1.2. Características de los antibióticos más utilizados en infecciones por Enterobacterales**

### **1.2.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos**

#### 1.2.1.1 Generalidades

Los agentes bacterianos están evolucionando tan rápidamente que la industria farmacéutica se vería obligada diariamente, en un escenario ideal, a superar los desafíos que plantean estos microorganismos dado que desarrollan con gran facilidad resistencia a los antibióticos utilizados para combatir las infecciones que producen (Abarca & Herrera, 2001). Esta situación no sucede en la actualidad debido a los costos involucrados en generar nuevos fármacos y al rápido surgimiento de mecanismos de resistencia a los mismos. Algunas de las causas a las que se les puede atribuir esta evolución pueden ser el mal uso de los antibióticos por desconocimiento del agente infeccioso y el uso de antibióticos como aditivos de engorde en alimentos para animales de consumo, entre otras causas (Coppola et al., 2020; Morris & Cerceo, 2020).

Los agentes antimicrobianos más utilizados en el mundo son los  $\beta$ -lactámicos. Estos antibióticos, son capaces de inhibir la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas (enzimas que rompen el anillo  $\beta$ -lactámico, inactivando al antibiótico).

Los  $\beta$ -lactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético y se caracterizan por tener un anillo  $\beta$ -lactámico dentro de su estructura. Tienen efectos bactericidas lentos, relativamente independientes de las concentraciones plasmáticas, son de baja toxicidad y de amplio rango terapéutico. Posteriormente, se fue ampliando el espectro de estos antibióticos teniendo más actividad frente a bacilos Gram negativos (Figura 1). Sin embargo, con la aparición gradual de mecanismos de resistencia adquirida se ha visto limitada su utilidad y validez empírica en determinadas situaciones (De Angelis et al., 2020).

El mecanismo principal de resistencia frente a los  $\beta$ -lactámicos es la producción de  $\beta$ -lactamasas, enzimas capaces de romper el enlace de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (De Angelis et al., 2020).

#### 1.2.1.2 Clasificación

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se dividen según su estructura química en cinco clases químicas principales: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y monobactámicos (Suarez & Guidol, 2009) (Figura 1).



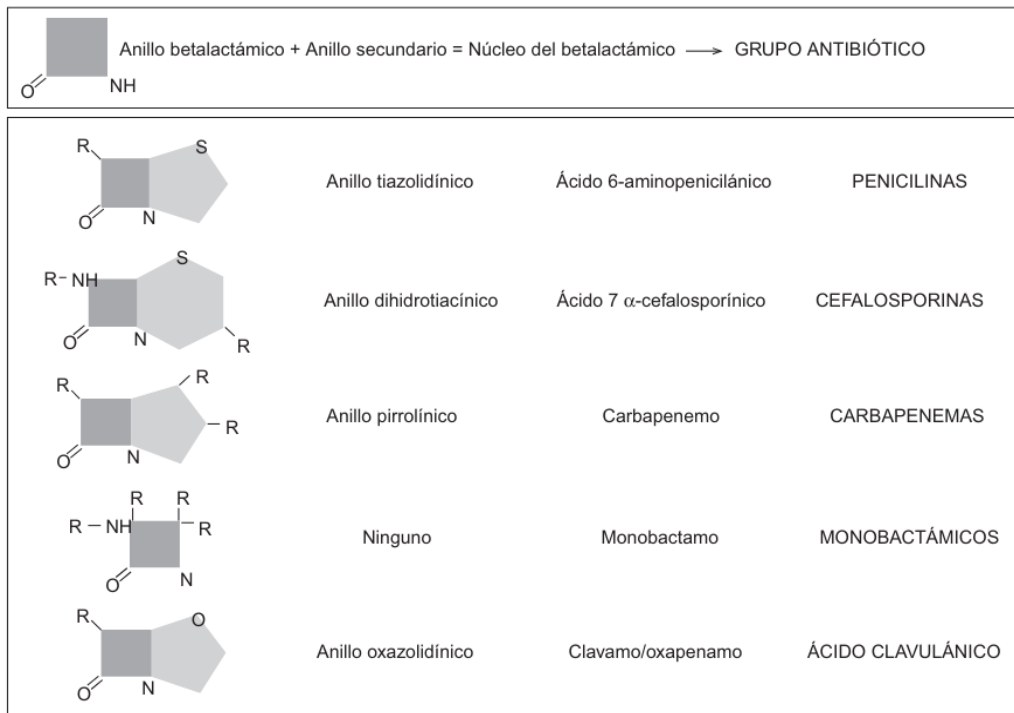


Figura 1. Estructura química de los  $\beta$ -lactámicos incluyendo sólo los inhibidores que contienen el anillo  $\beta$ -lactámico (Suarez & Guidol, 2009).

#### 1.2.1.2.1 Penicilinas

La penicilina fue el primer antibiótico ampliamente utilizado para tratar infecciones. Se caracterizan por tener el núcleo del ácido 6-aminopenicilánico, que está formado por dos anillos unidos: un anillo de  $\beta$ -lactámicos y un anillo de tiazolidina. Pueden clasificarse en: penicilinas naturales (G y V), penicilinas resistentes a las penicilinasas de *Staphylococcus* sp. (oxacilina, meticilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina) (Suarez & Guidol, 2009).

#### 1.2.1.2.2 Cefalosporinas

Debido a su uso clínico generalizado y tolerabilidad general, las cefalosporinas son una de las clases de antibióticos más utilizadas. Son producidas naturalmente por el hongo *Cephalosporium acremonium*. Comparten mecanismos de acción y una estructura similar con las penicilinas ya que poseen el mismo anillo central. Sin embargo, las cefalosporinas tienen un átomo adicional en el anillo lateral. Estas alteraciones pueden cambiar la actividad antimicrobiana, la resistencia a  $\beta$ -lactamasas o la farmacocinética (Harrison & Batcher, 2008; Chaudhry et al., 2019).

Actualmente las cefalosporinas se dividen en cinco generaciones:

Primera generación: Buena actividad contra bacterias aerobias Gram-positivas y algunos organismos Gram-negativos adquiridos en la comunidad como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Chaudhry et al., 2019). Ejemplos de cefalosporinas de primera generación son cefazolina y cefalotina.

Segunda generación: Presentan mayor espectro de acción contra las bacterias Gram negativas que las cefalosporinas de primera generación (Chaudhry et al., 2019). Dos ejemplos son: ceftaxime y cefuroxime.

Tercera generación: Resultan más eficaces frente a los bacilos Gram negativos y frente a los cocos Gram positivos. Son el tratamiento de elección para combatir infecciones por bacilos Gram negativos susceptibles a dichos antibióticos (Chaudhry et al., 2019). Ejemplos: ceftazidime y cefotaxime.

Cuarta generación: Antibióticos de amplio espectro de actividad, exhiben una estabilidad superior frente a  $\beta$ -lactamasas cromosómicas y plasmídicas de clase C (Chaudhry et al., 2019). Ejemplo: cefepime.

Quinta generación: Las cefalosporinas de quinta generación se desarrollaron para el tratamiento de bacterias multirresistentes con un espectro antibiótico más extendido, como es el caso de las infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) (Bui & Preuss, 2023). Ejemplo: ceftarolina.

#### 1.2.1.2.3 Inhibidores de $\beta$ -lactamasas

Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas son compuestos que tienen en su estructura un anillo  $\beta$ -lactámico y que son capaces de unirse a una  $\beta$ -lactamasa para que no pueda interferir con el  $\beta$ -lactámico utilizado para controlar la infección. Estos compuestos por sí solos, en general, tienen poca capacidad antimicrobiana. Sin embargo, cuando se los combina con un  $\beta$ -lactámico, se observa que la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el  $\beta$ -lactámico en cuestión disminuye drásticamente. Entre las formulaciones de inhibidores de  $\beta$ -lactamasa- $\beta$ -lactámico disponibles se encuentran: Amoxicilina-clavulánico, Ampicilina-sulbactam, Piperacilina-tazobactam y cefoperazona-sulbactam. Estos inhibidores tienen en su estructura un anillo  $\beta$ -lactámico (Drawz & Bronomo, 2010).

#### 1.2.1.2.4 Carbapenemes

Los carbapenemes son un grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizados como “última línea” contra infecciones por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (WHO, 2017). Imipenem, ertapenem y meropenem son los principales carbapenemes disponibles para el tratamiento de infecciones producidas por Enterobacterales.

Se trata de los  $\beta$ -lactámicos más estables ante la presencia de  $\beta$ -lactamasas y con mayor espectro antimicrobiano dentro de la familia. Los carbapenemes fusionan el anillo  $\beta$ -lactámico a un anillo pirrolidínico. Los carbapenémicos exhiben una actividad antimicrobiana más fuerte in vitro que las penicilinas y las cefalosporinas (Hawkey & Livermore, 2012). También se pueden combinar con otros antimicrobianos para tratar infecciones graves, ya que la aparición de patógenos multidrogo-resistentes (MDR) a menudo requiere el tratamiento de los pacientes afectados con múltiples antimicrobianos. Se define como patógeno MDR a aquel microorganismo no sensible al menos a un antimicrobiano de tres o más familias farmacológicas (Peri et al., 2019).

La resistencia a carbapenemes en bacilos Gram negativos constituye una problemática a nivel mundial que va en aumento (Nordmann et al., 2011; Peri et al., 2019).

#### 1.2.1.2.5 Monobactámicos

Los monobactámicos se caracterizan por tener un núcleo monocíclico, lo que lo diferencia de los otros  $\beta$ -lactámicos. Fueron aislados por primera vez de *Chromobacterium violaceum*. Actualmente el aztreonam es el único antibiótico de esta clase disponible (Asbel & Levinson, 2000).

#### 1.2.1.3 Mecanismo de acción de $\beta$ -lactámicos

El peptidoglicano es una parte importante de la pared celular bacteriana que está compuesto por un polímero formado por muchas subunidades idénticas. Es una parte altamente conservada de la envoltura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estructuralmente, el peptidoglicano es una cadena de glicanos compuesta por pequeñas unidades de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico; la parte de la pared celular de N-acetilo está conectada a una cadena pentapeptídica o tetrapeptídica muy conservada (L-alanina-D-isoglutamina-L-lisina-D-alanina-[D-alanina]).

El peptidoglicano que se acaba de formar se une al ya existente mediante la hidrólisis de los enlaces en este último, asegurando así, que la pared celular no estalle debido a la presión osmótica cuando la bacteria está en crecimiento (Sauvage et al., 2008; Sampaio & Gales, 2016).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos interfieren en la formación de la pared celular bacteriana al unirse covalentemente a las transpeptidasas o también llamadas proteínas de unión a penicilina (PBP), enzimas involucradas en la última etapa del entrecruzamiento del peptidoglicano tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas. La reacción final en la síntesis de la pared celular es la transpeptidación, en la que los glicopéptidos lineales se entrecruzan para formar una red tridimensional. Las PBP usan al antibiótico  $\beta$ -lactámico como sustrato ya que anillo  $\beta$ -lactámico es similar al complejo D-alanina-D-alanina del pentapéptido del ácido N-acetilmurámico. Esta acilación de las PBP hace que se detenga el proceso de transpeptidación, lo que resulta en una acumulación de unidades precursoras de la pared celular, lo cual activa el sistema autocatalítico terminando en lisis celular (Zapun et al., 2008; Bush, 2016).

#### 1.2.1.4 Mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos

En las bacterias Gram negativas, las  $\beta$ -lactamasas desempeñan un papel importante en la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las  $\beta$ -lactamasas, codificadas por los genes *bla*, son enzimas antiguas que existían incluso en ausencia de la presión de selección del uso terapéutico de los antibióticos terapéuticos. La historia de las  $\beta$ -lactamasas difícilmente puede describirse sin hacer referencia a la historia de los agentes antibacterianos  $\beta$ -lactámicos, como son las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenemes y los monobactámicos (Bush, 2016).

La primera enzima con actividad  $\beta$ -lactamasa reportada en 1940 fue de *Bacillus coli* (Abraham & Chain, 1940). A medida que la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en patógenos Gram negativos comenzó a identificarse con mayor frecuencia, se demostró que muchas bacterias entéricas producen  $\beta$ -lactamasas cromosómicas específicas de cada especie (Matthew & Hedges, 1976; Labia et al., 1977). Sin embargo, son las  $\beta$ -lactamasas móviles de las bacterias Gram negativas las que representan una amenaza más peligrosa en el empleo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los elementos genéticos transferibles que portan genes codificantes para diversas  $\beta$ -lactamasas se han convertido en el mecanismo más común de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en bacterias Gram negativas, con pocas barreras para la transmisión. Cuando las  $\beta$ -lactamasas se describieron por primera vez en el “factor R” (plásmido conjugativo que poseen genes de resistencia) en 1965, sólo se detectaron unas pocas de estas enzimas, asociadas

con una penicilinasa mutante en RTEM ahora conocida como TEM-1 (Datta & Kontomichalou, 1965; Datta & Richmond, 1966). Estos genes *bla*, posteriormente, se diseminaron en muchas especies de Enterobacterales (Matthew & Hedges, 1976). Posteriormente, se conoció que el gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa se puede obtener horizontalmente de diversas formas, pero principalmente mediante plásmidos. La fácil transmisión del factor R (*bla*<sub>TEM-1</sub>) a una multiplicidad de patógenos Gram negativos se asocia con el desencadenamiento de uno de los periodos más productivos del desarrollo de los antibióticos, especialmente de  $\beta$ -lactámicos. En 1974, los informes sobre la resistencia a la ampicilina en pacientes con meningitis generadas por *Haemophilus influenzae* llevaron al descubrimiento de que estas cepas producían una  $\beta$ -lactamasa adquirida de tipo TEM. En ese momento, la ampicilina era el tratamiento mayormente utilizado para el tratamiento de sepsis o meningitis pediátrica causada por *H. influenzae* tipo b, y las nuevas cepas productoras de TEM ya no respondían a los niveles terapéuticos de ampicilina (Medeiros & O'Brien, 1975). A finales de la década de los 80s, tanto en EE. UU. como en Europa, se comenzaron a describir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), casi todas variantes de TEM y también de la enzima SHV (Kliebe et al., 1985; Sirot et al., 1987; Meyer et al., 1993).

Las primeras cepas productoras de BLEE eran resistentes a las penicilinas y a la mayoría de las cefalosporinas, pero susceptibles a las combinaciones con inhibidores, característica generalmente usada para identificar fenotípicamente a los aislamientos productores de BLEE (Zhou & Huang, 1994). Las cepas productoras de TEM y SHV han ido disminuyendo, siendo reemplazadas por cepas productoras de BLEE de la familia CTX-M, que contribuyen de manera significativa a la resistencia a múltiples fármacos en muchas bacterias Gram negativas (Peirano et al., 2012; Barrios et al., 2017). Las enzimas CTX-M están estrechamente relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*, género que no está asociado generalmente con enfermedades clínicas (Decousser et al., 2001; Humeniuk et al., 2002).

Debido a que las cepas productoras de BLEE se hicieron cada vez más frecuentes en pacientes hospitalizados, los carbapenémicos se comenzaron a usar en los hospitales para hacerle frente a las infecciones causadas por estos microorganismos (Rahal et al., 1998). El uso de estos antibióticos contribuyó a que se detectara cada vez con más frecuencia la resistencia a los mismos (Elshamy & Aboshanab, 2020). Las carbapenemasas siguen siendo el principal mecanismo de resistencia a los carbapenemes en las bacterias Gram negativas. En un principio, se las consideraba como  $\beta$ -lactamasas no tradicionales con contenido de zinc, clínicamente irrelevantes, que sólo se evidenciaban en aislados clínicos ocasionales (Cullmann & Dick, 1990; Bottone, 2010). Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar a

prácticamente todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Si bien algunas enzimas pueden estar codificadas desde el cromosoma, la gran mayoría están codificadas por elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones), lo cual les confiere alto poder de diseminación entre agentes bacterianos. A su vez los elementos genéticos móviles donde se encuentran los genes de carbapenemasas, pueden portar genes de resistencia a otras clases de antibióticos (Martínez-Martínez & González-López, 2014). Las carbapenemasas se pueden clasificar en tres clases diferentes según su sitio catalítico y el sustrato que hidrolizan (Elshamy & Aboshanab, 2020).

Clase A: Se han descubierto varias de estas enzimas, algunas están codificadas cromosómicamente (NmcA, SME, IMI-1 y SFC-1), las demás están codificadas por plásmidos (KPC y derivadas de GES). Lo que tienen en común estas enzimas es que todas hidrolizan activamente los carbapenemes y son parcialmente inhibidas por ácido clavulánico (Elshamy & Aboshanab, 2020). Las enzimas KPC son las más frecuentes y a los pocos años de su descubrimiento se habían extendido a nivel global provocando importantes brotes. La problemática de estas carbapenemasas radica en que sus genes están localizados en plásmidos contenidos con alta frecuencia con *K. pneumoniae*, microorganismo que se caracteriza por poseer y acumular genes de resistencia a diferentes antibióticos (Halat & Moubareck, 2020).

La primera enzima identificada, KPC-1, se obtuvo de un aislamiento de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte en 1996 (Yigit et al., 2001). Es una enzima que hidroliza carbapenémicos aparte de penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. Poco después de la identificación de KPC-1, se produjeron brotes de *K. pneumoniae* productora de KPC-2 y KPC-3 (Woodford et al., 2004; Bratu et al., 2005) que se continuaron aislando en los Estados Unidos, por ejemplo, y propagándose entre otros géneros de Enterobacterales debido a la expansión clonal y a la transferencia horizontal de genes (Deshpande et al., 2006). En unos pocos años, las bacterias productoras de KPC se globalizaron. Se han descrito 201 variantes (abril 2024, <http://bldb.eu/Enzymes.php>), siendo, KPC-2 y KPC-3 las más prevalentes. En *K. pneumoniae* la propagación global del gen  $bla_{KPC}$  ha estado asociada con un clon importante (secuenciotipo ST-258) que se desempeñó como un transportador exitoso de dicha carbapenemasa (Naas et al., 2016).

La identificación de cepas productoras de carbapenemasas KPC a principios de la década de 2000 (Yigit et al., 2001; Yigit et al., 2003) condujo a epidemias a nivel global (Bradford et al., 2004; Leavitt et al., 2007). Aunque estas enzimas pueden estar presentes en casi todos los patógenos Gram negativos, se detectan principalmente en *K. pneumoniae* (Kazmierczak et al., 2016; van Duin & Doi, 2017).

Clase B: Las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) son clínicamente carbapenemasas relevantes. Presentan actividad sobre una gama amplia de antibióticos, además de los carbapenémicos, la mayoría de estas enzimas hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, pero no hidrolizan monobactámicos. Las MBL se pueden inhibir por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un quelante de  $Zn^{2+}$  y otros cationes divalentes. El mecanismo de hidrólisis depende de la interacción de los fármacos  $\beta$ -lactámicos con los iones de zinc en el sitio activo de la enzima. Se pueden encontrar MBL en diferentes especies de bacterias Gram negativas, lo que contribuye a que las infecciones provocadas por microorganismos productores de MBL, sean cada vez más difíciles de tratar ya que se agotan las posibles opciones terapéuticas (Bush & Bradford, 2020; Halat & Moubareck, 2020.).

Las MBL se pueden clasificar en subclases: B1, B2 y B3. La mayor cantidad de las enzimas clínicamente relevantes pertenecen a la subclase B1, como las enzimas VIM, IMP y NDM. Los genes que codifican estas enzimas suelen encontrarse en diferentes estructuras, se pueden asociar a integrones, que, a su vez se pueden asociar en plásmidos o transposones, lo que facilita su transferencia entre especies bacterianas (Bush & Bradford, 2020).

Las MBL de Nueva Delhi (NDM) son las carbapenemasas más frecuentes y constituyen un mecanismo de resistencia antibiótica que genera preocupación por varios motivos, los principales son: (I) se encontró que en la gran mayoría de las cepas portadoras de NDM su gen codificante se encuentra albergado en plásmidos conjugativos, lo que permite que el gen de resistencia se transmita fácilmente de una bacteria a otra, (II) que es muy probable que haya muchas personas que funcionan como portadores asintomáticos no reconocidos de bacterias productoras de NDM y (III) la falta de antibióticos efectivos para el tratamiento de infecciones por este tipo de bacterias. La dramática propagación global de cepas productoras de NDM sigue siendo uno de los eventos de resistencia a los antibióticos más preocupantes (Rolain et al., 2010, Pérez-López et al., 2020). Se han identificado hasta la fecha 61 variantes en este grupo (abril 2024, <http://bldb.eu/Enzymes.php>). Los genes *bla*<sub>NDM</sub> son predominantes en aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli*, pero también se han encontrado asociados a *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Pitout et al., 2008; Poirel et al., 2010). La principal variante de la enzima NDM, es la denominada NDM-1 (Hornsey et al., 2011; Bush & Bradford, 2020). La enzima original, NDM-1, se identificó por primera vez en un aislamiento de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes recuperado de la orina de un paciente sueco que había viajado a Nueva Delhi, India. Se encontró que *bla*<sub>NDM-1</sub> es transferible y codifica para una enzima que comparte poca identidad con

otras MBL, siendo las más similares VIM-1/VIM-2, con sólo un 32,4% de similitud (Halat & Moubareck, 2020).

La propagación de plásmidos que codificaban MBL distintas a NDM-1 había recibido poca atención en muchas regiones a principios de siglo, incluso en países donde se habían producido brotes localizados producidos por aislamientos con VIM-1, como en Grecia, con IMP-8 en Taiwán y con IMP-1 en Japón (Fukigai et al., 2007; Liao et al., 2011; Zagorianou et al., 2012).

