



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*

Meritxell Cubero González

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización
de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*

Meritxell
Cubero González

Tesis Doctoral

Facultad de Medicina
Departamento de Patología y Terapéutica Experimental



Epidemiología molecular,
factores de virulencia y caracterización
de los mecanismos de resistencia de
Klebsiella pneumoniae



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



2015

Meritxell Cubero González



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorado en Biomedicina. Línea de investigación:

“Metabolismo, señalización metabólica y patologías asociadas”

Facultad de Medicina – Campus de Bellvitge.

Departamento de Patología y Terapéutica Experimental.

**"Epidemiología molecular, factores de virulencia y
caracterización de los mecanismos de resistencia de
Klebsiella pneumoniae"**

Co-Directora:

Carmen Ardanuy Tisaire

PharmD, PhD

Profesora Asociada UB

Facultativo del Servicio de Microbiología

Hospital Universitari de Bellvitge

Investigadora CIBERES e IDIBELL

Co-Directora:

M^a Ángeles Domínguez Luzón

MD, PhD

Profesora Asociada UB

Jefe del Servicio de Microbiología

Hospital Universitari de Bellvitge

Investigadora REIPI e IDIBELL

Meritxell Cubero González

Barcelona, Noviembre de 2015

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de **CIBERES** (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias); CB06/06/0037.

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

A mis padres

A Jose

AGRADECIMIENTOS

Las decisiones que tomamos en la vida van marcando nuestro camino. Desde siempre he tenido muy claro que el mío estaba relacionado con la ciencia y en concreto con la biología. Mi sueño era trabajar en el laboratorio de un hospital. Mi camino me llevó hasta el servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge y aquí tuve la oportunidad de empezar con unas prácticas y realizar un doctorado. Este arduo compromiso valió la pena. Cinco años después de tomar esa decisión, sólo puedo agradecer a todas aquellas personas y entidades que me han ayudado y han hecho posible esta etapa.

En primer lugar, mi más sincero y profundo agradecimiento a la Dra. Josefina Liñares por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación. Sin su colaboración y apoyo esta tesis no se habría podido realizar.

A mis co-directoras de tesis, la Dra. Carmen Ardanuy y la Dra. M^a Ángeles Domínguez. Quiero agradecer las horas que me habéis dedicado corrigiendo trabajos. Gracias por preocuparos siempre por mí y por todo el conocimiento que me habéis enseñado durante este tiempo. A vuestro lado he sentido un gran apoyo y no he dejado de aprender continuamente.

A todos los miembros del grupo 19 del CIBERES (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias) y del grupo de Epidemiología de las Infecciones Bacterianas del IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge).

A la Dra. Teresa Vinuesa y al Prof. Miquel Viñas, del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Facultad de Medicina del Campus de Bellvitge y al Dr. Rogelio Martín, gracias por vuestra ayuda cuando la necesitaba.

A la Dra. Fe Tubau, por tu dedicación y las explicaciones magistrales, y amplío esta gratitud a todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge por la congelación de las cepas de *K. pneumoniae* y por facilitarme el trabajo separando las cepas con posible fenotipo hipermucoso.

A la Dra. Imma Grau y al Dr. Román Pallarés, del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge, por toda vuestra importante aportación clínica y por vuestras acertadas sugerencias en el diseño del estudio de las bacteriemias.

Al Dr. Miquel Pujol y a Guillermo, del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge, por vuestra ayuda y colaboración en el trabajo de la OXA-48.

A la Dra. Lucía Gallego, del Laboratorio de Antibióticos y Bacteriología Molecular, del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco UPV/EHU (campus Bizcaia). Gracias por

AGRADECIMIENTOS

aceptarme en tu laboratorio. Y a la Dra. Elena Sevillano, por enseñarme la metodología y la realización de los experimentos de hibridación. A las dos, por acogerme y colaborar en el trabajo de la OXA-48.

También se merecen una mención especial todas las personas con las que he compartido largas horas de trabajo y momentos de relajación durante las comidas. Cuando llegué, hace ya casi ocho años, conocí a dos de las personas que más me han marcado en esta etapa y a las que además las puedo considerar amigas. Montse, que me enseñó todas las técnicas del laboratorio con su paciencia y su gran sonrisa eterna. Y Dora, que además de todo lo que me enseñó, fue un gran apoyo y mi consejera. A las dos, gracias por estar siempre ahí y por haberme acogido del modo en el que lo hicisteis.

El grupo iba cambiando y creciendo, unos se iban y otros venían. Gracias a todos los estudiantes que vinieron a realizar prácticas en nuestro grupo porque con su entusiasmo y sus ansias por aprender me recordaban lo apasionante que es la ciencia.

Sara, gracias por aportarme nuevas ideas para esta tesis. Por explicarme las cosas con claridad y ponerte mano a mano conmigo en la poyata.

Hisashi, tu llegada ha coincidido con mi fase final de escritura de esta tesis pero aun así me has aportado alegría y frescura para conseguir amenizar este tramo. (“Meri chan, busy busy”)

Javi, nunca tienes un no, siempre estás dispuesto a ayudar, sobre todo en la poyata y en temas de bioestadística y motivación.

Mariana, empezamos siendo compañeras del master. Así empezó nuestra amistad y nuestros caminos se volvieron a juntar en Bellvitge. Hemos compartido confidencias y nos hemos apoyado tanto en lo laboral como en lo personal. Mil gracias.

A todos vosotros, gracias porque entre todos hemos conseguido crear un buen ambiente de trabajo para hacer más amenas las horas que pasamos juntos en el trabajo y fuera de él.

Y fuera del ambiente laboral, no puedo dejar de agradecer a las personas más importantes. A mis padres, por haber sido los pilares más fuertes de mi vida y dejarme tomar mis propias decisiones, aunque eso significase vivir separados. Por enseñarme a valorar que la formación académica era importante para forjar un buen futuro, pero siempre siendo una persona normal con los pies en la tierra. Por supuesto también a mi hermano, porque el orgullo que sientes hacia mí es recíproco e incondicional.

Siempre tienes una palabra de ánimo y una sonrisa para regalarme en los momentos de desmotivación. Gracias de todo corazón.

En general, a mis familias, Cubero González y Cortina Domínguez. Por vuestro interés en mi trabajo y valorarme como lo hacéis.

A mis amigos de Monzón, que desde siempre habéis estado a mi lado aunque sea en la distancia. Me preguntáis cómo me va el trabajo y os parece “chulísimo” todo lo que os cuento, aunque no tengáis ni idea de que va.

A mis amigos de Barcelona, por todos los momentos compartidos que han sido importantes para desconectar del trabajo, por las risas, las cenas...

Y por último a Jose, por haber compartido juntos triunfos y derrotas, alegrías y tristezas y por siempre haber estado a mi lado. Gracias por creer en mí y por tus palabras de aliento y sinceridad en los momentos que las he necesitado. Por tu paciencia en la recta final de este camino y tu gran ayuda y apoyo. ¡Lo hemos conseguido!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE	IV
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
1. TAXONOMÍA E HISTORIA.....	1
2. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Klebsiella</i>	5
3. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
3.1. <i>K. pneumoniae</i> como agente causal de infecciones	7
3.2. Brotes causados por <i>K. pneumoniae</i>	9
4. MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA.....	11
4.1. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos	11
4.1.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos.....	11
4.1.2. Las β -lactamasas y su clasificación	13
4.1.3. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs).....	16
4.1.4. AmpC plasmídicas.....	17
4.1.5. Carbapenemasas	18
4.2. Resistencia a quinolonas.....	19
4.3 Detección fenotípica de cepas <i>K. pneumoniae</i> resistentes	21
5. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	25
5.1. Tipificación molecular de los microorganismos	26
5.1.1. Electroforesis en campo pulsado (ECP).....	26
5.1.2. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	27
5.1.3. <i>Next-generation sequencing</i> (NGS).....	28
5.2 Elementos genéticos móviles portadores de mecanismos de resistencia	29
5.2.1. Plásmidos	29
5.2.2. Integrones	31
5.3. Clones pandémicos y epidémicos de <i>K. pneumoniae</i>	32
6. FACTORES DE VIRULENCIA	37
6.1. Antígenos de superficie	38
6.1.1. Polisacárido capsular (CPS) o antígeno K	39
6.1.2. Lipopolisacárido (LPS) o antígeno O.....	40
6.2. Adhesinas.....	42

6.2.1. Fimbrias tipo 1	42
6.2.2. Fimbrias tipo 3	43
6.3. Formación de biopelícula	44
6.4. Sideróforos	46
6.5. Resistencia al suero	46
6.6. Metabolismo del nitrógeno	47
6.7. Hipermucoviscosidad	48
OBJETIVOS	51
METODOLOGÍA.....	55
1. MICROORGANISMOS.....	51
1.1. Identificación de los aislamientos clínicos	51
1.2. Cepas de referencia	51
2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.....	53
2.1. Método de microdilución.....	53
2.2. Método de E-test	55
2.3. Método de difusión con disco para detección de BLEEs.....	55
2.4. Test de Hodge para la detección de carbapenemasas	56
2.5. Determinación de la inhibición de la acción carbapenemásica por distintos compuestos.....	58
3. TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	59
3.1. Procedimiento de la PCR	59
3.2. Amplificación del ADN.....	60
3.2.1. Obtención del ADN para PCRs	60
3.2.2 Reacción de PCR y condiciones de amplificación.....	60
3.3. Visualización de los productos de PCR.....	61
4. TIPIFICACION MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS	62
4.1. Análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado	62
4.1.1. Extracción del ADN cromosómico	62
4.1.2. Digestión del ADN y electroforesis en campo pulsado (ECP)	63
4.2. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	63
5. CARACTERIZACION DE LAS β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO	66
5.1. Detección por PCR de los genes que codifican β -lactamasas	66

5.2. Transferencia de la resistencia por conjugación	67
5.3. Secuenciación de los genes que codifican las β -lactamasas.....	68
MÉTODOS ESPECÍFICOS	69
1.1. Epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por <i>K. pneumoniae</i> (2007-2009)	69
1.1.1. Cepas estudiadas.....	69
1.1.2. Clasificación de los episodios de bacteriemia	69
1.1.3. Caracterización y tipificación molecular de los episodios de bacteriemia.....	70
1.2. Análisis de la prevalencia de clones hipervirulentos de <i>K. pneumoniae</i> como causa de bacteriemia.....	71
1.2.1. Cepas estudiadas.....	71
1.2.2. Caracterización y tipificación molecular de los aislamientos	71
1.2.3. Estudio de las características clínicas	71
1.3. Mecanismos de virulencia de <i>K. pneumoniae</i> que causa bacteriemia .	73
1.3.1. Cepas estudiadas.....	73
1.3.2 Test de hipermucoviscosidad	73
1.3.3. Formación de biopelícula aire-líquido o biopelícula (ALI)	74
1.3.4. Formación de biopelícula sólido-líquido (SLI).....	74
1.3.5. Adhesión bacteriana.....	76
1.3.6. Resistencia al suero	77
2.1 Caracterización de un brote causado por <i>K. pneumoniae</i> productora de <i>bla</i> _{OXA-1}	78
2.1.1. Cepas estudiadas.....	78
2.1.2. Estudio de la sensibilidad antibiótica	78
2.1.3. Estudio de los integrones	79
2.2. Caracterización molecular de un brote causado por <i>K. pneumoniae</i> productora de <i>bla</i> _{OXA-48}	81
2.2.1. Análisis del ADN plasmídico.....	84
2.2.1.1. Extracción del plásmidos por columnas	84
2.2.1.2. Estudio de plásmidos mediante ECP	84
2.2.1.3. Transferencia e hibridación con sonda de familia OXA-48.....	85
2.2.1.4. Preparación del ADN para la sonda de OXA-48.....	85
2.2.1.5. Hibridación.....	86

RESULTADOS	87
1.1. Epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por <i>K. pneumoniae</i> (2007-2009).....	87
1.1.1. Características clínicas de la bacteriemia por <i>K. pneumoniae</i>	87
1.1.2. Caracterización molecular de las cepas que causan bacteriemias de <i>K. pneumoniae</i>	90
1.2. Análisis de la prevalencia de clones hipervirulentos de <i>K. pneumoniae</i> como causa de bacteriemia (2007-2013)	98
1.2.1. Identificación y caracterización de las cepas hipermucoviscosas ..	98
1.2.2. Características clínicas de las bacteriemias causadas por <i>K. pneumoniae</i> hipermucoviscosas	101
1.3. Mecanismos de virulencia de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> que causa bacteriemia (2007- 2013).....	104
1.3.1. Selección de cepas para el estudio	104
1.3.2. Test de hipermucoviscosidad	105
1.3.3. Detección de la formación de biopelícula sobre medio líquido (<i>Air-liquid biofilm: ALI-Biofilm</i>)	106
1.3.4. Formación de biopelícula sobre medio sólido (<i>Solid-liquid biofilm: SLI-Biofilm</i>).....	108
1.3.5. Determinación de la capacidad de adhesión	109
1.3.6. Determinación de la resistencia al suero	111
2.1. Caracterización de un brote causado por <i>K. pneumoniae</i> productora de <i>bla_{OXA-1}</i>	114
2.1.1. Descripción del brote nosocomial.....	114
2.1.2. Caracterización molecular de la cepa epidémica	115
2.1.3. Caracterización del perfil de multiresistencia. Estudio de integrones	116
2.2. Caracterización molecular de un brote causado por <i>K. pneumoniae</i> productora de <i>bla_{OXA-48}</i> (2010-2012)	119
2.2.1. Descripción del brote epidemiológico	119
2.2.2. Caracterización de los aislamientos	120
2.2.3. Determinación del análisis plasmídico.....	122
2.2.4. Características clínicas de los pacientes	124
DISCUSIÓN	127

1.1. Epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por <i>K. pneumoniae</i> (2007-2009)	127
1.2. Análisis de la prevalencia de clones hipervirulentos de <i>K. pneumoniae</i> como causa de bacteriemia.....	130
1.3. Relación de las características fenotípicas de <i>K. pneumoniae</i> con los clones hipervirulentos y clásicos	135
2.1. Caracterización de un brote causado por <i>K. pneumoniae</i> productora de <i>bla_{OXA-1}</i>	140
2.2. Caracterización molecular de un brote causado por <i>K. pneumoniae</i> productora de <i>bla_{OXA-48}</i>	144
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA	151
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	XV
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.....	XXI

ABREVIATURAS

ADN ácido desoxirribonucleico

ALI formación de biopelícula aire-líquido

AP-PCR PCR *with arbitrary primers*

ATP adenosín trifosfato

BCIP 5-Bromo-4-cloro-3-indol fosfato, sal de toluidina

BFI índice de formación de biopelícula

BHI caldo de infusión cerebro corazón

BLEE β -lactamasa de espectro extendido

bp pares de bases / kb kilobases

B-AC bacteriemia adquirida en la comunidad

B-ACS bacteriemia asociada a cuidados sanitarios

B-NOS bacteriemia nosocomial

CC complejo clonal o grupo clonal

cgMLST *core genome multilocus sequence typing*

CLSI *The Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI concentración mínima inhibitoria

CPS polisacárido capsular o antígeno K

CS secuencia conservada

dNTP desoxirribonucleótidos trifosfato

ECDC Centro europeo de prevención y control de enfermedades

ECP electroforesis de campo pulsado

EDTA ácido dietilendiaminotetraacético

ESCMID *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

EUCAST *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HI-NHS suero humano normal inactivado con calor

KP-RC cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos

KP-SC cepas de *K. pneumoniae* sensibles a carbapenémicos

LB Luria Bertani

LPS lipopolisacárido o antígeno O

MALDI-TOF *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*

MLST *Multilocus sequence typing*

MST árbol de expansión mínima

NBT nitroazul de tetrazolio

NHS suero humano normal

ONPG orto-nitrofenilgalactopiranosido

PBEC peritonitis bacteriana espontánea en paciente cirrótico

PBPs proteínas fijadoras de penicilina

PBS-HBSS Tampón fosfato salino-Hanks' *Balanced Salt solution*

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PIV tampón [0,01 mM Tris-HCl pH 8, 1mM NaCl]

PLA abscesos hepáticos piogénicos

qacEΔ1 compuestos de amonio cuaternario

qnr *quinolone resistance* / QRDR *quinolone resistance-determining region*

REP-PCR *Repetitive Sequence-Based PCR*

SD desviación estándar

SDS dodecilsulfato sódico

SLI formación de biopelícula sólido-líquido

sp especie / subsp subespecie

SSC *Saline (sodium chloride) and Sodium Citrate*

ST secuenciotipo

TBE tris-ácido bórico-EDTA

TBS Tris-tampón salino

TE tris-EDTA

Tris-HCl tris (hidroximetil) aminometano-ácido clorídrico

ufc unidades formadoras de colonias

UCI unidades de cuidados intensivos

UV luz ultravioleta

var variante

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es un importante patógeno humano, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. Coloniza las mucosas y la piel de pacientes hospitalizados, causando sobre todo infecciones del tracto respiratorio y del tracto urinario. En personas con comorbilidades se comporta como un patógeno oportunista, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. *K. pneumoniae* es además la segunda causa de bacteriemia Gram negativa, tras *Escherichia coli*.

En nuestra área geográfica durante el periodo 2007-2009, *K. pneumoniae* fue una causa importante de bacteriemia nosocomial (n=223), comunitaria (n=67) y de bacteriemia relacionada con el sistema sanitario (n=58). La caracterización molecular de 290 cepas de *K. pneumoniae* mostró una gran diversidad genética lo que indica que la bacteriemia está causada por cepas endógenas propias de cada paciente. Las cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) fueron más frecuentes en la bacteriemia nosocomial y en la relacionada con el sistema sanitario (24/223, 10,8%; y 4/58, 6,9%, respectivamente) que en la bacteriemia comunitaria (2/67, 3%). Los principales focos de la bacteriemia fueron urinario (29/67, 43,3%) y biliar (21/67, 31,3%) en la bacteriemia comunitaria y en la bacteriemia asociada a catéter (89/223, 39,9%) en la nosocomial.

Entre las 878 cepas de *K. pneumoniae* causantes de bacteriemia en el periodo 2007-2013, sólo 53 (6%) presentaron el fenotipo hipermucoviscoso; entre estas, 28 fueron cepas hipervirulentas (presencia de los genes *magA* y/o *rmpA*, 52,8%), especialmente de los serotipos K1 (n=16) o K2 (n=9). La bacteriemia por cepas hipervirulentas se asoció a neumonía y absceso piogénico hepático.

Se estudiaron los factores de virulencia de 38 cepas de *K. pneumoniae* hipermucoviscosas [15 cepas *magA*(+)/*rmpA*(+) ST23 K1; 12 cepas *magA*(-)/*rmpA*(+); y 11 cepas *magA*(-)/*rmpA*(-)] y 7 cepas no hipermucoviscosas. Las cepas con presencia de los genes *magA* y/o *rmpA* fueron más hipermucoviscosas, mostraron mayor resistencia al suero y formaron biopelícula aire-líquido. Las cepas sin los genes *magA* y *rmpA* se adhirieron más rápidamente a una superficie sólida lo que podría ser ventajoso en el proceso invasivo.

La multirresistencia antibiótica de *K. pneumoniae* es un fenómeno creciente a nivel hospitalario y se ha estudiado en la segunda parte de esta tesis. En un primer estudio, se analizaron 98 *K. pneumoniae* aisladas en 38 pacientes en el período de mayo 2007 a diciembre 2009. Estas cepas presentaban resistencia a amoxicilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam, tobramicina, amikacina y ciprofloxacino; así mismo presentaban una sensibilidad disminuida a cefepime. Los aislamientos mostraron un único patrón en la electroforesis en campo pulsado (ECP) relacionado con el ST14. Se encontró el gen *bla*_{OXA-1} en un integrón de clase I que también contenía el gen *aac*(6')*Ib-cr*.

Un segundo trabajo, describe las características clínicas y moleculares de un brote (de octubre 2010 a diciembre 2012), causado por una cepa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KP-RC) productora de CTX-M-15 y OXA-48. En dicho brote también se detectaron cepas isogénicas sensibles a carbapenémicos (KP-SC) productoras de CTX-M-15. Los 38 pacientes tenían enfermedades de base. Diecisiete pacientes (14 KP-RC y 3 KP-SC) recibieron tratamiento previo con carbapenémicos. Todos los aislamientos fueron resistentes a gentamicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol. Tanto las KP-SC como

las KP-RC mostraron el mismo perfil de electroforesis en campo pulsado (ECP) asociado al ST101 y tenían el gen *bla*_{CTX-M-15}. Se detectó el gen *bla*_{OXA-48} asociado a un plásmido de 70 kb sólo en las KP-RC.

INTRODUCCIÓN

1. TAXONOMÍA E HISTORIA

En 1875, el patólogo alemán Edwin Klebs (1834–1913) observó por primera vez la presencia de bacterias en las vías aéreas de pacientes fallecidos a causa de neumonía (Klebs, 1875; Brisse *et al.*, 2006). Sin embargo, no está claro si la bacteria que observó Klebs era realmente *Klebsiella* o *Streptococcus pneumoniae*, ya que esta última bacteria es la primera causa de neumonía bacteriana (Woodhead, 2002). Unos años más tarde, en 1882 otro patólogo y microbiólogo alemán, Carl Friedländer (1847-1887), reconoció que había bacterias en los pulmones de la mayoría de los pacientes que morían de neumonía y detectó una ausencia de bacterias en los de los pacientes que tenían otra causa de muerte. Con este hallazgo concluyó que dichas bacterias encontradas serían la causa de la neumonía y las denominó bacilo de Friedländer (Friedländer, 1883).

También en 1882 se aisló la primera cepa de *Klebsiella sp.* de un paciente con rinoscleroma (*Klebsiella rhinoscleromatis*). En 1885, Trevisan dio nombre a uno de los géneros más representativos de la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*) e identificó al bacilo de Friedländer como *Klebsiella pneumoniae*, en honor a Edwin Klebs (Klebs, 1875; Friedländer, 1883; Brisse *et al.*, 2006).

La séptima edición del año 1957 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984*, define a la familia *Enterobacteriaceae* como una de las más importantes en patología humana (2015a; 2015b). Debido a la importancia médica del género *Klebsiella* se han ido realizando diferentes clasificaciones a lo largo del tiempo (Cowan *et al.*, 1960; Barr, 1977).

La primera clasificación del género se basó en criterios clínicos y permitió diferenciar tres especies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* (Drancourt *et al.*, 2001). Gracias a la utilización de métodos taxonómicos moleculares esta clasificación original fue revisada en repetidas ocasiones. En la actualidad predomina la clasificación establecida por Ørskov en 1984 que clasifica el género *Klebsiella* en 5 especies, basándose en las características fenotípicas y bioquímicas: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* y *K. planticola* (sinónimo de *K. trevisanii*). La especie tipo del género, *K. pneumoniae*, se dividió en tres subespecies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (descrita por Schroeter en 1886), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (descrita por Abel en 1893) y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (descrita por Trevisan en 1887). Esta clasificación se basa en su fenotipo, sus características bioquímicas, moleculares y sus manifestaciones clínicas (Brisse *et al.*, 2006) (Tabla 1).

Los estudios moleculares permitieron en 2001 la división del género en tres *clusters* de acuerdo con su heterogeneidad filogenética: *cluster* I, contenía las especies más patógenas, *K. granulomatis* y las tres subespecies de *K. pneumoniae*; *cluster* II, contenía *K. ornithinolytica*, *K. planticola* (descrita inicialmente como *K. trevisanii*) y *K. terrigena*; *cluster* III, contenía *K. oxytoca* (Brisse *et al.*, 2001). El *cluster* II fue reclasificado como un nuevo género, *Raoultella* (*R. ornithinolytica*, *R. planticola* y *R. terrigena*) (Drancourt *et al.*, 2001).

Otras especies nuevas o renombradas pertenecientes al género son: *Klebsiella variicola*, *Klebsiella alba*, *Klebsiella milletis*, *Klebsiella senegalensis*, *Klebsiella*

singaporensis (que ahora se incluye en *Klebsiella variicola*), *Klebsiella michiganensis* y *Klebsiella quasipneumoniae* con dos subespecies: *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* y *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Bascomb *et al.*, 1971b; Rosenblueth *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Brisse *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010; Brisse *et al.*, 2014) (Figura 1). En la actualidad se describen nuevas especies gracias a los análisis filogenéticos de las cepas, a la secuenciación de los genes 16S rRNA, *gyrA*, *parC*; a la tipificación molecular mediante “*multilocus sequence typing*” (MLST) y a las características bioquímicas (Brisse *et al.*, 2006; Brisse *et al.*, 2014) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

De las especies descritas hasta el momento, la especie de *Klebsiella* en que se basa esta tesis es *K. pneumoniae*.

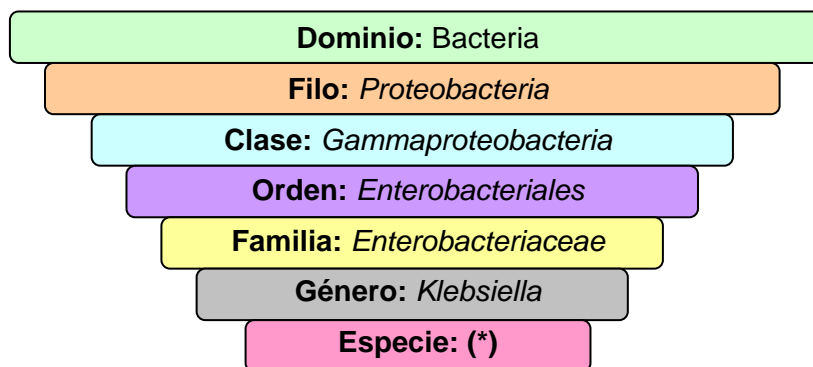


Figura 1: Pirámide taxonómica del género *Klebsiella*.

(*) Las diferentes especies que comprende el género *Klebsiella* se han descrito en el punto 1. Taxonomía e historia.