Clase D: Las  $\beta$ -lactamasas de clase D, también conocidas como enzimas de tipo OXA u oxacilinasas, están representadas por más de 1222 enzimas genéticamente diversas que están ampliamente diseminadas entre las bacterias Gram negativas (abril 2024, <http://bldb.eu/Enzymes.php>). Se llaman oxacilinasas porque generalmente hidrolizan las isoxazolilpenicilinas (oxacilina, meticilina y cloxacilina) mucho más rápido que las penicilinas clásicas y frente a las cefalosporinas de primera generación son relativamente menos efectivas (Antunes et al., 2014). Estas serin- $\beta$ -lactamasas son pobremente inhibidas por EDTA o ácido clavulánico y tienen una actividad débil frente a los carbapenémicos. Son principalmente encontradas en organismos como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* (Antunes et al., 2014). Basándose en la identidad de su secuencia de aminoácidos, las oxacilinasas se han subdividido en varios subgrupos. Dentro de estas, las enzimas pertenecientes a los grupos OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58 y OXA-143 son de gran importancia clínica debido a su amplia diseminación en patógenos bacterianos (Halat & Moubareck, 2020). Cabe mencionar que, OXA-23, primera  $\beta$ -lactamasa de tipo OXA resistente a carbapenémicos detectada, fue descubierta en 1995 en un plásmido de *A. baumannii* multirresistente a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados (Escocia), el mismo año que el imipenem fue aprobado para uso clínico (Scaife et al., 1995). En los años siguientes, se siguieron describiendo más oxacilinasas tanto en *A. baumannii* como en otras especies (Sevillano et al., 2006, Halat & Moubareck 2020).

Por otra parte, OXA-48, carbapenemasa de clase D conocida por estar muy relacionada con *K. pneumoniae* también se ha propagado entre otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Giani et al., 2012; Cuzon et al., 2015; Bush & Bradford, 2020).

La enzima OXA-48, que se encuentra en Enterobacterales multirresistentes, hidroliza lentamente los carbapenemes y las cefalosporinas de espectro expandido y es poco inhibida por la mayoría de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, a excepción del avibactam (inhibidor no  $\beta$ -lactámico) (Sader et al., 2018).



### 1.2.1.5 Epidemiología

La amenaza de enterobacterias productoras de carbapenemasas (ECP) es considerable, ya que los carbapenemes se utilizan generalmente en el tratamiento de infecciones causadas por bacilos Gram negativos productores de BLEE como se ha mencionado y, hasta la fecha, siguen siendo una de las últimas líneas de defensa contra estos microorganismos, junto con aminoglucósidos, fosfomicina, colistina, y combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores. Así mismo, es muy común que los aislamientos productores de carbapenemasas posean mecanismos adicionales de resistencia a otras clases de antibióticos (van Duin & Doi, 2017).

En cuanto a las diferentes carbapenemasas, KPC está ampliamente distribuida en todo el mundo y asociada con miembros del orden Enterobacterales. La primera cepa productora de KPC se aisló en Estados Unidos, en un paciente en Carolina del Norte (Yigit et al., 2001) y los aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de esta enzima en dicho país alcanzó su punto máximo en 2006 con un 36% de prevalencia (Abdallah et al., 2016). Los aislamientos productores de KPC también se extendieron en Sudamérica y Centroamérica. En un estudio observacional multinacional que abarcó siete países latinoamericanos (Argentina, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú y Venezuela), se incluyeron 255 pacientes con infecciones del torrente sanguíneo causadas por Enterobacterales. De estos pacientes, el 21% presentó aislamientos de EPC, que en su mayoría eran productores de KPC (83%). Estos últimos, correspondieron en su mayoría a clones de *K. pneumoniae*, la especie de la familia *Enterobacteriaceae* más comúnmente recuperada (Villegas et al., 2016). En Europa, la mayor incidencia de EPC productores de KPC ocurrió en Italia y Grecia. Estos dos países europeos en 2014-2015 contaron con una "situación endémica" de KPC. A pesar de que posteriormente se encontraron otras carbapenemasas en Italia y en Grecia, KPC sigue siendo la enzima más frecuente en Enterobacterales (Albiger et al., 2015; Bush & Bradford, 2020).

Las enzimas KPC también se han descrito en Asia, especialmente en China. En un estudio de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenemes de Shanghai, la mayoría de las EPC producían KPC (Zhang et al., 2015). Por el contrario, esta enzima se encontró con poca frecuencia en enterobacterias en pacientes de India, en los que estaba presente principalmente la carbapenamasa NDM (Kazi et al., 2015).

En relación con datos sobre África, en un reporte sobre la epidemiología de microorganismos productores de la enzima KPC se encontró una incidencia variable dependiendo del lugar donde se observe, dado que en el norte de África la prevalencia tiende a ser mayor que en el sur (Brink et al., 2012).

En relación con carbapenemasas de tipo MBL, si bien están distribuidas a nivel mundial, tienen una gran incidencia en Asia. El aislamiento presentaba resistencia a los carbapenemes y a la nueva carbapenemasa se le denominó NDM-1. Desde entonces, los Enterobacteriales *bla*<sub>NDM-1</sub> positivos se volvieron cada vez más frecuentes en India (Yong et al., 2009). Los estudios de seguimiento mostraron que este mecanismo de resistencia se extendió rápidamente no solo en India, sino también en Pakistán y Bangladesh (Kumarasamy et al., 2010). Posteriormente, se reportó con menor frecuencia en otros países de Asia como en China (Wang et al., 2016). En Europa, la mayoría de los productores de MBL se han encontrado en Rumanía, Polonia y Dinamarca, países considerados de transmisión moderada. Los brotes comunes, en estos casos, incluyeron aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* (Albiger et al., 2015). Por otro lado, en 2012, se produjo en Denver, Estados Unidos, un brote de *K. pneumoniae* productora de NDM-1. Presumiblemente, el éxito de transmisión de los aislamientos haya sido causado por los pacientes asintomáticos colonizados (CDC, 2012). En otro informe, en Illinois se encontró que un brote de EPC que producían NDM-1 estaba asociado con el uso de endoscopios (CDC, 2013). Hasta abril de 2016, se habían notificado a los CDC 157 casos de EPC que producían NDM en 25 estados (CDC, 2016).

Por otro lado, las EPC que producen VIM e IMP presentan una diseminación limitada; según los CDC, sólo hubo 17 aislamientos de siete estados y hasta abril de 2016, se habían reportado 10 brotes en 5 estados (CDC, 2016). Las MBL siguen siendo una causa típica de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacteriaceae* en Estados Unidos y Canadá (Rasheed et al., 2013; Bush & Bradford, 2020). También se han informado casos en países latinoamericanos. En un estudio internacional entre 2012-2014, se recuperaron EPC productores de VIM-23 de México y productores de NDM-1 de Venezuela (Kazmierczak et al., 2016). En un estudio multinacional en siete países latinoamericanos, el 9% y el 8% de los EPC producían VIM y NDM, respectivamente (Villegas et al., 2016).

Han surgido casos de MBL en pacientes infectados por EPC en varios países africanos durante las últimas décadas. El primer caso de NDM-1 se informó en Sudáfrica en 2010 (Lowman et al., 2011). Posteriormente, se encontraron cepas que producían NDM y VIM en Kenia, Nigeria y Sudáfrica (Kazmierczak et al., 2016). También se encontraron reportes en otros países del continente africano, como en Tanzania, Egipto, Marruecos, Argelia, Camerún (Mushi et al., 2014; Poirel et al., 2011; Sassi et al., 2014; Dortet et al., 2012).

Con respecto a otra carbapenemasa de interés, OXA-48 se identificó por primera vez en *K. pneumoniae* (Turquía en 2001), como se mencionó previamente (Poirel et al.,

2004). Los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de OXA-48 persistieron y fueron responsables de gran parte de las infecciones nosocomiales en los años posteriores (Baran & Aksu, 2016). En Europa, se han encontrado con frecuencia estos microorganismos especialmente en los países mediterráneos (Poirel et al., 2012). Es destacable que este mecanismo de resistencia se ha diseminado en el orden Enterobacterales en todo el mundo. Las regiones donde una gran cantidad de EPC producen OXA-48 incluyen Medio Oriente como los Emiratos Árabes Unidos, Arabia Saudita, Israel, Líbano (Al-Agamy et al., 2013; Lafeuille et al., 2013; Adler et al., 2015; Ahn et al., 2015); África como Libia, Egipto, Argelia, Marruecos, Sudáfrica (Brink et al., 2013; Poirel et al., 2013; Hammoudi et al., 2014; Barguigua et al., 2015; Cuzon et al., 2015); Asia como Rusia, India, China, Taiwán, Tailandia (Lascols et al., 2011; Fursova et al., 2015; Liu et al., 2015; Ma et al., 2015; Lunha et al., 2016); y América del Sur como, por ejemplo, Colombia y Brasil (Pereira et al., 2015; Ocampo et al., 2016).

### 1.2.2 Aminoglucósidos

#### 1.2.2.1 Generalidades

Al ser potentes antibióticos de amplio espectro, los aminoglucósidos se usan tanto para infecciones causadas por bacterias Gram negativas como por Gram positivas. Su composición química está formada por un anillo de aminoalcohol y moléculas de aminoazúcar unidas por un enlace de azúcar ligando. Estos grupos amino con carga positiva interactúan con moléculas con carga negativa, especialmente el ARNr de las subunidades ribosomales 30S y 50S de las células bacterianas, inhibiendo así la síntesis de proteínas y causando la muerte celular (Ramirez & Tolmasky, 2010; van Duijkeren et al., 2019).

Cuando en 1943 se descubrió la estreptomina, proveniente de *Streptomyces griseus* y se utilizó como fármaco específico para el tratamiento de la tuberculosis, se iniciaron nuevas investigaciones sobre los aminoglucósidos. En la década de los 1970, los aminoglucósidos semisintéticos dibekacina, amikacina y netilmicina se mostraron prometedores para encontrar terapias combinadas contra cepas que habían desarrollado resistencia a los primeros aminoglucósidos. Sin embargo, desde entonces, el desarrollo de nuevos aminoglucósidos ha disminuido significativamente. Hoy en día se utilizan aminoglucósidos naturales, como la estreptomina, kanamicina y gentamicina, y aminoglucósidos semisintéticos como amikacina, etilmicina y netilmicina (Mingeot-Leclercq et al., 1999; Zhang et al., 2023). Los aminoglucósidos se usan como agentes únicos o en combinación con otros antibióticos para tratar una variedad de

infecciones. Para algunas enfermedades, como la lepra, los aminoglucósidos por sí solos siguen siendo fármacos eficaces. Sin embargo, también funcionan bien con otros grupos de antibióticos y se pueden utilizar en terapia empírica combinada frente a infecciones graves causadas por microorganismos MDR. Cabe mencionar que los aminoglucósidos tienen efectos adversos irreversibles que limitan su uso, como la nefrotoxicidad, neurotoxicidad y otras reacciones alérgicas (von Wintersdorff et al., 2016; Krause et al., 2016).

Según sus propiedades químicas se dividen en diferentes grupos: 2-desoxiestrepamina (DOS) 4,6-disustituida; DOS 4,5-sustituida, DOS monosustituida. Los aminoglucósidos de mayor importancia médica pertenecen a las 2-desoxiestreptaminas (DOS) 4,6-disustituidas (Wachino & Arakawa, 2012).

#### 1.2.2.2 Mecanismo de acción

Una vez que los aminoglucósidos penetran en el citoplasma bacteriano, los aminoglucósidos alteran y bloquean la síntesis de proteínas. La unión de un ARNt afín al sitio A de la unidad ribosómica 30S se compone de dos eventos distintos. El primero (estado de reposo), donde se identifica el ARNt afín en una reacción de equilibrio rápida y un segundo paso que conduce a una unión firme que permite un ajuste preciso del ARNt dentro del sitio A (estado de decodificación). Los aminoglucósidos se unen al sitio A estabilizando una conformación del bucle interno muy similar al estado de decodificación con los A1492 y A1493 hacia fuera del bucle interno. Esto permite que otros ARNt se unan al ribosoma, por lo que causan defectos en la traducción del ARNm y la síntesis de proteínas defectuosas (Shandrick et al., 2004).

#### 1.2.2.3 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia más importantes que afectan a los aminoglucósidos son:

Alteración de los sitios de unión ribosómica: la alteración de los sitios de unión al ribosoma ocurre mediante acción de metiltransferasas: NpmA, ArmA y las variantes pertenecientes a la familia Rmt (RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG y RmtH). La metilación de las bases de unión del ARNr 16S reduce las interacciones de los aminoglucósidos con sus sitios de unión. Este sistema es muy eficaz porque altera todas las copias del ARNr 16S de la célula, confiriendo una resistencia significativa a todos los miembros de esta familia (Wachino & Arakawa, 2012).

Disminución de la captación y acumulación del fármaco: la reducción de la absorción de fármacos, especialmente en bacterias Gram negativas, está dada como resultado de una disminución en la permeabilidad de la membrana externa, especialmente con cambios en la expresión de porinas o mutaciones en los genes para las porinas. Tiene relevancia desde el punto de vista clínico, ya que afecta a todos los aminoglucósidos y da lugar a un nivel moderado de resistencia (Wang et al., 2022).

Enzimas modificadoras de aminoglucósidos: las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos catalizan modificaciones covalentes de grupos amino o hidroxilo en la molécula antibiótica, lo que da lugar a un fármaco químicamente modificado que se une de manera incorrecta a los ribosomas. Este fenómeno suele dar lugar a distintos niveles de resistencia. Las enzimas que modifican los aminoglucósidos son las N-acetiltransferasas (AAC), que utilizan acetil-coenzima A como donante y afectan a los grupos amino, las O-nucleotidiltransferasas (ANT) y las O-fosfotransferasas (APH), que utilizan ATP como donante y afectan a los grupos hidroxilo.

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos y las metiltransferasas suelen estar generalmente codificadas en plásmidos. El intercambio de plásmidos facilita la rápida adquisición de genes de resistencia a estos antibióticos no sólo dentro de una especie determinada, sino entre una gran variedad de especies bacterianas (Wang et al., 2022).

#### 1.2.2.4 Epidemiología

En 2003 se encontró la primera cepa clínica de *K. pneumoniae* que tenía el gen *armA* y un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* con *rtmA* en su genoma. Desde entonces, la detección de metilasas ha ido en aumento. Se ha observado que en los microorganismos involucrados los genes que codifican metilasas se encuentran junto a otros genes de resistencia antibiótica, en particular genes que codifican para BLEE o carbapenemasas (especialmente con MBL), lo que finalmente termina reduciendo las opciones terapéuticas disponibles (Zhang et al., 2023; Bodendoerfer et al., 2020).

En 2018, mediante un estudio realizado en nuestro país, se detectaron las dos primeras cepas de *A. baumannii* con el gen *rmtC*, junto a enzimas del tipo OXA-23 y OXA-51 (Bado et al., 2018).

### 1.2.3 Fosfomicina

#### 1.2.3.1 Generalidades

Debido a los problemas ocasionados por la diseminación de patógenos MDR y ante la falta de nuevos fármacos para combatir las infecciones causadas por estos patógenos, la fosfomicina es un antibiótico antiguo que se ha vuelto a emplear en la práctica clínica en los últimos años. Es un antibiótico que ha ganado reconocimiento por su capacidad para combatir infecciones causadas tanto por bacterias Gram positivas como por Gram negativas MDR (Aghamali et al., 2019). La fosfomicina fue descubierta en 1969, siendo un análogo del fosfoenolpiruvato (PEP) producido por *Streptomyces* spp. (Hendlin et al., 1969). La estructura de la fosfomicina tiene dos características clave: un grupo epóxido, esencial para su actividad biológica, y un resto de ácido fosfónico (Saiprasad et al., 2016).

#### 1.2.3.2 Mecanismo de acción

La fosfomicina es un antibiótico bactericida que inhibe el primer paso en la vía de síntesis del peptidoglicano, lo que provoca la lisis y muerte de las células bacterianas. Como análogo del PEP, la fosfomicina se une a MurA, una proteína importante en la biosíntesis del peptidoglicano, ya que se encarga de transferir el enolpiruvil de PEP al grupo 3'-hidroxilo de UDP- N-acetilglucosamina. Por lo tanto, se inhibe la formación de ácido N-acetilmurámico a partir de N-acetilglucosamina y fosfoenolpiruvato, lo que provoca la muerte celular. De hecho, la fosfomicina actúa sobre el sitio activo de MurA para inhibir la proteína formando un enlace tioéter con Cys115, un residuo clave en el sitio activo. La fosfomicina utiliza los sistemas de transporte de glicerol-3-fosfato (GlpT) y de transporte de absorción de hexosa fosfato (UhpT) como vías de entrada para generar la lisis de la membrana en las células bacterianas (Castañeda-García et al., 2013; Sastry & Doi, 2016).

#### 1.2.3.3 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana a la fosfomicina se produce a través de tres mecanismos; permeabilidad reducida, modificación del antibiótico y modificación de MurA:

Permeabilidad reducida: El principal mecanismo para la adquisición de resistencia a fosfomicina es una inactivación en las vías de transporte o captación de fosfonato. Las

mutaciones en cualquiera de los genes que controlan estas vías pueden reducir la absorción del antibiótico, confiriendo así diversos grados de resistencia a la fosfomicina (Falagas et al., 2016).

Modificación del antibiótico: Varias enzimas inhiben a la fosfomicina a través de diferentes modificaciones que escinden el enlace carbono-oxígeno de la fracción epóxido, incluidas las fosfonato quinasas FomA y FomB y las tiol-transferasas, glutatión-transferasas (FosA), L-cisteína-transferasas (FosB), ATP-transferasas (FosC) y FosX, que catalizan la adición de glutatión o cisteína a la fosfomicina. Las enzimas FosA y derivadas son importantes en Enterobacterales. FosA y derivadas, FosA3, FosA4, FosA5 y de FosC2 se encuentran codificados en plásmidos lo que contribuyó a su diseminación mundial (Fillgrove et al., 2003).

Modificación de MurA: En algunas bacterias patógenas los residuos de Asp que están presentes en el sitio catalítico de MurA, pueden sufrir mutaciones, como la mutación de Asp a Glu que confiere resistencia a fosfomicina (Falagas et al., 2016).

#### 1.2.3.4 Epidemiología

Los primeros datos del surgimiento de resistencia a la fosfomicina se ubican en el año 1977, las tasas de resistencia han variado entre países (Dulaney & Ruby, 1977). Actualmente, no todos los países reportan resistencia a fosfomicina (Aghamali et al., 2019).

Distintos estudios a nivel global demuestran que la resistencia a fosfomicina no es relevante por el momento y la mayoría de los aislamientos analizados se muestran sensibles a este antibiótico (Aghamali et al., 2019; Souza et al., 2015). En nuestro país, actualmente tenemos una baja incidencia de resistencia a fosfomicina. Según un estudio donde se involucraron muestras de todo el país, se obtuvo que ningún departamento superaba el 10% de resistencia (Acevedo et al., 2022).

En los microorganismos resistentes a fosfomicina se ha detectado la enzima FosA3. Actualmente, FosA3 es una enzima distribuida entre aislamientos clínicos y no clínicos de *E. coli* de diversos países a nivel mundial y también ha sido detectada en nuestro país (Villa et al., 2015; García-Fulgueiras et al., 2022).

En Asia, investigaciones de más de una década muestran que la resistencia general a la fosfomicina era mayor en China que en cualquier otro lugar del mundo, tanto en humanos como en animales. Un estudio realizado en Hong Kong mostraba que la proporción de aislamientos de *E. coli* que portaban el gen *fosA3* en poblaciones humanas era de alrededor del 5% y en animales entre el 1% y el 5% dependiendo de la especie (Ho et al., 2013; Ho et al., 2014).

A partir del año 2010, la resistencia a la fosfomicina, que se había informado principalmente en países asiáticos surgió en las Américas. En Estados Unidos, en la última década, la susceptibilidad a fosfomicina se encontraba en el entorno del 90% (Neuner et al., 2012; Aghamali et al., 2019) y se reportó la primera detección del gen *fosA3* en un aislamiento de *E. coli* de origen clínico que presentaba resistencia a fosfomicina (Alrowais et al., 2015).

Con relación a América Latina, los datos concuerdan con los reportados en Estados Unidos ya que países como Argentina, Brasil y México presentan una susceptibilidad a la fosfomicina mayor al 95% (Morfin-Otero et al., 2013; Villar et al., 2014; Souza et al., 2015).

Las investigaciones muestran que la resistencia a la fosfomicina es baja en los países europeos, independientemente de los años de uso de este antibiótico (Maraki et al., 2009; den Heijer et al., 2010; Kamenski et al., 2012; Kresken et al., 2014; Passadouro et al., 2014; Aghamali et al., 2019).

En África la resistencia global a la fosfomicina presenta mayor variabilidad según el país involucrado (Aghamali et al., 2019).

#### 1.2.4 Colistina

##### 1.2.4.1 Generalidades

La colistina o polimixina E, es un péptido antimicrobiano policatiónico, descubierto a finales de la década de los 40 en Japón, producido por *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*. Pertenece a la clase de antibióticos polimixina, clase que posee propiedades hidrofílicas y lipofílicas. El grupo de las polimixinas incluye cinco compuestos químicos diferentes (polimixinas A, B, C, D y E). Sin embargo, sólo dos polimixinas se usan a nivel clínico: polimixina B y colistina. Ambas tienen una actividad bactericida rápida y dependiente de la concentración (Gallardo-Godoy et al., 2016)

La colistina se utilizó por primera vez en medicina humana y veterinaria en los 50s, pero entre los años 1970 y 1980 su uso médico fue limitado, debido a su alta toxicidad. En las últimas décadas, la colistina se ha empezado a utilizar nuevamente como último



recurso en medicina humana para tratar infecciones por Gram negativos, especialmente enterobacterias productoras de carbapenemasas, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Biswas et al., 2012; Azzopardi et al., 2013).

#### 1.2.4.2 Mecanismo de acción

La colistina es una molécula bactericida dirigida contra la mayor parte de los bacilos Gram negativos, pero ineficaz contra bacterias Gram positivas, bacterias anaeróbicas y micoplasmas. Afectan directamente el lipopolisacárido de las membranas: el lípido A. El componente exterior del LPS está cargado negativamente e interactúa con cationes, principalmente  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , permitiendo la estabilización de la membrana externa. La colistina, una molécula con carga neta positiva, tiene una fuerte afinidad para unirse al LPS, lo que provoca un desplazamiento de cationes por interacción electrostática. Esto da como resultado una desorganización de la estructura de la membrana. Posteriormente, la colistina se introduce en la membrana externa a través de su cadena de ácido lipófilo. La colistina altera la permeabilidad de la membrana externa, para luego insertarse y llegar a la membrana interna. Luego se produce una desorganización de esta membrana al romper la integridad de la bicapa de fosfolípidos. Finalmente, ocurre lisis con liberación del contenido intracelular y la muerte de las células bacterianas (Poirel et al., 2017; Ahmed et al., 2020).

#### 1.2.4.3 Mecanismos de resistencia

Hasta 2015, se conocía que la resistencia a colistina estaba dada por mutaciones puntuales cromosómicas (Poirel et al., 2017). Posteriormente, se descubrió que la resistencia a este antibiótico ocurre principalmente por:

Modificaciones de la membrana externa mediante la alteración del LPS y la reducción de su carga negativa: Algunos microorganismos desarrollan naturalmente resistencia a las polimixinas a través de la sustitución de cationes en el LPS. Este mecanismo inhibitor afecta la expresión del operón *pmrHFIJKLM* y del gen *pmrE*, ambos responsables de la síntesis del grupo L-aminoarabinosa (L-Ara4N) y su fijación al lípido A (Poirel et al., 2017).

Sobreproducción de polisacárido de la cápsula: En *K. pneumoniae* se ha descrito que la sobreproducción y desprendimiento de polisacárido capsular aniónico impide a la colistina llegar al lípido A en la membrana externa (Llobet et al., 2008).

Genes de resistencia transferible: La eficacia clínica de colistina ha disminuido en los últimos años debido a la aparición de genes de resistencia transferible a la colistina (*mcr*) que se encuentran codificados en plásmidos. Éstos incluyen desde el *mcr-1* al *mcr-10*. Los genes *mcr* codifican una fosfoetanolamina transferasa que cataliza la adición de fosfoetanolamina al grupo fosfato del lípido A, reduciendo la carga negativa de la membrana externa bacteriana y atenuando así su afinidad por la colistina (Wang et al., 2020).

#### 1.2.4.4 Epidemiología

Entre los genes de la familia *mcr*, *mcr-1* y *mcr-9* son los más comunes a nivel mundial y han sido identificados en numerosos países, siendo considerados marcadores de resistencia a la colistina. Los siguientes genes en frecuencia son *mcr-3* y *mcr-5* y otros alelos se concentran en regiones pequeñas, *mcr-4*, *mcr-2*, *mcr-7*, entre otros.

Los niveles de resistencia a colistina en nuestro país presentan baja incidencia, sin embargo, se ha detectado la presencia de *mcr-1* en aislamientos de origen clínico (Papa-Ezdra et al., 2020).

### **1.3. Caracterización de aislamientos y movilidad de los genes que generan resistencia**

La tipificación de secuencias *multilocus* (MLST, por sus siglas en inglés) es un procedimiento en el cual se caracterizan aislamientos de una misma especie utilizando siete genes conservados. Para cada gen constitutivo, las diferentes secuencias de una especie bacteriana se asignan como alelos distintos y, para cada aislamiento, los alelos en cada uno de los siete loci definen el perfil alélico o tipo de secuencia (ST). Por lo tanto, cada aislamiento se caracteriza por una serie de siete números enteros que corresponden a los alelos en los siete loci conservados. La importancia de realizar MLST radica en que permite identificar clones y/o líneas clonales dentro de una especie, lo que permite estudiar los diferentes linajes de poblaciones bacterianas. Esto a su vez, permite realizar estudios epidemiológicos de la especie bacteriana (Blanchard et al., 2018). Cabe mencionar que el ST258 es un secuenciotipo importante en *K. pneumoniae* debido a que se cree que fue el gran responsable de los orígenes de la diseminación mundial de este patógeno especialmente en América del Norte, América del Sur y Europa (Wyres et al., 2019; Andrey et al., 2020; Soria, 2021).

Entre las cepas de *E. coli*, se destacan los secuenciotipos exitosos ST131, ST69, ST95 y ST73. Estos secuenciotipos están asociados a cepas que contienen varios genes de resistencia a antimicrobianos, los cuales son causantes de la mayoría de las infecciones intrahospitalarias (Bengtsson et al., 2012).

#### **1.4. Identificación de clones por electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)**

Otra herramienta para la caracterización de aislamientos que se combina con los datos de ST es la determinación de la presencia de clones mediante PFGE. Esta técnica se utiliza para realizar análisis epidemiológicos y consiste en estudiar los fragmentos de ADN en una electroforesis generados por enzimas de restricción de corte poco frecuente. Una vez que los fragmentos de ADN son separados, se puede identificar un patrón para cada cepa y compararlos con los otros aislamientos. Este patrón detecta pequeñas variaciones en el genoma bacteriano y es generado debido a los cambios del campo eléctrico al que es sometido el gel. Mediante estas comparaciones se obtienen un panorama cromosómico general, lo que permite entre otras cosas, obtener datos epidemiológicos del cepario (Goering, 2010).

#### **1.5. Diseminación de los mecanismos de resistencia**

Un elemento más en la caracterización de los aislamientos es evaluar la diseminación de los mecanismos de resistencia involucrados. Se define como resistoma al conjunto de genes que directa o indirectamente, inciden en la resistencia de una cepa dada frente a distintos antibióticos. El resistoma puede ser afectado por varios factores como la incidencia humana y la agricultura y esto puede llevar a una mayor facilidad en la transmisión de estos genes de resistencia intra e inter-especies (Perry & Wright, 2013). Esta transmisión se puede realizar mediante la utilización de diferentes mecanismos y elementos genéticos como los plásmidos, secuencias de inserción (IS), integrones, transposones (Tn) y bacteriófagos. Uno de los mecanismos principales en la transmisión de genes de resistencia son los plásmidos. Los plásmidos son moléculas extracromosomales que generalmente tienen un tamaño mucho menor que el cromosoma. Los plásmidos tienen dos cadenas de ADN superenrolladas y se replican independientemente del cromosoma bacteriano. Están normalmente presentes en una gran cantidad de células bacterianas. Dependiendo de su tipo, puede haber de uno a varios plásmidos en una sola célula. Se han identificado diferentes tipos de plásmidos, entre ellos se incluyen los plásmidos conjugativos o sexuales, los cuales se caracterizan

por contener una región *tra* que lleva a cabo el proceso de transferencia del plásmido a otra bacteria (Shintani et al., 2015).

### **1.6. Epidemiología local y vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antimicrobianos $\beta$ -lactámicos (RAM) en Uruguay**

En el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) del Ministerio de Salud Pública de Uruguay se lleva a cabo la vigilancia de microorganismos productores de carbapenemasas. Los laboratorios de análisis clínicos públicos y privados del país, previo a la Ordenanza Ministerial emitida en 2019 (1327/2019), que explicita que deben enviarse las cepas, remitían de forma voluntaria estos aislamientos de acuerdo con los criterios de inclusión preestablecidos (instructivo de envío de muestras al DLSP). Los primeros hallazgos de microorganismos portadores de carbapenemasas en el país fueron: un aislamiento de *K. pneumoniae* ST258 con KPC-2 en 2011 (Márquez et al., 2014); un aislamiento de *P. aeruginosa* con VIM en 2011 (Ingold et al., 2011) y un aislamiento de *Providencia rettgeri* con NDM-1 en 2012 (Fuente de datos: Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública. MSP. Uruguay). Estos tres tipos de carbapenemasas han sido los mayoritariamente detectados en Uruguay desde su aparición, y al igual que en otros países, la detección de la enzima NDM-1 aumentó desplazando a KPC-2 a partir de 2015 (Lopez et al., 2022). Además, se han aislado casos puntuales de *K. pneumoniae* portadora de OXA-48 (ST15, primer caso en 2018) (Araújo-Pírez et al., 2022) y *Serratia marcescens* con SME (primer aislamiento en 2020) (Fuente de datos: Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública. MSP. Uruguay). Por otro lado, el primer aislamiento de una enterobacteria doble productora de carbapenemasas (KPC + NDM) fue de *K. pneumoniae* en 2017 (ST258), con un aumento en el número de casos en 2021 (Fuente de datos: Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública. MSP. Uruguay; López et al., 2022).

En el caso de OXA-23 y OXA-58 en *A. baumannii* fueron detectadas en 2018 y desde entonces la mayoría de los *Acinetobacter spp* poseen OXA-23 (Fuente de datos: Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública. MSP. Uruguay; Bado et al., 2018).

En 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló un Plan Global de acción para la contención de la RAM con el objetivo de mejorar el entendimiento de la resistencia antimicrobiana a través de la comunicación y educación, y fortalecer el conocimiento y la evidencia a través de la vigilancia. En 2017, confeccionó una lista de patógenos bacterianos clave para la salud pública para guiar la investigación, desarrollo

y las estrategias con el fin de prevenir y controlar la resistencia a los antimicrobianos. Esta lista fue actualizada en 2024 (WHO, 2024) y los Enterobacteriales resistentes a los carbapenemes se encuentran dentro del grupo de patógenos críticos.

En Uruguay, en 2017 se comenzó a elaborar un programa nacional para la contención de la RAM para la salud animal en el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Posteriormente, en 2018 el MSP conformó un grupo técnico para la prevención de la resistencia antimicrobiana y su misión es desarrollar e implementar programas de salud para monitorear, controlar y prevenir la resistencia a los antimicrobianos. Tanto el grupo de trabajo del MSP como el del MGAP, trabajaron en conjunto para generar el Plan Nacional de Acción Contra la Resistencia Antimicrobiana enmarcado en el concepto de “Una salud” (PRAM, 2018) y también el Ministerio de Ambiente (PRAM, 2023). Finalmente, durante el año 2024 se concreta la elaboración del “Plan Nacional Único contra la RAM: herramienta básica para trabajar contra la resistencia”. Algunas estrategias que se tomaron con este plan incluyen:

- Identificar patógenos y su resistencia global
- Introducir vigilancia y presentación de informes para apoyar los esfuerzos de prevención y control en el uso de los antimicrobianos
- Establecer y coordinar una vigilancia nacional de la resistencia a los antimicrobianos (red de laboratorios) para proporcionar información actualizada e identificar grupos de patógenos en enfermedades infecciosas
- Establecer una gestión integrada de los animales y sistemas de salud
- Participación en la red global de RAM.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Desde el año 2017 y con una actualización en 2024 como fue mencionado, la OMS respalda la optimización del uso de antimicrobianos en humanos y animales para mantener su eficacia mediante el enfoque “Una salud”. Por ello, se publicó una lista de patógenos prioritarios para los que se debería realizar investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de estos patógenos, las enterobacterias, como *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (C3G) o carbapenemes, se encuentran dentro del grupo de prioridad crítica.

En la última década, se ha comenzado a reutilizar antimicrobianos en desuso (debido generalmente a su toxicidad) por la emergencia de resistencia a carbapenemes en patógenos como *K. pneumoniae*, *A. baumannii* o *P. aeruginosa*. En particular para el tratamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC o NDM se han tenido que emplear antimicrobianos como la colistina y la fosfomicina, dada la escasez de moléculas farmacológicamente activas disponibles.

Debido a la gravedad de la situación con el aumento de la resistencia frente a los antibióticos, es necesaria la aplicación de medidas de control con el fin de minimizar la diseminación de bacterias productoras tanto de BLEE como de carbapenemasas.

La contención de esta diseminación de cepas debe ser una prioridad de los profesionales y de las autoridades sanitarias. Contar con resultados de las variantes de carbapenemasas circulantes en un gran número de cepas de Enterobacterales, junto al estudio de mecanismos de resistencia a otras familias de antibióticos de importancia clínica y la posibilidad de diseminación de dichos mecanismos, es fundamental para el conocimiento de la epidemiología local. Este conocimiento puede aportar, además, a la evaluación de los programas de uso racional de antimicrobianos cuando corresponda.

Por lo anteriormente dicho, no solo es importante conocer cuáles son los tipos de carbapenemasas en el periodo de estudio, sino también conocer cuáles son las resistencias acompañantes a antibióticos de importancia crítica a nivel humano.

### 3. **OBJETIVOS**

#### 3.1. **Objetivo general**

Caracterizar aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas recibidos en el DLSP durante el año 2019, provenientes de distintos centros de salud del país.

#### 3.2. **Objetivos específicos**

- I. Caracterizar las carbapenemasas de cepas clínicas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.
- II. Estudiar las resistencias acompañantes (colistina, fosfomicina y aminoglucósidos).
- III. Estudiar los aislamientos desde el punto de vista clonal.
- IV. Analizar y comparar los plásmidos codificantes de carbapenemasas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Aislamientos clínicos**

Se estudiaron 63 aislamientos de *K. pneumoniae* y 11 aislamientos de *E. coli*. Asimismo, se estudió un aislamiento de *Morganella morganii* debido a que esta cepa fue aislada de un paciente del cual también se aisló una cepa de *E. coli*. Estas cepas fueron recibidas en el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) durante el año 2019 en el marco del Sistema de Vigilancia de cepas productoras de carbapenemasas. Se contó con el dato de fecha del aislamiento, procedencia, tipo de muestra, sexo y edad del paciente y los datos de identificación y sensibilidad antibiótica por VITEK® 2 Compact System.

### **4.2. Cepas de referencia utilizadas**

Para la determinación de sensibilidad a antibióticos se utilizó como cepa de referencia, *E. coli* ATCC 25922 de acuerdo con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). Para el análisis de los perfiles de resistencia a los antibióticos, se consideraron en la categoría de resistente también los valores de resistencia intermedia.

Para los ensayos de conjugación se utilizó la cepa receptora *E. coli* J53-2 (*E. coli*, *Genetic Stock Center*) resistente a rifampicina, ornitina negativa, indol positiva e inmóvil (Yi et al., 2012). Para la estimación del tamaño de los fragmentos y control de electroforesis en gel de campo pulsado se utilizó la cepa *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812.

### **4.3. Métodos**

Las cepas productoras de carbapenemasas estudiadas se encontraban conservadas a -70°C en el banco histórico de cepas del DLSP. Para su aislamiento, las cepas fueron sembradas en placas de Agar MacConkey Lactosa en presencia de 2µg/mL de ceftazidima y se incubaron en estufa a 37°C por 24 horas.

Los protocolos detallados se encuentran en la sección de Anexos.



#### 4.3.1. Detección fenotípica de carbapenemasas

Utilizando un cultivo fresco y puro, se preparó una suspensión de cada cepa equivalente a 0.5 McFarland. Posteriormente, se sembró la suspensión en una placa de agar Mueller-Hinton (MH). Se utilizó un kit confirmatorio para carbapenemasas (ROSCO Diagnostica) donde se colocaron los siguientes discos: Meropenem 10µg (MRP10), Meropenem 10µg + Ácido Fenilborónico (inhibidor de KPC y AmpC, MRPBO), Meropenem 10µg + Cloxacilina (inhibidor de AmpC, MRPCX), Meropenem 10µg + Ácido Dipicolínico (inhibidor de Metallo-β-Lactamasa, MRPDP) y Temocilina 30µg (TEM), en la placa de agar inoculada con la suspensión de cada cepa. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18-20 horas. Posteriormente, se midieron y se registraron los diámetros de las zonas de inhibición. Al momento de interpretar, se debe comparar la zona de inhibición del disco de MRP10 con las zonas de inhibición de cada uno de los discos de Meropenem + inhibidor (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla interpretativa de las zonas de inhibición (ROSCO Diagnóstica)

		Meropenem + Ácido fenilborónico (MRPBO)	Meropenem + Ácido dipicolínico (MRPDP)	Meropenem + Cloxacilina (MRPCX)	Termocilina (30 µg) (TEMOC)
KPC		≥4 mm	≤3 mm	≤3 mm	Variable
NDM	Meropenem (10 µg)	<4 mm	≥5 mm	≤3 mm	Variable
OXA-48 y similares	(MRP10)	≤3 mm	≤3 mm	≤3 mm	≤14 mm

Es posible que un organismo sea positivo para más de un mecanismo de resistencia. Sin embargo, un mecanismo de resistencia puede enmascarar el otro, dificultando así su detección.

#### 4.3.2. Reacciones de amplificación

Para la extracción de ADN se empleó la técnica de lisis bacteriana con liberación de ADN por shock térmico con posterior centrifugación (Anexo 9.1.1). El sobrenadante fue recuperado y conservado a -20°C para ser utilizado como molde en los diferentes ensayos (Dashti et al., 2009). La mezcla para realización de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), se preparó con un volumen final de 25µL. La concentración final de cada componente de la mezcla y los pasos de amplificación utilizados se indican para cada caso, ajustando la temperatura de hibridación según lo expuesto en las tablas correspondientes (Anexo 9.1.3). En cada reacción de

amplificación se incluyeron los correspondientes controles positivos, negativos y de mezcla. Para visualizar los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se cargó 15µL de cada producto de amplificación más 5µL de buffer de carga. En la corrida electroforética, se colocó también un marcador de peso molecular comercial para visualizar el tamaño de los productos de amplificación. Una vez finalizada la corrida, se procedió a la tinción con bromuro de etidio y posterior observación al transiluminador de UV y captura de imagen.

Mediante este método, se buscaron los genes codificantes de carbapenemasas *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>, y de las BLEE más frecuentes en la región y en nuestro país como *bla*<sub>CTX-M-grupo1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-grupo9</sub> (García-Fulgueiras et al., 2020). También se realizó la búsqueda de genes de resistencia a fosfomicina, *fosA*, *fosB*, *fomA*, *fomB*, *fosA3*, *fosC2*, *fosA7* (Kobayashi et al., 2000; Hou et al., 2012; Xu et al., 2013; Nakamura et al., 2014; Wang et al., 2021), a colistina *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* (Borowiak et al., 2017; Carattoli et al., 2017; Bado et al., 2018; Rebelo et al., 2018; Yang et al., 2018; Wang et al., 2018; Coppola et al., 2019; Lemlem et al., 2023) y a aminoglucósidos, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *npmA*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* (Bado et al., 2018). También fueron investigados por PCR, el secuenciotipo exitoso ST258 de *K. pneumoniae* mediante PCR para *pilV* (Gomez et al., 2016) y los secuenciotipos exitosos en *E. coli*, ST69, ST73, ST95, ST131 (Doumith et al., 2015). Las secuencias de todos los cebadores utilizados se encuentran en las tablas 2-6 en el Anexo 9.1.3.

Una vez obtenidos los amplicones de PCR para los genes de carbapenemasas se purificaron mediante un kit comercial (Zymo Research) y posteriormente fueron secuenciados mediante el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo y de MacroGen Inc. Se usó el programa CHROMAS (versión 1.45, Griffith University, Queensland Australia) para analizar los cromatogramas obtenidos y para buscar homología de las secuencias obtenidas y compararlas con otras secuencias ingresadas previamente en bancos de datos (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y Beta-Lactamase DataBase, <http://bldb.eu/>).

#### 4.3.3. Susceptibilidad antibiótica a fosfomicina, colistina y aminoglucósidos

Se realizó un antibiograma a cada cepa mediante una solución 0,5 MacFarland en suero fisiológico testeando los siguientes antibióticos: imipenem, meropenem, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina y amikacina.

Para calcular la concentración inhibitoria mínima (CIM) a **colistina** se utilizó el protocolo de CLSI (CLSI, 2021) (Anexo 9.1.4). Abreviadamente, este procedimiento consistió en disponer de cuatro placas con el medio MH con diferentes diluciones de colistina (0µg/mL, 1µg/mL, 2µg/mL y 4µg/mL) y, posteriormente, dividir cada placa de agar en hasta diez partes, una por cada muestra y un control positivo. Una vez inoculadas las cepas, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se leyeron los resultados evaluando el crecimiento en las distintas diluciones. El criterio de interpretación fue:  $\leq 2\mu\text{g/mL}$ = resistencia intermedia,  $\geq 4\mu\text{g/mL}$ = resistente. A los efectos de este trabajo, los valores de resistencia intermedia se consideraron como resistente.

Para evaluar la CIM a **fosfomicina**, brevemente se realizó una suspensión equivalente al 0,5 MacFarland en suero fisiológico de cada cepa problema. Luego, se hizo una dilución 1/20 de cada cepa problema a partir inóculo inicial y se sembraron 600µL de cada cepa en un pocillo del multi-inoculador para la posterior siembra en placas de agar MH por duplicado con diferentes diluciones de fosfomicina (2µg/mL, 4µg/mL, 8µg/mL, 16µg/mL, 32µg/mL, 64µg/mL, 128µg/mL y 256µg/mL). Se agregaron dos placas sin antibiótico antes y después de la inoculación para controlar la calidad de las suspensiones. Asimismo, se agregó a cada placa 50µg/mL de glucosa-6-fosfato. Posteriormente, se incubaron las placas a 37°C durante 18-20 horas (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2021) (Anexo 9.1.5).

#### 4.3.4. Electroforesis en gel de campo pulsado

Se llevó a cabo electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para todos los aislamientos. El protocolo utilizado fue según las guías de PulseNet. Brevemente, la restricción se realizó con la enzima *XbaI* (origen bacteriano *Xanthomonas badrii*, *Thermo Scientific*), utilizando 30 unidades por bloque, e incubando la digestión 37°C durante 18 horas. El gel para la corrida electroforética se preparó al 1% y las condiciones de corrida utilizadas fueron: 6 volts, durante 18 horas, pulso inicial 2.2 segundos, pulso final 54.2 segundos. Se empleó como cepa control un aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Braenderup (Anexo 9.1.6).