Tabla 1: Clasificación de las especies del género (Cowan *et al.*, 1960; Bascomb *et al.*, 1971a; Podschun *et al.*, 1998; Drancourt *et al.*, 2001)

Cowan (1960)	Bascomb (1971)	Ørskov (1984)	Drancourt (2001)
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>pneumoniae</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. edwardsii</i>	subsp. <i>ozaenae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. edwardsii</i>	<i>sensu stricto</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. granulomatis</i>
subsp. <i>edwardsii</i> var. <i>atlantae</i>	<i>sensu lato</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. terrigena</i> o <i>R. terrigena</i>
subsp. <i>edwardsii</i> var. <i>edwardsii</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. planticola</i> (incluyen <i>K. trevisanii</i>)	<i>K. planticola</i> o <i>R. planticola</i> (incluyen <i>K. trevisanii</i>)
	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. ornithinolytica</i>	<i>K. ornithinolytica</i> o <i>R. ornithinolytica</i>
	<i>K. "grupo sin nombre"</i>		<i>K. oxytoca</i>
	<i>E. aerogenes</i> (o <i>K. mobilis</i>)		

2. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Klebsiella*

El género *Klebsiella* lo componen bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae (Tabla 2). Es un bacilo inmóvil, oxidasa negativa y catalasa positiva, tienen una cápsula, básicamente compuesta por polisacáridos, que es un importante determinante de patogenicidad (Cowan *et al.*, 1960; Brisse *et al.*, 2006).

Las especies de *Klebsiella* son ubicuas en la naturaleza debido a su gran adaptación a diferentes nichos ecológicos y a sus diferentes especies. *Klebsiella* además de tener como hábitat las aguas residuales, el suelo y las plantas, es un patógeno oportunista común de humanos y otros animales que coloniza las mucosas de los mamíferos. La microbiota nasofaríngea y especialmente la del tracto gastrointestinal son los reservorios de *Klebsiella* (Bagley, 1985).

No tienen requerimientos específicos para su crecimiento, ya que pueden cultivarse fácilmente en medios de cultivo sencillos como Agar sangre, siendo sus condiciones óptimas de crecimiento son 37°C y pH 7. Son anaerobias facultativas ya que pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno y muchas de las especies que forman el género pueden sobrevivir utilizando citrato y glucosa como fuente de carbono, y amonio como fuente de nitrógeno. Fermentan la lactosa y el manitol y reducen el nitrato a nitrito. Tienen actividad ureasa positiva (hidroliza la urea a dióxido de carbono y amoníaco) y son indol y ornitina negativas (no degradan el triptófano y no poseen la enzima ornitina descarboxilasa), aunque siempre hay excepciones en algunas especies.

No producen ácido sulfhídrico y son positivas para el test del Rojo de Metilo y Voges-Proskauer (fermentación de la glucosa por la vía ácido mixta con producción de ácidos estables en el tiempo y por la vía butanodiólica con formación de un metabolito neutro) y también para el test ONPG (presencia de la enzima β -galactosidasa capaz de fermentar la lactosa). Las cepas de *Klebsiella* pueden ser aisladas de sangre, orina, muestras abdominales, muestras respiratorias, etc (Cowan *et al.*, 1960; Brisse *et al.*, 2006; Brisse *et al.*, 2014).

Tabla 2: Características fenotípicas de las especies de *Klebsiella*

	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>				
Indol	-	-	-	+	-	v	+
Rojo de metilo	-	+	+	v	+	v	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	+	+	+
Citrato	+	-	-	+	+	+	+
ONPG	+	+	-	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	+
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	+	v	-	+	+	+	+
Urea	+	v	-	+	+	+	+
Malonato	+	-	+	+	+	+	+
Lactosa	+	-	-	+	-	-	-
Crecimiento a 10°C	-	-	-	+	+	+	+
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-

3. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *Klebsiella pneumoniae*

3.1. *K. pneumoniae* como agente causal de infecciones

K. pneumoniae desempeña un importante papel como causa de enfermedades infecciosas oportunistas, siendo la segunda enterobacteria oportunista más importante como causa de infecciones nosocomiales y comunitarias, después de *Escherichia coli* (Al-Hasan *et al.*, 2010).

Causa una gran variedad de infecciones siendo importante como patógeno urinario, abdominal y respiratorio (Podschun *et al.*, 1998; Shon *et al.*, 2013). Además en los últimos años se ha observado, especialmente en Asia, un incremento de abscesos piogénicos hepáticos causados por *K. pneumoniae* (Shon *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014).

Las infecciones nosocomiales debidas a *Klebsiella* son especialmente problemáticas en las unidades pediátricas y de neonatos, unidades de quemados y sobre todo en las unidades de cuidados intensivos (UCI) debido a la presencia de cepas multirresistentes (Ruiz *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2012; Sadowska-Krawczenko *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2014; Vandeveldel *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015; Ontanilla *et al.*, 2015).

El grado de colonización por cepas multirresistentes aumenta en pacientes hospitalizados en función del tiempo de estancia hospitalaria y del uso de antibióticos. La capacidad de este microorganismo para diseminarse se traduce

en la aparición de brotes nosocomiales, cuyo principal reservorio es la colonización del tracto digestivo de los pacientes hospitalizados. Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* presentan unas tasas de mortalidad y morbilidad variables. Los factores de riesgo que favorecen una colonización/infección son la inmunodepresión de los pacientes (pacientes con diabetes mellitus o cáncer), la edad (niños y ancianos mayoritariamente), la realización de procedimientos invasivos (catéteres), el uso de los agentes antimicrobianos, el alcoholismo crónico y la vulnerabilidad frente a microorganismos multirresistentes (Asensio *et al.*, 2000; Cabellos *et al.*, 2009; Perianes-Diaz *et al.*, 2014; Yali *et al.*, 2014; Little *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Gajul *et al.*, 2015)

Los casos de infecciones causadas por cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* son más frecuentes en Asia, aunque en los últimos años se está detectando un incremento a nivel mundial. En la década de los 90, se describieron casos de abscesos piogénicos hepáticos causados por *K. pneumoniae* adquirida en la comunidad en países asiáticos. Además, en la última década se han comunicado casos esporádicos de abscesos piogénicos hepáticos y neumonías causadas por *K. pneumoniae*, en el resto del mundo (Shon *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014b; Lin *et al.*, 2015).

3.2. Brotes causados por *K. pneumoniae*

La capacidad de *K. pneumoniae* para colonizar el ambiente hospitalario, los fómites, los pacientes y el personal hospitalario, favorecen la diseminación de las infecciones de adquisición hospitalaria (Freeman *et al.*, 2014).

Las técnicas moleculares de tipado facilitan la identificación de la cepa causante del brote hospitalario y son imprescindibles para un mejor conocimiento de las infecciones nosocomiales (Pfaller *et al.*, 2001). En el caso de los brotes clonales, causados por organismos de la misma especie y con el mismo perfil de resistencia antibiótica, la tipificación molecular es necesaria para determinar la relación genotípica entre las cepas causantes del brote y para detectar el posible origen de la infección (Sader *et al.*, 1995). Sin embargo, los métodos fenotípicos, especialmente el perfil de resistencia a los antibióticos (antibiotipo o patrón de resistencia) constituyen una primera aproximación útil para la investigación de un brote nosocomial.

La mayor parte de los brotes de infección nosocomial causados por *K. pneumoniae* multirresistente descritos en la literatura en la década de los 70 son debidos a cepas resistentes a aminoglucósidos (Podschun *et al.*, 1998). En la década de 1990 a 2000 se comenzaron a describir los brotes causados por las cepas productoras de BLEEs (Peña *et al.*, 1998), mientras que las causadas por cepas resistentes a carbapenémicos se describen a partir de los años 2000 (Pitart *et al.*, 2011).

Entre la variedad de factores de riesgo que pueden facilitar la colonización y/o infección por cepas *K. pneumoniae* multirresistentes cabe destacar la gravedad del paciente, la duración de la hospitalización y los tratamientos invasivos que impliquen una mayor manipulación del paciente como la ventilación mecánica y los catéteres intravasculares o urinarios (Kuehn, 2013; Lee *et al.*, 2015).

Sin embargo, el consumo de antibióticos es el factor más determinante ya que estos ejercen una presión selectiva sobre la flora bacteriana propia de cada paciente, eliminando las bacterias sensibles y permitiendo la multiplicación de las bacterias resistentes a los antibióticos, que acaban convirtiéndose en la flora predominante (Borer *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2012).

Para controlar la diseminación de cepas resistentes en el ambiente hospitalario, es necesario cumplir adecuadamente una serie de medidas de control de la infección. Incluyendo la rápida identificación del brote, una estricta higiene y el seguimiento de los protocolos hospitalarios que previenen de la transmisión de la cepa entre distintos pacientes mediante fómites o por la actividad del personal sanitario. La utilización de medidas de barrera en la manipulación de los pacientes colonizados o infectados con alguna cepa de *K. pneumoniae* multirresistente y el uso de material fungible de un solo uso, son medidas de control que minimizan la transmisión de las cepas multirresistentes circulantes (Podschun *et al.*, 1998; Peña *et al.*, 1998; Tacconelli *et al.*, 2014).

4. MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

4.1. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos

4.1.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos

La utilización masiva de los antibióticos β -lactámicos ha originado la aparición de diversos mecanismos de resistencia bacteriana que limitan su uso en la práctica clínica (Figura 2). Se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Fisher *et al.*, 2005; Öztürk *et al.*, 2015).

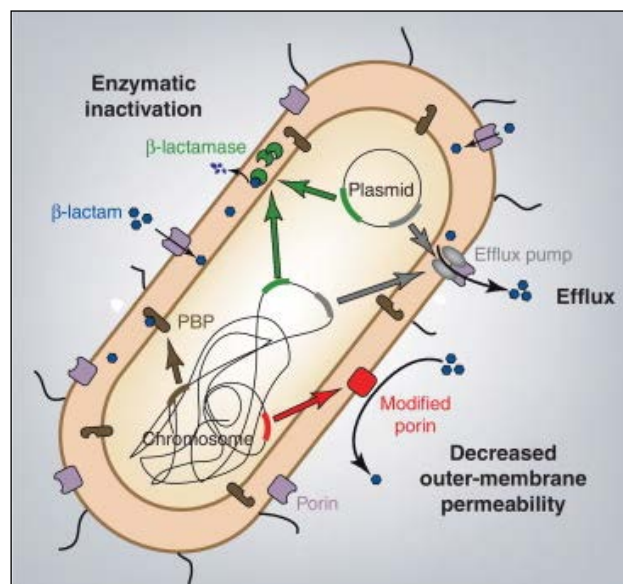


Figura 2: Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en Enterobacteriaceae (Nordmann *et al.*, 2012a)

a) Alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilina (*penicillin binding proteins*, PBP_s): Las PBP_s son enzimas que catalizan la síntesis del peptidoglicano y, son a su vez, la diana específica de los antibióticos β -lactámicos. Las modificaciones en su estructura impiden su interacción normal con el antibiótico confiriendo pérdida de afinidad de las PBP_s por los antibióticos β -lactámicos, provocando que las bacterias se hagan más resistentes a ellos. La hiperproducción de PBP_s también puede dar lugar a una disminución de la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos β -lactámicos al no existir suficientes moléculas del antibiótico para saturar el exceso de PBP_s producidas.

b) Modificación de la permeabilidad de la membrana externa: La membrana externa de las bacterias Gram negativas supone para los antibióticos β -lactámicos una barrera que deben atravesar antes de unirse a las PBP_s. Al ser hidrófilos los antibióticos β -lactámicos, no difunden bien a través de la membrana externa y deben utilizar canales proteicos inespecíficos para atravesarla, denominados porinas. La resistencia a antibióticos β -lactámicos puede producirse por pérdida de las porinas, reducción de su número o modificación de las mismas. Con frecuencia este mecanismo se asocia a otros mecanismos de resistencia elevando la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, como la producción de β -lactamasas o la presencia de bombas de eflujo que bombean el antibiótico al exterior. En *K. pneumoniae* se han identificado dos porinas principales: OmpK35 y OmpK36 (Alberti *et al.*, 1993; Ardanuy *et al.*, 1998; Hernández-Allés *et al.*, 1999).

c) Producción de β -lactamasas: Las β -lactamasas son hidrolasas que rompen el enlace amida del anillo β -lactámico inactivando el antibiótico de forma irreversible. En la familia de las enterobacterias, la síntesis de las β -lactamasas constituye el mecanismo más importante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos y de adaptación bacteriana frente a nuevos antibióticos β -lactámicos.

d) Bombas de expulsión activa: Los sistemas de expulsión están formados por proteínas de membrana especializadas, que captan y expulsan los antibióticos desde el citoplasma a la membrana de forma activa, gracias a la energía de protones o por un sistema relacionado con el ATP.

La bombas de expulsión activa AcrAB y OqxAB se han detectado frecuentemente en *K. pneumoniae*. Aunque OqxAB se describió inicialmente en *E. coli* en 2003 se ha detectado en otra especies de la familia Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*). Comparte un 40% de homología con otras bomba de expulsión activa como AcrAB de *K. pneumoniae* y *E. coli* o MexAB en *Pseudomonas aeruginosa* (Yuan *et al.*, 2012; Bialek-Davenet *et al.*, 2015).

4.1.2. Las β -lactamasas y su clasificación

De los posibles mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, la producción de β -lactamasas es la principal causa de la resistencia de las enterobacterias a este grupo de antimicrobianos (Curello *et al.*, 2014).

La gran diversidad de enzimas y de perfiles de hidrólisis ha hecho que se hayan propuesto diferentes esquemas para su clasificación.

Las clasificaciones de β -lactamasas más utilizadas son la molecular de Ambler y la funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995) (Tabla 3).

Ambler en 1980 propuso la primera clasificación de β -lactamasas basada en la estructura molecular dividiéndolas en dos clases: clase A o penicilinasas que poseen un residuo de serina en el centro activo (poseen un fenotipo de resistencia a penicilinas y a combinaciones de penicilinas con inhibidores de las β -lactamasas) y clase B o cefalosporinasas, metalo- β -lactamasas que requieren zinc como cofactor (Ambler, 1980).

Un año más tarde, fueron Jaurin y Grundström los que ampliaron esta clasificación con la clase C; cefalosporinasas con una serina en su centro activo (Jaurin *et al.*, 1981).

A finales de los años 80, se definen como clase D las β -lactamasas tipo serina que hidrolizan la cloxacilina o la oxacilina. Las β -lactamasas de la clase molecular D también se denominan oxacilinasas debido a que hidrolizan oxacilinasas con mejor rapidez que las penicilinas y/o cefalosporinas. Se dividen en 2 subgrupos: 2de para las que su perfil de hidrólisis es de BLEE y 2df para las carbapenemasas (Huovinen *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 2010).

Tabla 3: Clasificación de las β -lactamasas (Bush *et al.*, 2010)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

Actualmente, el número total de β -lactamasas caracterizadas llega casi a las 1000 como se detalla en la página web dirigida por la Dra. Karen Bush donde se presentan las enzimas de la familia TEM, SHV y OXA (<http://www.lahey.org/studies>).

4.1.3. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

Las cepas de *K. pneumoniae* producen una β -lactamasas (penicilinasas) de codificación cromosómica (LEN-1 y SHV-1), aunque es frecuente la producción de β -lactamasas de codificación plasmídica (TEM, CTX-M, OXA...) (Haeggman *et al.*, 2004).

La producción de β -lactamasas plasmídicas es variable encontrándose con mayor frecuencia las del grupo funcional 2b pertenecientes a la clase molecular A, según la clasificación de Bush y Medeiros, SHV, TEM y CTX-M. En los últimos años, la identificación de otros tipos de β -lactamasas ha ido incrementando especialmente las β -lactamasas de la familia de las OXA y las carbapenemasas (Cantón *et al.*, 2012b).

Los miembros de la especie *K. pneumoniae* que presentan estas enzimas producen las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), son homogéneamente resistentes a penicilinas (ampicilina, amoxicilina, piperacilina y ticarcilina) y presentan resistencia variable a otros grupos antibióticos. Tienen la capacidad de hidrolizar las cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime) y monobactámicos (aztreonam), pero no las cefamicinas (cefoxitina). Mayoritariamente no hidrolizan los carbapenémicos como imipenem, meropenem y ertapenem (a excepción de los grupos 2df, 2f y 3). Las BLEEs son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Los genes que las codifican se localizan en elementos móviles facilitando su diseminación

y presentando co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas (Gupta *et al.*, 2003; Cercenado *et al.*, 2011).

4.1.4. AmpC plasmídicas

La cefalosporinasa cromosómica (AmpC) fue la primera enzima bacteriana descrita capaz de destruir la penicilina, que fue detectada en una cepa de *E. coli* en 1940 (Jacoby, 2009). En la clasificación estructural de β -lactamasas propuesta por Ambler las enzimas AmpC pertenecen a la clase molecular C y según la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros se les asigna el grupo 1 (Bush *et al.*, 2010).

Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de 2^a y 3^a generación y no se inhiben por ácido clavulánico. Pueden ser de localización cromosómica o plasmídica así, se han detectado cepas con co-existencia de AmpC y BLEE presentando una elevada concentración mínima inhibitoria (CMI) a cefalosporinas (Paterson *et al.*, 2005).

La variabilidad genética de las β -lactamasas tipo AmpC ha permitido su clasificación en diferentes familias. Las más comunes entre las cepas de *K. pneumoniae* son CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX y DHA (Jacoby, 2009). Aunque la producción de AmpC plasmídicas no es frecuente en las enterobacterias, es un hecho que se debe tener en cuenta (Rodríguez-Baño *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2013).

4.1.5. Carbapenemasas

Las cepas *K. pneumoniae* y otras enterobacterias con resistencia a antibióticos carbapenémicos (imipenem, ertapenem, meropenem) son un problema reciente en todo el mundo, limitando todavía más las opciones terapéuticas (Nordmann *et al.*, 2011a; Cantón *et al.*, 2012a). Además, estas cepas a menudo albergan también mecanismos adicionales de resistencia, como producción de BLEEs, mutaciones en genes, expresión de bombas de flujo, enzimas modificantes de aminoglucósidos, etc.

Las carbapenemasas pueden pertenecer a las clases de β -lactamasas A, B y D (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 2010). Según su mecanismo hidrolítico, las enzimas de la clase A y D son β -lactamasas con centro activo serina, mientras que las enzimas de la clase B son metalo- β -lactamasas ya que requieren zinc como cofactor. Las carbapenemasas de la clase A incluyen a las familias SME, IMI, NMC, GES y KPC; las de la clase B las familias IMP, VIM, SPM, GIM y SIM y las de la clase D la familia OXA (Queenan *et al.*, 2007).

La clase molecular se asocia con la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y/o carbapenémicos. Las enzimas de la clase A hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, aztreonam (todas excepto la familia GES) y los carbapenémicos. Las enzimas de la clase A son inhibidas por el ácido clavulánico pero no por el EDTA. Las enzimas de la clase B hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos pero no hidrolizan el aztreonam. Son enzimas inhibidas por el EDTA y no por el ácido clavulánico. Y por último, las enzimas de la clase D hidrolizan penicilinas, hidrolizan de modo variable a

cefalosporinas y carbapenémicos pero no hidrolizan el aztreonam. Las carbapenemasas de la familia OXA se pueden inhibir por el ácido clavulánico y no por el EDTA (Queenan *et al.*, 2007).

4.2. Resistencia a quinolonas

En 1962 se descubrió la primera molécula de la familia de las quinolonas, el ácido nalidíxico, activo frente a algunas bacterias Gram negativas. En la década de los 80 aparecieron las primeras quinolonas fluoradas (fluoroquinolonas) que mejoraron el espectro de las anteriores. El amplio uso de estos antimicrobianos ha favorecido al desarrollo de resistencias mediadas principalmente por cambios cromosómicos.

En *K. pneumoniae*, los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas más conocidos son las mutaciones puntuales en la zona conocida como *quinolone resistance-determining region* (QRDR) de la ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV (genes *parC* y *parE*). La primera diana de resistencia a quinolonas en microorganismos Gram negativos es *gyrA*. Una mutación en *gyrA* da lugar a resistencia de bajo nivel. La existencia de varias mutaciones en *gyrA* aumenta gradualmente el nivel de resistencia de bajo nivel. La causa de resistencia de alto nivel se debe a la presencia de mutaciones simultáneas en *gyrA* y en *parC* (Deguchi *et al.*, 1997).

Sin embargo, también existen mecanismos de resistencia transferibles adquiridos mediante elementos genéticos móviles (Ruiz *et al.*, 2012), que pueden clasificarse en:

a.) Protección de la diana por proteínas de la familia *qnr* (quinolone resistance): (Martínez-Martínez *et al.*, 1998a; Martínez-Martínez *et al.*, 1998b; Tran *et al.*, 2002)

Las proteínas *qnr* protegen la ADN girasa y la topoisomerasa IV (dianas de las quinolonas) frente a inhibidores naturales, confieren resistencia a nalidíxico y provocan un aumento en las CMI de las quinolonas.

El operón suele localizarse formando parte de un integrón de clase 1 portador de otros mecanismos de resistencia adicionales (Rodríguez-Martínez, 2005).

b.) Bombas de expulsión: (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2013; Al-Marzooq *et al.*, 2014; Goudarzi *et al.*, 2015)

Actividad de transportadores activos endógenos que provocan la expulsión de los antimicrobianos desde la membrana celular al medio exterior (*qepA*, *OqxAB*).

c.) Modificación enzimática: (Cubero *et al.*, 2013a)

La enzima *aac(6')-Ib-cr* es una variante de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa, capaz de inactivar por acetilación los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas.

d.) Alteraciones de la permeabilidad: porinas (Martínez-Martínez *et al.*, 1996; Ardanuy *et al.*, 1998)

Alteraciones en la permeabilidad de la membrana que disminuyen la penetración intracelular del fármaco (OmpK35, OmpK36).

En algunas cepas multirresistentes es frecuente la presencia de uno o varios genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas, lo que explica la frecuente asociación de las β -lactamasas plasmídicas y la resistencia a quinolonas incrementada (Robicsek *et al.*, 2006a; Robicsek *et al.*, 2006b; Jacoby *et al.*, 2014).

4.3 Detección fenotípica de cepas *K. pneumoniae* resistentes

Los estudios de sensibilidad antibiótica deben seguir los estándares nacionales e internacionales donde se proponen los métodos y los puntos de corte clínicos y epidemiológicos para determinar la sensibilidad antibiótica. Dichos puntos de corte se revisan y se modifican periódicamente. En Europa hay 7 países con comités nacionales europeos para decidir los puntos de corte de nuevos y antiguos antimicrobianos: BSAC (Reino Unido), CA-SFM (Francia), CRG (Países Bajos), DIN (Alemania), NWGA (Noruega), SRGA (Suecia) y MENSURA (España). Para evitar divergencias de interpretación entre distintos países europeos, se creó el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) desde la *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, <http://www.eucast.org/> (ESCMID). Todavía no existe una coordinación entre el comité europeo (EUCAST) y el

americano (*The Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, CLSI*), lo que se traduce en discrepancias en la interpretación de algunos antibióticos.

Siguiendo las definiciones del EUCAST, se entiende como microorganismo sensible (S) cuando el nivel de actividad antimicrobiana implica una elevada probabilidad de éxito terapéutico. Una cepa con sensibilidad clínica intermedia (I) sería considerada cuando el éxito terapéutico tenga un efecto incierto, lo que implica que la infección debida a dicho microorganismo debe ser adecuadamente tratada en el lugar de la infección con un antimicrobiano concentrado o con una elevada dosis. Por último, se define una cepa como clínicamente resistente (R) cuando el nivel de actividad antimicrobiana comporta una elevada probabilidad de fallo terapéutico. Los puntos de corte se presentan como $S \leq x$ mg/L; $I > x, \leq y$ mg/L y $R > y$ mg/L según la resistencia clínica y los puntos de corte clínicos y epidemiológicos (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

El aumento progresivo de cepas resistentes por producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) hace que sean necesarios métodos de cribado para su rápida detección. Uno de los test más utilizados es el test de la sinergia del doble disco que consiste en hacer crecer una cepa en una placa de agar Mueller-Hinton y poner un disco de carga estándar de cefotaxima y uno de ceftazidima y un disco que contenga una combinación de ácido clavulánico y estos antibióticos. Un test positivo resultaría cuando el halo del antibiótico en combinación con el ácido clavulánico aumente su diámetro respecto al halo del antibiótico en solitario.

Otro método muy utilizado es el E-test que evalúa las cefalosporinas de tercera generación con y sin un inhibidor de la β -lactamasa. Una disminución de la CMI

en 3 o más diluciones, al añadir ácido clavulánico, indica la posible presencia de una BLEE. También se puede determinar la actividad de carbapenémicos con los E-test de imipenem e imipenem/EDTA o en combinación con ácido borónico, aunque no es un buen método para la detección de OXA-48. La mayoría de los sistemas automatizados de estudio de la sensibilidad antibiótica disponen de cribado para BLEEs.

La detección de cepas productoras de carbapenemasas se basa en la aplicación de pruebas de sensibilidad mediante disco difusión o con sistemas automatizados, aunque no detectan todas las familias de carbapenemasas y pueden dar discrepancias. El antibiótico carbapenémico más indicado para detectar las cepas productoras de carbapenemasas es el ertapenem ya que sus CMI's suelen ser más elevadas que las de otros carbapenémicos (Nordmann *et al.*, 2012b).

Un método de detección no molecular propuesto para la detección de la actividad de las carbapenemasas es el test de Hodge que mide de forma indirecta la hidrólisis del imipenem y es un buen método para la detección de KPC y OXA-48.

Las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizan en una primera aproximación para la identificación de las β -lactamasas:

- Familia de β -lactamasas (*bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}) (Fang *et al.*, 2008).
- Cefalosporinasas (CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX y DHA) (Jacoby, 2009).

- Carbapenemasas detectadas en *K. pneumoniae*: carbapenemasas de clase A (SME, IMI, NMC, GES, KPC), carbapenemasas de clase B o metalo- β -lactamasas (NDM, IMP, VIM) (Queenan *et al.*, 2007) y carbapenemasas de clase D del tipo OXA-48 (Poirel *et al.*, 2004).