Las imágenes se analizaron con el programa *GelCompar II 5.1* (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Se generaron matrices de similitud con el índice de DICE y se agruparon mediante el algoritmo *unweighted pair-group method with arithmetic mean* (UPMGA), para la posterior construcción de los dendrogramas correspondientes con 2% de tolerancia de bandas y 0% de optimización (Bado et al., 2016).

#### 4.3.5. Ensayo de conjugación para determinar la movilidad de los mecanismos de resistencia

A partir de un cultivo puro de las cepas parentales y receptora previamente incubadas a 37°C durante 18-24 horas en medio MacConkey, se inocularon en caldo Luria-Bertani y se incuban a 37°C en agitación (200 rpm) durante 3 horas. Luego de este período, se realizó una mezcla conteniendo 0.2mL de la cepa donante y 2.2mL de la cepa receptora, la cual fue incubada a 37°C durante 24 horas sin agitación. Posteriormente, se inocularon las placas con los volúmenes: 100µL de la mezcla de conjugación y, 100µL de un concentrado el cual se obtuvo mediante una centrifugación de dicha mezcla a 4000 rpm durante 3 min, en la que luego se retiró la mayor parte del sobrenadante y disolviendo el “pellet” en el volumen restante, el cual fue inoculado en las placas con antibióticos (Anexo 9.1.7). Posteriormente, la mezcla de conjugación en cada caso fue plaqueada en medio MacConkey suplementado con 2µg/mL de ceftazidime y 150µg/mL de rifampicina e incubados a 37 °C durante 18-24 horas. En paralelo se realizaron controles de viabilidad, mediante la siembra de las cepas donante y receptora en MacConkey sin antibiótico y controles de ausencia de crecimiento en MacConkey con 2µg/mL de ceftazidime y 150µg/mL de rifampicina (Papa-Ezdra et al., 2021).

Aquellos clones capaces de crecer en el medio con la doble presión antibiótica fueron considerados cepas transconjugantes (Tc+). Con el fin de comprobar que las Tc+ no sean copias del donante, se les realizaron pruebas bioquímicas MIO (motilidad-indol-ornitina), antibiograma por disco difusión, incluyendo test de sinergia para carbapenemasas, y búsqueda mediante PCR de los genes presentes en la cepa donante respectiva.

En aquellas cepas que presentaron genes de resistencia a fosfomicina, se realizó el ensayo de conjugación utilizando el mismo procedimiento anterior con la variante de utilizar 2µg/mL de fosfomicina, acompañado de 50µg/mL de glucosa-6-fosfato y 150µg/mL de rifampicina (Garcia-Fulgueiras et al., 2022).

#### 4.3.6. Determinación del tamaño de los plásmidos transferidos

Los tamaños de los plásmidos transferidos se estimaron en las cepas Tc+ mediante tratamiento con nucleasa S1 (*Thermo Scientific*, Waltham, MA). La nucleasa S1 corta los plásmidos superenrollados en moléculas lineales, lo que permite que mediante PFGE, los plásmidos grandes migren como bandas discretas observables después de la tinción con etidio. Posteriormente, sus tamaños se estimaron de manera confiable mediante comparación con marcadores de ADN lineal (Barton et al., 1995). Para el

armado de los bloques se utilizó una turbidez de 9 en la escala McFarland. La digestión de cada bloque se realizó con 2 unidades de nucleasa durante 1 hora a 37°C. Los geles para la corrida de electroforesis se prepararon al 1% y las condiciones de corrida fueron: 6 voltios, 18 horas, pulso inicial 2.2 segundos, pulso final 54.2 segundos. Como cepa de referencia para estimar el tamaño de los plásmidos, se utilizó la cepa *S. enterica* serovar Braenderup digerida con *XbaI* (García-Fulgueiras et al., 2017).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterización de las cepas

Las cepas identificadas fueron: *K. pneumoniae* (n=63, 84%), *E. coli* (n=11, 15%) y *M. morganii* (n=1, 1%).

Remitieron aislamientos al DLSP seis instituciones públicas y siete instituciones privadas de Montevideo y tres instituciones públicas y cuatro instituciones privadas del interior del país (Canelones, Maldonado, Colonia, Durazno, Rocha, Salto y Paysandú). El origen de los aislamientos fue: orina (n=44, 59%), sangre (n=9, 12%), secreciones respiratorias (n=6, 8%) y orígenes varios (n=16, 21%) (Figura 2). La edad de los pacientes osciló entre los 18 y 92 años, siendo la media 62 años (Anexo 9.3).

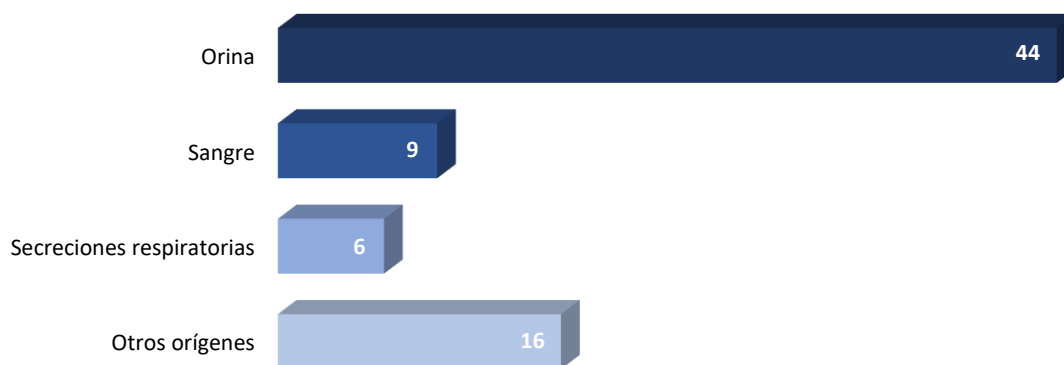


Figura 2. Procedencia de los aislamientos.

Con respecto a los perfiles de susceptibilidad a antibióticos los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron 100% resistentes a: ampicilina-sulbactam (AMS), cefazolina (CFZ), cefuroxime (CXM), imipenem (IMI), meropenem (MERO), y a trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), 99% resistente a cefotaxime (CTX), 95% resistentes a ceftazidime (CAZ) y a piperacilina-tazobactam (PTZ), 67% resistente a cefepime (FEP), 65% resistente a ciprofloxacina (CIP), 39% resistente a gentamicina (CN), 18% resistente a amikacina (AK), 5% a fosfomicina (FOS) y 11% a colistina Figura 3 (Anexo 9.3).

Se considera resistente a imipenem y a meropenem al aislamiento que presente una CIM mayor o igual a 4µg/mL

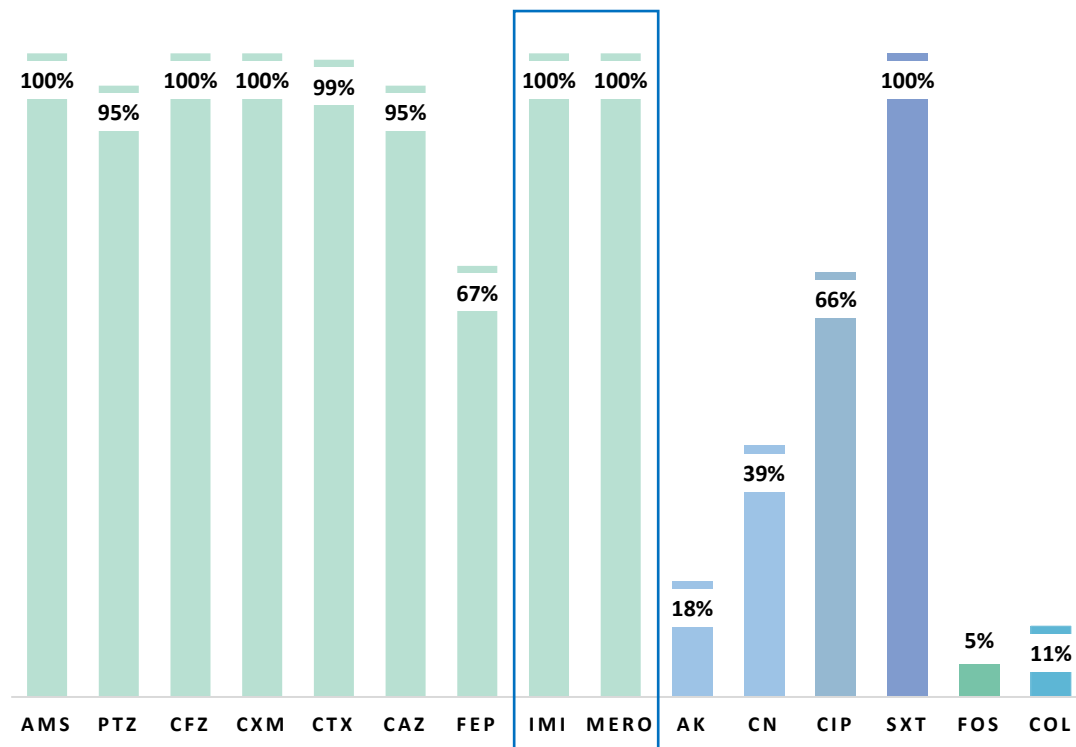


Figura 3. Perfil de resistencia a antibióticos de la colección de cepas. Se recuadran las resistencias que dan cuenta de la presencia de carbapenemasas.

El 71% de las cepas de *K. pneumoniae* y el 64% de las cepas de *E. coli* presentaron un fenotipo MDR. Si bien dentro de las primeras existe gran variedad de combinaciones para generar este fenotipo MDR, la combinación más común: CAR (cabapenemes)/CN/CIP/SXT con un porcentaje del 44%. En cuanto a *E. coli*, no se destaca una combinación específica que genere el fenotipo MDR (Anexo 9.3).

De la caracterización fenotípica de las carbapenemasas se encontró que en 51 casos (69%), las enzimas fueron de clase B (MBL), en 21 casos (29%) de clase A (serin-carbapenemasas) y en 1 caso (1%) de clase D (OXA) (Figura 4). Posteriormente, por PCR y secuenciación se determinó que las MBL fueron codificadas por *bla<sub>NDM-1</sub>*, las serin-carbapenemasas por *bla<sub>KPC-2</sub>* y la enzima de clase D por *bla<sub>OXA-48</sub>*.

En *K. pneumoniae* los genes detectados se distribuyeron según: 42 *bla<sub>NDM-1</sub>*, 19 *bla<sub>KPC-2</sub>*, 1 *bla<sub>OXA-48</sub>*. En *E. coli* la distribución fue: 7 *bla<sub>NDM-1</sub>* y 3 *bla<sub>KPC-2</sub>*. Un aislamiento de *K. pneumoniae*, y uno de *E. coli* presentaron coproducción de *bla<sub>NDM-1</sub>*/*bla<sub>KPC-2</sub>* (Figura 5).

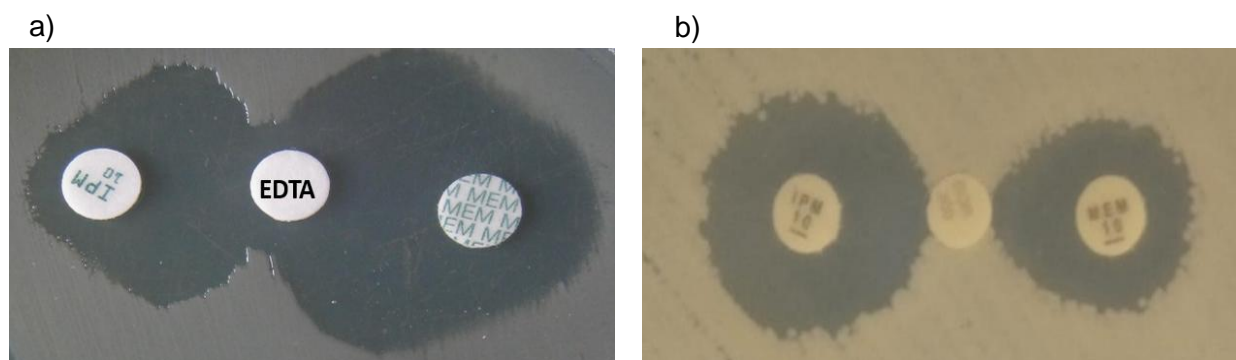


Figura 4. Tests de sinergia positivos.

Imipenem (IPM), meropenem (MEM) e inhibidores: a) EDTA, b) ácido borónico, BOR.

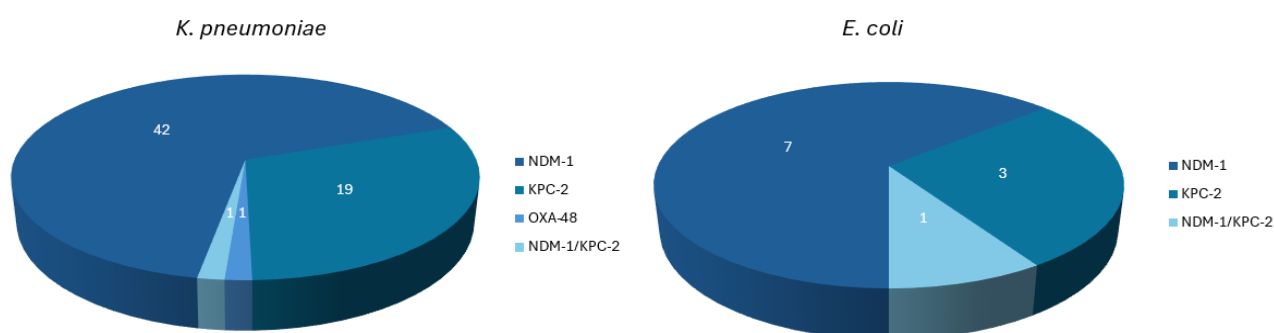


Figura 5. Proporción de carbapenemas según la especie

Con respecto a los resultados de resistencia a colistina, ocho aislamientos de *K. pneumoniae* fueron resistentes a este antibiótico. Sin embargo, ninguno de los aislamientos presentó las variantes del gen *mcr* investigadas. En cinco de los ocho casos resistentes, estaba presente *bla*<sub>NDM-1</sub>, y en dos casos *bla*<sub>KPC-2</sub>. Tres de las cepas que tenían *bla*<sub>NDM-1</sub> pertenecían al ST258 y uno de los aislamientos presentaba además *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. En otro de los casos se encontró la co-producción *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-8</sub>. y en otro la co-producción de *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Este último aislamiento pertenecía al ST258.

Al diferenciar por especie y con relación a la fosfomicina, un solo aislamiento de *K. pneumoniae* (1.6%) resultó resistente a este antibiótico y se identificó la presencia de *fosA3*. Esta cepa posee la enzima *bla*<sub>NDM-1</sub>. En relación con *E. coli*, tres cepas de las once (27.3%) resultaron resistentes a fosfomicina y también fue caracterizado el gen *fosA3*. Una de estas cepas pertenece al secuenciotipo exitoso ST69 y presenta el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, mientras que las dos restantes portaban *bla*<sub>NDM-1</sub>.



En las cepas resistentes a amikacina ( $\geq 64\mu\text{g/mL}$ ) y gentamicina ( $\geq 16\mu\text{g/mL}$ ) se evaluó la presencia de metilasas. Se identificó un aislamiento de *E. coli* portador de los genes *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>KPC-2</sub> y con el gen de la metilasa *rmtC* (cepa 891).

### 5.2. Coproducción de carbapenemasas con $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M

El 20% (15/74) de las cepas de la colección presentaron BLEE y se trataba solamente de aislamientos de la especie *K. pneumoniae*. Dentro de este porcentaje 12 cepas (80%) tenían el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, mientras que el 20% restante presentaban *bla*<sub>CTX-M-8</sub>.

El 24% (15/63) de los aislamientos de *K. pneumoniae* presentaban una BLEE de la familia CTX-M. Se identificó *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub> en nueve casos, dos presentaban co-producción entre *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub> y una cepa presentaba *bla*<sub>OXA-48</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>. En dos cepas se encontró *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-8</sub> y en una *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-8</sub> (Anexo 9.3.2).

En las cepas de *E. coli*, no se encontraron BLEE de la familia CTX-M.

### 5.3. Secuenciotipos exitosos y PFGE

Como se mencionó anteriormente, se identificó el secuenciotipo ST258 en el 21% (n=13/63) de las cepas de *K. pneumoniae*. Dentro de estos aislamientos, ocho presentaron únicamente *bla*<sub>NDM-1</sub>, tres *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub> y una aislamientos *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-8</sub>. El 25% de los aislamientos en donde se observó una co-producción, eran ST258. Sólo una cepa correspondiente al ST258 presentaba *bla*<sub>KPC-2</sub> sin co-producción de BLEE ni genes de resistencia para fosfomicina ni colistina.

Por PFGE se generaron entre 14 y 22 fragmentos de ADN genómico de 61 aislamientos de *K. pneumoniae*, ya que dos cepas (763 y 897) fueron no tipificables mediante este método. El análisis de los perfiles de bandas obtenidos reveló una gran diversidad con 36 pulsotipos diferentes (I-XXXVI) (Figura 6). El pulsotipo mayoritario denominado I, representó el 13% de los aislamientos (8/61). Todas las cepas pertenecientes a este clon presentaban el gen de la carbapenemasas *bla*<sub>NDM-1</sub> y presentaban el secuenciotipo ST258. Casi el 50% de las cepas pertenecientes a este grupo, además, presentaban co-producción de BLEE. El pulsotipo que sigue en frecuencia fue el II representado por seis cepas (9.5%). Estos aislamientos tenían en común poseer el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>. El pulsotipo III, estaba representado por cuatro cepas (6.4%), todas ellas presentando el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> y sin co-producción de BLEE. Los perfiles de las cepas 539 y 807 productoras *bla*<sub>NDM-1</sub> se agruparon en el pulsotipo IV (3.2%), la cepa 539 también presentaba *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Las cepas 547 y la 723 conforman el pulsotipo V y ambas

presentan *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>. El pulsotipo VI, agrupa cinco cepas (6.4%). Este es el único pulsotipo que contiene cepas con diferentes carbapenemasas: las cepas 774, 832 y 739 presentan *bla*<sub>KPC-2</sub> mientras que los dos restantes (765 y 892) presentaban *bla*<sub>NDM-1</sub>. Tanto el pulsotipo VII como el VIII representan el 3.2% de los aislamientos. Ambos pulsotipos representados por cepas que producen *bla*<sub>NDM-1</sub> y sólo la cepa 702 dentro de del pulsotipo VIII coproducía la *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. El pulsotipo XXXVI está compuesto por dos cepas, la 667 y la 796 (3.2%). Ambas cepas de este pulsotipo poseen *bla*<sub>NDM-1</sub> y pertenecen al secuenciotipo ST258. Los 26 pulsotipos restantes, IX-XXXV, están representados por una única cepa (Anexo 9.3.2).



Figura 6. Dendrograma de las cepas de *K. pneumoniae*. Se indica con el color violeta a los pulsotipos que poseen solo la enzima KPC-2, con el color verde a los pulsotipos con la enzima NDM-1 y con celeste el pulsotipo que poseen aislamientos con las dos carbapenemasas.

En *E. coli* el único secuenciotipo exitoso que se encontró fue ST69 en el 36% de los aislamientos (4/11). Las cepas 666, 697, 750 presentaban este secuenciotipo y tenían el gen de la carbapenemasa *bla*<sub>KPC-2</sub> y no presentaban co-producción con BLEE. La cepa 680 fue la única que presentó este secuenciotipo junto con la enzima *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Con respecto a análisis por PFGE en *E. coli*, se analizaron los perfiles de bandas de 10 aislamientos ya que la cepa 643 resultó no tipificable (Figura 7). Se identificaron seis pulsotipos (I-VI) con pequeñas variaciones. El pulsotipo mayoritario, al cual se denominó I, está representado por el 40% de las cepas (4/10). Todas las cepas de este pulsotipo presentan *bla*<sub>NDM-1</sub>, con la particularidad que la cepa 812 posee también el gen *fosA3* y el aislamiento 891 también presenta el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>. El segundo pulsotipo (II) está formado por dos aislamientos con diferentes carbapenemasas, la cepa 666 tiene el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>/*fosA3* y la cepa 680 *bla*<sub>NDM-1</sub>. Ambos aislamientos pertenecen a ST69. Los pulsotipos III, IV, V, VI están representados por un único aislamiento. El pulsotipo III y VI tienen cepas con *bla*<sub>KPC-2</sub>, mientras que los pulsotipos IV y V tienen aislamientos con *bla*<sub>NDM-1</sub>. Además, estos últimos dos pulsotipos pertenecen al ST69. La cepa que forma el pulsotipo VI (805) presenta además *fosA3*.

Ninguna de las tres cepas resistentes a fosfomicina se encontraban relacionadas mediante PFGE (Anexo 9.3.1).

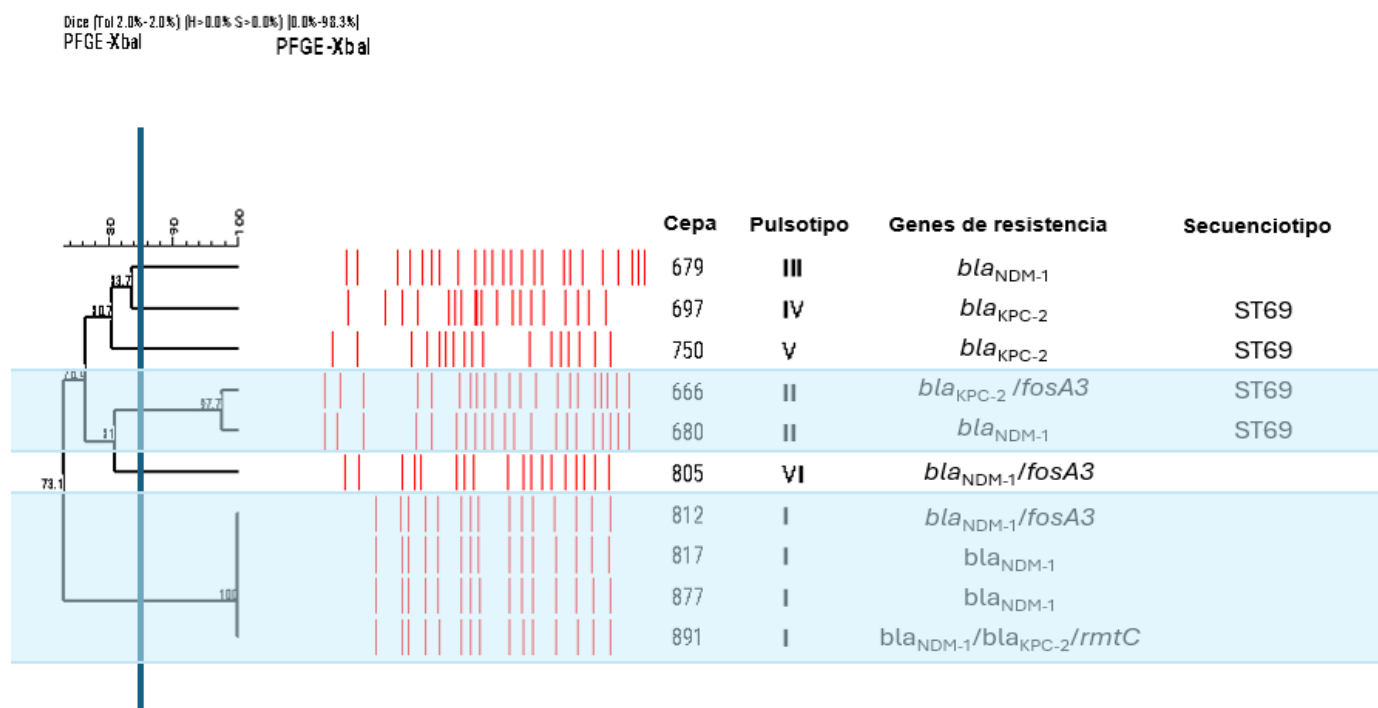


Figura 7. Dendrograma de las cepas de *E. coli*. Se indica con el color violeta a los pulsotipos que poseen solo la enzima KPC-2, con el color verde a los pulsotipos con la enzima NDM-1 y con celeste el pulsotipo que poseen aislamientos con las dos carbapenemasas.

#### 5.4. Ensayos de conjugación

Se realizaron ensayos de conjugación para todas las cepas para evaluar la movilidad de los genes involucrados en las diferentes resistencias a antibióticos. Como resultado, se obtuvo que el 81% de los aislamientos fueron positivos en los ensayos de conjugación.

El gen *bla*<sub>NDM-1</sub> fue el que se movilizó de modo más frecuente en el 84% de los casos, en 43 cepas con el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> de los 51 aislamientos portadores. El gen *bla*<sub>KPC-2</sub> se movilizó 70% de los casos, en 17 aislamientos con *bla*<sub>KPC-2</sub> de 24 aislamientos portadores.

En relación con cada especie, en *K. pneumoniae* el 78% de los genes codificantes de carbapenemasas se localizaron en plásmidos conjugativos. Al observar según los genes de carbapenemasas dentro de esta especie, se encontró que el 81% de las cepas que presentaron el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> lo transfirieron por conjugación (35/43), el 50% de las cepas que presentaban coproducción *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-8</sub>, fueron positivas (1/2) y que sólo el 12% de las cepas que contenían *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, fueron positivos para conjugación (1/9), en los ocho casos restantes se movilizó sólo *bla*<sub>NDM-1</sub>.

En los aislamientos de *K. pneumoniae* con *bla*<sub>KPC-2</sub>, los resultados de la conjugación fueron positivos en el 65% de los casos (12/19); en dos de los cuatro aislamientos que portaron producción conjunta de *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub> se movilizaron ambos genes y en los otros dos sólo se movilizó *bla*<sub>KPC-2</sub>. Para la cepa *bla*<sub>OXA-48</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub> el valor de transferencia fue del 100% (1/1), mientras que aquella cepa en la que co-residían los genes de carbapenemasas *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>KPC-2</sub> la conjugación no fue exitosa.

En cuanto a las cepas de *E. coli* (n=11), el 100% de los genes codificantes de carbapenemasas se presentaron en plásmidos conjugativos: *bla*<sub>NDM-1</sub> (7/7), *bla*<sub>KPC-2</sub> (3/3) y *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>KPC-2</sub> (1/1).

En ninguno de los cuatro aislamientos (1 *K. pneumoniae* y 3 *E. coli*) donde había combinación *bla*<sub>NDM-1</sub>/*fosA3* (n=3) o *bla*<sub>KPC-2</sub>/*fosA3* (n=1) ocurrió la transferencia del gen *fosA3* acompañando a la carbapenemasa (Anexo 9.3).

Al estudiar el transconjugante de la *E. coli* 891, se observó que además de los dos genes para carbapenemasas, también se transfirió el gen para la metilasa RMT-C (Anexo 9.3.1).

## 5.5. Tamaño plasmídico

Con respecto a *K. pneumoniae*, el 41% de los plásmidos que se transfirieron por conjugación, tenían un tamaño estimado de 140kb y el 35%, 220kb. En cuatro cepas (8%), el plásmido que poseían era de aproximadamente 105kb y en tres aislamientos (6%) el tamaño del plásmido fue de 245kb. Las cepas 612 y 787, presentaron plásmidos de un tamaño estimado 55kb y 455kb, respectivamente. Tres cepas (667, 729 y 746) presentaron dos plásmidos cada una, de tamaños aproximados de 80/220kb, 80/250kb y 225/670kb, respectivamente (Anexo 9.3.2).

En *E. coli*, el 64% de los plásmidos portados por los Tc+ tenían un tamaño aproximado de 220kb. Todas las cepas pertenecientes al grupo mayoritario presentaron este tamaño aproximado a excepción de la cepa que presenta *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>KPC-2</sub> y además el gen *rmtC*. El plásmido de esta cepa fue de un tamaño estimado de 245kb.

Los aislamientos 680 y 697 presentaron plásmidos con tamaños aproximados de 140kb, 250kb, respectivamente. Por último, la cepa 750 tiene dos plásmidos de tamaños estimados de 225/670kb (Anexo 9.3.1).

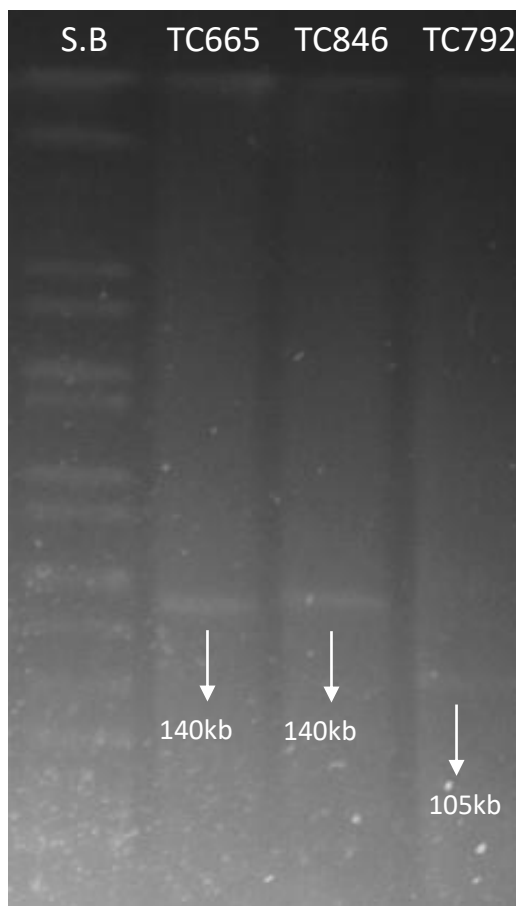


Figura 8. Campo pulsado mostrando los tamaños plasmídicos

### **5.6. *M. morganii***

En cuanto a la cepa de *M. morganii*, especie naturalmente resistente a la colistina, presentó  $bla_{NDM-1}$  y no co-producía ninguna BLEE. Resultó ser sensible a la fosfomicina y el resultado de conjugación fue positivo, confirmando la transferencia de  $bla_{NDM-1}$ . Al relacionar esta cepa con la del aislamiento de *E. coli* que provenía del mismo paciente, se observó que ambos poseen  $bla_{NDM-1}$  y que una vez caracterizados sus plásmidos conjugativos el tamaño de estos fue entre 170-140kb, respectivamente.

## 6. DISCUSIÓN

En la serie estudiada, la presencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas fue considerablemente mayor en relación con *E. coli* (84% vs 15%). En *K. pneumoniae* el gen de carbapenemasa principalmente detectado fue: *bla*<sub>NDM-1</sub> en el 68% de los casos y seguido de, *bla*<sub>KPC-2</sub> en el 31%. Esto concuerda con los países de la región, donde en más del 65% de las cepas se detecta *bla*<sub>NDM-1</sub> y entre un 20-30% *bla*<sub>KPC-2</sub> (Velásquez-Porta & Lau-Bonilla, 2017; Sacsquispe-Contreras & Bailón-Calderón, 2018). En el caso de *E. coli* la distribución fue 63% de detección de *bla*<sub>NDM-1</sub> y 37% de *bla*<sub>KPC-2</sub>, al igual que en el caso de *K. pneumoniae*, esto concuerda con datos de la región (van Duin & Doi, 2017; Cejas et al., 2019).

Dos aislamientos de la colección analizada, uno de *K. pneumoniae* y otro de *E. coli*, eran dobles productores de carbapenemasas (*bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>KPC-2</sub>). El primer país en donde se aisló una cepa que co-producía dos clases de carbapenemasas fue en Grecia entre los años 2009 y 2010 (Giakkoupi et al., 2009). A partir de ese momento, se comenzaron a reportar cepas con doble carbapenemasas a nivel mundial (Meletis et al., 2015). En la región, estos aislamientos se han encontrado en varios países como Argentina, Chile, Paraguay, Ecuador y Colombia (Organización Panamericana de la Salud, 2021; Thomas et al., 2022).

En nuestro país, el primer aislamiento de una cepa doble productora de carbapenemasas fue en el año 2017. La misma se aisló de una muestra de líquido peritoneal de un paciente ingresado en un centro hospitalario de la ciudad de Montevideo. Desde entonces estos aislamientos doble productores se fueron detectando esporádicamente: entre los años 2017-2019 los casos de doble carbapenemasas representaron 0,93%. A partir del 2021 se observó un aumento de dichos aislamientos y pasaron a ser el 3.3% de los casos (López et al., 2022; Otero et al., 2022). Estos hallazgos estaban en sintonía con lo que estaba ocurriendo tanto en la región como en el resto del mundo, debido a que luego de la pandemia de COVID-19, se notificó un aumento sustancial en el número de aislamientos con doble carbapenemasa, ocasionado probablemente por el uso excesivo de antibióticos durante la pandemia (Organización Panamericana de la Salud, 2021).

En relación con la acumulación de mecanismos de resistencia en los aislamientos de enterobacterias, la co-producción de carbapenemasas con BLEE ya ha sido descrito en distintos países, lo que complejiza aún más la situación de la resistencia a antimicrobianos a nivel mundial (Aquino-Andrade et al., 2018). En la colección

analizada, *K. pneumoniae* presentó co-producción de carbapenemasas con BLEE. La combinación de *bla*<sub>NDM-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub> fue la más frecuente, seguido por las combinaciones *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, y *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Estos hallazgos ponen de manifiesto la plasticidad de *K. pneumoniae* para combinar genes codificantes para de carbapenemasas y para BLEE.

El ST258 es el responsable de la alta diseminación de *K. pneumoniae* a nivel mundial, especialmente en América del Norte, América del Sur y Europa (Wyres et al., 2019; Andrey et al., 2020; Soria, 2021). Sin embargo, Uruguay tiene un patrón diferente a la región debido a que este secuenciotipo no es relevante en nuestra epidemiología y, como se puede observar, durante este período de estudio, el porcentaje de ST258 fue bajo (21%).

En cuanto a las cepas de *E. coli*, a pesar de que ST131 es el secuenciotipo exitoso mayormente encontrado a nivel mundial, no fue identificado en esta colección. Solamente fue encontrado ST69 en el 36% de los aislamientos. Estos resultados coinciden con lo reportado, ya que ST69 se identifica en orden de prevalencia en segundo lugar luego de ST131 en distintos países a lo largo del tiempo (Manges et al., 2019).

En *K. pneumoniae*, se encontró una gran variedad de pulsotipos (I-XXXVI), si bien hubo un pulsotipo mayoritario, el mismo estaba comprendido por sólo ocho cepas (13%). Estos aislamientos presentaban el gen de la carbapenemasa *bla*<sub>NDM-1</sub>. Tres de estas ocho cepas, presentaron, además, genes de la familia CTX-M, lo que evidencia la movilidad de los plásmidos dentro de un mismo pulsotipo. De los 36 pulsotipos, 26 están constituidos por un solo aislamiento, lo que demuestra la gran policlonalidad encontrada.

En *E. coli* entre las 10 cepas tipificables, se encontraron seis pulsotipos, el pulsotipo mayoritario estaba representado por 4 cepas (40%) y lo que tuvieron en común fue que portaban el gen *bla*<sub>NDM-1</sub>. Asimismo, la cepa 812 poseía también el gen *fosA3* y el aislamiento 891 también presentó el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> y el gen *rmtC*. Este pulsotipo muestra una gran movilización de plásmidos debido que en el mismo pulsotipo, se observa una gran heterogeneidad de genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos.

Por otro lado, se destaca la elevada presencia de carbapenemasas en plásmidos conjugativos, siendo la enzima *bla*<sub>NDM-1</sub>, la que tiene mayor frecuencia de movilización, además de que es la enzima mayoritaria detectada. Cabe mencionar, que si bien los aislamientos de *E. coli* fueron un bajo número, todos los ensayos de conjugación fueron positivos, por lo que la totalidad de los genes de carbapenemasas se encontraban en



plásmidos movilizables por conjugación. Se destaca en ambas especies el importante rol de estos plásmidos en la transferencia y diseminación de genes de carbapenemasas.

En cuanto a la resistencia a otras familias de antibióticos, ningún aislamiento resultó ser resistente tanto a fosfomicina como a colistina. Esto es un dato relevante ya que la fosfomicina y la colistina se usan en terapias combinadas de infecciones por Enterobacterales productores de carbapenemasas. Los porcentajes de resistencia globales a estos antibióticos fueron bajos (5% para la fosfomicina y 11% para la colistina), lo cual permitiría seguir utilizándolos de modo empírico.

En cambio, cuando se analiza la fosfomicina en la especie *E. coli*, el porcentaje al superar el 20% (27.3%), podría dificultar el tratamiento antibiótico empírico con este antibiótico.

Por otro lado, en ninguna de las cepas que presentaron el gen *fosA3* ocurrió la transferencia de dicho gen. Sin embargo, las carbapenemasas de estos aislamientos sí se transfirieron en los ensayos de conjugación. Esto podría deberse a que el gen *fosA3* estuviera contenido en una plataforma genética que no fuera movilizable bajo las condiciones de los ensayos realizados ya sea porque no está en el mismo plásmido que el gen *bla* o porque se presionó con antibióticos para las carbapenemasas, pero no para la fosfomicina.

Al analizar la resistencia a colistina, se observó que las cepas resistentes a este antibiótico eran *K. pneumoniae* y en ningún caso se detectaron genes de resistencia transferible. Esto puede deberse a que en esta especie los mecanismos de resistencia transferibles no son frecuentes por el momento en nuestro país.

En América Latina, la resistencia observada en la región para aminoglucósidos es distinta según el antibiótico en cuestión. Para gentamicina los niveles de resistencia en enterobacterias en general son mayores que para amikacina, siendo los valores gentamicina del 39% y a amikacina de 18% (CLSI, 2019), lo que depende de las normas internacionales utilizadas en la interpretación de los puntos de corte. Si utilizáramos las normas actuales (CLSI, 2024), los valores de gentamicina ascenderían a 53% y de amikacina a 44%, lo que remarca la importancia de mantener los datos de CIM a lo largo del tiempo y establecer las normas utilizadas en su interpretación.

Se caracterizó un único aislamiento de *E. coli* que además de ser doble productor de carbapenemasas, presentaba resistencia a amikacina y a gentamicina por la presencia de una metilasa, *rmrC*. Los genes identificados se encontraban en un plásmido conjugativo, lo que pone de manifiesto la capacidad de diseminación horizontal de los

mecanismos de resistencia estudiados, con el consecuente impacto en la resistencia a antibióticos de amplio uso en el tratamiento de infecciones por microorganismos MDR.

Con respecto al aislamiento identificado como *M. morganii* que provenía de un mismo paciente del cual se había aislado también una cepa de *E. coli* productora de NDM-1, se observó que dichos microorganismos no comparten el mismo plásmido, a considerar por el tamaño de estos en los ensayos realizados.

## 7. CONCLUSIONES

Actualmente, la resistencia antibiótica es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial, y el uso excesivo e inadecuado de antibióticos ha acelerado el problema. Un punto crítico en este tema es la emergencia de carbapenemasas en cepas de enterobacterias MDR, lo cual contribuyó a aumentar los costos hospitalarios, la morbilidad y la mortalidad de los pacientes que padecen infecciones por este tipo de bacterias.

Según los resultados de este trabajo, *K. pneumoniae* y *E. coli* son patógenos con alta variabilidad que representa un gran problema sanitario debido a su capacidad de albergar genes de resistencia a carbapenems y otros antibióticos en plásmidos conjugativos, facilitando así su diseminación. Por este motivo, se enfatiza la importancia de mantener una vigilancia continua para conocer los patógenos y los mecanismos de resistencia circulantes y así poder optimizar los recursos terapéuticos disponibles.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abarca, G., & Herrera, M. L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1–2).

Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Landman, D., Ghitan, M., Collins, B. A., Bratu, S., & Quale, J. (2016). Rise and fall of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(10). <https://doi.org/10.1093/jac/dkw242>

Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. In *Nature* (Vol. 146, Issue 3713). <https://doi.org/10.1038/146837a0>

Acevedo, M. J., Cabrera, E., Gaudio, M., Rodriguez, V., Vignoli, R. (2022). Resistencia a fosfomicina en uropatógenos de centros de salud privados y públicos del país.

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacterales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* and *Budviciaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>

Adler, A., Hussein, O., Ben-david, D., Masarwa, S., Navon-venezia, S., Schwaber, M. J., Carmeli, Y., Setton, E., Golan, S., Brill, S., Lipkin, V., Frodin, E., Mendelson, G., Rave, R., Yehuda, N., Aizen, I., Kaganski, M., Gershkovich, P., Sasson, A., Charish, L. (2015). Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in post-acute-care hospitals in Israel, 2008-13. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1). <https://doi.org/10.1093/jac/dku333>

Aghamali, M., Sedighi, M., Bialvaei, A. Z., Mohammadzadeh, N., Abbasian, S., Ghafouri, Z., & Kouhsari, E. (2019). Fosfomicin: Mechanisms and the increasing prevalence of resistance. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 68, Issue 1). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000874>

Ahmed, M. A. E., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.B. (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* Dec;9(1):868-885. doi: 10.1080/22221751.2020.1754133. PMID: 32284036; PMCID: PMC7241451.

- Ahn, C., Butt, A. A., Rivera, J. I., Yaqoob, M., Hag, S., Khalil, A., Pitout, M., & Doi, Y. (2015). OXA-48-Producing *Enterobacteriaceae* Causing Bacteremia, United Arab Emirates. *International Journal of Infectious Diseases*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.11.008>
- Al-Agamy, M. H., Shibl, A. M., Elkhizzi, N. A., Meunier, D., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2013). Persistence of *Klebsiella pneumoniae* clones with OXA-48 or NDM carbapenemases causing bacteraemias in a Riyadh hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(2). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.006>
- Albiger, B., Glasner, C., Struelens, M. J., Grundmann, H., Monnet, D. L., Koraqi, A., Bino, S., Hartl, R., Apfalter, P., Glupczynski, Y., Jans, B., Marković, T., Dedeić-Ljubović, A., Kojić, D., Strateva, T., Sabtcheva, S., Butić, I., Tambić Andrašević, A., Pieridou-Bagatzouni, D., Nordmann, P. (2015). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: Assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance*, 20(45). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062>
- Alrowais, H., McElheny, C. L., Sychala, C. N., Sastry, S., Guo, Q., Butt, A. A., & Doi, Y. (2015). Fosfomycin resistance in *Escherichia coli*, Pennsylvania, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 21(11). <https://doi.org/10.3201/eid2111.150750>
- Andrey, D.O., Pereira-Dantas, P., Martins, W.B.S., Marques De Carvalho, F., Medeiros, E.A., Walsh, T.R., Gales, A.C. (2020). An emerging clone, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST16, associated with high mortality rates in a CC258 endemic setting. *Clinical Infectious Diseases*, 71(7), e141-e150
- Antunes, N. T., Lamoureaux, T. L., Toth, M., Stewart, N. K., Frase, H., & Vakulenko, S. B. (2014). Class D  $\beta$ -lactamases: Are they all carbapenemases? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02522-13>
- Aquino-Andrade, A., Merida-Vieyra, J., Arias de la Garza, E., Arzate-Barbosa, P., & De Colsa Ranero, A. (2018). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Mexico: report of seven non-clonal cases in a pediatric hospital. *BMC microbiology*, 18, 1-8
- Araújo-Pírez, L., Ávila, P., García Fulgueiras, V., Papa-Ezdra, R., Mota, M., López, M., Camou, T., Iriarte, A., Vignoli, R. (2020). First report of plasmidic OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay, 2452, ASM Microbe

Asbel, L. E., & Levison, M. E. (2000). CEPHALOSPORINS, CARBAPENEMES, AND MONOBACTÁMICOS . *Infectious Disease Clinics of North America*, *14*(2), 435–447. doi:10.1016/s0891-5520(05)70256-7

Azzopardi, E. A., Boyce, D. E., Thomas, D. W., & Dickson, W. A. (2013). Colistin in burn intensive care: ¿Back to the future? In *Burns* (Vol. 39, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.07.015>

Bado, I., Gutiérrez, C., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Pirez, L. A., Seija, V., Baset, C., Rieppi, G. & Vignoli, R. (2016). 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. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *6*, 5-9.