La utilización de estas técnicas es cada vez más frecuente para confirmar la presencia de β -lactamasas, especialmente carbapenemasas. Tras la amplificación de los genes, es necesario conocer su secuencia y compararla con las secuencias de los genes ya identificados, cuyas secuencias están depositadas en bases de datos como *Genebank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

El uso de la espectrometría de masas para detectar la actividad de los carbapenemasas basándose en el análisis de la degradación de los antibióticos carbapenémicos es una incorporación reciente en la detección de carbapenemasas.

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) acoplada a un detector de iones TOF (tiempo de vuelo), permite visualizar el carbapenémico degradado cuando se compara con el carbapenémico activo no degradado. El uso de la espectrometría de masas es útil para un diagnóstico bacteriológico rápido y barato, aunque de momento no es una metodología adecuada para la determinación de la sensibilidad antibiótica (Hrabák *et al.*, 2011; Burckhardt *et al.*, 2011)

5. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Los sistemas de tipificación molecular sirven para reconocer la relación genética entre aislamientos bacterianos vinculados epidemiológicamente y que derivan de un microorganismo ancestral común. Además de ser útiles en la identificación de aislamientos genéticamente relacionados, son técnicas capaces de diferenciar los aislamientos no relacionados que pertenezcan a la misma especie (Sader *et al.*, 1995).

El término clon o complejo clonal en epidemiología, hace referencia al grupo de aislamientos que descienden de un ancestro común, o que proceden directamente de la misma fuente o de la misma cadena de transmisión. Estos aislamientos mantienen un nivel de similitud genética elevado, mucho mayor que el de los aislamientos seleccionados arbitrariamente, sin relación epidemiológica.

Las técnicas moleculares varían desde los estudios de restricción del ADN cromosómico mediante electroforesis de campo pulsado (ECP), a la secuenciación de fragmentos internos de genes metabólicos muy conservados (*Multilocus sequence typing*, MLST), a los análisis del número de copias de determinadas secuencias de inserción o aquellas secuencias repetidas a lo largo del cromosoma (REP-PCR) o a la amplificación arbitraria de fragmentos genéticos (AP-PCR).

5.1. Tipificación molecular de los microorganismos

5.1.1. Electroforesis en campo pulsado (ECP)

Mediante el análisis del patrón de macro-restricción del ADN cromosómico realizado con la electroforesis ECP se consigue determinar el tamaño de los fragmentos de ADN. Es una técnica de tipado molecular muy discriminativa, capaz de separar los fragmentos de ADN de alto peso molecular (desde 100 bases hasta 10 megabases) y tiene varias utilidades en el rastreo e investigación de los brotes. Se usa para la investigación de los brotes de infecciones nosocomiales o comunitarias (Swaminathan 2001).

ECP es una de las técnicas “*gold standard*” en los estudios de epidemiología a nivel nacional e internacional. Su origen data de 1984 cuando Schwartz y Cantor idearon una manera de separar moléculas grandes de ADN. Este método ha tenido una gran aceptación y aplicabilidad como técnica de tipificación molecular (Schwartz *et al.*, 1984).

La interpretación y comparación de los perfiles de bandas permite establecer la relación epidemiológica entre los aislamientos, siguiendo los criterios propuestos por Tenover *et al.* La detección de los fragmentos de ADN se consigue tras exponer el gel teñido con bromuro de etidio a la luz ultravioleta y fotografiarlo. Así, se consideran aislados distintos cuando se diferencian en más de 3 fragmentos o bandas de ADN. Dos aislados se consideran

genéticamente muy relacionados (subtipos similares de un patrón de ECP) cuando tienen de 1 a 3 bandas de diferencia entre ambos patrones (Tenover *et al.*, 1995).

La ventaja del análisis de los perfiles de restricción es que es una técnica altamente reproducible y precisa en la determinación de la relación genética de las cepas microbianas.

5.1.2. *Multilocus sequence typing* (MLST)

La disminución del coste de las técnicas de secuenciación permitió el desarrollo de esquemas de tipificación bacteriana basados en la secuenciación del ADN. La técnica más utilizada es el “*Multilocus sequence typing*” (MLST), que se basa en la secuenciación de fragmentos internos de 7 genes metabólicos muy conservados (*house-keeping* genes). En *K. pneumoniae* los genes secuenciados para el MLST son los descritos en la web del Institut Pasteur (Paris) (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>) (Diancourt *et al.*, 2005).

- *rpoB* (beta-subunidad de la ARN polimerasa)
- *gapA* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa)
- *mdh* (malato deshidrogenasa)
- *pgi* (fosfoglucoasa isomerasa)
- *phoE* (fosforina E)
- *infB* (factor de iniciación de la traducción 2)
- *tonB* (transductor de la energía periplásmica)

La mayoría de las especies bacterianas tienen la variación suficiente en los genes metabólicos analizados como para dar lugar a muchos alelos por cada uno de los locus. Esto permite la diferenciación de miles de combinaciones alélicas utilizando únicamente los 7 genes metabólicos mencionados. A cada secuencia única obtenida de estos genes se le asigna un número de alelo diferente y cada cepa se caracteriza por la combinación de las secuencias únicas de los alelos en cada uno de los siete loci, lo cual constituye su perfil alélico o secuenciotipo (ST). La asignación de alelos o STs se hace utilizando bases de datos que en el caso de *K. pneumoniae* está depositada en el Instituto Pasteur (<http://bigsd.dbweb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

5.1.3. *Next-generation sequencing* (NGS)

Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento (NGS), se introdujeron en el mercado en 2005 teniendo un gran impacto en genómica (transcriptómica y epigenómica) con la secuenciación del genoma completo. Por ahora no es un método de tipificación rutinario en los laboratorios, pero se está introduciendo poco a poco gracias a su gran utilidad. La técnica consiste en realizar, de forma automatizada, múltiples alineamientos de las secuencias obtenidas con las secuencias de una base de datos interna que contiene el software.

El desarrollo de estas nuevas tecnologías permite, entre un amplio rango de aplicaciones, la rápida secuenciación de los aislamientos de *K. pneumoniae* y aporta información sobre la presencia de genes de resistencia, además de clasificar los aislamientos de los diferentes linajes clonales (Arena *et al.*, 2014).

5.2 Elementos genéticos móviles portadores de mecanismos de resistencia

5.2.1. Plásmidos

Muchos microorganismos y entre ellos *K. pneumoniae*, han ido adquiriendo mecanismos de resistencia bien sea por mutaciones de los genes propios responsables de la resistencia o por adquisición de plásmidos u otro ADN bacteriano extracromosómico (Carattoli, 2013).

Los plásmidos junto con otros elementos móviles como integrones y transposones juegan un papel importante en la diseminación de los mecanismos de resistencia. Las cepas de *K. pneumoniae* al igual que otras enterobacterias pueden acumular plásmidos epidémicos mediante conjugación o transformación. La difusión de un plásmido de resistencia es satisfactoria cuando se transfiere a una célula receptora sensible que carece de él y permite la diseminación de la bacteria portadora del plásmido como agente infeccioso (Carattoli, 2011).

Estos plásmidos pueden llevar genes que codifican factores de virulencia y mecanismos de resistencia que incrementan la habilidad de las cepas para resistir en medios hostiles y sobrevivir frente a antimicrobianos de uso terapéutico como cefalosporinas, carbapenémicos, penicilinas, aminoglucósidos o fluoroquinolonas (Carattoli, 2013). Aparentemente, la presencia de plásmidos no beneficia a la bacteria hospedadora ya que supone una carga de “*fitness extra*”. Sin embargo, en situaciones de presión antibiótica

selectiva un fenotipo de resistencia es fácilmente seleccionable con el uso de antimicrobianos, incrementando su prevalencia y su rápida diseminación, en comparación con otras bacterias que no presenten el plásmido. Las cepas resistentes son causas importantes de bacteriemias adquiridas en el hospital, y constituyen un problema grave en unidades de cuidados intensivos y en pacientes con estancias hospitalarias prolongadas (Mathers *et al.*, 2015).

Los plásmidos de resistencia tienen diferentes orígenes y pueden afectar a diversas especies bacterianas. El análisis plasmídico nos permite también identificar plásmidos epidémicos idénticos que se encuentren en diferentes clones dentro de una especie bacteriana, o en diferentes especies bacterianas (Carattoli, 2013). *K. pneumoniae* normalmente puede llevar más de un plásmido, bien sea de pequeño tamaño, pero con un alto número de copias o de gran tamaño, pero con un bajo número de copias (Ramirez *et al.*, 2014).

Cuando dos plásmidos diferentes cohabitan en la célula huésped y compiten por factores que promueven la replicación o segregación, se da la incompatibilidad. El grado de incompatibilidad depende del número de copias de cada plásmido y su velocidad de replicación, ya sea de forma ordenada o aleatoria. La posterior segregación será de forma aleatoria, pero las células hijas siempre contendrán una cantidad equitativa de plásmidos (Kachroo *et al.*, 2009) (Figura 3).

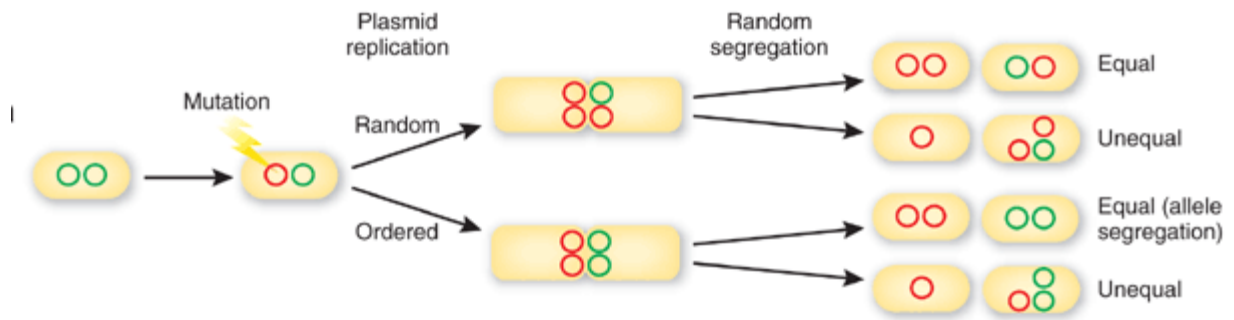


Figura 3: Replicación plasmídica desde una célula progenitora (Kachroo *et al.*, 2009)

5.2.2. Integrones

Los integrones son elementos genéticos en los que se pueden insertar genes, entre ellos genes de resistencia antimicrobiana, gracias a un mecanismo de recombinación específico (Lévesque *et al.*, 1995; White *et al.*, 2001; Sabaté *et al.*, 2002).

La estructura general de los integrones consiste en dos segmentos de ADN conservados (extremo 5' [5'CS] y extremo 3' [3'CS]), separados por una región variable donde se encuentran los casetes genéticos (Figura 4). En la región 5'CS, se encuentra la integrasa (*intI*) encargada de catalizar la recombinación específica de sitio, la integración y la escisión de los casetes de genes y que permite clasificar los integrones en clases, siendo la clase I la más frecuente en las cepas clínicas (Sabaté *et al.*, 2002). En esta zona conservada también se encuentran el lugar de recombinación específico (*attI*) y los promotores necesarios para expresar los genes que se encuentran en los casetes de resistencia de la zona variable (White *et al.*, 2001). En la región 3'CS, se

encuentran el gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario presentes en algunos antisépticos y desinfectantes (*qacEΔ1*) y el gen que determina resistencia a las sulfonamidas (*sulI*) (Lévesque *et al.*, 1995).

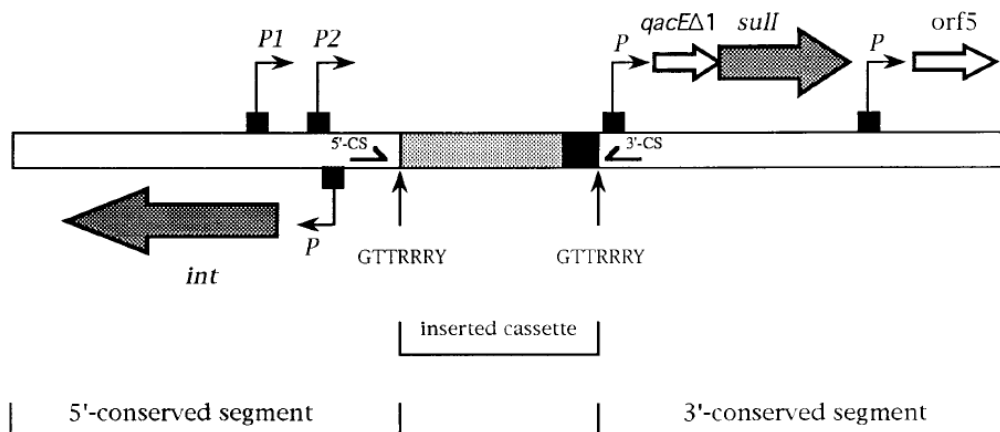


Figura 4: Estructura general del integrón de clase I (Lévesque *et al.*, 1995)

El mapeado de los integrones mediante PCR y secuenciación es una herramienta epidemiológica útil para estudiar la evolución de estos mecanismos que diseminan los genes de resistencia antibiótica, su expresión genética y su posición en el integrón (Lévesque *et al.*, 1995).

Los integrones probablemente no son móviles, pero se diseminan en transposones o plásmidos conjugativos que aseguran su difusión entre bacterias (Sabaté *et al.*, 2002).

5.3. Clones pandémicos y epidémicos de *K. pneumoniae*

Las cepas multirresistentes y elevadamente virulentas están emergiendo a nivel mundial y por ello es necesario conocer su diseminación y poder

relacionar dichas cepas agrupandolas en complejos clonales o grupos clonales (CCs). Algunas cepas multirresistentes (productoras de BLEE y/o resistentes a carbapenémicos y/o a quinolonas y/o a aminoglucósidos) pertenecen a grupos clonales que se han descrito en muchos países. Así ciertos genes, el tipo de infección (nosocomial o comunitaria) y los orígenes clínicos de las cepas nos pueden dar una idea de a qué grupo clonal pertenecen (Bialek-Davenet *et al.*, 2014) (Figura 5).

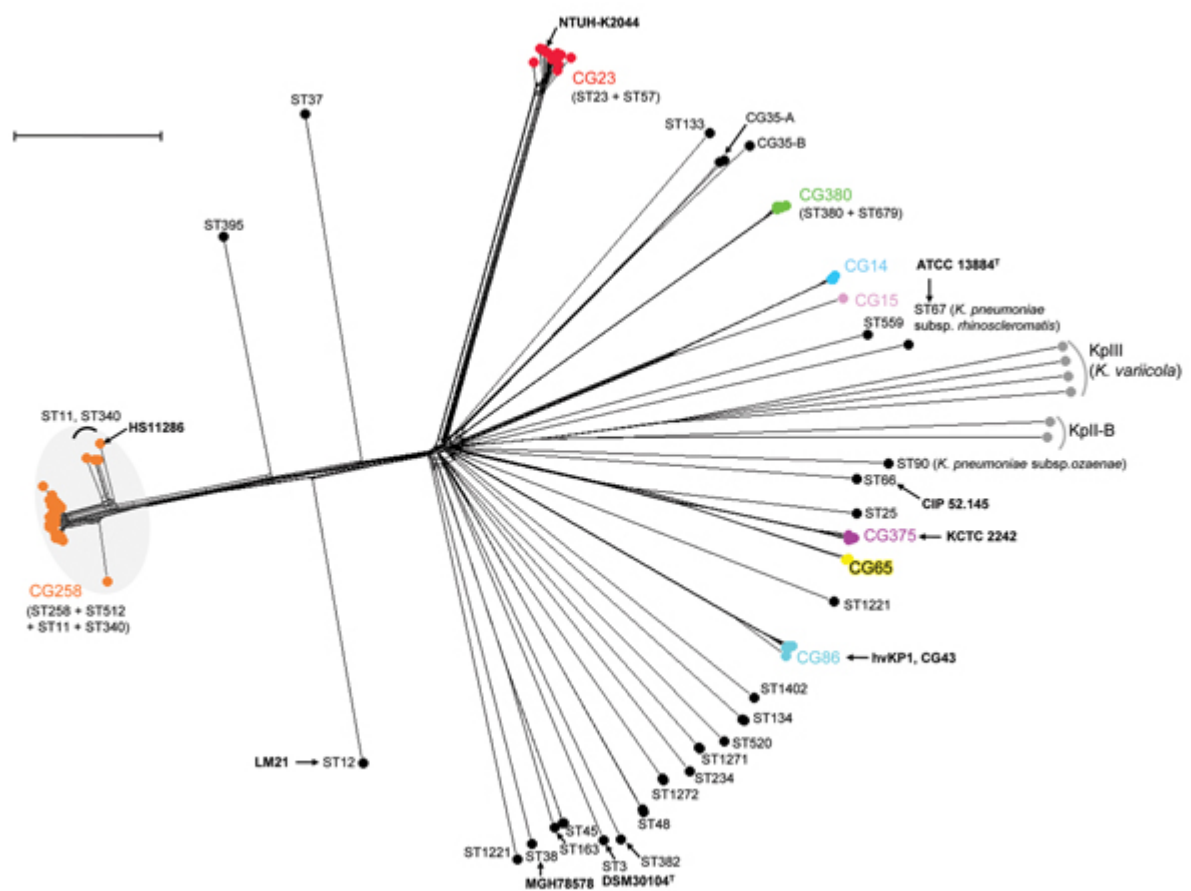


Figura 5: Árbol filogenético de 167 genomas de *K. pneumoniae* determinado según el perfil alélico de 694 genes *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST). Los grupos clonales más relevantes están coloreados: CG258, CG23, CG35-A y CG35-B, CG380, CG14, CG15, CG375, CG65, CG86. La barra de escala representa 100 discordancias alélicas. El *Neighbor-net* está generado con el programa SplitsTree v4.13.1 (Bialek-Davenet *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓN

Entre los secuenciotipos descritos encontramos ST23 relacionado con las cepas hipervirulentas del serotipo K1 y los secuenciotipos ST380, ST86, ST57, ST65 y ST375 relacionados con el serotipo K2 también asociados con frecuencia con cepas hipervirulentas. Por otro lado, las cepas multirresistentes se han asociado con los secuenciotipos ST11, ST14, ST15, ST258 y ST512 (Bialek-Davenet *et al.*, 2014).

El Centro europeo de prevención y control de enfermedades (ECDC) recoge los datos de resistencia antibiótica de microorganismos que causan bacteriemia. Las gráficas muestran las proporciones de aislados de *K. pneumoniae* resistentes (resistentes e intermedios) a diferentes antibióticos encontrados en Europa (Figuras 6 y 7) (http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx).

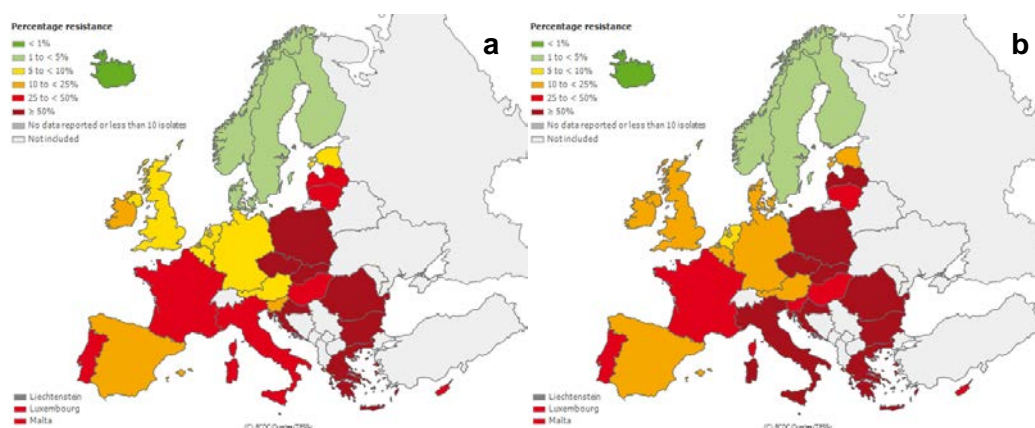


Figura 6: Proporción de aislados resistentes: a. aminoglucósidos, b. cefalosporinas de 3ª generación,

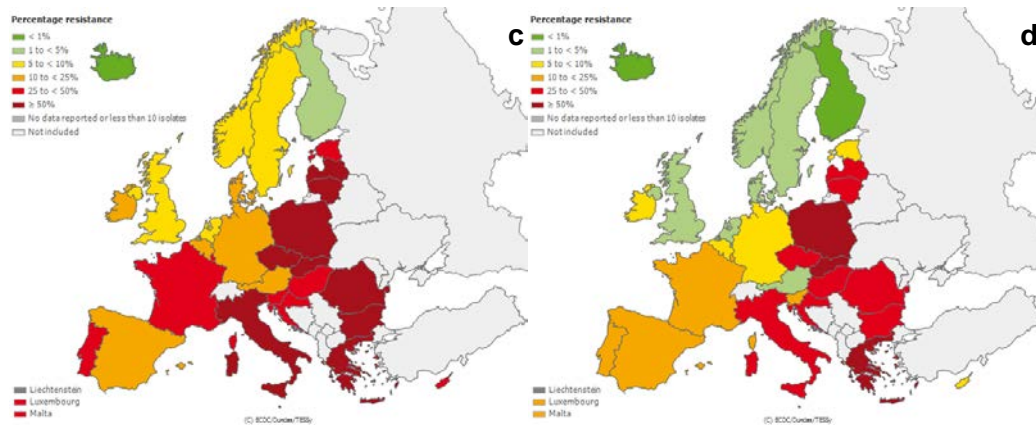


Figura 6 (continuación): Proporción de aislados resistentes: c. fluoroquinolonas y d. multirresistentes (resistente a aminoglucósidos, cefalosporinas de 3ª generación y fluoroquinolonas)

La emergencia a nivel mundial de cepas resistentes a carbapenémicos está causando un problema sanitario grave ya que su diseminación es a veces difícil de controlar. En el control de un brote epidémico causado por estas cepas es muy importante el diagnóstico rápido, la vigilancia activa y el seguimiento estricto de las guías de control para infecciones facilitada por el ECDC u otros organismos

(http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections/guidance-infection-prevention-control/Pages/guidance-prevention-control-infections-CRE.aspx) (Nordmann *et al.*, 2014).

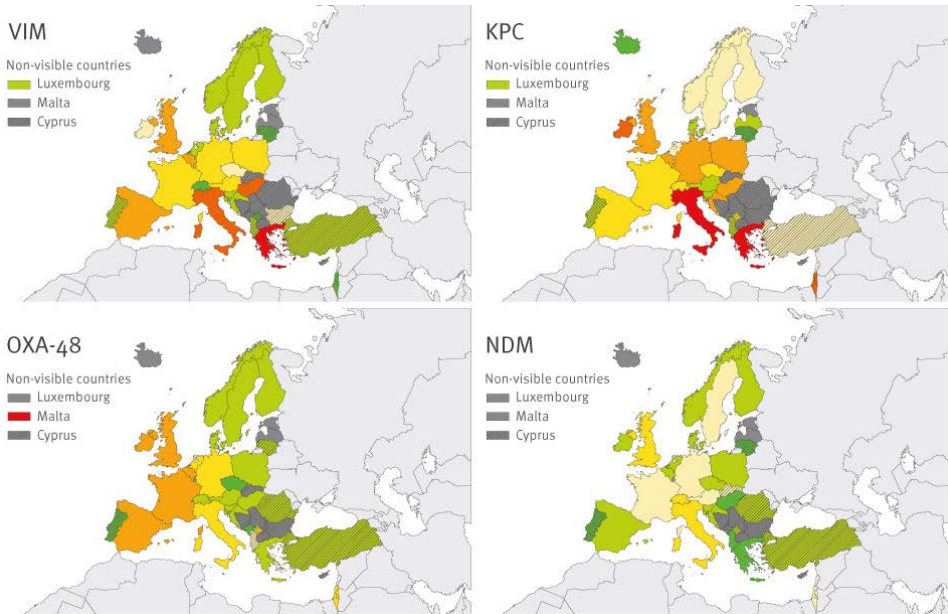
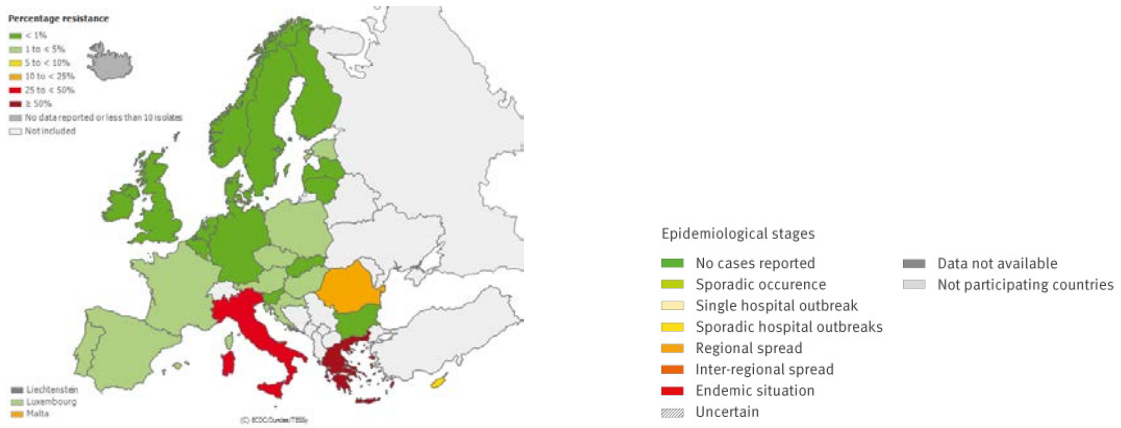


Figura 7: Proporción de aislados resistentes a carbapenémicos y de las cepas productoras de carbapenemasas tipos: VIM, KPC, OXA-48 y NDM (Glasner *et al.*, 2013).

6. FACTORES DE VIRULENCIA

La capacidad de *Klebsiella pneumoniae* para causar infecciones se debe a una serie de factores implicados en la evasión del sistema inmune y en la invasión tisular. Entre estos factores se encuentran: los antígenos de superficie (polisacárido capsular [CPS] y lipopolisacárido [LPS]), las adhesinas (fimbrias o no fimbrias), los sideróforos, la resistencia al suero, la actividad ureásica y la hiper mucoviscosidad (Podschun *et al.*, 1998; Brisse *et al.*, 2006; Maroncle *et al.*, 2006; Broberg *et al.*, 2014) (Figura 8).