Bado, I., Papa-Ezdra, R., Delgado-Blas, J. F., Gaudio, M., Gutiérrez, C., Cordeiro, N. F., & Vignoli, R. (2018). 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. *Microbial Drug Resistance*, *24*(7), 1012-1019.

Baran, I., & Aksu, N. (2016). Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0136-2>

Barguigua, A., Zerouali, K., Katfy, K., El Otmani, F., Timinouni, M., & Elmdaghri, N. (2015). Occurrence of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco. *Infection, Genetics and Evolution*, *31*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.010>

Barrios, H., Garza-Ramos, U., Mejia-Miranda, I., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Mosqueda-García, D., & Silva-Sanchez, J. (2017). ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *10*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.008>

Barton, B. M., Harding, G. P., & Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 226, Issue 2, pp. 235–240). <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1220>

Bengtsson, S., Naseer, U., Sundsfjord, A., Kahlmeter, G., & Sundqvist, M. (2012). Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic *Escherichia coli* devoid of

phenotypically detectable resistance. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 67(1), 69-73.

Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M. (2012). Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 10, Issue 8). <https://doi.org/10.1586/eri.12.78>

Blanchard, A. M., Jolley, K. A., Maiden, M. C., Coffey, T. J., Maboni, G., Staley, C. E., & Töttemeyer, S. (2018). The applied development of a tiered multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Dichelobacter nodosus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 551.

Bodendoerfer, E., Marchesi, M., Imkamp, F., Courvalin, P., Böttger, E. C. & Mancini, S. (2020). Co-occurrence of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside-non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *International journal of antimicrobial agents*, 56(1), 106019.

Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>

Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 23, Issue 2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>

Bratu, S., Mooty, M., Nichani, S., Landman, D., Gullans, C., Pettinato, B., Karumudi, U., Tolaney, P., & Quale, J. (2005). Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7). <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3018-3020.2005>

Bousquet, A., Duprilot, M., Moissenet, D., Salauze, B., Rambaud, J., Genel, N., Vu-Thien, H., Arlet, G., Decré, D. (2014) First case of multidrug-resistant *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-232</sub> carrying *Klebsiella pneumoniae* and its probable cross-transmission in a French hospital. *Int J Antimicrob Agents*. Nov;44(5):469-70. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.004.

Bradford P. A., Bratu S., Urban C., Visalli M., Mariano N., Landman D., Rahal J. J., Brooks S., Cebular S., Quale J. (2004). Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 39:55– 60. <https://doi.org/10.1086/421495>

- Brink, A. J., Coetzee, J., Clay, C. G., Sithol, S., Richards, G. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.05956-11>
- Brink, A. J., Coetzee, J., Corcoran, C., Clay, C. G., Hari-Makkan, D., Jacobson, R. K., Richards, G. A., Feldman, C., Nutt, L., Van Greune, J., Deetlefs, J. D., Swart, K., Devenish, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2013). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1). <https://doi.org/10.1128/JCM.02234-12>
- Brolund, A., & Sandegren, L. (2016). Characterization of ESBL disseminating plasmids. In *Infectious Diseases* (Vol. 48, Issue 1). <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1062536>
- Bui, T., & Preuss, C. V. (2023). Cephalosporins. StatPearls Publishing; PMID: 31855361.
- Bush, K. (2016). Overcoming  $\beta$ -lactam resistance in Gram-negative pathogens. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 8, Issue 9). <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0076>
- Bush, K. & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of Beta-Lactamase-Producing Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, 1–37
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*, 63(3), 219-228
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 1–5
- Castañeda-García, A., Blázquez, J., & Rodríguez-Rojas, A. (2013). Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. In *Antibiotics* (Vol. 2, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>
- Cejas, D., Elena, A., Guevara-Nuñez, D., Sevillano-Platero, P., De Paulis, A., Magariños, F., Alfonso, C., Berger, M.A., Fernández-Canigia, L., Gutkind, G., Radice, M. (2019). Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina:



Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *Journal of global antimicrobial resistance*, 18, 238-242.

Centers for Disease Control, Prevention Notes from the field: hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing New Delhi metallo-beta-lactamase—Denver, Colorado, 2012. (2013). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 62:108; PMID:23407128

Centers for Disease Control and Prevention Tracking CRE. (2016); <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/TrackingCRE.html> accessed May/23/2016

Chaudhry, S. B., Veve, M. P. & Wagner, J. L. (2019). Cephalosporins: A Focus on Side Chains and  $\beta$ -Lactam Cross-Reactivity. *Pharmacy*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/pharmacy7030103>

Chávez, C. E., Brito, V. M. C., & Acosta, L. S. A. (2020). Resistencia antimicrobiana de enterobacterias y uso de antibióticos en pacientes de uci clínica Dame 2014. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 5(4), 271-287

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Journal of Services Marketing* (Vol. 31, Issue 3)

Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., & Vignoli, R. (2020). Transferable resistance to highest priority critically important antibiotics for human health in *Escherichia coli* strains obtained from livestock feces in Uruguay. *Frontiers in veterinary science*, 7, 588919.

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews*, 52(3), 375-395.

Cullmann, W., & Dick, W. (1990). Heterogeneity of beta-lactamase production of *Pseudomonas maltophilia*, a nosocomial pathogen. *Chemotherapy*, 36(2). <https://doi.org/10.1159/000238757>

Cuzon, G., Bentchouala, C., Vogel, A., Héry, M., Lezzar, A., Smati, F., Dortet, L., & Naas, T. (2015). First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 46, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.005>

- Dashti, A., Jadaon, M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med J*, 41(2), 117-122.
- Datta, N., & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, 208(5007). <https://doi.org/10.1038/208239a0>
- Datta, N., & Richmond, M. H. (1966). The purification and properties of a penicillinase whose synthesis is mediated by an R-factor in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, 98(1). <https://doi.org/10.1042/bj0980204>
- De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5090.
- Decousser, J. W., Poirel, L., & Nordmann, P. (2001). Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3595-3598.2001>
- den Heijer, C. D. J., Donker, G. A., Maes, J., & Stobberingh, E. E. (2010). Antibiotic susceptibility of unselected uropathogenic *Escherichia coli* from female Dutch general practice patients: A comparison of two surveys with a 5 year interval. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10). <https://doi.org/10.1093/jac/dkq286>
- Deshpande, L. M., Rhomberg, P. R., Sader, H. S., & Jones, R. N. (2006). Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(4). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.004>
- Díaz-Velásquez, S., Castañeda-Torres, S., Cruz-López, C., Carrasco-Solano, F. & Moreno-Mantilla, M. (2021). Etiología de infecciones urinarias y prevalencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. *REBIOL*, 41(2):179-186
- Dortet, L., Poirel, L., Anguel, N., & Nordmann, P. (2012). New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 4-producing *Escherichia coli* in Cameroon. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 9). <https://doi.org/10.3201/eid1809.120011>
- Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds, R., Wain, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2015). Rapid identification of major *Escherichia coli*

sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 160–166. <https://doi.org/10.1128/JCM.02562-14>

Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160-201

Dulaney, E. L., & Ruby, C. L. (1977). In vitro development of resistance to fosfomycin. *The Journal of Antibiotics*, 30(3). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.252>

Elshamy, A., & Aboshanab, K. M. (2020). A review on bacterial resistance to carbapenemes: epidemiology, detection and treatment options. *Future science OA*, 6(3), FSO438

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2021). *EUCAST*.

Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Samonis, G. & Vardakas, K. Z. (2016). Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev*, 29:321–347

Farmer, J. J., Farmer, M. K., & Holmes, B. (2010). The *Enterobacteriaceae*: General Characteristics. In *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. <https://doi.org/10.1002/9780470688618.taw0051>

Fillgrove, K. L., Pakhomova, S., Newcomer, M. E., & Armstrong, R. N. (2003). Mechanistic Diversity of Fosfomycin Resistance in Pathogenic Microorganisms. *Journal of the American Chemical Society*, 125(51). <https://doi.org/10.1021/ja039307z>

Fukigai, S., Alba, J., Kimura, S., Iida, T., Nishikura, N., Ishii, Y., & Yamaguchi, K. (2007). Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.10.011>

Fursova, N. K., Astashkin, E. I., Knyazeva, A. I., Kartsev, N. N., Leonova, E. S., Ershova, O. N., Alexandrova, I. A., Kurdyumova, N. V., Sazikina, S. Y., Volozhantsev, N. V., Svetoch, E. A., & Dyatlov, I. A. (2015). The spread of *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>OXA-244</sub> carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter spp.* isolated in Moscow, Russia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0108-y>

Gallardo-Godoy, A., Muldoon, C., Becker, B., Elliott, A. G., Lash, L. H., Huang, J. X., Butler, M. S., Pelingon, R., Kavanagh, A. M., Ramu, S., Phetsang, W., Blaskovich, M. A. T., & Cooper, M. A. (2016). Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(3). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01593>

Garcia-Fulgueiras, V., Araujo, L., Bado, I., Cordeiro, N. F., Mota, M. I., Laguna, G., Algorta, G. & Vignoli, R. (2017). Allodemic distribution of plasmids co-harboring *bla*<sub>CTX-M-15/aac(6')-Ib-cr/qnrB</sub> in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Uruguay's paediatric hospital. *Journal of global antimicrobial resistance*, 9, 68-73

Garcia-Fulgueiras, V., Zapata, Y., Papa-Ezdra, R., Ávila, P., Caiata, L., Seija, V., Rojas Rodriguez, A. E., Magallanes, C., Márquez Villalba, C., & Vignoli, R. (2020). First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring *bla*<sub>KPC-3</sub> in Latin America. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.003>

Garcia-Fulgueiras, V., Caiata, L., Bado, I., Giachetto, G., & Robino, L. (2022). Antibiotic susceptibility and fosfomicin resistance characterization in a cohort of children older than 6 years of age with urinary tract infection. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(2), 120-124

Giani, T., Conte, V., Di Pilato, V., Aschbacher, R., Weber, C., Larcher, C., & Rossolini, G. M. (2012). *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 56, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/AAC.00035-12>

Giakkoupi, P., Pappa, O., Polemis, M, Vatopoulos, A.C., Miriagou, V., Zioga, A., Papagiannitsis, C. C., Tzouvelekis, L. S. (2009) Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep;53(9):4048-50. doi: 10.1128/AAC.00690-09

Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 866-875

Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C., Martinez, M. B. (2016) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol.* Suppl 1:3-30. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015

Gomez, S. A., Rapoport, M., Piergrossi, N., Faccone, D., Pasteran, F., De Belder, D., Petroni, A., & Corso, A. (2016). Performance of a PCR assay for the rapid identification of the *Klebsiella pneumoniae* ST258 epidemic clone in Latin American clinical isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 145–146. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.018>

- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2020). The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
- Hammoudi, D., Moubareck, C. A., Aires, J., Adaime, A., Barakat, A., Fayad, N., Hakime, N., Houmani, M., Itani, T., Najjar, Z., Suleiman, M., Sarraf, R., & Sarkis, D. K. (2014). Countrywide spread of OXA-48 carbapenemase in Lebanon: Surveillance and genetic characterization of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in 10 hospitals over a one-year period. *International Journal of Infectious Diseases*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.07.017>
- Harrison, C. J., & Bratcher, D. (2008). Cephalosporins: A review. In *Pediatrics in Review* (Vol. 29, Issue 8). <https://doi.org/10.1542/pir.29-8-264>
- Hawkey, P. M., & Livermore, D. M. (2012). Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ (Online)*, 344(7863). <https://doi.org/10.1136/bmj.e3236>
- Hendlin, D., Stapley, E. O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J., Miller T. W., Chalet, L., Kahan, F. M., Foltz, E. L., Woodruff, H. B., Mata, J. M., Hernandez, S. & Mochales, S. (1969). Fosfomicina, un nuevo antibiótico producido por cepas de *Streptomyces*. *Science* 166:122–123
- Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Law, P. Y., Li, Z., Lai, E. L., & Chow, K. H. (2013). Dissemination of plasmid-mediated fosfomicin resistance *fosA3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3). <https://doi.org/10.1111/jam.12099>
- Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Lai, E. L., Cheung, Y., Lau, T. C. K., & Chow, K. H. (2014). Prevalence and molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomicin resistance genes among blood and urinary *Escherichia coli* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 63(4). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.074468-0>
- Hornsey, M., Phee, L., & Wareham, D. W. (2011). A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.05108-11>
- Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., & Philippon, A. (2002).  $\beta$ -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.3045-3049.2002>

- Hou, J., Huang, X., Deng, Y., He, L., Yang, T., Zeng, Z., Chen, Z., & Liu, J. H. (2012). Dissemination of the fosfomicin resistance gene *fosA3* with CTX-M  $\beta$ -lactamase genes and *rmtB* carried on incFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2135–2138. <https://doi.org/10.1128/AAC.05104-11>
- Ingold, A.J., Castro, M., Nabón, A., Borthagaray, G., Márquez, C. (2011). Detección del gen codificante de la metalo- $\beta$ -lactamasa VIM-2 en un integrón de clase 1 asociado con el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en el Uruguay: primera comunicación. *Rev Argent Microbiol*. Jul-Sep;43(3):198-202.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2021). The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (Order: Enterobacterales): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>
- Kamenski, G., Wagner, G., Zehetmayer, S., Fink, W., Spiegel, W., & Hoffmann, K. (2012). Antibacterial resistances in uncomplicated urinary tract infections in women: ECO-SENS II data from primary health care in Austria. *BMC Infectious Diseases*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-222>
- Kazi, M., Drego, L., Nikam, C., Ajbani, K., Soman, R., Shetty, A., & Rodrigues, C. (2015). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* at a tertiary care laboratory in Mumbai. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3). <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2249-x>
- Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Hackel, M., Rabine, S., De Jonge, B. L. M., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2016). Global dissemination of *bla*<sub>KPC</sub> into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and in vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00107-16>
- Kazmierczak, K. M., Rabine, S., Hackel, M., McLaughlin, R. E., Biedenbach, D. J., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2016). Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.02379-15>
- Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., & Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.28.2.302>

- Kobayashi, S., Kuzuyama, T., & Seto, H. (2000). Characterization of the *fomA* and *fomB* gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomycin resistance on *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 647–650. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.647-650.2000>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Kresken, M., Pfeifer, Y., Hafner, D., Wresch, R., & Körber-Irrgang, B. (2014). Occurrence of multidrug resistance to oral antibiotics among *Escherichia coli* urine isolates from outpatient departments in Germany: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the role of fosfomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.020>
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
- Labia, R., Guionie, M., Masson, J. M., Philippon, A., & Barthelemy, M. (1977).  $\beta$ -lactamases produced by a *Pseudomonas aeruginosa* strain highly resistant to carbenicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.785>
- Lafeuille, E., Decré, D., Mahjoub-Messai, F., Bidet, P., Arlet, G., & Bingen, E. (2013). OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from libyan patients. *Microbial Drug Resistance*, 19(6). <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0219>
- Lascols, C., Hackel, M., Marshall, S. H., Hujer, A. M., Bouchillon, S., Badal, R., Hoban, D., & Bonomo, R. A. (2011). Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in India: Data from the SMART study (2009). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9). <https://doi.org/10.1093/jac/dkr240>
- Leavitt A., Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Schwaber M.J., Carmeli Y. (2007). Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3026 – 3029. <https://doi.org/10.1128/AAC.00299-07>

- Lemlem M, Aklilu E, Mohammed M, Kamaruzzaman F, Zakaria Z, Harun A & Deva, S. (2023) Molecular detection and antimicrobial resistance profiles of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in broiler chicken farms in Malaysia. PLoS ONE 18(5): e0285743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285743>
- Liao, I. C., Chen, H. M., Wu, J. J., Tsai, P. F., Wang, L. R., & Yan, J. J. (2011). Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates at a Taiwanese hospital: Lack of distinctive phenotypes for screening. *APMIS*, 119(8). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02772.x>
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 75, Issue 11). <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205>
- Liu, Y., Feng, Y., Wu, W., Xie, Y., Wang, X., Zhang, X., Chen, X., & Zong, Z. (2015). First report of OXA-181-producing *Escherichia coli* in China and characterization of the isolate using whole-genome sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00442-15>
- Llobet, E., Tomás, J. M., & Bengoechea, J. A. (2008). Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, 154(12). <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022301-0>
- López, M. (2021). Caracterización de carbapenemasas en Uruguay 2011-2021.
- López, M., Caiata, L., Otero, A., Mogdasy, C. (2022). Carbapenemase surveillance in Uruguay: a ten year picture. Poster presentado en el congreso mundial WasPalm, Uruguay
- Lowman, W., Sriruttan, C., Nana, T., Bosman, N., Duse, A., Venturas, J., Clay, C., & Coetzee, J. (2011). NDM-1 has arrived: First report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. In *South African Medical Journal* (Vol. 101, Issue 12)
- Lunha, K., Chanawong, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L., Saenjamla, P., Chaimanee, P., Angkititrakul, S., & Chetchotisakd, P. (2016). High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(2). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.009>
- Lv, L., Wan, M., Wang, C., Gao, X., Yang, Q., Partridge, S.R., Wang, Y., Zong, Z., Doi, Y., Shen, J., Jia, P., Song, Q., Zhang, Q., Yang, J., Huang, X., Wang, M., Liu, J.H. (2020).



Emergence of a Plasmid-Encoded Resistance-Nodulation-Division Efflux Pump Conferring Resistance to Multiple Drugs, Including Tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*. Mar 3;11(2):e02930-19. doi: 10.1128/mBio.02930-19. PMID: 32127452; PMCID: PMC7064769

Ma, L., Wang, J. T., Wu, T. L., Siu, L. K., Chuang, Y. C., Lin, J. C., Lu, M. C., & Lu, P. L. (2015). Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139152>

Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), 10-1128

Maraki, S., Samonis, G., Rafailidis, P. I., Vouloumanou, E. K., Mavromanolakis, E., & Falagas, M. E. (2009). Susceptibility of urinary tract bacteria to fosfomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00721-09>

Márquez, C., Ingold, A., Echeverría, N., Acevedo, A., Vignoli, R., García-Fulgueiras, V., Viroga, J., Gonzalez, O., Odizzio, V., Etulain, K., Nuñez, E., Albornoz, H., Borthagaray, G., & Galiana, A. (2014). Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: Infection control and molecular characterization. *New Microbes and New Infections*, 2(3), 58–63. <https://doi.org/10.1002/nmi2.40>

Martínez-Martínez, L., & González-López, J. (2014). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(S4). [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70168-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70168-5)

Mathers, A. (2016). Mobilization of Carbapenemase-Mediated Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ei10-0010-2015>

Matthew, M., & Hedges, R. W. (1976). Analytical isoelectric focusing of R factor determined  $\beta$ -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *Journal of Bacteriology*, 125(2). <https://doi.org/10.1128/jb.125.2.713-718.1976>

Mayhall, C. G. (2000). *Hospital Epidemiology And Infection Control*, 2nd ed. Philadelphia, PA:Lippincott Williams & Wilkins.