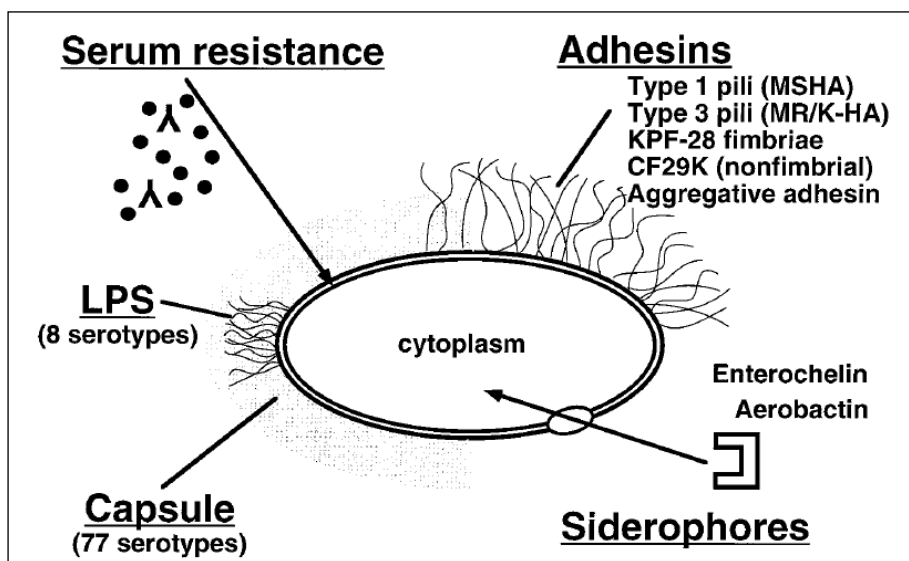


Figura 8: Representación esquemática de los factores de virulencia de *K. pneumoniae* (Podschun *et al.*, 1998)

6.1. Antígenos de superficie

Los miembros del género *Klebsiella* expresan 2 tipos de antígenos en su superficie. El primero es un lipopolisacárido (LPS o antígeno O) y el otro es un polisacárido capsular (antígeno K). Ambos antígenos contribuyen notablemente a la patogenicidad de la bacteria.

Hasta el momento han sido descritos 78 antígenos K y 9 antígenos O. La variabilidad estructural de estos antígenos se ha utilizado para clasificar las cepas en varios serotipos y según el serotipo se han detectado diferencias en la virulencia de las cepas. La diversidad de la cápsula polisacáridica es útil para la identificación serológica, aunque en la actualidad el serotipado molecular debería reemplazar a este método (Brisse *et al.*, 2004).

El antígeno O es el componente más externo del LPS de la membrana externa y está formado por un polímero de oligosacáridos que se repiten dotándole de una gran variabilidad química. Las cepas de *K. pneumoniae* expresan constitutivamente la cápsula polisacáridica que junto al LPS, facilita la resistencia del organismo a la muerte por opsonización fagocítica, mediante el complemento. La resistencia al complemento se ve favorecida por la gran variabilidad que se encuentra en el antígeno O. Además, la resistencia al suero también se asocia al antígeno K, aunque en este caso depende más de la cantidad de cápsula producida que de la variabilidad en su composición química (Álvarez *et al.*, 2000).

No todos los serotipos de *K. pneumoniae* actúan del mismo modo frente al complemento. Siendo el antígeno O1 el más frecuentemente detectado en las cepas de *K. pneumoniae* capsuladas; se produce en la superficie de las cepas con algunos polisacáridos capsulares como K2, K7, K19, K21, K22 y K66; mientras que la cápsula de los serotipos K1, K10 y K16 enmascaran al antígeno O1 y favorecen la resistencia a bacteriófagos e impiden la activación del complemento (Tomas *et al.*, 1991).

6.1.1. Polisacárido capsular (CPS) o antígeno K

La cápsula (CPS) es uno de los factores de virulencia más importantes para *K. pneumoniae* ya que le protege contra la actividad bactericida del suero, los péptidos antimicrobianos y la fagocitosis. La diferente composición del polisacárido capsular de los distintos serotipos de *Klebsiella* determina diferentes grados de virulencia. Las cepas mutantes sin CPS no presentan virulencia y no son capaces de causar infecciones.

De los 78 serotipos descritos por el momento, los serotipos K1 y K2 son los más estudiados y a su vez los más virulentos. Entre los serotipos asociados con enfermedad invasiva y mayor patogenia encontramos además de K1 y K2, los serotipos K5, K54, K57 y k20 (Turton *et al.*, 2010). Un método rápido para predecir el serotipo K está basado en la secuenciación del gen *wzi*, que forma parte del operón capsular y está conservado en todos los tipos capsulares de

K. pneumoniae. Este gen codifica una proteína de membrana externa implicada en la unión de la cápsula a la superficie celular (Brisse *et al.*, 2013).

6.1.2. Lipopolisacárido (LPS) o antígeno O

En *K. pneumoniae*, los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa son esenciales para la estructura y la inmunidad ya que protege de los antibióticos y favorece la adhesión. LPS está formado por tres dominios: el lípido A, un núcleo de oligosacáridos y el antígeno O (Figura 9).

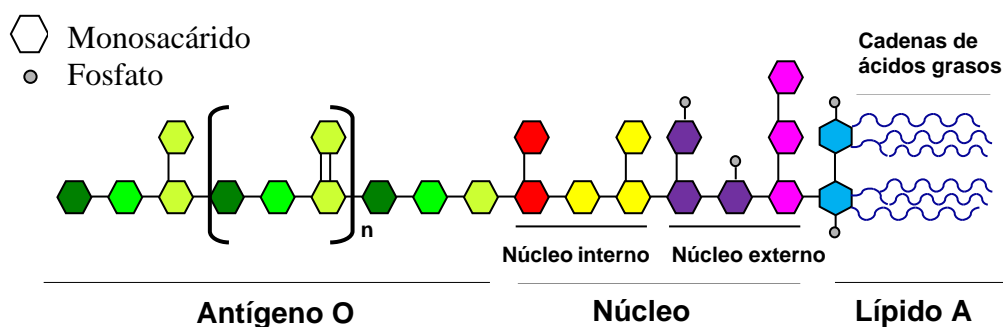


Figura 9: Estructura química del lipopolisacárido. Figura modificada de (Pupo *et al.*, 2009)

El lípido A es el anclaje hidrofóbico a la membrana celular y puede estar compuesto por una gran variedad de sacarolípidos y ácidos grasos involucrados en la resistencia a los péptidos antimicrobianos. Es el responsable de la toxicidad de la molécula y sus variaciones pueden ayudar a los patógenos Gram negativos a evadir la respuesta inmunitaria innata (Llobet *et al.*, 2015).

El núcleo hidrofílico formado por varios azúcares facilita el sitio de unión al antígeno O. Y el antígeno O, también hidrofílico, es un complejo polisacárido variable compuesto de polímeros de oligosacáridos repetidos que se encuentra expuesto en la superficie bacteriana.

El antígeno O es el principal factor de resistencia al complemento y de defensa frente a la fagocitosis. Sin embargo, la expresión de la cápsula es imprescindible para la resistencia al complemento siendo menos importante la composición química del polisacárido capsular (tipo K) (Álvarez *et al.*, 2000; Shankar-Sinha *et al.*, 2004). En la parte externa del LPS se encuentra localizado el gen *uge* relacionado con la codificación de uridina que ayuda a la colonización bacteriana y a la virulencia (Regué *et al.*, 2004).

Los azúcares que componen el antígeno O, su secuencia y la forma de unirse determinan la especificidad del serotipo O de las diferentes cepas. En contraste al elevado número de antígenos capsulares, sólo se han descrito 9 antígenos O, incluyendo los serotipos O1, O2 (también llamado O2ab), O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12 (Vinogradov *et al.*, 2002).

En *K. pneumoniae*, el antígeno O1 es el más prevalente y está formado por unidades D-galactano I y D-galactano II repetidas. Tiene un papel determinante en la integridad y la permeabilidad de la membrana externa, en el transporte de moléculas a través de la membrana y en la patogénesis jugando un papel importante en la interacción de la bacteria con el sistema inmune (March *et al.*, 2013).

6.2. Adhesinas

Las bacterias producen múltiples adhesinas que ayudan al microorganismo a adherirse a las células del huésped, lo que es crítico para la infección. Para la adhesión, *K. pneumoniae* presenta fimbrias que mayoritariamente pueden ser de dos tipos predominantes: el tipo 1 (manosa sensible) y el tipo 3 (manosa resistente) (Podschun *et al.*, 1998).

6.2.1. Fimbrias tipo 1

Las fimbrias de tipo 1 son más gruesas (de 5 a 7 nm de diámetro), rígidas, producen canales y su propiedad adhesiva está mediada por la adhesina *fimH*, localizada en el final de las fimbrias.

El tipo 1 está asociado con la patogénesis de las infecciones del tracto urogenitario y del tracto respiratorio, adhiriéndose a las células tubulares proximales y las células ciliadas de la tráquea afectando a la colonización. Favorecen la proliferación de patógenos que puede causar neumonía, principalmente en pacientes con ventilación mecánica (Podschun *et al.*, 1998).

El *cluster fim* está formado además de por la adhesina *fimH* de otros genes. *fimA*: codifica la subunidad mayor de la fimbria; *fimF*, *fimG* y *fimH*: codifican la subunidad menor (homólogos de *fimC* y *fimD* de *E. coli*); *fimI*: esencial para la biosíntesis en *E. coli*; y por último el gen *finK*: involucrado en la regulación de la

expresión de la fimbria, únicamente se halla en *K. pneumoniae* (Struve *et al.*, 2008).

La adhesina *fimH* reconoce estructuras que contienen manosa presentes en las células del huésped o en la matriz extracelular. Esto favorece que la bacteria se adhiera y colonice el epitelio del tracto urogenitario sobretodo.

6.2.2. Fimbrias tipo 3

Las fimbrias de tipo 3 son más delgadas (de 2 a 5 nm de diámetro), de 0,5 a 2 μm de longitud y no forman canales aunque parecen tener una morfología curvada debida a su flexibilidad. Intervienen en la adherencia basolateral a las células endoteliales y los epitelios del tracto respiratorio y urinario, y favorecen la adhesión a la superficie del hígado, pulmones y vejiga. Presentan una composición aminoacídica, morfología, serología y composición química diferente de las fimbrias de tipo 1 (Podschun *et al.*, 1998; Di *et al.*, 2003).

El operón *mrk* codifica una adhesina de tipo fimbria tipo 3 y facilita la unión a la matriz extracelular. Está compuesto por seis genes requeridos para la expresión de las fimbrias de tipo 3. *mrkA*: codifica la subunidad mayor de la fimbria (desempeñan un papel importante en la formación de biopelícula en *K. pneumoniae* sobretodo en infecciones nosocomiales); *mrkB*, *mrkC* y *mrkE*: ensamble de la fimbria y regulación de la expresión de la fimbria; *mrkD*: codifica la adhesina responsable de la hemaglutinación y resistencia a manosa y *mrkF*: mantiene la estabilidad de la fimbria en la superficie celular (Allen *et al.*, 1991).

6.3. Formación de biopelícula

Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales o como una población multicelular con una elevada organización y recubiertas por una matriz polimérica que favorece su asociación con las superficies biológicas y no biológicas. La formación de biopelícula representa un modo de protección que permite a las células sobrevivir en medios y circunstancias hostiles. Dentro de las comunidades de la biopelícula se pueden distinguir células planctónicas (crecen como una única célula suspendida) y células sésiles (en algunas circunstancias las células planctónicas se vuelven estructuras estacionarias unidas a las superficies) (Stoodley *et al.*, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004)

La formación de la biopelícula la podemos dividir en 5 etapas secuenciales (Figura 10):

- 1.) La bacteria en forma planctónica se adhiere inicialmente a la superficie.
- 2.) Una vez adherida la bacteria comienza a dividirse y a formar una microcolonia.
- 3.) La biopelícula va madurando acumulando en multicapas las células sésiles.
- 4.) La bacteria secreta sustancias como exopolisacáridos que constituyen la matriz polimérica que le proporciona a la biopelícula la cohesión y la estructura necesarias para la correcta formación de la comunidad. La estructura formada tiene forma de setas y presenta canales entre ellas.
- 5.) El paso final es la desunión de la superficie y la dispersión de la bacteria que vuelve a estar en su forma planctónica preparada para colonizar una nueva superficie.

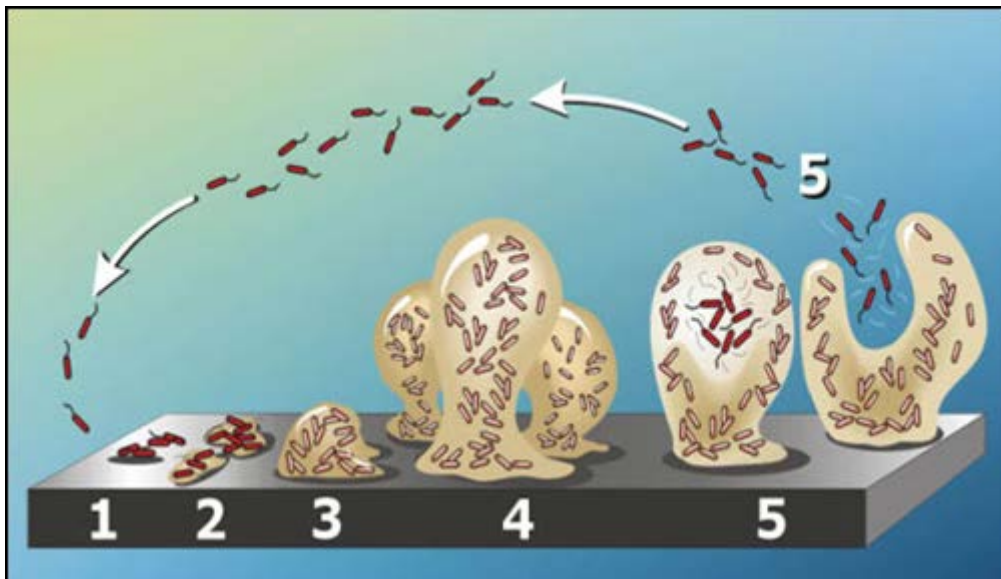


Figura 10: Diagrama de las 5 etapas de la formación de la biopelícula (Stoodley *et al.*, 2002)

La composición de la matriz extracelular es compleja y varía entre especies bacterianas. Puede tener una composición heterogénea (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos), incluso entre cepas de la misma bacteria sometidas a diferentes condiciones ambientales. Aunque normalmente se asocian las biopelículas bacterianas con procesos infecciosos, es necesario señalar que algunas biopelículas tienen diferentes funciones: adhesión, cohesión, absorción, retención de agua, barrera protectora, actividad enzimática, fuente de nutrientes, intercambio de información genética, regulador de energía... (Stoodley *et al.*, 2002; Flemming *et al.*, 2010).

6.4. Sideróforos

El hierro es un elemento vital para el desarrollo bacteriano y a veces su disponibilidad puede ser limitada. Para solventar este problema *K. pneumoniae* produce los sideróforos, determinantes para la adquisición de hierro ya que se trata de quelantes que facilitan la obtención de hierro de la bacteria al unirse a las proteínas del hospedador. Algunos de los sideróforos de *K. pneumoniae*, clasificados según su composición química, son la enterobactina (*ent*), la aerobactina (*iucA*), la yersiniabactina (*ybtS*) u otros sideróforos como el codificado por *iutA* y el sistema de adquisición de hierro *kfu* (Brisse *et al.*, 2006; Compain *et al.*, 2014).

6.5. Resistencia al suero

La resistencia al suero es la habilidad de la bacteria de resistir frente al efecto bactericida del suero humano, lo que contribuye a la virulencia de la bacteria. Este mecanismo está mediado por la cascada del complemento tanto en la vía clásica como en la alternativa. Algunos de los componentes implicados en la resistencia al suero en *K. pneumoniae* son los antígenos capsulares, los lipopolisacáridos y algunas proteínas de membrana externa.

El CPS actúa enmascarando las moléculas de la superficie bacteriana capaces de activar la cascada del complemento evitando que en ellas se deposite el componente C3. Por otro lado, las cadenas O del LPS que no quedan cubiertas

por el CPS son expuestas en la superficie con un tamaño superior al habitual. Por ello, a la hora de depositarse el componente C3 queda demasiado lejos de la membrana bacteriana impidiéndose la activación de la cascada, no se formaría el complejo de ataque a la membrana. Dicho complejo de ataque está implicado en la formación del poro transmembrana que provocaría la lisis bacteriana debido a una variación osmótica (Podschun *et al.*, 1998; Izquierdo Lázaro, 2003).

6.6. Metabolismo del nitrógeno

K. pneumoniae es capaz de metabolizar urea como fuente de nitrógeno gracias a una ureasa citoplasmática que hidroliza la urea a amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco puede modificar la estabilidad tisular y juega un papel importante en la persistencia de algunos patógenos. La incapacidad de metabolizar la urea puede disminuir la capacidad de colonización y persistencia de la bacteria en medios donde la urea sea abundante como ocurre en el tracto digestivo (Burne *et al.*, 2000).

El operón de la ureasa en *K. pneumoniae* está formado por genes funcionales y genes accesorios requeridos para su activación y correcto funcionamiento. Entre los genes funcionales o estructurales encontramos el trímero formado por las unidades *ureA*, *ureB* y *ureC*.

La biogénesis de la ureasa funcional requiere la presencia y expresión de los genes accesorios *ureD*, *ureF*, *ureG* y *ureE* (Figura 11).

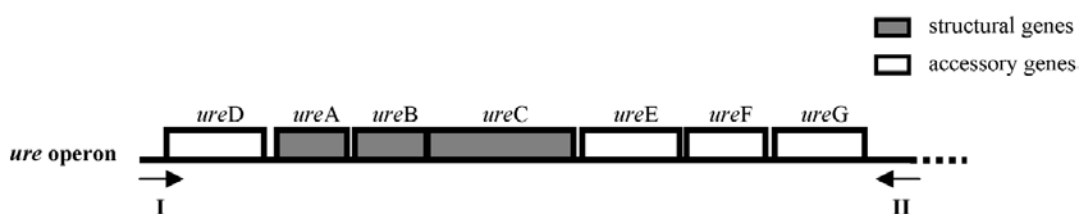


Figura 11: Organización genética del operón *ure* de *K. pneumoniae* con los genes estructurales y los genes accesorios que tienen un papel importante en la activación del enzima (Maroncle *et al.*, 2006)

La función de *ureE* es la de transportar el níquel mientras que la función del complejo *ureDFG* es la de configurar el trímero *ureABC* para que pueda aceptar el níquel. Es una activación de dos componentes sin los cuales no se regularía correctamente el operón de la ureasa en respuesta a la capacidad de hidrolizar la urea presente en el medio (Maroncle *et al.*, 2006).

Otra fuente de nitrógeno y carbono utilizada por *K. pneumoniae* es la alantoina muy relacionada con los abscesos hepáticos. El *cluster* de la alantoina está formado por tres genes estructurales (*allA*, *gcl* y *allD*), el gen *allR* que es un represor del regulón y el gen *allS* que codifica el activador del regulón del metabolismo de la alantoina que interactúa con el gen *allD* (Chou *et al.*, 2004).

6.7. Hipermucoviscosidad

Los cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* con serotipos relacionados con la elevada producción de polisacárido capsular, pueden afectar a personas sanas

y causar infecciones adquiridas en la comunidad como abscesos hepáticos piógenos, abscesos cerebrales, endoftalmitis y neumonía (Liu *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2014a).

Estas cepas hipervirulentas suelen presentar un fenotipo hipermucoviscoso que puede ser debido a la expresión de dos genes: gen A asociado a la mucoviscosidad (*magA*) y gen regulador del fenotipo mucoide A (*mpA*) (Fang *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). Dicho fenotipo hipermucoso se puede apreciar a simple vista realizando el test conocido como “*string test*”, mediante el cual obtendríamos un resultado positivo cuando se generara un hilo mucoso de más de 5 mm al tocar la colonia con un asa (Figura 12).

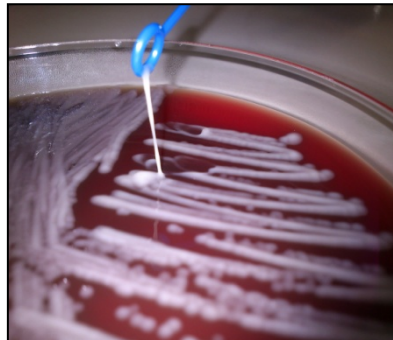


Figura 12: Fenotipo hipermucoviscoso de una cepa de *K. pneumoniae*

El gen *magA* está localizado en un *cluster* específico del serotipo capsular K1 mientras que *mpA* se puede encontrar tanto en el cromosoma como en un plásmido y es el encargado de regular la síntesis de polisacárido extracelular.

OBJETIVOS

OBJETIVO 1. Análisis de las características clínicas y microbiológicas de la bacteriemia causada por *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013).

1.1. Estudio de la epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por *K. pneumoniae* (2007- 2009).

1.2. Análisis de la bacteriemia causada por clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* (2007- 2013).

1.3. Caracterización de los mecanismos de virulencia de las cepas de *K. pneumoniae* que causa bacteriemia (2007- 2013).

OBJETIVO 2. Análisis de *K. pneumoniae* multirresistentes en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2012).

2.1. Caracterización de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-1} (2007-2009).

2.2. Epidemiología molecular de las infecciones por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-48} y *bla*_{CTX-M-15} (2010-2012).

METODOLOGÍA

MÉTODOS GENERALES

1. MICROORGANISMOS

1.1. Identificación de los aislamientos clínicos

Los aislamientos de *K. pneumoniae* procedentes de muestras clínicas durante el periodo de estudio se identificaron y se determinó su sensibilidad a los antibióticos por el método automatizado MicroScan® (Beckman Coulter). Estos aislamientos se criopreservaron en glicerol para futuros estudios.

Los datos demográficos de los pacientes y la sensibilidad antibiótica de los aislamientos de *K. pneumoniae* se recogieron en una base de datos.

1.2. Cepas de referencia

Como cepas de control se utilizaron las siguientes:

- Para los estudios de la sensibilidad antibiótica: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Para los estudios de transferencia de la resistencia: *E. coli* J53-2 resistente a rifampicina (> 100 µg/ml) como cepa receptora de plásmidos conjugativos.
- Para el estudio de la OXA-48:
 - *K. pneumoniae*: 7680 → OXA-48 (Pitart *et al.*, 2011)

- Para los estudios de plásmidos:
 - *E. coli* NCTC 50193 (CECT678): contiene los plásmidos de 54,38 kb, 7,30 kb, 5,56 kb, 5,14 kb, 3,98 kb, 3,08 kb, 2,71 kb y 2,06 kb.
 - *E. coli* NCTC 59192 (CECT679): contiene plásmidos de 154 kb, 66,2 kb, 37,6 kb y 7,4 kb.

2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

2.1. Método de microdilución

La identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica se realizó por el sistema MicroScan (Beckman Coulter) que combina diferentes pruebas bioquímicas y enzimáticas para la identificación de los microorganismos, junto con concentraciones críticas de antibióticos para determinar la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$) (CMI) de los distintos antibióticos frente a los microorganismos. La CMI por el método de microdilución se define como la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento visible de bacterias, cuando se utiliza un inóculo de 10^5 unidades formadoras de colonia/ml (ufc/ml). Se dispensan 0,1 ml de cultivo bacteriano en cada pocillo de una placa con diferentes concentraciones de los diversos antibióticos deshidratados (en forma de diluciones seriadas).

La lectura de los paneles se realizó a las 18 horas de incubación a 35°C , utilizando el sistema MicroScan (Beckman Coulter) (Tabla 4). Los antibióticos estudiados fueron: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina, ticarcilina, piperacilina/tazobactam, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, aztreonam, imipenem, ertapenem, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino y cotrimoxazol.

Se utilizaron los puntos de corte de sensibilidad y resistencia de EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad antibiótica.

Tabla 4: Rango de diluciones de los antimicrobianos utilizados en los paneles de MicroScan®

Antimicrobianos	Abreviaturas	Rango de diluciones (Panel NC53)	Rango de diluciones (Panel NC52)
Amikacina	Ak	8-32	-
Amoxicilina/ác. clavulánico	Aug	8/4-16/8	8/4-16/8
Ampicilina	Am	8-16	8-16
Aztreonam	Azt	1, 8-16	-
Cefazolina	Cfz	8-16	8-16
Cefepime	Cpe	1, 8-16	1, 8-16
Cefotaxima	Cft	1-32	1-32
Cefotaxima/CA	Cft/CA	0,5/4-1/4, 4/4	0,5/4-1/4, 4/4
Cefoxitina	Cfx	8-16	8-16
Ceftazidima	Caz	1, 4-16	1-16
Ceftazidima/CA	Caz/CA	0,25/4, 2/4	0,25/4-0,5/4, 2/4
Cefuroxima	Crn	4-16	4-16
Cefalotina	Cf	8-16	8-16
Ciprofloxacino	Cp	0,5-2	0,5-2
Ertapenem	Etp	0,5-4	1
Fosfomicina	Fos	-	16-64
Gentamicina	Gm	2-8	-
Imipenem	Imp	1-8	1-8
Ácido nalidíxico	NA	16	16
Nitrofurantoina	Fd	-	32-64
Norfloxacino	Nxn	-	0,5-1, 4-8
Piperacilina/Tazobactam	P/T	8-16, 64	8-16, 64
Tigeciclina	Tgc	1-2	-
Tobramicina	To	2-8	2-8
Trimetoprim/Sulfametoxazol	T/S	2/38	2/38-4/76

2.2. Método de E-test

Este es un método de difusión cuantitativo que utiliza unas tiras comerciales impregnadas con concentraciones decrecientes de antibiótico lo que permite conocer la CMI exacta del microorganismo por difusión, ya que la tira tiene, además de las concentraciones seriadas dobles que se utilizan convencionalmente, concentraciones intermedias entre estas.

Se utilizó un inóculo ajustado a 0,5 de la escala McFarland ($\approx 10^8$ ufc/ml), se sembró en una placa de agar Mueller-Hinton (BD) y una vez seca, se colocaron las diferentes tiras de E-test (AB Biodisk). La lectura se realizó tras incubar la placa en atmósfera aerobia durante 18 horas a 37°C. La CMI se leyó en el punto de intersección del halo de inhibición con la tira de E-test.

2.3. Método de difusión con disco para detección de BLEEs

La sensibilidad a los antibióticos por el método de disco-difusión se realizó en todos los aislamientos con el perfil de resistencia BLEE, según las recomendaciones del EUCAST. Se sembró un inóculo ajustado a 0,5 de la escala McFarland ($\approx 10^8$ u.f.c./ml) en una placa de agar Mueller-Hinton (BD) sobre la que se colocaron los discos de antibióticos: amoxicilina/ácido clavulánico, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, cefoxitina, cefepime e imipenem, con carga estándar. Se incubó la placa en atmósfera aeróbica 18 horas a 37°C y se leyeron los halos de inhibición de los diferentes antibióticos. La ampliación del halo entre las cefalosporinas y el ác. clavulánico (sinergia) sugiere la presencia de una BLEE.

Tabla 5: Carga estándar de los discos de antibióticos utilizados para método de disco-difusión.

Antimicrobianos	Abreviaturas	Carga estándar de los discos de antibióticos
Ampicilina	AMP1	(10 µg)
Cefalotina	CEFA	(30 µg)
Cefoxitina	CFX	(30 µg)
Cefuroxima	CFU2	(30 µg)
Ticarcilina	TIC1	(75 µg)
Amoxicilina/ác. clavulánico	AMC1	(20/10 µg)
Cefotaxima	CTX1	(30 µg)
Ceftacidima	CTZ	(30 µg)
Aztreonam	AZT	(30 µg)
Gentamicina	GENT	(10 µg)
Tobramicina	TOBR	(10 µg)
Amikacina	AMIK	(10 µg)
Ciprofloxacino	CIP	(5 µg)
Imipenem	IMI	(10 µg)
Norfloxacin	NOR	(10 µg)
Ác. pipemidico	PMD	(75 µg)
Cotrimoxazol	COTR	(1,25/23,75 µg)
Nitrofurantoina	NITR	(300µg)
Fosfomicina	FOSF	(200 µg)

2.4. Test de Hodge para la detección de carbapenemasas

Es un método de detección fenotípica de carbapenemasas que se basa en detectar la actividad hidrolítica del aislado bacteriano frente a imipenem. Se realizó a las cepas de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a carbapenémicos y/o piperacilina/tazobactam.

El test de Hodge modificado es una prueba sensible pero poco específica para detectar carbapenemasas de las clases A y D y es poco sensible para detectar carbapenemasas de la clase B (metalo- β -lactamasas).

Se inoculó por inundación una placa de agar Mueller-Hinton con una suspensión de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 ajustada a 0,5 de la escala de McFarland. Una vez seca, se depositó en el centro de la placa un disco de imipenem o meropenem. A continuación se realizó una estría desde la periferia de la placa hasta el disco con las cepas de *K. pneumoniae* que se quiere probar la producción de carbapenemasas. Además se incluyen cepas control con (control positivo) y sin (control negativo) actividad carbapenemasa. Las placas se incubaron en atmósfera aerobia durante 18-24 horas a 35°C +/- 2°C.

La producción de carbapenemasa de la cepa de *K. pneumoniae* permite el crecimiento de la cepa sensible a carbapenémicos (*E. coli* ATCC 25922). El resultado positivo es una distorsión del halo de inhibición con forma de hoja de trébol característica. El test es negativo cuando no se muestra distorsión en el halo de inhibición del antibiótico (Figura 13).

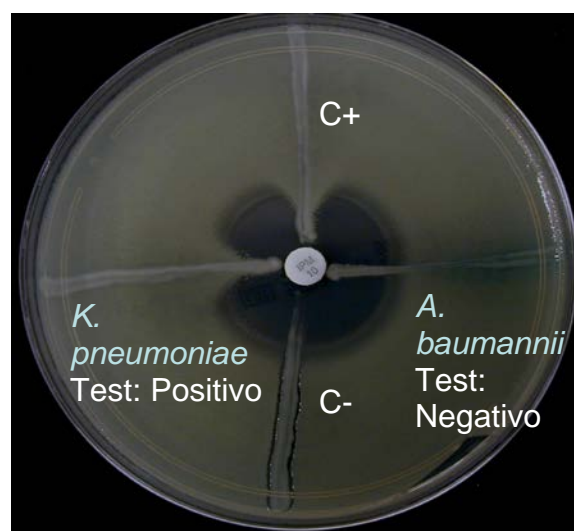


Figura 13: Test de Hodge

2.5. Determinación de la inhibición de la acción carbapenémica por distintos compuestos

La determinación de la actividad inhibitoria (sinergia) de la hidrólisis de los carbapenémicos, del ácido clavulánico o el EDTA se realizó por el método de difusión en agar. Se usan discos de amoxicilina/ác. clavulánico e imipenem y/o meropenem en el caso de las carbapenemasas de clase A y de clase D o discos impregnados con EDTA e imipenem y/o ceftacídima en el caso de las carbapenemasas de clase B.

El efecto sinérgico (ampliación del halo) entre el imipenem y el EDTA sugiere la presencia de una carbapenemasa de clase B. Mientras que la sinergia entre el ác. clavulánico y el imipenem sugiere la presencia de una carbapenemasa de clase A o D.

3. TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.1. Procedimiento de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de varias copias de ADN utilizando unos cebadores específicos que permiten la amplificación específica de los genes. Los cebadores son secuencias cortas de ADN que se unirán a la secuencia a amplificar de la cadena molde de ADN.

La PCR se realiza en un termociclador que hace ciclos con diferentes tiempos y temperaturas que van aumentando y disminuyendo. El primer paso es la desnaturalización que consiste en la separación del ADN de la muestra en cadenas sencillas. A continuación se produce la hibridación de los cebadores seleccionados a las regiones específicas del ADN. Por último se realiza la elongación o extensión de los cebadores sobre las secuencias de ADN de la muestra. El producto de la PCR va amplificándose con cada ciclo y cada nuevo segmento de ADN copiado sirve de molde para el siguiente ciclo, lo que permite amplificar el ADN en forma exponencial.

3.2. Amplificación del ADN

3.2.1. Obtención del ADN para PCRs

La extracción de ADN se realizó también a partir de cultivo bacteriano reciente. Se resuspendió una colonia en 100 µl de tampón ST [6 mM Tris-HCl (pH 8), 1 M NaCl, 0,1 M EDTA (pH 8), 0,2% Desoxicolato sódico, 0,5% N-laurilsarcosinato sódico] y que contenía 1 µg/ml de lisozima. Se incubó a 37°C durante 60 minutos y a 95°C durante 5 minutos. A continuación 5 µl del lisado bacteriano se diluyó en 495 µl de TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)]

Otro método utilizado para la obtención del ADN molde se realizó fundiendo durante 15 minutos a 70°C un disco preparado según lo descrito en el apartado 3.1.

3.2.2 Reacción de PCR y condiciones de amplificación

Se realiza la PCR utilizando la preparación de la mix que se indica a continuación:

- | | |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| ➤ 5x Tampón 2,0 mM (contiene MgCl ₂ y dNTPs) | 10 µl |
| ➤ Cebador (stock 50 µM) | 0,4 µl de cada uno |
| ➤ <i>MyTaq</i> polimerasa (1-5 unidades, ECOGEN) | 0,3 µl |
| ➤ Agua | Ajustar a volumen final 50 µl |
| ➤ ADN | 2 µl |

Las condiciones de amplificación se mantienen para todas las PCRs aunque varían los ciclos de amplificación y las temperaturas de hibridación según los cebadores utilizados.

Inicialización	95 °C x 1´	
Desnaturalización	95 °C x 15´´	
Hibridación	T^a específica de cada cebador x 15´´	} 30/35 ciclos
Extensión	72 °C x 1´	
Extensión final	72 °C x 10´	
Conservación	4 °C ∞	

3.3. Visualización de los productos de PCR

Tras la PCR se prepararon geles de agarosa al 1% en tris-ácido bórico-EDTA (TBE) a los que se añadió SYBR® Safe (Thermofisher, LIFE TECHNOLOGIES S.A.). Se realizaron las electroforesis durante 45 minutos a 120 voltios y se fotografiaron las imágenes.

4. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

4.1. Análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado

4.1.1. Extracción del ADN cromosómico

Se realizó una suspensión bacteriana homogénea con unas colonias del cultivo reciente en agar sangre en 200 µl del tampón PIV [0,01 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM NaCl]. Se leyó la densidad óptica (DO_{620}) de la suspensión y se ajustó con la siguiente ecuación: $[Vol_{dil} = (DO_{620} \times 40 \times 210) - 210]$.

La suspensión obtenida se mezcló a partes iguales con una suspensión de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% en tampón PIV.

Se prepararon bloques de agarosa de 20 µl conteniendo las células bacterianas. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 5 horas en 1 ml una solución de lisis (Tris-HCl 6 mM pH 8, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M pH 8, desoxicolato sódico 0,2% y N-laurilsarcosinato sódico 0,5%), que contenía lisozima (0,2 µg/ml), RNAsa (0,25 µg/ml) y Bridj (0,25% de Bridj-58).

A continuación los bloques de agarosa se trataron durante 18 horas a 50°C con 1 ml de una solución (EDTA 0,5 M pH 9 y N-laurilsarcosinato sódico 1%) que contenía proteinasa-K (1 mg/ml). Finalmente los bloques se lavaron cada 30 minutos 4 veces en 3 ml de tampón TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM).

4.1.2. Digestión del ADN y electroforesis en campo pulsado (ECP)

El ADN cromosómico fue digerido utilizando 40 unidades de la enzima de restricción *Xba*I (NewEngland-Biolabs) según las condiciones establecidas por el fabricante. La electroforesis se realizó mediante el sistema CHEF-DR II (Bio-Rad) de ECP. Se utilizaron geles de agarosa (Seakem LE, FMC Bioproducts) al 1% en tampón 0,5x TBE (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico, 0,2 mM EDTA; pH 8,5). La electroforesis se llevó a cabo en 0,5x TBE durante 18 horas a 14°C. Los pulsos fueron distribuidos linealmente de 1 a 30 segundos, con un voltaje mantenido de 6 v/cm.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante media hora y se fotografiaron con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

La interpretación de los patrones de bandas se hizo siguiendo criterios preestablecidos (Tenover *et al.*, 1995). Se consideraron genotipos distintos los que presentaban diferencias en más de tres bandas, y se les asignaron las letras Kp seguido de un número: Kp1, Kp2,... Cuando las diferencias observadas fueron de 3 o menos bandas se consideraron subtipos genéticamente relacionados y se identificaron mediante la adición de un índice numérico (Kp1.1, Kp1.2...).

4.2. Multilocus sequence typing (MLST)

La identidad de los patrones de ECP mayoritarios con los clones internacionales se realizó mediante el MLST, que en *K. pneumoniae* utiliza 7 genes metabólicos.

Se realizó la amplificación por PCR (según lo descrito en el apartado 3.1) de los 7 genes metabólicos utilizando la metodología descrita en <http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación de los 7 genes metabólicos utilizados en el MLST

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
<i>rpoB</i>	rpoB-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCCGAAATGGCWGAGAACCA 3'	501 bp
	rpoB-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC 3'	
<i>gapA</i>	gapA-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG 3'	450 bp
	gapA-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT 3'	
<i>mdh</i>	mdh-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTTCAG 3'	477 bp
	mdh-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCAGCAGCAG 3'	
<i>pgi</i>	pgi-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC 3'	432 bp
	pgi-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT 3'	
<i>phoE</i>	phoE-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG 3'	420 bp
	phoE-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT 3'	
<i>infB</i>	infB-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAGTCTGCTGGACTATATTCG 3'	318 bp
	infB-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC 3'	
<i>tonB</i>	tonB-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAGTCTGCTGGACTATATTCG 3'	414 bp
	tonB-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGCTGRGCRGAGAG 3'	

Los amplificados se purificaron utilizando el kit comercial (*Qiaquick PCR purification kit*, Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron con el sistema de nucleótidos terminadores “*Rhodamine Terminator Cycle Sequencing*” (*Big dye terminator v3.1*,

Applied Biosystems), utilizando un servicio externo de secuenciación (<https://dna.macrogen.com/eng/index.jsp>).

Las secuencias obtenidas se editaron y se analizaron (*forward* y *reverse*) con el programa SeqScape (Applied Biosystems). Las secuencias consenso obtenidas se compararon con las depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

La asignación de alelos y de secuenciotipo (ST), que es un número arbitrario asignado a cada combinación de alelos, se realizó utilizando la base de datos del Instituto Pasteur:

(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>).

Se definieron como *cluster* aquellos STs que agrupaban 3 o más aislamientos.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores universales utilizados para la secuenciación del MLST de *K. pneumoniae*

Nombre cebador	Secuencia
seq-F	5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA 3'
seq-R	5' TTGTGAGCGGATAACAATTC 3'

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

La caracterización de las BLEE en los aislamientos de *K. pneumoniae* se realizó mediante la amplificación de los genes que codifican BLEEs por PCR, la transferencia de la resistencia por conjugación y la secuenciación de los productos de PCR.

5.1. Detección por PCR de los genes que codifican β -lactamasas

Se utilizó una PCR con múltiples dianas para detectar los genes específicos de las familias de las β -lactamasa (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}) y *bla*_{OXA} (Tabla 8).

Tabla 8. Cebadores para la detección de familia de β -lactamasa (Fang *et al.*, 2008)

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	5' CTTTATCGGCCCTCACTCAA3'	273 bp
	SHV-R	5' AGGTGCTCATCATGGGAAAG3'	
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	5' CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA3'	445 bp
	TEM-R	5' ACGCTCACCCGCTCCAGATTTAT3'	
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	5' ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC3'	593 bp
	CTX-M-R	5' TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG3'	
<i>bla</i> _{OXA}	OXA-F	5' ACACAATACATATCAACTTCGC3'	813 bp
	OXA-R	5' AGTGTGTTTAGAATGGTGATC3'	

5.2. Transferencia de la resistencia por conjugación

Se utilizó el método de conjugación en medio líquido. Como receptor se utilizó la cepa de *E. coli* J53-2 resistente a rifampicina (CMI > 100 µg/ml).

Se inocularon las cepas donante (*K. pneumoniae* multirresistente) y receptora (*E. coli* J53-2), por separado, en dos tubos independientes con caldo Luria Bertani (LB) (Difco). Se incubaron con agitación, durante 4 horas a 37°C, para obtener una fase de crecimiento exponencial con una máxima expresión de *pili*. A continuación, se preparó la mezcla de conjugación: en un recipiente se pusieron 6 ml de LB atemperado a 37°C y se añadieron 500 µl del cultivo en fase exponencial de la cepa receptora y 100 µl del cultivo en fase exponencial de la cepa donante.

Se incubaron a 37°C durante 4 horas sin agitación. Se realizaron subcultivos en placas de Mueller-Hinton con rifampicina (100µg/ml) para el control de crecimiento de la cepa receptora, placas de Mueller-Hinton con tobramicina (16 µg/ml) como control de crecimiento de la cepa donante y placas de Mueller-Hinton con rifampicina (100 µg/ml) y tobramicina (100 µg/ml) para seleccionar los transconjugantes. Los transconjugantes se identificaron y se realizó la sensibilidad antibiótica para comprobar la transferencia de la resistencia. Los mecanismos de resistencia de los transconjugantes se caracterizaron igual que en los aislados clínicos.

5.3. Secuenciación de los genes que codifican las β -lactamasas

La secuenciación de los genes que codifican las β -lactamasas se realizó a partir de los amplificadores obtenidos con los cebadores descritos previamente para la PCR-múltiple, tanto de los transconjugantes como de los aislamientos bacterianos.

Los amplificadores se purificaron utilizando el kit comercial (*Qiaquick PCR purification kit*, Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

La secuenciación se llevó a cabo con el sistema “*Rhodamine Terminator Cycle Sequencing*” (*Big dye terminator v3.1*, Applied Biosystems), utilizando un servicio externo de secuenciación (<https://dna.macrogen.com/eng/index.jsp>). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa SeqScape (Applied Biosystems). Las secuencias consenso obtenidas se comparan con las depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

MÉTODOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1. Estudio de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con bacteriemia en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013)

1.1. Epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por *K. pneumoniae* (2007-2009)

1.1.1. Cepas estudiadas

Se estudiaron 348 aislados de *K. pneumoniae* procedentes de 348 episodios de bacteriemia asociados en 335 pacientes atendidos en nuestro hospital desde enero de 2007 a diciembre de 2009. Se recogieron los datos demográficos, las características clínicas y los focos de infección de los pacientes.

1.1.2. Clasificación de los episodios de bacteriemia

Los episodios de bacteriemia se clasificaron en bacteriemia nosocomial (B-NOS), bacteriemia asociada a cuidados sanitarios (B-ACS) y bacteriemia adquirida en la comunidad (B-AC) (Friedman *et al.*, 2002).

B-NOS se denominó cuando un paciente tenía un hemocultivo positivo, transcurridas como mínimo 48 horas desde su ingreso hospitalario.

B-ACS se definió cuando un paciente tenía un hemocultivo positivo en el momento de su ingreso hospitalario o en las siguientes 48 horas y cumplía alguno de los siguientes requisitos:

- 1.) Haber recibido tratamiento intravenoso en casa o haber tenido cuidados sanitarios durante el mes previo a la bacteriemia.
- 2.) Haber sido sometido a hemodiálisis o haber recibido quimioterapia intravenosa durante el mes previo a la bacteriemia.
- 3.) Haber estado hospitalizado 2 o más días en los 3 meses previos a la bacteriemia.
- 4.) Estar ingresado en un centro socio-sanitario.

Cuando no se cumplía ninguno de estos requisitos, pero un paciente tenía un hemocultivo positivo en el momento de su ingreso hospitalario o en las primeras 48 horas del ingreso se definió como B-AC.

1.1.3. Caracterización y tipificación molecular de los episodios de bacteriemia

La sensibilidad antibiótica se determinó mediante la microdilución. El perfil de multirresistencia y la detección de la producción de BLEE se analizaron mediante el método de disco difusión. A todos los aislamientos disponibles se les realizó el tipado molecular por ECP y al menos un aislamiento de cada perfil de ECP se seleccionó para tipificación por MLST. Las cepas productoras de BLEE se caracterizaron con la PCR múltiple con la cual se detectan las familias de β -lactamasas *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{OXA}.

1.2. Análisis de la prevalencia de clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* como causa de bacteriemia

1.2.1. Cepas estudiadas

Se estudiaron 878 (89,3%) aislamientos disponibles de los 983 episodios de bacteriemia causados por *K. pneumoniae* en 880 pacientes en el periodo 2007- 2013.

1.2.2. Caracterización y tipificación molecular de los aislamientos

Se estudió la sensibilidad antibiótica por el método de microdilución. La identificación del fenotipo hipermucoviscoso se llevó a cabo según el test del hilo. El test del hilo consiste en obtener un hilo de más de 5 mm de longitud cuando se toca con un asa la colonia crecida en una placa de agar sangre.

La tipificación molecular de los aislamientos se llevó a cabo por MLST. La caracterización molecular incluyó la detección por PCR de los genes del fenotipo hipermucoviscoso, *magA* y *rmpA*. La variante *rmpA2* del gen *rmpA* se estudió en los aislamientos que presentaban el fenotipo hipermucoviscoso (Lee *et al.*, 2010).

1.2.3. Estudio de las características clínicas

Se estudiaron y compararon las características clínicas, demográficas y la mortalidad de los pacientes con bacteriemia causada por cepas hipervirulentas, por cepas hipermucoviscosas no hipervirulentas y por cepas no hipermucoviscosas.

Además, se realizó el serotipado mediante la secuenciación del gen *wzi* del operón capsular K (Tabla 9).

Tabla 9. Cebadores para el estudio de los genes de virulencia responsables del fenotipo hipermucoviscoso y serotipado (Fang *et al.*, 2004; Brisse *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Brisse *et al.*, 2013).

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
<i>magA</i>	magA-F	5' GGTGCTCTTTACATCATTGC3'	1280 bp
	magA-R	5' GCAATGGCCATTTGCGTTAG3'	
<i>rmpA</i>	rmpA-F	5' ACTGGGCTACCTCTGCTTCA3'	535 bp
	rmpA-R	5' CTTGCATGAGCCATCTTTCA3'	
<i>rmpA2</i>	rmpA2-F	5' CTTTATGTGCAATAAGGATGTT3'	636 bp
	rmpA2-R	5' CCTCCTGGAGAGTAAGCATT3'	
<i>wzi</i>	wzi-F	5' GTGCCGCGAGCGCTTTCTATCTTGGTATTCC3'	580 bp
	wzi-R	5' GAGAGCCACTGGTTCCAGAA[C/T]TT[C/G]ACCGC3'	

En las cepas identificadas como serotipo K1 y K2 mediante secuenciación de *wzi* se realizó una PCR específica para estos dos serotipos según la metodología descrita previamente, [K1: cebadores *magA* (Fang *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2010) y K2 (Turton *et al.*, 2008)].

Tabla 10. Cebadores utilizados para la identificación del serotipo K2

Serotipo	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
<i>K2</i>	K2-wzy-F	5' GACCCGATATTCATACTTGACAGAG 3'	641 bp
	K2-wzy-R	5' CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC 3'	

1.3. Mecanismos de virulencia de *K. pneumoniae* que causa bacteriemia

1.3.1. Cepas estudiadas

Se seleccionaron 38 aislamientos con fenotipo hiper mucoviscoso (apartado 1.2) y 7 con fenotipo no hiper mucoviscoso (apartado 1.1) para el estudio de los mecanismos de virulencia.

1.3.2 Test de hiper mucoviscosidad

Los niveles de mucoviscosidad se determinaron en cepas crecidas en 1ml de Luria-Bertani (LB) a 37°C durante 18 horas. Se centrifugaron 5 minutos a 1.000 g y se midió la absorbancia a 600 nm. Se comparó la velocidad de precipitación de las cepas observando la turbidez del medio tras la centrifugación: la presencia de un sedimento compacto en el fondo del *ependorf* indica menor hiper mucoviscosidad mientras que un sedimento difuso representa una mayor hiper mucoviscosidad, como se muestra en la figura 14 (Wu *et al.*, 2011).

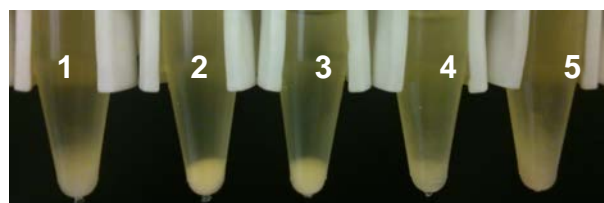


Figura 14. Observación del sedimento obtenido con el test de hiper mucoviscosidad.

***Eppendorfs* 1, 4 y 5:** sedimento difuso, mayor hiper mucoviscosidad

***Eppendorfs* 2 y 3:** sedimento compacto, menor hiper mucoviscosidad

1.3.3. Formación de biopelícula aire-líquido o biopelícula (ALI)

La formación de la biopelícula ALI se estudió en tubos de poliestireno de 5 mm de diámetro. El cultivo bacteriano a partir de una colonia completamente resuspendida en 2 ml de caldo de infusión cerebro corazón (*Brain Heart infusion*, BHI) se incubó en reposo durante 72 horas a 37°C. La formación de biopelícula ALI se consideró positiva cuando se observó una película gruesa cubriendo completamente la superficie aire-líquido.

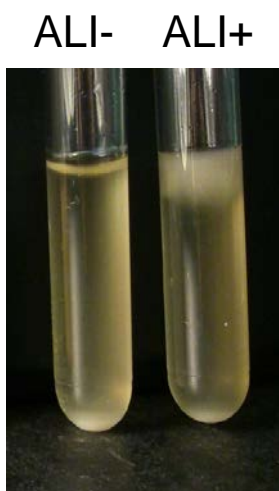


Figura 15. Observación de la formación de la biopelícula ALI

1.3.4. Formación de biopelícula sólido-líquido (SLI)

La formación de biopelícula SLI se estudió en placas de 96 pocillos (Puig *et al.*, 2014). Se partió de un cultivo de 18 horas en 1ml de BHI a 37°C. Se ajustó la absorbancia (DO_{600}) a 0,01 en 150 μ l y se incubó aproximadamente 24 horas a 37°C. Se determinó la absorbancia antes del inicio de la formación de la biopelícula para verificar un correcto crecimiento bacteriano. Una vez pasado el tiempo de

incubación (18 horas) se retiró el caldo de cultivo y se lavó la placa con agua destilada tres veces. La biopelícula SLI se tiñó con 150 μ l de cristal violeta al 0,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la placa con agua destilada tres veces para eliminar trazas de biopelícula que no estén pegadas a la superficie del pocillo. Por último, se disolvió el cristal violeta que tiñó la biopelícula adherida con la ayuda de etanol al 90% y se midió su absorbancia a 570nm.

La formación de una biopelícula SLI se consideró positiva cuando el valor de la absorbancia de un pocillo triplicaba el valor del control negativo (aproximadamente $DO_{570} \leq 0,2$). Se consideró formación de biopelícula SLI fuerte cuando la DO_{570} era $>0,6$, intermedia con $DO_{570} \leq 0,6$ y >2 y cualquier otro valor de $DO_{570} \leq 0,2$ se consideró como débil o negativa.