Medeiros, A. A., & O'Brien, T. F. (1975). Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a tem-type  $\beta$ -lactamase but little permeability barrier to ampicillin. *The Lancet*, 305(7909). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)91630-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)91630-X)

Meletis, G., Chatzidimitriou, D. & Malisiovas, N. (2015). Productores de carbapenemasas dobles y múltiples: los bacilos excesivamente blindados de la década actual. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34, 1487–1493. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2379-9>

Meyer, K. S., Urban, C., Eagan, J. A., Berger, B. J., & Rahal, J. J. (1993). Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Annals of Internal Medicine*, 119(5). <https://doi.org/10.7326/0003-4819-119-5-199309010-00001>

Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and resistance. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 43, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/aac.43.4.727>

Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., Tinoco-Carrillo, P., Petersen, L., López, P., Reyna-Flores, F., Alcantar-Curiel, D., Garza-Ramos, U., & Garza-González, E. (2013). Characterization of *Enterobacteriaceae* Isolates Obtained from a Tertiary Care Hospital in Mexico, Which Produces Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase. *Microbial Drug Resistance*, 19(5) <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0263>

Morris, S., & Cerceo, E. (2020). Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. *Antibiotics*, 9(4), 196

Mushi, M. F., Mshana, S. E., Imirzalioglu, C., & Bwanga, F. (2014). Carbapenemase genes among multidrug resistant gram negative clinical isolates from a tertiary hospital in Mwanza, Tanzania. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/303104>

Naas, T., Dortet, L., & I. Iorga, B. (2016). Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17(9). <https://doi.org/10.2174/1389450117666160310144501>

Nakamura, G., Wachino, J. I., Sato, N., Kimura, K., Yamada, K., Jin, W., Shibayama, K., Yagi, T., Kawamura, K., & Arakawa, Y. (2014). Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3175–3179. <https://doi.org/10.1128/JCM.01094-14>

- Neuner, E. A., Sekeres, J., Hall, G. S., & Van Duin, D. (2012). Experience with fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00402-12>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10). <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- Nordmann, P. & Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, *69*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological reviews*, *51*(4), 381-395
- Ocampo, A. M., Chen, L., Cienfuegos, A. V., Roncancio, G., Chavda, K. D., Kreiswirth, B. N., & Jiménez, N. (2016). A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>
- Organización Panamericana de la Salud (2021). Alerta Epidemiológica: Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacterales en Latinoamérica y el Caribe
- Otero, A., López, M., Caiata, L., Cortinas, M., Mogdasy, C. Emergence of double-carbapenemase-producing enterobacterales during COVID-19 pandemic in Uruguay. (2022). Poster presentado en el congreso mundial WasPalm, Uruguay
- Papa-Ezdra, R., Diaz, F. G., Vieytes, M., García-Fulgueiras, V., Caiata, L., Ávila, P., & Vignoli, R. (2020). First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr-1* in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *20*, 187-190
- Papa-Ezdra, R., Caiata, L., Palacio, R., Outeda, M., Cabezas, L., Bálsamo, A., & Seija, V. (2021). Prevalence and molecular characterisation of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in an outbreak-free setting in a single hospital in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *24*, 58-62
- Passadouro, R., Fonseca, R., Figueiredo, F., Lopes, A., & Fernandes, C. (2014). Evaluation of the antimicrobial susceptibility of community-acquired urinary tract infection. *Acta Médica Portuguesa*, *27*(6). <https://doi.org/10.20344/amp.5352>
- Peirano, G., Van Der Bij, A. K., Gregson, D. B., & Pitout, J. D. D. (2012). Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-

- producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.06025-11>
- Pereira, P. S., Borghi, M., De Araújo, C. F. M., Aires, C. A. M., Oliveira, J. C. R., Asensi, M. D., & Carvalho-Assef, A. P. D. A. (2015). Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.04243-14>
- Perez-Lopez, A., Sundararaju, S., Al-Mana, H., Tsui, K. M., Hasan, M. R., Suleiman, M., & Tang, P. (2020). Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among the pediatric population in Qatar. *Frontiers in microbiology*, 11, 581711
- Peri, A. M., Doi, Y., Potoski, B. A., Harris, P. N., Paterson, D. L., & Righi, E. (2019). Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 94(4), 413-425
- Perry, J. A., & Wright, G. D. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in microbiology*, 4, 138
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenemes in Gram-negative bacterial pathogens. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 300, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
- Pitout J.D., Revathi G., Chow B.L., Kabera B., Kariuki S., Nordmann P., Poirel L. (2008) Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clin. Microbiol. Infect.*;14:755–759. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02030.x
- Plan Nacional de Acción contra la Resistencia Antimicrobiana (2018). Ministerio de Salud Pública
- Poirel, L., Abdelaziz, M. O., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2013). Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 41, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.015>
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>

Poirel L., Hombrouck-Alet C., Freneaux C., Bernabeu S., Nordmann P. (2010). Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.*;10:832. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70279-6

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 30, Issue 2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>

Poirel, L., Kämpfer, P., & Nordmann, P. (2002). Chromosome-encoded ambler class a  $\beta$ -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4038-4040.2002>

Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7). <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>

Poirel, L., Revathi, G., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01247-10>

Porta, T. V. & Bonilla, D. L. (2017). Detección de los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 26(2), 8-17

Quiñones, D., Betancourt, Y., Carmona, Y., Pereda, N., Álvarez, S., & Kobayashi, N. (2020). *Escherichia coli* extraintestinal, resistencia antimicrobiana y producción de betalactamasas en aislados cubanos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(3).

Rahal, J. J., Urban, C., Horn, D., Freeman, K., Segal-Maurer, S., Maurer, J., Mariano, N., Marks, S., Burns, J. M., Dominick, D., & Lim, M. (1998). Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*, 280(14). <https://doi.org/10.1001/jama.280.14.1233>

Rahbé, E., Glaser, P., & Opatowski, L. (2024). Modeling the transmission of antibiotic-resistant Enterobacterales in the community: a systematic review. *medRxiv*, 2024-01.

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6). <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>

- Rasheed, J. K., Kitchel, B., Zhu, W., Anderson, K. F., Clark, N. C., Ferraro, M. J., Savard, P., Humphries, R. M., Kallen, A. J., & Limbago, B. M. (2013). New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6). <https://doi.org/10.3201/eid1906.121515>
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A. & Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6), 17-00672
- Reyes, J. A., Melano, R., Cárdenas, P. A., & Trueba, G. (2020). Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24, 231-238
- Rolain, J. M., Parola, P., & Cornaglia, G. (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): Towards a new pandemic? In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 16, Issue 12). <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03385.x>
- Sacsquispe-Contreras, R. & Bailón-Calderón, H. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*, 35, 259-264
- Sader, H. S., Mendes, R. E., Pfaller, M. A., Shortridge, D., Flamm, R. K., & Castanheira, M. (2018). Antimicrobial activities of aztreonam-avibactam and comparator agents against contemporary clinical *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01856-17>
- Saiprasad, P. & Krishnaprasad, K. (2016). Exploring the hidden potential of fosfomycin for the fight against severe Gram-negative infections. In *Indian Journal of Medical Microbiology* (Vol. 34, Issue 4). <https://doi.org/10.4103/0255-0857.195379>
- Sampaio, J. L. M., & Gales, A. C. (2016). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *brazilian journal of microbiology*, 47(Suppl. 1), 31-37
- Sassi, A., Loucif, L., Gupta, S. K., Dekhil, M., Chettibi, H., & Rolain, J. M. (2014). NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.02818-13>

- Sastry, S. & Doi, Y. (2016). Fosfomicin: Resurgence of an old companion. In *Journal of Infection and Chemotherapy* (Vol. 22, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.01.010>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Scaife, W., Young, H. K., Paton, R. H., & Amyes, S. G. B. (1995). Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter spp.* species from a clinical source. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 36, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/jac/36.3.585>
- Sevillano, E., Valderrey, C., Canduela, M. J., Umaran, A., Calvo, F., & Gallego, L. (2006). Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathologie Biologie*, 54(8-9 SPEC.ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.030>
- Shandrick, S., Zhao, Q., Han, Q., Ayida, B. K., Takahashi, M., Winters, G. C., Simonsen, K. B., Vourloumis, D., & Hermann, T. (2004). Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(24). <https://doi.org/10.1002/anie.200454217>
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, 6, 242.
- Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-michaud, A., Perroux, R., & Cluzel, R. (1987). Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20(3). <https://doi.org/10.1093/jac/20.3.323>
- Souza, R. B., Trevisol, D. J., & Schuelter-Trevisol, F. (2015). Bacterial sensitivity to fosfomicin in pregnant women with urinary infection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(3). <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.009>
- Soria Segarra, C. G. (2021). Caracterización clínica, epidemiológica y factores de riesgo para la infección/colonización por Enterobacterales productores de carbapenemasa.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Thomas, G.R., Corso, A., Pasterán, F., Shal, J., Sosa, A., Pilonetto, M., de Souza-Peral, R.T., Hormazábal, J.C., Araya, P., Saavedra, S.Y., Ovalle, M.V., Jiménez-Pearson, M.A., Chacón, G.C., Carbon, E., Mazariegos-Herrera, C.J., Gonzalez-Velásquez, S. D. C., Satan-Salazar, C., Villavicencio, F., Touchet, N.M., Busignani, S., Mayta-Barrios, M.,

Ramírez-Illescas, J., Vega, M.L., Mogdasy, C., Rosas, V., Salgado, N., Quiroz, R., El-Omeiri, N., Galas, M.F., Ramón-Pardo, P., Melano, R.G. (2022) Increased Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriales Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. *Emerg Infect Dis.* Nov;28(11):1-8. doi: 10.3201/eid2811.220415.

van Duijkeren, E., Schwarz, C., Bouchard, D., Catry, B., Pomba, C., Baptiste, K. E., Moreno, M. A., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Wester, A. L., Ignate, K., Kunsagi, Z., & Jukes, H. (2019). The use of aminoglycosides in animals within the EU: Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: A review. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 74, Issue 9). <https://doi.org/10.1093/jac/dkz161>

van Duin, D., & Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In *Virulence* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>

Velásquez Porta, T., & Lau Bonilla, D. (2017). Detección de los genes de carbapenemasa *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en aislados de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la Ciudad de Guatemala. *Revista científica*, 26 (2), 8–17.

Villa, L., Guerra, B., Schmoger, S., Fischer, J., Helmuth. (2015). IncA/C Plasmid Carrying *bla<sub>(NDM-1)</sub>*, *bla<sub>(CMY-16)</sub>*, and *fosA3* in a *Salmonella enterica* serovar *corvallis* strain isolated from a migratory wild Bird in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*, 59 (6597–6600)

Villar, H. E., Jugo, M. B., Macan, A., Visser, M., Hidalgo, M., & Maccallini, G. C. (2014). Frequency and antibiotic susceptibility patterns of urinary pathogens in male outpatients in Argentina. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(6). <https://doi.org/10.3855/jidc.3766>

Villegas, M. V., Pallares, C. J., Escandón-Vargas, K., Hernández-Gómez, C., Correa, A., Álvarez, C., Rosso, F., Matta, L., Luna, C., Zurita, J., Mejía-Villatoro, C., Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Cortesía, M., Guzmán-Suárez, A., & Guzmán-Blanco, M. (2016). Characterization and clinical impact of bloodstream infection caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in seven Latin American countries. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154092>

von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolfs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>



- Wachino, J. I., & Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resistance Updates*, 15(3). <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.05.001>
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, J., Wang, Y., Wang, Z. Y., Wu, H., Mei, C. Y., Shen, P. C., Pan, Z. M., & Jiao, X. (2021). Chromosomally Located *fosA7* in *Salmonella* Isolates From China. *Frontiers in Microbiology*, 12 (December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.781306>
- Wang, N., Luo, J., Deng, F., Huang, Y., & Zhou, H. (2022). Antibiotic combination therapy: a strategy to overcome bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 839808
- Wang, S., Zhao, S. Y., Xiao, S. Z., Gu, F. F., Liu, Q. Z., Tang, J., Guo, X. K., Ni, Y. X., & Han, L. Z. (2016). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in three hospitals in Shanghai, China. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147740>
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L.P. *et al.* The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Na Commun* 9, 1179 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>
- Wang, X., Li, Q., Kang, J., Zhang, Z., Song, Y., Yin, D., Guo, Q., Song, J., Li, X., Wang, S., & Duan, J. (2021). Co-Production of NDM-1, CTX-M-9 Family and *mcr-1* in a *Klebsiella pneumoniae* ST4564 Strain in China. *Infect Drug Resist. Infection and Drug Resistance*, 449-457
- World Health Organization. “Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Reserch, Discovery and Development of New Antibiotics”. 2017
- World Health Organization. (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Wyres, K. L., Cahill, S. M., Holt, K. E., Hall, R. M., & Kenyon, J. J. (2019). Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide

outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with Kaptive. *Microbial genomics*, 6(3), e000339.

Wyres, K. L., Lam, M. M. C. & Holt, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* 18, 344–359 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>

Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Froumine, R., Tokolyi, A., Gorrie, C. L., Lam, M. M. C., Duchêne, S., Jenney, A., & Holt, K. E. (2019). Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS genetics*, 15(4), e1008114.

Woodford, N., Tierno, P. M., Young, K., Tysall, L., Palepou, M. F. I., Ward, E., Painter, R. E., Suber, D. F., Shungu, D., Silver, L. L., Inglima, K., Kornblum, J., & Livermore, D. M. (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004>

Xu, X., Chen, C., Lin, D., Guo, Q., Hu, F., Zhu, D., Li, G., & Wang, M. (2013). The fosfomycin resistance gene *fosB3* is located on a transferable, extrachromosomal circular intermediate in clinical *Enterococcus faecium* isolates. *PloS One*, 8(10), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078106>

Yang, Y. Q., Li, Y. X., Lei, C. W., Zhang, A. Y., & Wang, H. N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791–1795. <https://doi.org/10.1093/jac/dky111>

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>

Yigit, H., Queenan, A. M., Rasheed, J. K., Biddle, J. W., Domenech-Sanchez, A., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2003). Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3881-3889.2003>

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., Wang, Y. 2017. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* 8:10.1128/mbio.00543-17

- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Zagorianou, A., Sianou, E., Iosifidis, E., Dimou, V., Protonotariou, E., Miyakis, S., Roilides, E., & Sofianou, D. (2012). Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Eurosurveillance*, 17(7). <https://doi.org/10.2807/ese.17.07.20088-en>
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
- Zhang, F., Zhu, D., Xie, L., Guo, X., Ni, Y., & Sun, J. (2015). Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and the prevalence of ST131 subclone H30 in Shanghai, China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(6). <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2356-3>
- Zhang, Y., Zhang, N., Wang, M., Luo, M., Peng, Y., Li, Z., & Lu, X. (2023). The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosafety and Health*, 5(01), 14-20.
- Zhou, X., & Huang, L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1189(2), 195-203.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Protocolos

#### 9.1.1 Protocolo de extracción de ADN (Dashti, 2009)

- Colocar 200µL de agua mQ estéril en un eppendorf de 1.5mL
- Colocar 3 o 4 colonias
- Vortexear
- Poner en el termobloque a 100°C por 10 min
- Colocar en el freezer a -20°C por 5 min
- Centrifugar 10 min a 13000 rpm
- Pasar el sobrenadante a un eppendorf de 1.5mL
- Conservar a -20°C

#### 9.1.2 Protocolo para conservar cepas a -80°C

- Colocar 910µL de caldo LB en un eppendorf de 1.5mL
- Colocar en el tubo 3 o 4 ansadas de colonias.
- Vortexear
- Colocar 390µL de glicerol estéril
- Vortexear
- Congelar en el freezer a -80°C

### 9.1.3. Protocolos y tablas de cebadores

**Tabla 2.** Carbapenemasas y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

Cebador	Secuencia (5'→3')	T amplificación (°C)	Tamaño (pb)	Referencia	Programa de amplificación	
PAN-CTX-M-F	TTTGCAGATGTCAGTACCAGTAA	61	543	García-Fulgueiras, 2020	Desnaturalización inicial	94 °C 5 min
PAN-CTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA					
CTX-M-1-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTG	54	830			
CTX-M-1-R	CGTAGCCGGGCCGCCAACGTGA					
CTX-M-2-F	TTAATGATGACTCAGAGCATT	52	875			
CTX-M-2-R	GATACCTCGCTCCATTATTGTC					
CTX-M-G3-F	ACCTGATTAACAATCCCAT	55	514			
CTX-M-G3-R	ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC					
CTX-M-8-F	TGAATACTTCAGCCACACG	50	922			
CTX-M-8-R	TAGAATTAATAACCGTCGGT					
CTX-M-G4-F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG	57	473			
CTX-M-G4-R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG					
KPC-F	AACAAGGAATATCGTTGATG	94	905			
KPC-R	AGATGATTTTCAGAGCCTTA					
NDM-1F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	56	620			
NDM-1R	CGGAATGGCTCATCACGATC					
OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	50	744			
OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC					

**Tabla 3.** ST exitosos

Cebador	Secuencia (5'→3')	T amplificación (°C)	Tamaño (pb)	Referencia	Programa de amplificación	
pilv-F	TGATGCTGATGGCAGACTGA	53	320	Gomez, 2016	Desnaturalización inicial	94°C 5 min
					Amplificación	30 ciclos
pilv-R	TGATGTCACACCCTGCCCA	60	490	Doumith, 2015	Desnaturalización inicial	94 °C 3 min
					Amplificación	30 ciclos
ST131-F	GACTGCATTTTCGTCCGCATA	60	310	Doumith, 2015	Amplificación	30 ciclos
ST131-R	CCGGCGGCATCATAATGAAA					
ST95-F	ACTAATCAGGATGGCGAGAC	60	200	Doumith, 2015	Amplificación	30 ciclos
ST95-R	ATCACGCCCATTAATCCAGT					
ST69-F	ATCTGGAGGCAACAAGCATA	60	104	Doumith, 2015	Extensión	72 °C 5 min
ST69-R	AGAGAAAGGCGTTCAGAAT					

**Tabla 4.** Fosfomicina

Cebador	Secuencia (5'→3')	T amplificación (°C)	Tamaño (pb)	Referencia	Programa de amplificación			
fosA-F	ATCTGTGGTCTGCCTGTCGT	56	271	Hou, 2012	Desnaturalización inicial	94 °C 1 min		
fosA-R	ATGCCCGCATAGGGCTTCT							
fosB-F	AATCGGATTTTAGTGTGAAACA	58	417	Xu, 2013				
fosB-R	GGTAATCGGATAATAGTGTGA							
fomA-F	GGGGGATCCACGCCGATTTCTTGCC	60	795	Kobayashi, 2020				
fomA-R	GGGGGATCCCGCAGAAGCAGTCGTGGTG							
fomB-F	GGGGGATCCCTGGAAAACCTCACGATCCGC	60	991	Kobayashi, 2020				
fomB-R	GGGGGATCCTTCGGCAAGCTGCTTGAGCGTC							
fosA3-F	TGAATCATCTGACGCTGG	45	404	Hou, 2012			Amplificación	35 ciclos
fosA3-R	TCAATCAAAAAAGACCATC							
fosC2-F	CGTTCGGTGGAGTTCTATAC	54	334	Hou, 2012				
fosC2-R	CTTGATAGGGTTTAGACTTC							
fosA7-F	ATGCTTCAATCTCTGAACCAC	52	409	Wang, 2021				
fosA7-R	CCGAAACGCATTCAGAGTA							

**Tabla 5. Colistina**

Cebador	Secuencia (5'→3')	T amplificación (°C)	Tamaño (pb)	Referencia	Programa de amplificación						
CLR5-F (mcr-1)	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	45	310	Bado, 2018	Desnaturalización inicial	94 °C 5 min					
CLR5-R (mcr-1)	CTTGGTCGGTCTGTAGGG										
mcr2-1F	TGTTGCTTGTCGCCGATTGGA	54	715	Rebelo, 2018							
mcr2-1R	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG										
mcr-3 F	TTGGCACTGTATTTGCATTT	52	542	Yin, 2017							
mcr-3 R	TTAACGAAATTTGGCTGGAACA										
mcr-4 F	ATTGGGATAGTCGCCCTTTT	52	487	Carattoli, 2017							
mcr-4 R	TTACAGCCAGAATCATTATCA										
mcr-5 F	TATCTCGACAAGGCCATGCTG	60	613	Borowiak, 2017			Amplificación	30 ciclos	94 °C 40 seg T amplificación específica 40 seg 72 °C 40 seg		
mcr-5 R	GAATCTGGCGTTTCGCTAGT										
mcr-6-F	AAGTATCTTGGTGGCGTGGG	55	252	Lemlem, 2023							
mcr-6-R	ATTACCTTCGCACACAGGGG										
mcr7.1-F	AGGGGATAAACCGACCCTGA	58	335	Yang, 2018							
mcr7.1-R	TGATCTCGATGTTGGGCACC										
mcr8-F	ACAGACAATAAGCGGGGAGC	56	667	Wang, 2018							
mcr8-R	CAATAAGCGCATCACCCCTGC										
mcr9-F	TTTGATTGCAGGTGTTGCCG	57	900	Coppola, 2020						Extensión	72 °C 10 min
mcr9-R	AGATATAGCCCGCTTTCGCC										

**Tabla 6. Aminoglucósidos**

Cebador	Secuencia (5'→3')	T amplificación (°C)	Tamaño (pb)	Referencia	Programa de amplificación			
armA-F	TATGGGGTCTACTATTCTGCCTAT	54	514	Bado, 2018	Desnaturalización inicial	94 °C 5 min		
armA-R	TGTTGGATCCCTTCTCCTTT							
rmlA-F	CTAGCGTCCATCCTTCCCTC	58	634					
rmlA-R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC							
rmlB-F	TCAACGATGCCCTCACCTC	56	458					
rmlB-R	GCAGGGCAAAGTAAATCC							
rmlC-F	GCCAAAGTACTCACAAGTGG	56	751					
rmlC-R	CTCAGATCTGACCAACAAG							
rmlD-F	CAGTTGAAGCCAGCGGAACGC	66	371					
rmlD-R	GCGCTCCATCCATTCGGAATAG							
npmA-F	CTCAAACCAAGAAAGACGG	52	640					
npmA-R	GAAACATGCCAGAAACTC							
rmlC-F	CGAAGAAGTAACAGCCAAA	38	710					
rmlC-R	ATCCCAACATCTCTCCCACT							
rmlE-F	ATGAATATTGATGAAATGGTT	50	818					
rmlE-R	TGATTGATTCTCCTCTTTT							
rmlF-F	ACGCATCTGCACCAGATCACC	60	678					
rmlF-R	GGGCAGGAGCTTCATCAGAA							
rmlG-F	AAATACCGGATGTGTGTCC	58	249					
rmlG-R	ACACGGCATCTGTTCTTCC							
rmlH-F	AGGTGGAAAGCAGGCAAG	56	493					
rmlH-R	CTCAAACCAAGTGGCGTAGT							
						Amplificación	30 ciclos	94 °C 1 min T amplificación específica 1 min 72 °C 1 min
						Extensión		72 °C 10 min

#### 9.1.4. Concentración inhibitoria mínima (CIM) a colistina (CLSI 2021)

##### Preparación de placas

Se preparan 4 placas de Muller-Hilton Agar con diferentes concentraciones de colistina (Cada placa admite un máximo de 10 cepas):

- 0 µg/mL (control de crecimiento)
- 1 µg/mL
- 2 µg/mL
- 4 µg/mL

##### Preparación de inóculos y siembra

- Con un asa o hisopo, recoger 3-5 colonias de una placa de agar no selectivo fresca (18-24 horas) y transferir a solución salina estéril (4-5mL).
- Ajustar la turbidez a 0,5 McFarland.
- Diluir el inóculo estandarizado 1:10 en solución salina.