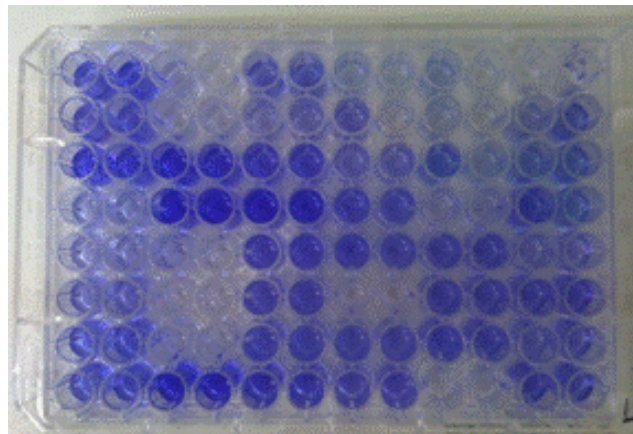


Figura 16. Tinción con cristal violeta de la biopelícula SLI

1.3.5. Adhesión bacteriana

La adhesión se estudió usando el método de aglutinación con las bolas paramagnéticas (*BioFilm Ring Test*®, *Biofilm Control*, Francia) (Chavant *et al.*, 2007). La suspensión bacteriana se mezcló con las bolas magnéticas y se incubó a 37°C durante 1, 3 y 5 horas. El índice de formación de biopelícula (BFI) se obtuvo con el software de *BioFilm Ring Test*®; los valores >7 corresponden a una ausencia total de adherencia bacteriana, mientras que valores <5 se asociaron con diferentes grados de adhesión bacteriana.

En una adhesión positiva, las fuerzas magnéticas de atracción no son capaces de retener las bolitas magnéticas y de atraerlas hacia el fondo del pocillo. De este modo se atenúa la intensidad de color y se observa una ruptura del punto marrón debido a la inserción de las bolitas magnéticas entre las bacterias en crecimiento que se están adhiriendo al fondo del pocillo.

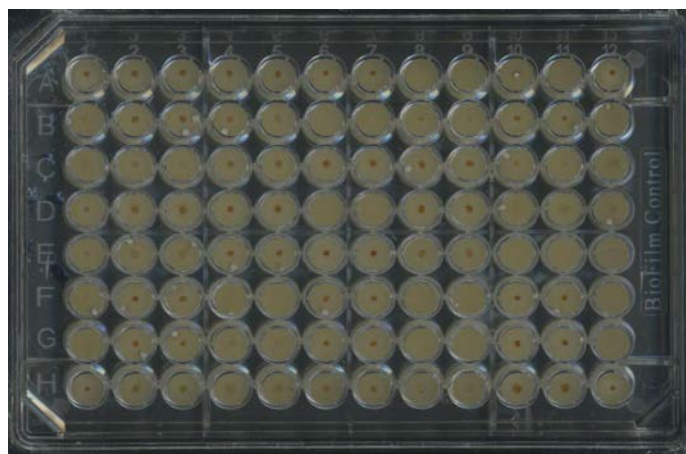


Figura 17. Adhesión medida en placa: *BioFilm Ring Test*®

1.3.6. Resistencia al suero

Se partió de un cultivo bacteriano en fase exponencial (15 ml BHI a 37°C en agitación durante 2 horas). Se ajustó la densidad óptica DO_{600} entre 0,5-0,6. Se centrifugaron y el sedimento se diluyó en la solución PBS-Hanks' Balanced Salt+Ca/Mg (HBSS).

La suspensión diluida se mezcló 1:3 vol/vol con suero humano normal (NHS) SIGMA-ALDRICH o con suero humano normal inactivado con calor (HI-NHS) y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Se sembraron diluciones seriadas del cultivo con NHS y con HI-NHS. El fenotipo de resistencia al suero se determinó dividiendo el número de ufc/ μ l en NHS por ufc/ μ l en HI-NHS.

OBJETIVO 2. Caracterización de *K. pneumoniae* multirresistentes en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013)

2.1 Caracterización de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-1}

2.1.1. Cepas estudiadas

Entre mayo de 2007 y diciembre de 2009, se detectaron 98 aislamientos de *K. pneumoniae* pertenecientes a 38 pacientes, con un patrón de ECP idéntico y pertenecientes al ST14. La relación genética de los aislamientos se estudió mediante ECP y MLST.

2.1.2. Estudio de la sensibilidad antibiótica

Se les estudió la sensibilidad antibiótica por el método de microdilución MicroScan (Beckman Coulter) y los 98 aislamientos presentaron resistencia a: amoxicilina/ác. clavulánico, piperacilina/tazobactam, tobramicina, amikacina y ciprofloxacino; y presentaban una sensibilidad reducida a cefepime.

Se realizó la técnica de la sinergia del doble disco y la presencia de BLEEs se confirmó con una PCR múltiple para identificar el tipo de BLEE. Las cepas identificadas como posibles productoras de OXA-1 por técnicas de microdilución o disco-difusión, se confirmaron mediante la técnica de la sinergia del doble disco. En

esta técnica de difusión en agar se disponen los discos de antibióticos a una distancia de 25-30 mm de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg).

2.1.3. Estudio de los integrones

La conjugación se realizó utilizando la cepa de *E. coli* J53-2 (CMI rifampicina ≥ 100 µg/ml) como receptora. Los transconjugantes se seleccionaron en placas que contenían rifampicina (100 µg/ml) y tobramicina (16 µg/ml). Se estudió la sensibilidad antibiótica de los transconjugantes mediante disco difusión y microdilución.

El estudio de integrones se realizó en los aislamientos de *K. pneumoniae* y sus transconjugantes utilizando las combinaciones de cebadores descritos en la tabla 11. El orden y el tamaño aproximado de los genes amplificados se representan en la figura 18.

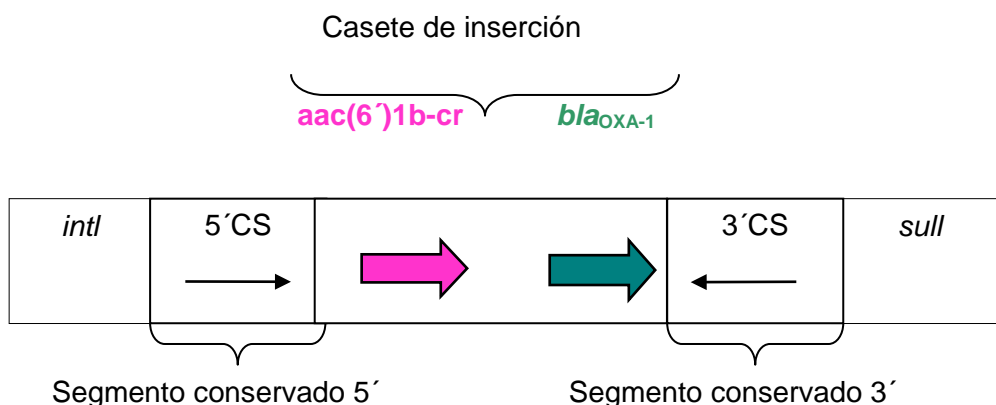


Figura 18. Estructura del integrón de clase I en *K. pneumoniae*- *bla_{OXA-1}*.

Tabla 11. Cebadores utilizados para el estudio de los integrones de clase I

(Lévesque *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 2006)

Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado (aproximado)
aac(6')-I-F	5'TAATTGCTGCATTCCGC3'	654 bp
aac(6')-I-R	5'TGTGACGGAATCGTTGC3'	
5'CS	5'GGCATCCAAGCAGCAAG3'	2 kb
3'CS	5'AAGCAGACTTGACCTGA3'	
intl1-F	5'GGTCAAGGATCTGGATTTCCG3'	Variable
intl1-R	5'ACATGCGTGTAATCATCGTC3'	
sull	5'TGAAGGTTTCGACAGCAC3'	Variable

Se les realizó la amplificación y la secuenciación de las regiones determinantes de resistencia a quinolonas de los genes *gyrA* y *parC* (Tabla 12).

Tabla 12. Cebadores utilizados para el estudio de la resistencia a quinolonas (Brisse *et al.*, 2001)

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
<i>parC</i>	parC-F	5'CTGAATGCCAGCGCCAAATT3'	319 pb
	parC-R	5'TGCGGTGGAATATCGGTCGC3'	
<i>gyrA</i>	gyrA-F	5'CGCGTACTATACGCCATGAACGTA3'	589 pb
	gyrA-R	5'ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG3'	

2.2. Caracterización molecular de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-48}

Se estudiaron 62 aislados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (KP-RC) y 23 aislamientos sensibles a carbapenémicos con el mismo patrón de ECP y MLST (KP-SC). Los aislamientos se obtuvieron de muestras clínicas de 42 pacientes atendidos en nuestro hospital desde octubre de 2010 a diciembre de 2012.

La sensibilidad antibiótica se realizó por el método de microdilución MicroScan (Beckman Coulter). La presencia de carbapenemasas se realizó por el test de Hodge y por la sinergia de doble disco entre carbapenémicos, amoxicilina/ác. clavulánico, EDTA y ácido borónico. La relación genética de los aislamientos se estudió mediante ECP y MLST.

Otro método para detectar la presencia de carbapenemasas es por la sinergia de los discos de carbapenémicos combinados con inhibidores. En la figura 19 se observa el efecto de sinergia cuando se combina el carbapenémico (meropenem, MRP 10) con inhibidores: meropenem con ácido fenilborónico (MR+BO), meropenem con ácido dipicolínico (MR+DP) y meropenem con cloxacilina (MR+CL).

<http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>

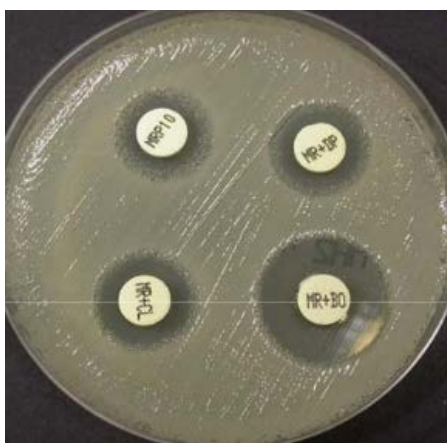


Figura 19: Confirmación de la producción de carbapenemasas.

Las siguientes carbapenemasas de clase A (KPC, IMI, NMC, GES), clase B o metalo-β-lactamasas (IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, GIM, SIM, SPM) y oxacilinasas (OXA-48) se detectaron por PCR. Además las cepas se estudiaron por PCR múltiple para detectar BLEEs (Tabla 13 a, b y c)

Tabla 13. Cebadores para el estudio de la resistencia a carbapenémicos (Queenan *et al.*, 2000; Radice *et al.*, 2004; Aubron *et al.*, 2005; Dallenne *et al.*, 2010)

a.) Carbapenemasas de clase A

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
NMC	NMC1	5' GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA3'	2158 pb
	NMC4	5' CGGTGATAAAATCACACTGAGCATA3'	
SME	IRS5	5' AGATAGTAAATTTTATAG3'	1138 pb
	IRS6	5' CTCTAACGCTAATAG3'	
IMI	IMI-F	5' ATAGCCATCCTTGTTTAGCTC3'	818 pb
	IMI-R	5' TCTGCGATTACTTTATCCTC3'	

KPC	MultiKPC-F	5' CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC3'	538 pb
	MultiKPC-R	5' ACGACGGCATAGTCATTTGC3'	
GES	GES-F	5' AGTCGGCTAGACCGGAAAG3'	399 pb
	GES-R	5' TTTGTCCGTGCTCAGGAT3'	

b.) Carbapenemasas de clase B (Yan *et al.*, 2001; Castanheira *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Nordmann *et al.*, 2011b)

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
IMP-2	IMP-2-F	5' GGCAGTCGCCCTAAAACAAA3'	737 pb
	IMP-2-R	5' TAGTACTTGGCTGTGATGG3'	
VIM-1	VIM-1-F	5' TTATGGAGCAGCAACCGATGT3'	920 pb
	VIM-1-R	5' CAAAAGTCCCGCTCCAACGA3'	
VIM-2	VIM-2-F	5' AAAGTTATGCCGCACTCACC3'	865 pb
	VIM-2-R	5' TGCAACTTCATGTTATGCCG3'	
SPM-1	SPM-1-F	5' CCTACAATCTAACGGCGACC3'	650 pb
	SPM-1-R	5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC3'	
NDM	NDM-F	5' GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC3'	621 pb
	NDM-R	5' CGGAATGGCTCATCACGATC3'	
GIM	GIM-1-F	5' AGAACCTTGACCGAACGCAG3'	748 pb
	GIM-1-R	5' ACTCATGACTCCTCACGAGG3'	
SIM	SIM-1-F	5' TACAAGGGATTTCGGCATCG3'	571 pb
	SIM-1-R	5' TAATGGCCTGTTCCCATGTG3'	

c.) Carbapenemasas de clase D (Dallenne *et al.*, 2010)

Gen	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado
OXA-48	MultiOXA48-F	5' GCTTGATCGCCCTCGATT3'	281 pb
	MultiOXA-48-R	5' GATTTGCTCCGTGGCCGAAA3'	

2.2.1. Análisis del ADN plasmídico

2.2.1.1. Extracción del plásmidos por columnas

La extracción del ADN plasmídico se realizó utilizando el sistema comercial de columnas de *GeneJET plasmid miniprep kit* (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante.

La separación del ADN extraído se realizó por electroforesis utilizando geles de agarosa al 0,7% en tampón 0,5x TBE durante 4 horas a 75 voltios. Como patrón de pesos moleculares se utilizó el ADN de las cepas control *Escherichia coli* NCTC 50193 (CECT678) y NCTC 59192 (CECT679), con un rango de tamaño de plásmidos entre 163,3 y 2 kb. La cepa 7680 de *K. pneumoniae* que contenía el plásmido con el gen *bla_{OXA-48}* fue usada como control positivo.

2.2.1.2. Estudio de plásmidos mediante ECP

Se preparan bloques de agarosa con células bacterianas para ECP con la metodología descrita previamente utilizando una mayor concentración bacteriana (1 McFarland). La digestión se realiza con 1 unidad de la nucleasa S1 durante 45 minutos a 37 °C, en 1 ml de una solución de 20 mM Tris-HCL (pH 7,5), 0,1 mM ZnCl₂, 50 mM NaCl y 50% glicerol (Barton *et al.*, 1995).

La electroforesis se llevó a cabo en 0,5x TBE durante 20 horas a 14°C. Los pulsos fueron distribuidos linealmente de 5 a 20 segundos.

2.2.1.3. Transferencia e hibridación con sonda de familia OXA-48

Para localizar el gen *bla*_{OXA-48} se transfirieron los geles de ECP a una membrana de nailon mediante la técnica Southern Blot y se hibridaron con una sonda de OXA-48 marcada con dUTP-digoxigenina.

El gel de agarosa de ECP fue tratado con una solución de HCl 1M durante 20 minutos (despurinación). Después se trató con una solución compuesta por NaOH 2 M y NaCl 5 M durante 20 minutos más (desnaturalización). Para finalizar con un tratamiento durante 20 minutos con una solución neutralizante (TRIS 1 M pH7 y NaCl 5 M).

La transferencia de los plásmidos separados en el gel de ECP a una membrana de nailon se realizó por capilaridad utilizando la solución de transferencia (20x SSC: NaCl 0,3 M y citrato sódico 0,3 M pH 7) que se dejó actuar toda la noche a temperatura ambiente. La fijación del ADN a la membrana se realizó mediante exposición a luz UV durante 4 minutos.

2.2.1.4. Preparación del ADN para la sonda de OXA-48

Se utilizó como sonda un fragmento de 281 pb obtenido por PCR de la cepa patrón 7680 utilizando nucleótidos marcados (dATP, dGTP, dCTP: 0,2 mmol/l de cada uno; dUTP-digoxigenina: 0,07 mmol/l; dTTP: 0,13 mmol/l) y los cebadores (MultiOXA48-F/R). El marcaje de la sonda se comprobó aplicando concentraciones seriadas en una membrana de nailon, revelándose según el procedimiento de hibridación. Los puntos de color se compararon con muestras patrón de concentración conocida.

2.2.1.5. Hibridación

Se colocó la membrana en un recipiente sellado con solución de hibridación (20x SSC, 10% N-Lauroilsarcosina, 10% SDS, 10x solución de bloqueo), a 42°C durante 1 hora en un horno giratorio (prehibridación).

Se sustituyó la solución de prehibridación con 2,5 ml de solución de hibridación junto con ADN de esperma de salmón recién desnaturalizado y la sonda también desnaturalizada, incubándose en agitación constante a 60°C durante 18 horas.

Se realizaron 4 lavados de la membrana, dos a temperatura ambiente durante 15 minutos con una solución 2x SSC y SDS 0,1% y dos a 68°C durante 30 minutos con una solución 0,1x SSC y SDS 0,1%.

Posteriormente se incubó la membrana en 20 ml de solución de bloqueo durante 30 minutos, se lavó 3 veces con 50 ml de Tris-tampón salino (TBS) durante 10 minutos.

La membrana se incubó 1 hora en 20 ml de solución de bloqueo que contenía el anticuerpo (antidigoxigenina, Roche Diagnostics) en una concentración 1:5000. Se lavó 3 veces más con 50 ml de TBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La membrana se sumergió en una solución cromática (50 µl de NBT y 37,5 µl de BCIP) durante toda la noche protegida de la luz y sin agitación. Finalmente, se lavó con agua corriente durante 5 minutos y se visualizaron las bandas.

RESULTADOS

OBJETIVO 1. Estudio de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con bacteriemia en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013)

1.1. Epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por *K. pneumoniae* (2007-2009)

1.1.1. Características clínicas de la bacteriemia por *K. pneumoniae*

Durante el periodo 2007-2009 se detectaron 348 episodios de bacteriemia causadas por *K. pneumoniae* en 335 pacientes adultos.

Los episodios de bacteriemia se clasificaron en tres tipos: bacteriemias hospitalarias o nosocomiales [N=223 (64,1%), (B-NOS)]; bacteriemia adquirida en la comunidad [N=67 (19,2%), (B-AC)] y bacteriemia asociada a cuidados sanitarios [N=58 (16,7%), (B-ACS)].

La tabla 14 muestra las características demográficas y los focos asociados con la bacteriemia causada por *K. pneumoniae* en los tres grupos. Los principales focos de adquisición de la bacteriemia fueron: bacteriemia relacionada con catéter para B-NOS (39,9%) y bacteriemia relacionada con infección de tracto urinario para B-ACS (50,0%) y B-AC (43,3%). Otros focos de adquisición importantes fueron el biliar y el respiratorio. La bacteriemia primaria fue más frecuente en B-NOS (18,4%) que en B-ACS (10,3%) y en B-AC (8,9%).

Tabla 14. Características demográficas, focos asociados y comorbilidades de los pacientes con bacteriemia.

Características	B-AC N=67 (19,2%)	B-ACS N=58 (16,7%)	B-NOS N=223 (64,1%)	p-valor		
				B-AC vs. ACS	B-AC vs. B- NOS	B-ACS vs. B- NOS
Edad (+/- SD)	69,8 (+/- 16,266)	65,4 (+/- 13,270)	61,5 (+/- 15,815)	0,102	0	0,088
Sexo (hombres)	52,2%	60,3%	62,8%	0,363	0,122	0,733
Focos de bacteriemia						
Bacteriemia primaria	6 (8,9)	6 (10,3)	41 (18,4)	0,793	0,066	0,144
Urinario	29 (43,3)	29 (50)	37 (16,6)	0,025	<0,001	<0,001
Con sonda urinaria	0	15 (25,9)	34 (15,2)	<0,001	<0,001	0,058
Sin sonda urinaria	29 (43,3)	14 (24,2)	3 (1,4)	0,025	0	0
Abdominal	4 (6)	2 (3,5)	12 (5,4)	0,510	0,854	0,547
Biliar	21 (31,3)	14 (24,2)	24 (10,8)	0,370	<0,001	0,008
PBEC *	2 (3)	1 (1,7)	3 (1,3)	0,646	0,366	0,828
Absceso hepático	2 (3)	2 (3,5)	1 (0,5%)	0,882	0,072	0,048
Piel y tejidos blandos	1 (1,5)	0	3 (1,3)	0,350	0,929	0,374
Neumonía	2 (3)	1 (1,7)	10 (4,5)	0,646	0,589	0,334
Bacteriemia relacionada con catéter	0	3 (5,2)	89 (39,9)	0,059	0	<0,001
Otros focos	0	0	3 (1,3)	0	0,340	0,374
Comorbilidades						
Diabetes mellitus	22 (32,8)	16 (27,6)	51 (22,9)	0,524	0,110	0,453
Cáncer	10 (14,9)	35 (60,3)	87 (39)	<0,001	<0,001	0,003
Enf. cardiovascular	19 (28,3)	7 (12,1)	68 (30,5)	0,025	0,879	0,005
Enf. crónica pulmonar	11 (16,4)	8 (13,8)	27 (12,1)	0,684	0,409	0,729
Enf. cerebrovascular	5 (7,5)	5 (8,6)	22 (9,9)	0,811	0,810	0,775
Enf. hepática crónica	9 (13,4)	6 (10,3)	13 (5,8)	0,596	0,061	0,223
Insuficiencia renal crónica	0	5 (8,6)	4 (1,8)	0,014	0,577	0,008
Transplante de órgano sólido	4 (6)	4 (6,9)	13 (5,8)	0,832	1	0,762
Mortalidad (30 días)	11 (16,4)	12 (20,7)	53 (23,8)	0,539	0,241	0,621

PBEC* peritonitis bacteriana espontánea en paciente cirrótico

La mayoría de los pacientes con bacteriemia nosocomial (B-NOS) estaban ingresados principalmente en las unidades de cuidados intensivos n=99 (44,4%), cirugía digestiva n=18 (8,1%), hematología n=23 (10,3%) y gastroenterología n=7 (23,1%).

La comorbilidad más frecuente entre los pacientes con B-AC fue la diabetes mellitus, entre los pacientes con B-ACS fueron el cáncer y la diabetes mellitus, mientras que entre los pacientes con B-NOS fue también el cáncer y en segundo lugar las enfermedades cardiovasculares seguidas por la diabetes mellitus. La tasa de mortalidad a los 30 días se mantuvo similar entre los tres grupos de pacientes.

Todos los aislamientos presentaron resistencia a ampicilina, piperacilina y ticarcilina. La producción de β -lactamasas de espectro extendido se detectó en 30 (8,6%) de los episodios de bacteriemia, siendo la familia CTX-M la más frecuente en B-NOS (Tabla 15). Los aislamientos de B-NOS fueron más resistentes a los antibióticos que los aislamientos de B-ACS y B-AC (Tabla 16).

Tabla 15. Combinaciones de β -lactamasas de espectro extendido encontradas en 30 episodios de bacteriemia.

	N (%)
SHV-CTX-M	15 (50%)
SHV-TEM	7 (23,3%)
SHV-CTX-M-TEM	3 (10%)
SHV-CTX-M-OXA	4 (13,3%)
SHV-TEM-OXA	1 (3,3%)

Tabla 16. Tasas de resistencia antibiótica de los episodios de bacteriemia.

	B-AC N=67 (19,2%)	B-ACS N=58 (16,7%)	B-NOS N=223 (64,1%)	B-AC vs. B- ACS	B-AC vs. B- NOS	B-ACS vs. B- NOS
				p valores		
Gentamicina	0	1 (1,7)	13 (5,8)	0,281	0,044	0,200
Tobramicina	0	2 (3,5)	30 (13,4)	0,125	<0,001	0,033
Amikacina	0	1 (1,7)	19 (8,5)	0,281	0,009	0,073
Ciprofloxacino	12 (17,9)	14 (24,1)	72 (32,3)	0,392	0,031	0,230
Cotrimoxazol	7 (10,4)	10 (17,3)	55 (24,7)	0,269	0,011	0,232
Sensibles	43 (64,2)	34 (58,6)	115 (51,6)	0,524	0,093	0,338
Alguna resistencia	24 (35,8)	24 (41,4)	108 (48,4)	0,524	0,093	0,338
Producción de BLEEs	2 (3)	4 (6,9)	24 (10,8)	0,307	0,179	0,830

1.1.2. Caracterización molecular de las cepas que causan bacteriemias de *K. pneumoniae*

El tipado molecular mediante electroforesis en campo pulsado (ECP) se realizó a una selección de 203 aislamientos de los 310 aislamientos disponibles, demostrando una elevada diversidad genética, aunque se detectaron algunos *clusters* entre las cepas B-NOS (figura 20).

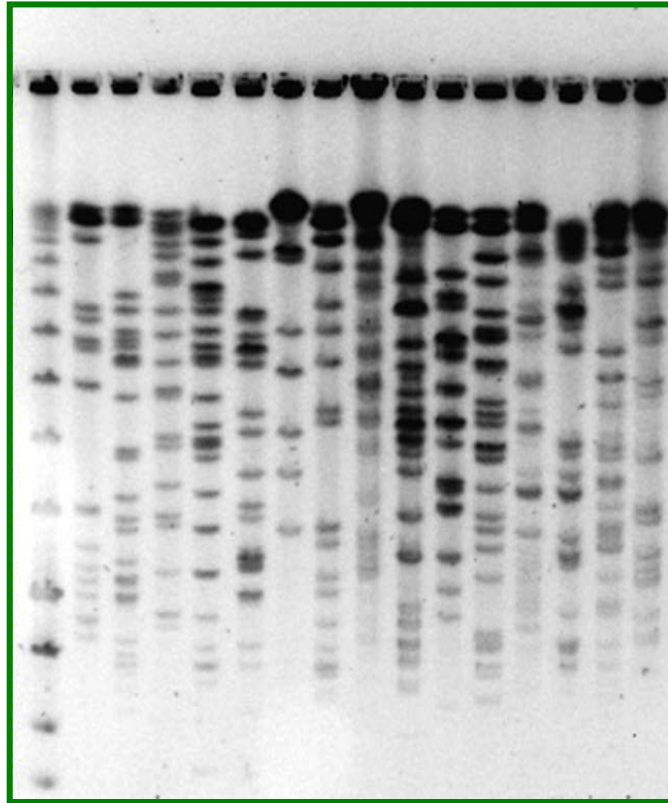


Figura 20. Gel de ECP mostrando aislamientos bacteriémicos de *K. pneumoniae*.

Se caracterizaron molecularmente mediante *Multilocus sequence typing* (MLST), una selección de 298 aislamientos representativos que correspondían a:

- a.) 107 aislamientos no tipados por ECP
- b.) 191 aislamientos tipados previamente por ECP. Incluyendo al menos 1 aislamiento de cada uno de los patrones de ECP encontrados entre los 203 aislamientos tipados por ECP.

Por MLST, se encontraron 161 secuenciotipos (STs) diferentes: n=101 STs fueron encontrados en B-NOS, n=33 STs en B-ACS y n=27 STs en B-AC.

14 STs fueron comunes entre B-NOS y B-ACS, 14 STs entre B-NOS y B-AC y 3 STs entre B-ACS y B-AC.

RESULTADOS

Entre los 161 STs encontrados, detectamos 21 STs descritos por primera vez en nuestro estudio (Tabla 17).

Tabla 17. Perfil alélico de los nuevos STs.

ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
1006	10	40	2	1	7	4	40
1007	2	6	5	1	1	4	8
1008	16	24	21	27	52	22	150
1009	2	10	1	1	12	1	25
1010	2	3	1	1	1	4	48
1011	2	1	5	1	9	4	56
1012	4	1	1	1	9	1	83
1013	2	2	1	1	3	3	1
1014	4	4	1	1	27	7	4
1015	10	1	11	1	4	8	43
1016	18	22	18	22	115	13	51
1017	2	2	2	1	1	4	34
1018	16	18	45	44	55	60	67
1019	18	1	1	70	94	20	51
1020	2	2	5	1	10	1	6
1021	2	2	1	1	1	1	40
1022	60	24	21	44	29	22	67
1023	16	24	21	38	47	22	67
1024	4	1	2	2	3	1	39
1025	16	1	21	53	44	22	67
1026	2	1	2	35	10	24	19

Para el análisis definitivo, se consideró que los aislamientos pertenecientes a un mismo patrón de ECP compartían el mismo MLST. En la tabla 18, se muestra el

análisis de los 310 aislamientos disponibles para el estudio de tipificación molecular en función del tipo de bacteriemia y relacionado con el patrón de resistencia.

Siete STs (ST13, ST15, ST17, ST35, ST37, ST42 y ST45), estuvieron presentes en los 3 grupos. En B-AC es en el único grupo donde se ha detectado el ST25 y del mismo modo ST211, ST214, ST360, ST485, ST515, ST6 y ST711 sólo se han detectado en B-NOS. No se encontró ningún ST que estuviese presente sólo en B-ACS.

Tabla 18: Patrones de resistencia asociados a los secuenciotipos que agrupan a más de una cepa y su distribución por los 3 grupos de bacteriemia

Tipos de bacteriemia (Nº)	STs (aislamientos)	Patrón de resistencia
B-AC (N=59)	ST101 (n=1)	Cip
	ST11 (n=1)	Cip
	ST13 (n=1)	Sensible
	ST14 (n=1)	Sxt
	ST15 (n=1)	Sxt-Cip
	ST17 (n=1)	Sensible
	ST23 (n=2)	Sensible
	ST29 (n=1)	BLEE
	ST34 (n=1)	Sensible
	ST35 (n=1)	Sensible
	ST36 (n=1)	Sensible
	ST37 (n=1)	Sensible
	ST42 (n=1)	Cip
	ST45 (n=4)	Sensible
	ST54 (n=1)	Sensible
	40 STs diferentes	BLEE-Cip (n=1), Sxt-Cip (n=2), Sxt (n=3), Cip (n=5), sensible (n=29)

Tabla 18 (continuación): Patrones de resistencia asociados a los secuenciotipos que agrupan a más de una cepa y su distribución por los 3 grupos de bacteriemia

Tipos de bacteriemia (Nº)	STs (aislamientos)	Patrón de resistencia
B-NOS (N=197)	ST1 (n=5)	BLEE-Sxt-Tob-Cip (n=1), BLEE-Sxt-Cip (n=3), Sxt (n=1)
	ST101 (n=2)	BLEE-Sxt-Tob-Cip (n=1), sensible (n=1)
	ST104 (n=5)	Sxt (n=1), sensible (n=4)
	ST11 (n=3)	BLEE-Sxt-Cip (n=1), Sxt-Tob-Cip (n=2)
	ST13 (n=2)	Sensible
	ST14 (n=17)	BLEE-Sxt-Tob-Cip (n=1), Sxt-Tob-Cip (n=11), Sxt-Cip (n=2), sensible (n=3)
	ST15 (n=1)	Cip
	ST17 (n=2)	Sensible
	ST20 (n=1)	Sensible
	ST23 (n=2)	Sensible
	ST29 (n=3)	Sensible
	ST34 (n=4)	BLEE-Sxt-Tob-Cip (n=2), BLEE-Sxt-Cip (n=2)
	ST35 (n=5)	Sensible
	ST36 (n=2)	Sensible
	ST360 (n=3)	Cip (n=1), sensible (n=2)
	ST37 (n=8)	Sxt (n=5), sensible (n=3)
	ST42 (n=1)	Sensible
	ST45 (n=8)	Sxt-Cip (n=2), Cip (n=1), sensibles (n=6)
	ST485 (n=3)	Cip (n=2), sensible (n=1)
	ST515 (n=2)	Sensible
	ST54 (n=6)	Sxt-Cip (n=1), Cip (n=3), sensible (n=2)
ST6 (n=3)	Sxt-Cip (n=1), sensible (n=2)	
ST70 (n=5)	Sensible	
104 STs diferentes	BLEE-Sxt-Tob-Cip (n=6), BLEE-Sxt-Cip (n=2), BLEE-Tob-Cip (n=2), BLEE-Cip (n=2), BLEE-Tob (n=1), Sxt-Cip-Tob (n=4), Sxt-Cip (n=4), Sxt (n=6), Cip (n=9), sensible (n=68)	

Tabla 18 (continuación): Patrones de resistencia asociados a los secuenciotipos que agrupan a más de una cepa y su distribución por los 3 grupos de bacteriemia

Tipos de bacteriemia (Nº)	STs (aislamientos)	Patrón de resistencia
B-ACS (N=54)	ST1 (n=3)	BLEE Sxt-Tob-Cip (n=1), BLEE-Sxt-Cip (n=1), BLEE-Cip (n=1),
	ST104 (n=1)	Sensible
	ST13 (n=3)	Sxt-Cip (n=1), sensible (n=2)
	ST15 (n=2)	Tob-Cip (n=1), Cip (n=1)
	ST17 (n=2)	Sxt-Cip (n=1), sensible (n=1)
	ST20 (n=4)	Sensible
	ST35 (n=2)	Cip (n=1), sensible (n=1)
	ST37 (n=1)	Sensible
	ST42 (n=2)	Cip (n=1), sensible (n=1)
	ST45 (n=2)	Sensible
	ST70 (n=1)	BLEE-Sxt
	31 STs diferentes	Sxt (n=2), Cip (n=6), sensible (n=23)

Se detectaron un total de 17 *clusters* (≥ 3 aislamientos con idéntico ST) entre los aislamientos estudiados. Los 17 *clusters* agrupaban a 118 (38,1%) de los 310 aislamientos. Los 17 estaban presentes entre los pacientes B-NOS, 13 se encontraron entre los pacientes B-AC y 11 entre los pacientes B-ACS (Tabla19).

Teniendo en cuenta los STs relacionados STs (que derivan de un ST común) se detectaron 47 *clonal sets* que agrupaban 185 aislamientos y 125 *singletons*.

Tabla 19: Distribución de los aislamientos pertenecientes a los 17 *clusters*

STs (Nº aislamientos)	B-AC	B-ACS	B-NOS
1 (8)	0	3	5
104 (6)	0	1	5
11 (4)	1	0	3
13 (6)	1	3	2
14 (18)	1	0	17
15 (4)	1	2	1
17 (5)	1	2	2
20 (5)	0	4	1
23 (4)	2	0	2
29 (4)	1	0	3
34 (5)	1	0	4
35 (8)	1	2	5
37 (9)	1	1	7
42 (4)	1	2	1
45 (13)	4	1	8
54 (6)	1	0	5
70 (5)	0	1	4

La mayor diversidad se encontró entre los aislamientos obtenidos de episodios de B-AC y el mayor número de *clusters* se encontraron entre los aislamientos obtenidos de episodios de B-NOS.

Debido a la gran distancia genética entre los diferentes genotipos no hemos encontrado ningún ST como posible fundador.

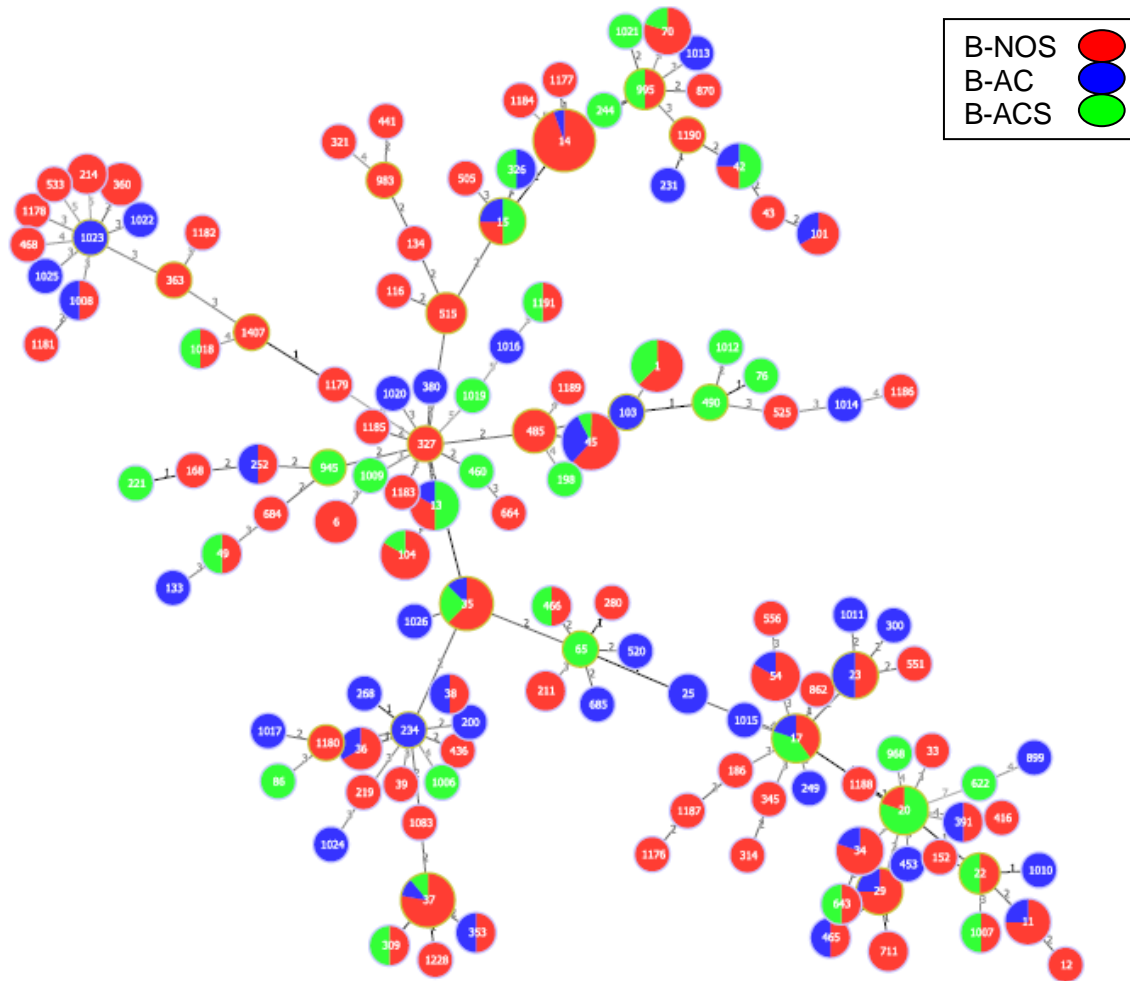


Figura 21. Árbol de expansión mínima (MST). *Phyoviz* (<http://www.phyloviz.net/wiki>)

El algoritmo *goeBURST Full MST* utiliza una escala de grises para marcar las líneas entre los STs (en círculos de colores según sus características, en nuestro caso según el tipo de bacteriemia). Cuanto más oscura sea la línea entre 2 STs menos diferencias se encuentran entre sus perfiles de MLST y el número de la línea indica el número de diferencias entre 2 STs.

1.2. Análisis de la prevalencia de clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* como causa de bacteriemia (2007-2013)

1.2.1. Identificación y caracterización de las cepas hipermucoviscosas

Se estudiaron los aislamientos de *K. pneumoniae* causantes de bacteriemia en el periodo 2007 a 2013 con el fin de detectar la presencia del fenotipo hipermucoviscoso. Dicho fenotipo está relacionado con el gen de hipermucoviscosidad (*magA*) y/o el gen regulador del fenotipo mucoide (*rpmA*). El fenotipo hipermucoviscoso se caracteriza por la formación de un hilo mucoso de más de 5 mm cuando con la ayuda de un asa de siembra se tocan las colonias de *K. pneumoniae* crecidas en la placa de medio de cultivo (Figura 22).



Figura 22. Test de hipermucoviscosidad positivo, presencia de un hilo de >5 mm (*string test*).

Durante el periodo de estudio se detectaron 986 episodios de bacteriemia por *K. pneumoniae* en 880 pacientes. De estos, 878 aislamientos (89,1%) estuvieron

disponibles para el estudio del fenotipo hiper mucoviscoso. Mediante el test del hilo se identificaron 53 episodios (6%) en 50 pacientes causados por cepas con fenotipo hiper mucoviscoso.

Las 53 cepas se caracterizaron mediante PCR de los genes relacionados con la hiper mucoviscosidad (*magA* y *rmpA*), PCR y secuenciación de parte del operón capsular (*wzi*) y MLST.

Entre estos 53 episodios, se detectaron los genes *magA* y *rmpA* en 16 (30,2%) aislamientos y sólo el gen *rmpA* en 12 (22,6%) aislamientos. En los 25 (47,2%) aislamientos hiper mucoviscosos restantes no se detectó ninguno de los dos genes.

Una vez realizado el estudio molecular por MLST y la secuenciación del gen *wzi*, se detectaron 16 aislamientos del serotipo K1 todos pertenecientes al ST23 (2-1-1-1-9-4-12), 9 aislamientos del serotipo K2 pertenecientes a 5 STs y 28 aislamientos de otros serotipos con diversos STs.

Tabla 20. Características de los aislamientos hiper mucoviscosos.

Genes de virulencia	Serotipo relacionado	MLST	Alelo <i>wzi</i>	Nº aislamientos
<i>magA</i> (+) / <i>rmpA</i> (+)	K1	ST23	1	16
<i>magA</i> (-) / <i>rmpA</i> (+)	K2	ST25	72	1
		ST65	72	1
		ST86	2	3
		ST380	2	3
		ST493	2	1
	No-K1/K2	ST1013 ^a	122 ^a	3
<i>magA</i> (-) / <i>rmpA</i> (-)	Varios K1/K2 no-	Varios STs	Varios <i>wzi</i>	25

^a El ST1013 y el alelo *wzi* 122 han sido descritos por primera vez en el presente estudio.

Tabla 21. Perfil alélico de los STs de los aislamientos *magA*(+) y/o *rmpA*(+).

ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
23	2	1	1	1	9	4	12
25	2	1	1	1	10	4	13
65	2	1	2	1	10	4	13
86	9	4	2	1	1	1	27
380	2	1	1	1	1	4	19
493	2	1	70	1	12	1	127
1013	2	2	1	1	3	3	1

En nuestra área geográfica la prevalencia del fenotipo hipermucoviscoso es baja, 53/878 (6%). La incidencia de *K. pneumoniae* portadores del gen *magA* fue 16/878 (1,8%) y todos los aislamientos pertenecían al mismo clon [*rmpA*(+), ST23 y serotipo K1]. La de los aislamientos *magA*(-)/*rmpA*(+) fue 12/878 (1,4%) y 25/878 (2,8%) para los aislamientos *magA*(-)/*rmpA*(-). Igualmente la bacteriemia causada por clones hipervirulentos de los serotipos K1 o K2 es baja 25/878 (2,8%).

Todos los aislamientos de *K. pneumoniae magA* y/o *rmpA* eran sensibles a todos los antimicrobianos probados excepto a ampicilina, piperacilina y ticarcilina. Casi la mitad (11/25) de los aislamientos hipermucoviscosos *magA*(-)/*rmpA*(-) presentan una resistencia adicional [dos aislamientos eran productores de BLEEs y seis aislamientos eran resistentes a fluoroquinolonas]. Por otro lado, 43,8% de los aislamientos no hipermucoviscosos también presentan alguna resistencia [15,5% de los aislamientos eran productores de BLEEs y 29,6% eran resistentes a fluoroquinolonas].

Todos los aislamientos *magA(+)/rmpA(+)* albergaban además el gen *rmpA2* (activador transcripcional), variante del gen *rmpA* (Lee *et al.*, 2010). De los 12 aislamientos *magA(-)/rmpA(+)*, sólo la mitad albergaban el gen *rmpA2*. Mientras que ningún aislamiento *magA(-)/rmpA(-)* presentaban el gen *rmpA2*.

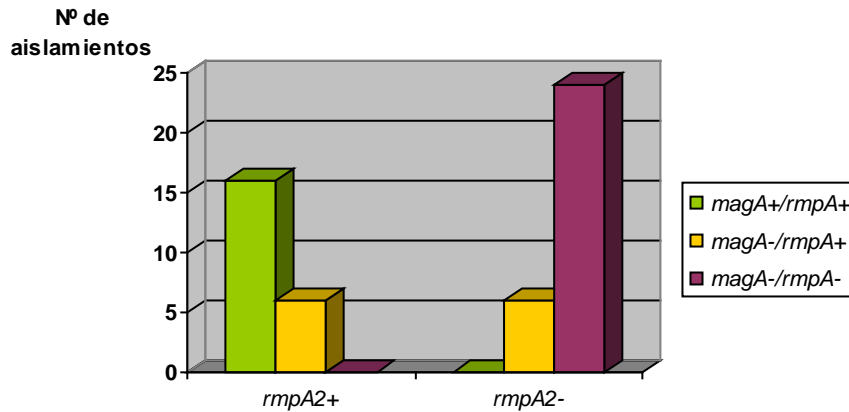


Figura 23. Presencia de los genes relacionados con la hiper mucoviscosidad (*magA*, *rmpA* y *rmpA2*) en los aislamientos hiper mucoviscosos.

1.2.2. Características clínicas de las bacteriemias causadas por *K. pneumoniae* hiper mucoviscosas

La tabla 22 muestra las características clínicas y demográficas de los pacientes con bacteriemia causada por *K. pneumoniae* hiper mucoviscosas con y sin genes (*magA* y/o *rmpA*) y no hiper mucoviscosas. Los pacientes con episodios de bacteriemia causados por cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo hiper mucoviscoso fueron mayoritariamente hombres (33/50, 66%) con una media de edad de 67,04 años (+/- SD 15,74).

Aunque la mayoría de las bacteriemias causadas por *K. pneumoniae* hiper mucoviscosas son de adquisición comunitaria, entre las bacteriemias debidas a

las cepas hipervirulentas K1, 7 (25%) fueron nosocomiales. La adquisición nosocomial de estas cepas sugiere su presencia colonizando a los pacientes, probablemente con anterioridad a la admisión en el hospital y que posteriormente desarrollan la infección en el hospital.

Aunque las cepas portadoras del gen *magA* se han asociado mayoritariamente con pacientes con abscesos hepáticos piogénicos adquiridos en la comunidad, en nuestro estudio menos de un 25% de los episodios de bacteriemia tuvieron este origen. Otros focos detectados fueron neumonía, tracto urinario y catéter intravenoso.

Comparando los tres grupos de bacteriemias diferenciados en la tabla 22, en el primero (*magA* y/o *rmpA*) se encontraba la mayor frecuencia de abscesos hepáticos piogénicos y de neumonías.

Una cuarta parte (27,2%) de los pacientes sufrió shock séptico, sin distinción de grupo. La presencia de comorbilidades fue más frecuente entre las cepas no hipermucoviscosas, aunque por lo general todos los pacientes padecían alguna comorbilidad.

La tasa de mortalidad a los 30 días se mantuvo similar entre los pacientes del primer (*magA* y/o *rmpA*) y del tercer grupo (no hipermucoviscosas), con una media de 21,7% de los pacientes (182/837).

La elevada frecuencia de aislamientos *magA*(-)/*rmpA*(-) entre los aislamientos hipermucoviscosos indica que es necesario realizar un análisis molecular para la detección de cepas virulentas.

Tabla 22. Características de los pacientes y origen de las bacteriemias según la presencia de genes hipermucoviscosos.

Características	Hipermucoviscosas		No hipermucoviscosas
	<i>magA+/rmpA+</i> o <i>magA-/rmpA+</i>	<i>magA-/rmpA-</i>	
Nº de casos	28	25	825
Edad (+/- SD)	56,7 (+/-SD 18,3)	69,3 (+/-SD 15,6)	64,7 (+/- 14,6)
Sexo (Hombres)	20 (71,4%)	13 (52%)	550 (66,7%)
Adquisición			
B-AC	13 (46,4%) ^b	11 (44%) ^c	149 (18,1%)
B-ACS	8 (28,6%)	12 (48%) ^c	190 (23,1%)
B-NOS	7 (25%) ^b	2 (8%) ^c	486 (58,9%)
Origen de la infección			
Absceso hepático	6 (21,4%) ^b	2 (8%) ^c	6 (0,7%)
Neumonía	5 (17,9%) ^b	-	30 (3,6%)
Urinario	8 (28,6%) ^a	14 (56%) ^c	233 (28,2%)
BRC*	2 (7,1%)	1 (4%) ^c	192 (23,3%)
Abdominal	3 (10,7%)	-	41 (4,9%)
Biliar	1(3,6%) ^a	6 (24%)	153 (18,5%)
Primario	3 (10,7%)	1 (4%)	139 (16,8%)
PBEC**	-	1 (4%)	10 (1,2%)
Otros	-	-	21 (2,5%)
Shock séptico	7 (25%)	6 (24%)	215 (26,1%)
Comorbilidades	21 (75%) ^b	19 (76%) ^c	739 (89,6%)
Mortalidad (30 días)	7 (25%)	2 (8%)	173 (20,9%)

*BRC: bacteriemia relacionada con catéter intravenoso

**PBEC: peritonitis bacteriana espontánea en paciente cirrótico

^a $p < 0,05$ comparando hipermucoviscosas (*magA+/rmpA+* o *magA-/rmpA+*) vs (*magA-/rmpA-*).

^b $p < 0,05$ comparando hipermucoviscosas (*magA+/rmpA+* o *magA-/rmpA+*) vs no hipermucoviscosas.

^c $p < 0,05$ comparando hipermucoviscosas (*magA-/rmpA-*) vs no hipermucoviscosas.

1.3. Mecanismos de virulencia de las cepas de *K. pneumoniae* que causa bacteriemia (2007- 2013)

1.3.1. Selección de cepas para el estudio

Se seleccionaron 38 aislamientos de *K. pneumoniae* representantes de los diferentes genotipos del fenotipo hipermucoviscoso (apartado 1.2) y 7 aislamientos con fenotipo no-hipermucoviscoso (apartado 1.1).

Tabla 23. Aislamientos clínicos seleccionados.

Test del hilo	<i>magA</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmp2A</i>	Serotipo K	Nº de cepas	ST
+	+	+	+	K1	15	23 (n=15)
+	-	+	+	K2	6	25, 65, 86 (n=3), 380
+	-	+	-	K2	3	380 (n=2), 493
+	-	+	-	No-K1/K2	3	1013 (n=3)
+	-	-	-	No-K1/K2	11	17, 37, 45, 152, 321, 460, 622, 719, 895 (n=2), 1035
-	-	-	-	No-K1/K2	7	17 (n=2), 35, 104, 214, 465, 711

Todos los aislamientos seleccionados se caracterizaron mediante:

- Test de hipermucoviscosidad (DO a 600nm $\geq 0,2$)
- Adhesión en tubo
- Formación de biopelícula en caldo de infusión cerebro corazón BHI (DO a 570 nm $\geq 0,2$) (BD)
- Adhesión en placa (índice de formación de biopelícula ≤ 5)
- Resistencia al suero

1.3.2. Test de hipermucoviscosidad

Las cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo hipermucoviscoso con presencia de genes *magA*(+) y/o *rmpA*(+) presentaron un resultado positivo para el test de la hipermucoviscosidad, siendo más elevada su presencia entre las cepas *magA*(+)/*rmpA*(+).

Las cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo hipermucoviscoso presentaron un sedimento menos compacto después de la centrifugación que las cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo no hipermucoviscoso y estas diferencias se correlacionaron con el número de genes identificados.

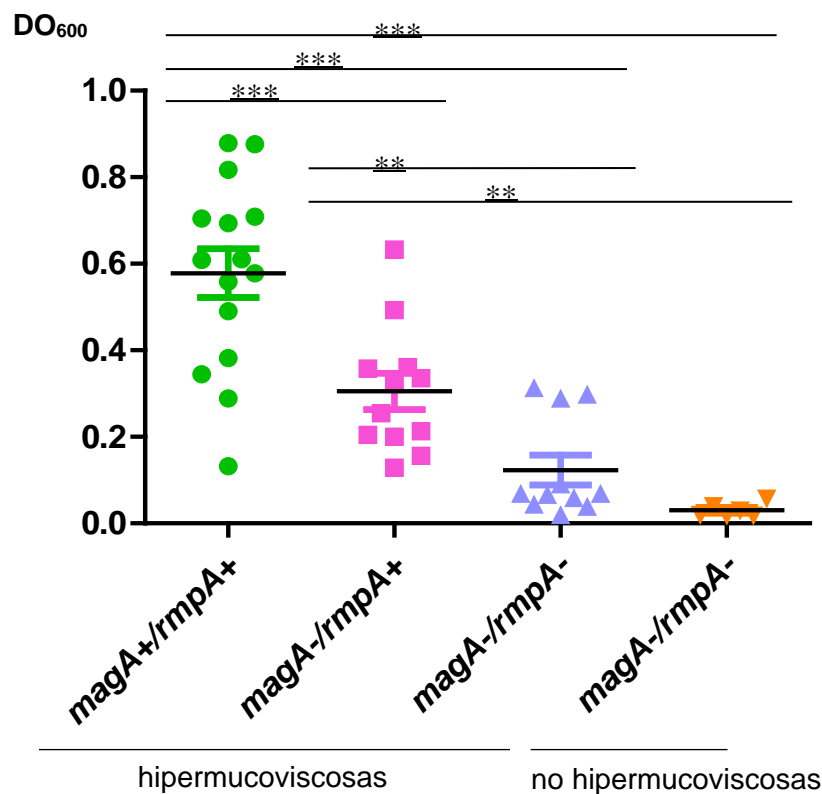


Figura 24. Resultados del test de hipermucoviscosidad en los distintos grupos de cepas. La hipermucoviscosidad se determinó midiendo la DO₆₀₀ del sobrenadante obtenido

tras la centrifugación (1,000×g durante 5 minutos) de un cultivo de 18 horas. A mayor DO_{600} mayor hipermucoviscosidad.