- Dividir cada placa de agar colistina para analizar hasta 10 aislados por placa y rotular.
- Con una pipeta o un asa, verter 10µL de la dilución 1:10 en la parte correspondiente de cada placa de agar colistina.
- Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas.

#### Interpretación de resultados

- Examinar la placa de control de crecimiento, que debe mostrar crecimiento confluyente para que la prueba sea válida.
- Examinar cuidadosamente las placas de colistina con luz transmitida en busca de colonias o película luminosa de crecimiento.
- Leer la CIM como la concentración más baja en placa de agar de colistina que inhibe completamente el crecimiento del aislado de la prueba (Incluso 1 colonia se consideraría crecimiento).

#### 9.1.5 Concentración inhibitoria mínima a Fosfomicina (EUCAST, 2021):

##### Preparación de placas

Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton que contenían 50µg/mL de glucosa-6-fosfato y fosfomicina en concentraciones de 2µg/mL a 256µg/mL. Se agrega dos placas de Muller-Hilton una antes y otra después de la inoculación para verificar la calidad de las suspensiones. Las diluciones de agar se realizaron por duplicado.

##### Preparación de inóculos y siembra

- Obtener una suspensión equivalente al 0,5 Mc Farland en SF de cada cepa problema
- Realizar una dilución 1/20 de cada suspensión
- Colocar 600 µl de la dilución 1/20 en cada pocillo del multi-inoculador
- Dejar secar las placas e incubar durante 18-24 horas a 35 °C.

##### Interpretación de los resultados

La CIM se determina como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de la cepa problema, sin tener en cuenta una sola colonia o una leve neblina causada por el inóculo.

### 9.1.6 Protocolo de PFGE según las guías de PulseNet

#### Día 0: Repique de los aislamientos

- Colocar una colonia aislada de los cultivos de prueba en placas de medios no selectivos para crecimiento confluyente.
- Incubar los cultivos a 37 °C durante 14-18 horas.

#### Día 1: Preparación de la suspensión celular

- Preparar el tampón TE
- Preparar agarosa para PFGE al 1% en tampón TE
- Colocar la agarosa en un baño de agua a 55-60°C y equilibrar la agarosa en el baño de agua durante 15 minutos o hasta que esté lista para su uso.
- Rotular los tubos y transferir 2mL del tampón de suspensión celular (CSB) a dichos tubos.
- Con un hisopo estéril, suspender las colonias en CSB girando suavemente el hisopo para que las colonias se dispersen uniformemente hasta ajustar la concentración de las suspensiones celulares de las cepas a estudiar a una escala de 7.4 McFarland y a una escala de 8,4 para la cepa control *S. enterica* serovar Braenderup.

#### Elaboración de los bloques

- Transferir 150µL de la suspensión celular ajustada a tubos Eppendorf de 1,5mL etiquetados.
- Añadir 7.5µL de proteinasa K a cada tubo y mezclar suavemente.
- Añadir 150µL de agarosa fundida al 1% a la mezcla (suspensión celular + proteinasa K) y mezclar pipeteando suavemente arriba y abajo dos o tres veces.
- Dispensar inmediatamente la mezcla en los pocillos apropiados del molde sin introducir burbujas. Realizar dos plugs de cada muestra. Dejar que los tapones se solidifiquen a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.



#### Lisis de los bloques:

- Preparar el tampón de lisis
- Rotular un tubo de 15mL para cada grupo de bloques y añadir 2mL de tampón de lisis celular y 25µL de proteinasa K.
- Transferir los bloques del molde con una espátula al tubo debidamente etiquetado.
- Incubar en baño con agitación por 18 horas a 55°C.

#### Lavado de los bloques de agarosa tras la lisis celular:

- Retirar los tubos del baño de agua y descartar el tampón de lisis.
- Añadir 10-15mL de agua ultrapura estéril precalentada a cada tubo y agitar los tubos en un baño de agua o incubadora a 54-55°C durante 10-15 min.
- Descartar el agua de los tubos y repetir el paso nuevamente.
- Posteriormente, descartar el agua, y realizar tres lavados con 10-15mL de tampón TE estéril precalentado (54-55°C) y agitar los tubos en un baño de agua durante 10-15 min.
- Decantar el último lavado y añadir 5-10mL de TE estéril.
- Continuar con la digestión del ADN o almacenar los bloques en tampón TE a 4°C hasta que se necesiten.

#### Corte y digestión de los bloques:

- Cortar el bloque en tres partes y colocar una de esas partes en un tubo de 1.5mL con 200µL de la mezcla: enzima *Xba*I, buffer de dicha enzima y agua ultrapura
- Incubar por 18 hs a 37°C en el termobloque

#### Día 2: Preparación de la agarosa, del tampón de corrida y del equipo

- Preparar 100mL de agarosa 1% para PFGE. Fundirla y posteriormente dejarla enfriar hasta 50°C.
- Preparar el tampón de corrida con un volumen final de dos litros y una concentración final 0.5X.

- Lavar la máquina con 2 litros de agua ultrapura, dejar circular el agua con la bomba prendida para eliminar posibles residuos de agarosa o tampón de corrida.

#### Montaje y cargado del gel:

- Limpiar todas las partes de la cuba electroforética y armar el molde. Usar un nivel para asegurarse de que esté perfectamente horizontal.
- Colocar los bloques de agarosa en los dientes del peine, secándolos bien con papel absorbente.
- Colocar el peine en el gel con los bloques de agarosa apuntando hacia la dirección de migración.
- Verter la agarosa, previamente termostalizada, lentamente y en forma continuada para evitar la formación de burbujas. Reservar 5mL.
- Dejar solidificar, posteriormente retirar el peine y llenar los pocillos con la agarosa reservada. Dejar solidificar.

#### Parámetros de corrida:

- 6 voltios
- Pulso inicial 2.2 segundos
- Pulso final 54.2 segundos
- Tiempo 18 horas
- Bomba: 70
- Temperatura de refrigeración: 14 °C

#### Día 3: Tinción y documentación de un gel de agarosa

Cuando termine la electroforesis, retirar y colocar el gel en un recipiente adecuado con 400mL de bromuro de etidio.

Desteñir el gel en aproximadamente 500mL de agua mQ durante 30-60 minutos.

Capturar y guardar la imagen como archivo TIFF siguiendo las instrucciones del equipo.

Vaciar el tampón de la cámara de electroforesis y desecharlo. Enjuagar la cámara con 2 litros de agua ultrapura.

## Recetas para PFGE:

### Tampón de suspensión celular

- 100 mL de 1 M Tris, pH 8.0
- 200 mL de 0.5 M EDTA, pH 8.0
- Ajustar el volumen a 1000 mL con agua ultrapura
- Autoclavar

### 1 M Tris pH 8

- Pesar 12.1 gramos de Tris
- Suspender en 80mL de H<sub>2</sub>O y ajustar pH 8, agregando aprox. 4.2mL de HCl concentrado
- Ajustar volumen a 100mL
- Autoclavar

### 1 M Tris pH 7.5

- Pesar 12.1 gramos de Tris
- Suspender en 80mL de H<sub>2</sub>O y ajustar pH 7.5, agregando aprox. 4.5mL de HCl concentrado
- Ajustar volumen a 100mL
- Autoclavar

### 0.5 M EDTA pH 8

- Pesar 18.6 gramos de EDTA y suspender en 80mL de H<sub>2</sub>O
- Agitar y ajustar pH 8 con aproximadamente 2 gramos de NaOH
- Ajustar volumen a 100mL
- Autoclavar

### TE

- 1 M Tris pH 7.5      10mL      C.final: 10 mM
- 0.5 M EDTA pH 8      2mL      C.final: 1 mM
- H<sub>2</sub>O                      988mL
- Autoclavar

### Tampón de lisis

- 1mL Tris 1M
- 2mL EDTA

- 2mL Sarcosina
- 15mL de agua ultrapura

#### Tampón de digestión

- 20µL del tampón de la enzima
- 3µL de la enzima *XbaI*
- 177µL de agua ultrapura

#### 10 X TBE

- Tris                                    108g                                    0.89 M
- Ácido Bórico                        55g                                    0.89 M
- 0.5 M EDTA pH 8                  40mL                                    0.25 M
- H<sub>2</sub>O c.s.p                                1 litro
- Autoclavar

#### 9.1.7 Protocolo de conjugación (Papa-Ezdra, 2021)

- Repicar cepas
- Incubar dos tubos de 50mL con 10mL o 15mL de caldo LB. En el primero se coloca la cepa receptora y en el otro, la cepa donante.
- Incubar en baño a 37°C y 200 rpm por 2 horas y media. En otro tubo, se colocan 200µL de la donante y 2000µL de la receptora luego de la incubación
- Incubar los tres tubos (donante, receptora y mezcla) en la estufa por 18-24 horas
- Plaqueo:
  - La donante y la receptora se plaquean en MacConkey solo y con la combinación de antibiótico (controles).
  - La mezcla de conjugación se plaquea en tres placas con antibióticos de la siguiente forma:
    1. 100µL de la mezcla
    2. Centrifugado: En dos tubos de 1.5mL poner todo el excedente y centrifugarlos por 10 min a 4000 rpm. Sacar y tirar 900µL de cada tubo. Resuspender el pellet y plaquear 100µL de cada tubo
- Colocar las placas en la estufa por 24 horas a 37°C

## 9.2. Reactivos, equipos y software

9.2.1. Reactivos: Reactivos para PCR (Qiagen y Thermo scientific), agarosa (NZYtech), TBE, tampón de carga (5X, Bionline), marcador de peso molecular V (NZYtech), agente fluorescente para detección de ADN (bromuro de etidio, Amresco), Kit de purificación DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research), enzima de restricción XbaI (origen bacteriano *Xanthomonas badrii*, Thermo scientific y New England Biolabs), agua destilada, suero fisiológico, tampón TE, tampón ES, N-Lauroylsarcosine sodium salt, agarosa para PFGE (Bio-Rad), proteinasa K (Meridian Bioscience), Test fenotípico para detección de carbapenemasas (Rosco Diagnostica A/S), antibióticos en disco: meropenem (Oxoid, concentración: 10µg), imipenem (Oxoid, concentración: 10µg), EDTA (ácido etilendiamino tetraacético, Britania, concentración: 372µg), ácido bórico (Britania, concentración: 300µg) amikacina (Oxoid, concentración: 30µg), gentamicina (Oxoid, concentración: 10 µg), ciprofloxacina (Oxoid, concentración: 5µg), trimetoprim-sulfametoxazol (Oxoid, concentración: 25µg), fosfomicina (Oxoid, concentración: 200µg), antibióticos en polvo: ceftriaxona (Libra), rifampicina (Sigma-Aldrich), colistina (Sigma-Aldrich), fosfomicina (Sigma-Aldrich), glucosa 6-fosfato (Roche), medios: agar Mueller-Hinton (Oxoid), agar MacConkey Lactosa (Oxoid), caldo Luria-Bertani (Oxoid), medio MIO (Biokey, Britania).

9.2.2. Equipos: Cabina (modelo: UVC/T-AR, Biosan), set de micropipetas (P1000, P200, P20, P10, P2, Eppendorf, ThermoFisher y Labnet international inc.), termociclador (modelo: Maxygene II, Axygen y modelo: Multigene Optimax, Labnet international inc.), cuba electroforética (modelo: Owl Easycast™ B1, ThermoFisher), centrífuga (modelo: Universal 320, Hettich), espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop), equipo de lectura de geles (modelo: Analyst Investigator Eclipse, Fotodyne), Multiinoculador, CHEF-DRIII System (Bio-Rad), cuba electroforética para PFGE (Bio-Rad), baño con agitación (modelo: SB-12L, Benchmark), turbidímetro (modelo: DEN-1B, Biosan).

9.2.3. Software: *GelCompar II 5.1* (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) y CHROMAS (versión 1.45, Griffith University, Queensland Australia).

## 9.3 Tablas de cepas

### 9.3.1 Tabla 7. Cepas de *E. coli*

Cepa	Fecha	Departamento	Genes RAM	Secuenciotipo	Pulsotipo	Concentración Inhibitoria Mínima													Fenotipo MDR	Tc genes RAM	Tamaño plasmídico (kb)		
						AMS	PTZ	CFZ	CXM	CTX	CAZ	FEP	IMI	MERO	AK	CN	CIP	FOS				COL	SXT
R 643	12/3/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	-	N/T	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	8	>= 16	<= 2	>= 16	>= 4	4	<1	>= 320	CAR/GN/CIP/SXT*	-	-	
R 666	29/3/2019	Colonia	<i>bla<sub>KPC-2</sub>/fosA3</i>	ST 69	II	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	32	4	>= 16	>= 16	>= 64	4	<= 0.25	128	<1	>= 320	CAR/AK/FOS/SXT*	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	220	
R 679	8/4/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	-	III	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	32	>= 16	>= 16	<= 2	<= 1	<= 0.25	4	<1	>= 320	CAR/SXT	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	220
R 680	8/4/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	ST 69	II	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	16	>= 16	>= 16	4	4	<= 0.25	4	<1	>= 320	CAR/SXT	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	140
R 697	26/4/2019	Colonia	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	ST 69	IV	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	32	4	2	8	>= 16	>= 64	4	<= 0.25	4	<1	>= 320	CAR/AK/SXT*	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	250
R 750	1/7/2019	Montevideo	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	ST 69	V	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	4	8	>= 16	<= 2	<= 1	<= 0.25	4	1	>= 320	CAR/SXT	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	670/225
R 805	3/9/2019	Durazno	<i>bla<sub>NDM-1</sub>/fosA3</i>	-	VI	>= 32	64	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	>= 16	>= 16	<= 2	<= 1	0.5	>256	<1	>= 320	CAR/FOS/SXT*	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	220	
R 812	13/9/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub>/fosA3</i>	-	I	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	8	>= 16	8	8	>= 16	>= 4	>256	1	>= 320	CAR/GN/CIP/FOS/SXT*	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	220
R 817	20/9/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	-	I	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	>= 16	>= 16	<= 2	<= 1	>= 4	4	<1	>= 320	CAR/CIP/SXT*	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	220	
R 877	4/11/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	-	I	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	>= 16	>= 16	<= 2	<= 1	<= 0.25	<2	<1	>= 320	CAR/SXT	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	220	
R 891	18/11/2019	Montevideo	<i>bla<sub>NDM-1</sub>/bla<sub>KPC-2</sub>/rmtC</i>	-	I	>= 32	>= 128	>= 64	>= 64	>= 64	>= 64	>= 16	>= 16	>= 64	>= 16	>= 4	4	<1	<= 20	CAR/AK/GN/CIP*	<i>bla<sub>NDM-1</sub>/bla<sub>KPC-2</sub>/rmtC</i>	245	

Nota: Las cepas indicadas con (\*) se han determinado como fenotipo MDR.

AMS: ampicilina /sulbactam, PTZ: piperacilina /tazobactam, CFZ: cefazolina, CXM: cefuroxime, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime FEP: cefepime, IMI: imipenem MERO: meropenem AK: amikacina CN: gentamicina CIP: ciprofloxacina FOS: fosfomicina COL: colistina SXT: trimetropim-sulfametoazol, CAR: Carbapenemes.

### 9.3.2 Tabla 8. Cepas de *K. pneumoniae*

Cepa	Fecha	Departamento	Genes RAM	ST	PT	CTX	CAZ	FEP	IMI	MEM	AK	GN	CIP	FOS	COL	SXT	Fenotipo RAM	Tc genes RAM	S1 (kb)
R521	04/01/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M-15</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 32	≥ 16	≥ 16	≥ 64	4	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/AK/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R523	07/01/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XV	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	16	≥ 16	≥ 4	<2	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	105
R533	14/01/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	II	4	16	2	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≤ 0.25	4	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R539	16/01/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	IV	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≥ 16	2	16	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R540	16/01/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	X	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.25	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	8	<1	≤ 20	CAR	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R547	21/01/2019	Montevideo	bla <sub>KPC</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	V	≥ 64	32	32	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≥ 4	4	<1	≤ 20	CAR/CIP	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R555	24/01/2019	Montevideo	bla <sub>KPC</sub> /bla <sub>CTX-M8</sub>	-	XIV	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≥ 16	16	≥ 16	1	8	1	≤ 20	CAR/GN/CIP*	-	-
R571	04/02/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	VII	≥ 64	≥ 64	4	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	0.5	<2	<1	≥ 320	CAR/SXT	-	-
R572	04/02/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	II	8	16	4	≥ 16	≥ 16	16	2	≤ 0.25	4	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>KPC</sub>	140
R574	05/02/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XXXII	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	0.5	8	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>NDM-1</sub>	105
R584	12/02/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	VII	≥ 64	≥ 64	4	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	0.5	4	<1	≥ 320	CAR/SXT	-	-
R585	12/02/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	II	≥ 64	16	2	≥ 16	≥ 16	16	4	≤ 0.25	8	<1	≥ 320	CAR/SXT	-	-
R588	13/02/2019	Maldonado	bla <sub>KPC-2</sub>	-	XXXV	≥ 64	16	32	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R589	13/02/2019	Durazno	bla <sub>NDM-1</sub> /fosA3	-	XVIII	≥ 64	≥ 64	16	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≥ 4	128	<1	≥ 320	CAR/CIP/FOS/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	105
R601	15/02/2019	Colonia	bla <sub>KPC-2</sub>	-	II	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≤ 0.25	4	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R612	25/02/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	XXI	≥ 64	16	4	≥ 16	≥ 16	16	2	≤ 0.25	8	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>NDM-1</sub>	55
R627	28/02/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	II	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R654	20/03/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XVI	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	32	8	1	4	<1	≥ 320	CAR/AK/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R658	26/03/2019	Colonia	bla <sub>KPC-2</sub>	-	XXXIV	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≤ 0.25	8	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R665	29/03/2019	Colonia	bla <sub>KPC-2</sub>	-	XXX	32	4	≤ 1	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≤ 0.25	8	<1	≤ 20	CAR/SXT	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R667	01/04/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 64	4	≥ 4	4	2	≥ 320	CAR/AK/CIP/COL/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220/80
R674	03/04/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≥ 16	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	-	-
R702	03/05/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	VIII	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 4	<2	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	220
R718	30/05/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	IX	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	4	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>NDM-1</sub>	245
R723	05/06/2019	Montevideo	bla <sub>KPC</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	V	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≥ 16	≥ 4	<2	2	≥ 320	CAR/GN/CIP/COL/SXT*	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R729	10/06/2019	Montevideo	bla <sub>KPC</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 64	4	≥ 4	8	2	≥ 320	CAR/AK/CIP/COL/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	250/80
R739	21/06/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	VI	8	16	4	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	-	-
R741	21/06/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XII	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	1	4	1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	245
R744	26/06/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	III	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	245
R746	01/07/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XI	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	16	1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>NDM-1</sub>	670/225
R763	12/07/2019	Durazno	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	N/T	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≥ 16	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R765	16/07/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>KPC-2</sub>	-	VI	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≥ 16	16	≥ 16	≥ 4	8	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	-	-
R767	16/07/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	16	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≥ 4	4	4	≥ 320	CAR/CIP/COL/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R771	16/07/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XXXI	≥ 64	≥ 64	4	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	4	<1	≥ 320	CAR/SXT	bla <sub>NDM-1</sub>	140
R774	22/07/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	VI	8	16	4	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	-	-
R783	26/07/2019	Rocha	bla <sub>NDM-1</sub>	-	III	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	2	4	1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	140
R784	26/07/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	III	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	16	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	140
R787	01/08/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	III	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	455
R792	07/08/2019	Montevideo	bla <sub>OXA-48</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	-	XIII	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≥ 4	<2	<1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	bla <sub>OXA-48</sub> /bla <sub>CTX-M15</sub>	105
R796	12/08/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 64	4	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/AK/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	140
R807	09/09/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	IV	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≥ 16	2	<2	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	-	-
R811	13/09/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	XXIV	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 64	4	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/AK/CIP/SXT*	-	-
R832	30/09/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	VI	8	16	2	≥ 16	≥ 16	16	≤ 1	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	-	-
R836	04/10/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XV	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≥ 16	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R845	17/10/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XXXIII	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	-	-
R846	17/10/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XVII	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	1	4	1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	140
R848	17/10/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≥ 4	16	>4	≥ 320	CAR/CIP/COL/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R863	23/10/2010	Paysandú	bla <sub>KPC-2</sub>	ST258	XXIX	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	1	4	<1	≥ 320	CAR/CIP/SXT*	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R867	28/10/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	XIX	32	≥ 64	16	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	<2	4	≥ 320	CAR/AK/GN/CIP/COL/SXT*	bla <sub>KPC-2</sub>	140
R873	30/10/2019	Salto	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M8</sub>	-	XXV	≥ 64	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	<2	4	≥ 320	CAR/COL/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R887	11/11/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XX	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	4	1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	140
R888	13/11/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M8</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	8	≥ 64	≥ 16	≥ 4	16	<1	≥ 320	CAR/AK/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub> /bla <sub>CTX-M8</sub>	220
R889	13/11/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 64	4	≥ 4	<2	<1	≤ 20	CAR/AK/CIP	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R892	18/11/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	VI	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/AK/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R897	20/11/2019	Montevideo	bla <sub>KPC-2</sub>	-	N/T	≥ 64	≥ 64	32	≥ 16	≥ 16	16	≥ 16	≥ 4	4	>4	≥ 320	CAR/GN/CIP/COL/SXT*	-	-
R903	29/11/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	I	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	1	<2	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R904	29/11/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	-	XXII	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	16	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	bla <sub>NDM-1</sub>	220
R905	02/12/2019	Montevideo	bla <sub>NDM-1</sub>	ST258	XXVII	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 4	4	<1	≥ 320	CAR/GN/CIP/SXT*	-	-