Medias \pm errores estándares de como mínimo tres replicas independientes de cada experimento. El análisis de la varianza "One-way" fue analizado con el test estadístico de múltiple comparación "Newman-Keuls *post hoc*" ($P = < 0,0001$) donde: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ y ***, $P < 0,001$.

1.3.3. Detección de la formación de biopelícula sobre medio líquido (*Air-liquid biofilm: ALI-Biofilm*)

La adhesión en tubo se denominó formación de biopelícula ALI (formación de una película en la superficie de contacto entre el aire y el medio de cultivo líquido). Al igual que con el test de hipermucoviscosidad, la formación de ALI se relacionó con la presencia de los genes del fenotipo hipermucoviscoso siendo más propensa su formación en las cepas *magA(+)/rmpA(+)*.

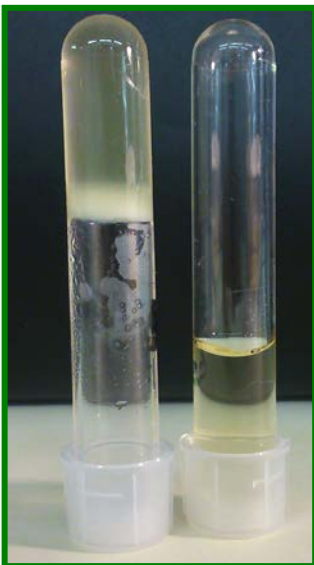


Figura 25. Test de adhesión en tubo. La biopelícula tipo ALI se midió visualmente considerándose como resultado positivo cuando se generó una película consistente de biopelícula en la superficie del medio que al girar el tubo mantenía el cultivo líquido (tubo izquierda). Se consideró negativo cuando no se observó formación de biopelícula y al girar el tubo no es capaz de mantener el cultivo líquido (tubo derecha).

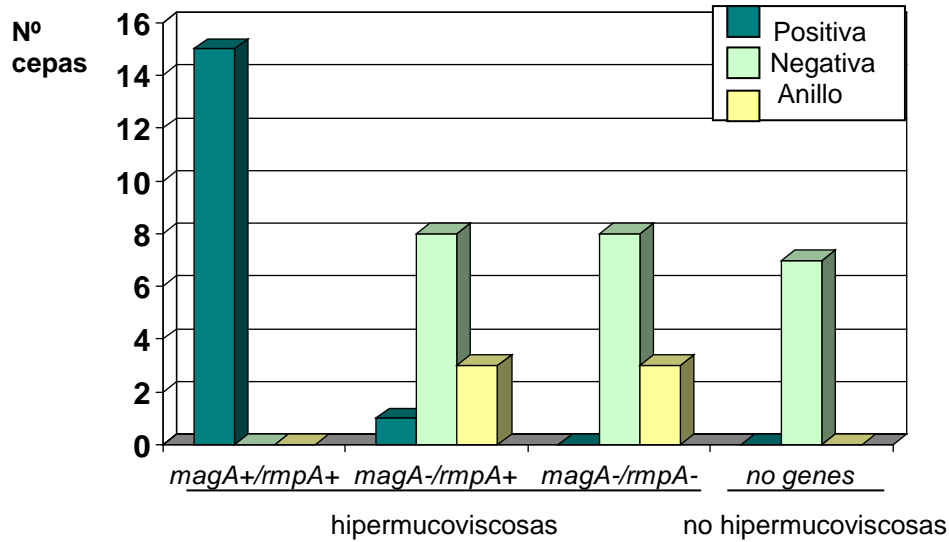


Figura 26. Distribución de la adhesión en tubo de los aislamientos de fenotipo hipermucoviscoso y fenotipo no hipermucoviscoso según la presencia de genes.

Los aislamientos con fenotipo hipermucoviscoso *magA(+)/rmpA(+)* presentaron un resultado positivo ($\geq 6/10$ repeticiones) con una película consistente en la superficie líquida. Entre los aislamientos con fenotipo hipermucoviscoso *magA(-)/rmpA(+ y/o -)*, a excepción de 1 aislamiento con resultado positivo, se observó formación de anillo en 3 aislados (película pegada en las paredes del tubo pero no cubriendo la superficie líquida completamente) y resultados negativos en otros 8 aislados (no se forma película ni anillo). Los 7 aislamientos no hipermucoviscosos tuvieron resultados negativos.

La mayoría de las cepas formaban una biopelícula muy débil o no formaba biopelícula 25/45 (55,6%). Se detectó una biopelícula intermedia en 15/45 cepas (33,3%) y una biopelícula fuerte sólo en 5/45 cepas (11,1%).

La formación de biopelícula no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de aislamientos, la tasa de hiper mucoviscosidad, la adhesión bacteriana o la resistencia al suero. Estos resultados sugieren que la formación de biopelícula SLI es una característica adaptativa independiente de cada aislamiento.

Adhesión (BFI)

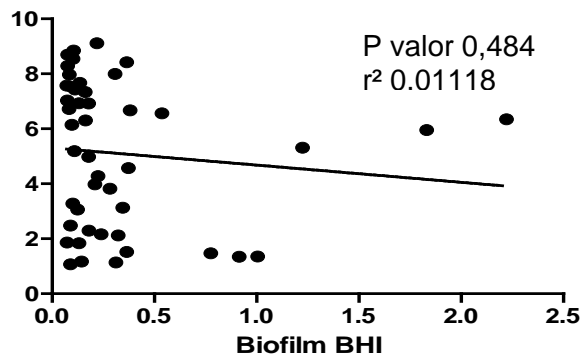


Figura 28. Biopelícula respecto a la adhesión. No se encontró una relación significativa entre la adhesión (medida en BFI) y la capacidad de formación de biopelícula sobre medio sólido.

1.3.5. Determinación de la capacidad de adhesión

La capacidad de adhesión bacteriana se realizó con un método de aglutinación con bolitas magnéticas (*BioFilm Ring Test®*). La adhesión bacteriana [índice de formación de biopelícula (BFI)] se determinó mediante el software *BioFilm Control*. El BFI obtenido fue inversamente proporcional a la adhesión bacteriana. Así, los

RESULTADOS

valores de BFI <5 se asocian con la adhesión, mientras que valores de BFI ≥ 5 se asocian con la ausencia de adhesión. Se consideró correcto el método cuando se detectó un punto marrón en el fondo de cada pocillo de la placa de Microtiter como control de no adhesión, siguiendo el protocolo descrito previamente (Chavant *et al.*, 2007). La variación de forma y color del punto marrón está determinada por la proporción de adhesión.

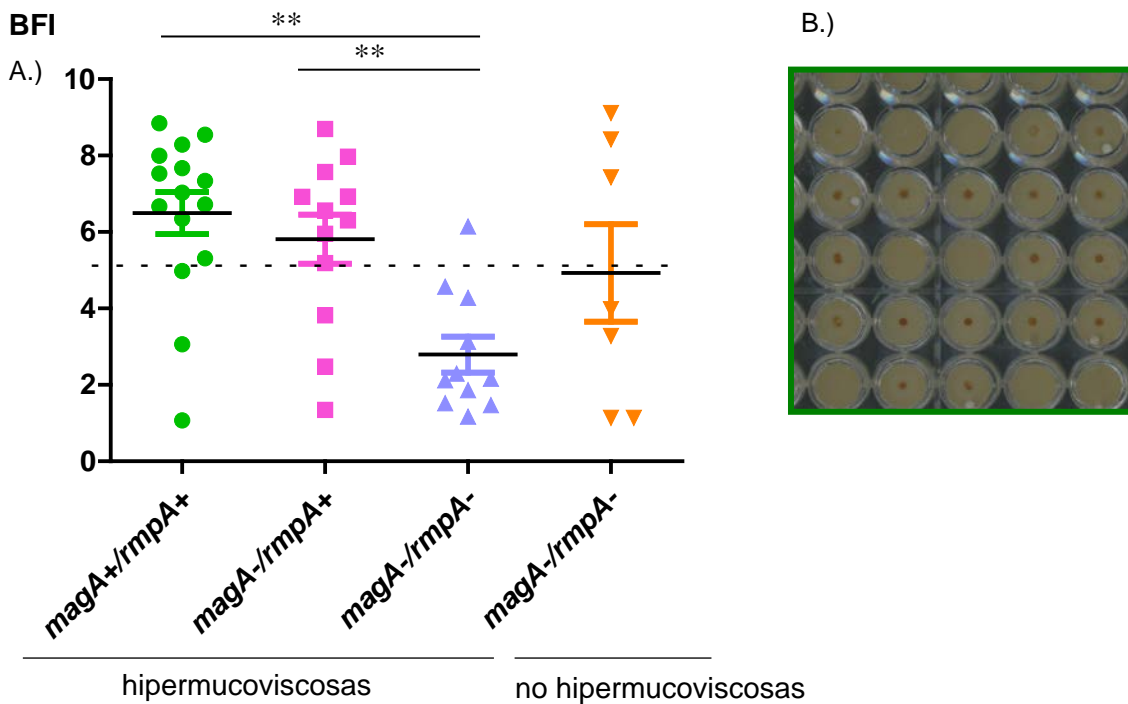


Figura 29. A.) Adhesión en placa respecto a la presencia de genes. El índice BFI (expresado en ordenadas) es inversamente proporcional a la adhesión. La adhesión inicial a la superficie sólida se determinó con el método “*BioFilm ring test*” tras 5 horas en crecimiento estático a 37°C. La línea de puntos representa el límite de adhesión (BFI=5), con valores <5 para los niveles más altos de adhesión. Medias \pm errores estándares de como mínimo tres replicas independientes de cada experimento. El análisis de la varianza “*One-way*” fue analizado con el test estadístico de múltiple comparación “*Newman-Keuls post hoc*” ($P=0,0016$) donde: **, $P < 0,01$.

Figura 29. B. (continuación) Ejemplo de adhesión en placa. La presencia de un botón en el centro del pocillo indica no adhesión. La ausencia del botón indica adhesión.

Casi la mitad de las cepas (20/45, 44,4%) mostraron adhesión después de 5 horas de incubación. Sin embargo, sólo 6 (22,2%) de las 27 cepas que presentaban fenotipo hipermucoviscoso con *magA*(+) y/o *rmpA*(+) mostraron una fuerte adhesión a la superficie de la placa. Mientras que 10 (90,9%) de las 11 cepas que presentaban fenotipo hipermucoviscoso *magA*(-)/*rmpA*(-) y 4 (57,1%) de las 7 cepas que no presentaban fenotipo hipermucoviscoso mostraron adhesión.

Se observó una reducción significativa en la adhesión asociada a la presencia de genes *magA* y *rmpA*.

1.3.6. Determinación de la resistencia al suero

Se determinó la resistencia al suero humano en los cuatro grupos de aislamientos. Los niveles más elevados de resistencia al suero humano (casi 100% resistentes) se observaron en las cepas que presentaban fenotipo hipermucoviscoso con los genes *magA*(+) y/o *rmpA*(+), mientras que cepas *magA*(-)/*rmpA*(-) mostraron los niveles de resistencia al suero variables con independencia de tener o no el fenotipo hipermucoviscoso.

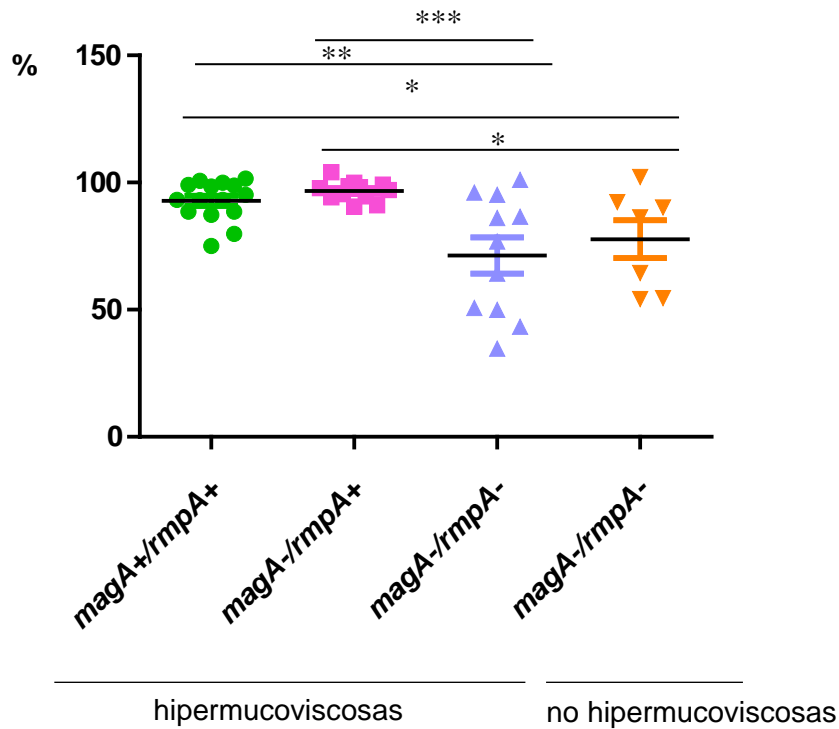


Figura 30. Resistencia al suero respecto a la presencia de genes. Se consideró una cepa resistente al suero cuando sobrevivía al NHS al 75% comparándola con el HI-NHS al 75%. Medias \pm errores estándares de como mínimo tres replicas independientes de cada experimento. El análisis de la varianza “One-way” fue analizado con el test estadístico de múltiple comparación “Newman-Keuls *post hoc*” ($P = 0,0004$) donde: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ y ***, $P < 0,001$.

En resumen, las cepas con mayor número de genes son significativamente las más hipermucoviscosas, forman más adhesión en tubo (película) y mostraban una mayor resistencia al suero, mientras que mostraban menos adhesión en placa. La mayor formación de biopelícula y adhesión en placa se detectó en las cepas sin genes aunque sin diferencias significativas.

Tabla 24. Características fenotípicas de los aislamientos hipermucoviscosos y los aislamientos clásicos.

Características	Hipermucoviscoso			No hipermucoso
	<i>magA+</i> <i>lrmpA+</i>	<i>magA-</i> <i>lrmpA+</i>	<i>magA-</i> <i>lrmpA-</i>	<i>magA-</i> <i>lrmpA-</i>
Nº cepas estudiadas	15	12	11	7
Hipermucoviscosidad	14 (93,3%)	10 (83,3%)	3 (27,3%)	0
Biopelícula SLI	4 (26,7%)	4 (33,3%)	8 (72,7%)	5 (71,4%)
Adhesión en placa	3 (20%)	3 (25%)	10 (90,9%)	4 (57,1%)
Biopelícula ALI	15 (100%)	3 (25%)	0	0
Resistencia al suero	15 (100%)	12 (100%)	6 (54,5%)	4 (57,1%)

OBJETIVO 2. Caracterización de *K. pneumoniae* multirresistentes en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013)

2.1. Caracterización de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-1}

2.1.1. Descripción del brote nosocomial

Durante el periodo 2007-2009 se detectó en nuestro hospital un aumento de cepas de *K. pneumoniae* con un patrón común de multirresistencia: penicilinas, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino y trimetoprim-cotrimoxazol. Estas cepas presentaban además una disminución de sensibilidad a cefepime. Se observó sinergia entre los discos de ácido clavulánico y cefepime y cefotaxima similar a las observadas en las cepas productoras de BLEEs.

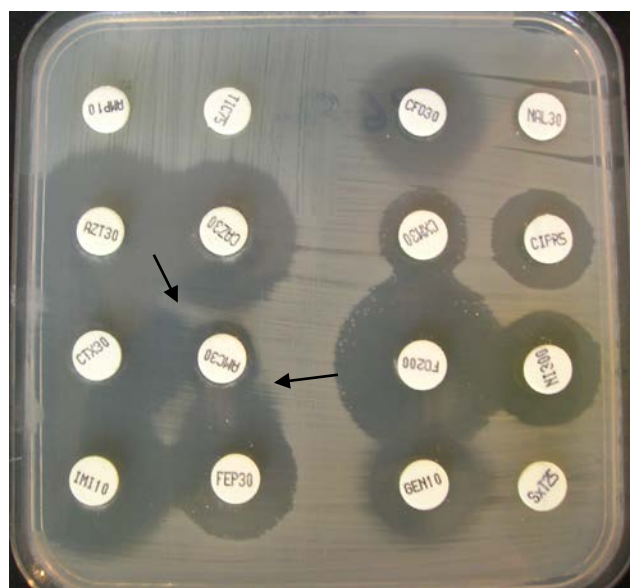


Figura 31. Antibiograma por disco difusión de la cepa *K. pneumoniae* bla_{OXA-1}.

AMP: ampicilina; TIC: ticarcilina; CFO: ceftiofina; NAL: ácido nalidíxico; AZT: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CXM: cefuroxima; CIPR: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; AMC: amoxicilina/ ácido clavulánico; FO: fosfomicina; NI: nitrofurantoina; IMI: imipenem; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; SXT: cotrimoxazol.

Las flechas indican la sinergia que se observa entre AMC con FEP y CTX.

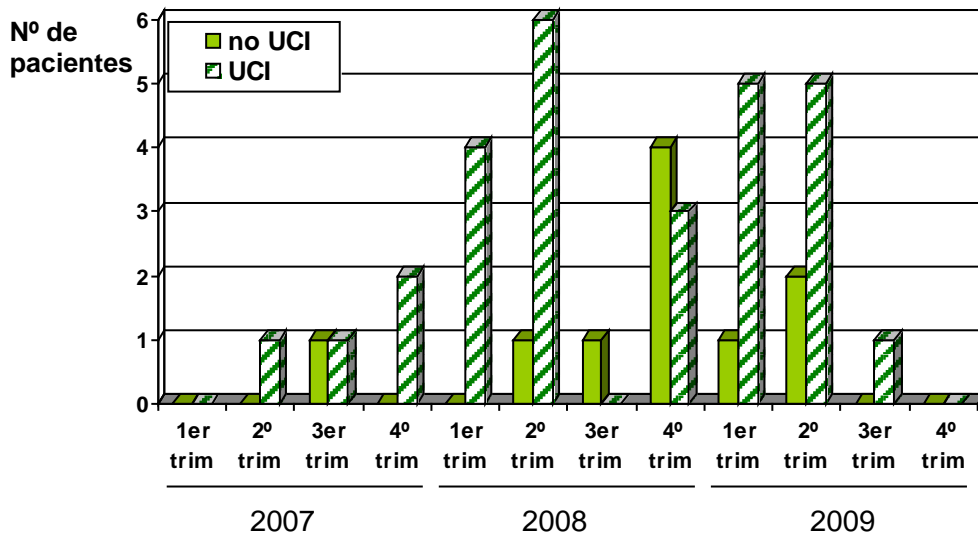


Figura 32. Distribución temporal de los 38 pacientes pertenecientes al brote. Las barras rayadas representan a pacientes ingresados en las UCIs y las verdes a pacientes ingresados en otros servicios hospitalarios.

2.1.2. Caracterización molecular de la cepa epidémica

El análisis por ECP tras restricción con *Xba*I mostró un patrón mayoritario que se identificó en los 98 aislamientos, pertenecientes a 38 pacientes. Este patrón se diferenció fácilmente del patrón de otros aislamientos de *K. pneumoniae* BLEE o multirresistente contemporáneos no asociados con este brote de infecciones.

Se detectó por PCR una β -lactamasa de la familia OXA en los 98 aislamientos estudiados que fue identificada como la enzima OXA-1 tras secuenciación.

Se seleccionaron 7 aislamientos para el MLST: 2 del perfil de ECP mayoritario (Kp98) y 1 de cada subtipo de este perfil de ECP (de Kp98-1 a Kp98-5). En todos los aislamientos se encontró un único secuenciotipo (ST14) que se engloba en el complejo clonal 14 (CC14). El CC14 se ha asociado con frecuencia a brotes de infección nosocomial en diferentes países (Diancourt *et al.*, 2005; Hrabák *et al.*, 2009). Además, las cepas del CC14 adquieren con facilidad nuevos determinantes de resistencia antibiótica (OXA, BLEE, carbapenemasas, etc.) lo que puede justificar el perfil de multirresistencia de la cepa epidémica.

La mayoría de pacientes con aislamientos de las cepas de *K. pneumoniae*-OXA-1 estaban ingresados en las UCIs (71%, 27/38). Las muestras más frecuentes donde se encontró *K. pneumoniae*-OXA-1 fueron orina (8/85 pacientes), seguido de sangre (9/49 pacientes) y de muestras respiratorias (11/27 pacientes).

2.1.3. Caracterización del perfil de multirresistencia. Estudio de integrones

El patrón de multirresistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas fue transferible por conjugación a la cepa *E. coli* J53-2 rifampicina resistente.

El transconjugante mostraba el mismo perfil de multirresistencia que el aislamiento de *K. pneumoniae* utilizado como cepa donadora, con la excepción de la CMI de

ciprofloxacino, en la cual se detectó una resistencia disminuida en la cepa receptora (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración mínima inhibitoria de varios antimicrobianos en el aislamiento de *K. pneumoniae* n° 8260 y su transconjugante y de la cepa receptora *E. coli* J53-2

Antimicrobiano	CMI del aislamiento n° 8260 (µg/ml)	CMI del transconjugante n° 8260 (µg/ml)	CMI de la cepa <i>E. coli</i> J53-2 (µg/ml)
Ampicilina	≥32	≥32	≤8
Piperacilina	≥128	≥128	≤8
Ticarcilina	≥128	≥128	≤8
Amoxicilina/ác. clavulánico	≥32/16	≥32/16	≤8/4
Piperacilina/tazobactam	32	32	≤8
Cefuroxima	16	16	8
Cefotaxima	≤2	≤2	≤1
Ceftacidima	≤1	≤1	≤1
Cefepime	2	2	≤1
Aztreonam	≤1	≤1	≤1
Imipenem	≤2	≤2	≤1
Gentamicina	≤4	≤4	≤2
Tobramicina	≥16	≥16	≤2
Amikacina	32	32	≤8
Cotrimoxazol	≥4/76	≥4/76	≤2/38
Ciprofloxacino	2	0,5	≤0,5

Mediante PCR (5´CS-3´CS) se detectó la presencia de un integrón de clase I. Se realizó el mapeado del integrón mediante diferentes combinaciones de PCR y posterior secuenciación.

RESULTADOS

Así se identificó un integrón de clase I que albergaba en su zona variable los genes *bla*_{OXA-1} y *aac(6')*-Ib-cr en las cepas clínicas y los transconjugantes.

La acetilasa *aac(6')*-Ib-cr explica la resistencia a aminoglucósidos (tobramicina y amikacina) y un bajo nivel de resistencia a quinolonas. Además la cepa epidémica presentaba un cambio Ser83Leu en GyrA. No se detectó ningún cambio en ParC.

Tabla 26. Combinaciones de cebadores del estudio de integrones en *K. pneumoniae*- *bla*_{OXA-1}.

Cebadores	Amplificados
aac 6'lb-cr-F - aac 6'lb-cr-R	654 pb
OXA-F – OXA-R	1011 pb
5'CS - 3'CS	2 kb
aac(6')-I- F– OXA-R	1655 pb
OXA-F- aac 6'lb-cr-R	Negativo
5'CS - aac 6'lb-cr-R	500 pb
OXA-F – 3'CS	700 pb
IntI-F - aac 6'lb-cr-R	2,3 kb
OXA-F – <i>sull</i>	500 pb

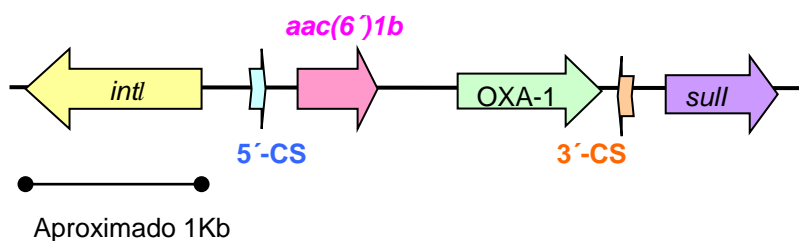


Figura 33. Estructura del integrón de clase I que albergaba los genes *aac(6')*1b y *bla*_{OXA-1} (aprox 4Kb)

2.2. Caracterización molecular de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-48} (2010-2012)

2.2.1. Descripción del brote epidemiológico

En el periodo de octubre-2010 a diciembre-2012 se detectó una brote nosocomial causado por la diseminación de una cepa de *K. pneumoniae* multiresistente que además era resistente a carbapenémicos (KP-RC) que afectó a 28 pacientes ingresados mayoritariamente en las áreas de Cirugía Digestiva y Medicina Intensiva. Todos los aislamientos (n=62) presentaban el mismo patrón de ECP que se asoció al ST101 por MLST. Este ST se relaciona con el complejo clonal 82 (CC82).

Durante el transcurso del brote, se detectaron 23 aislamientos con el mismo patrón de ECP (Kp1) asociado al ST101, presentaban el perfil de BLEE y eran sensibles a los carbapenémicos (KP-SC). En 22 pacientes se aislaron cepas KP-RC, en 14 pacientes se aislaron cepas KP-SC y en 6 pacientes se aislaron ambos tipos.

Nº pac

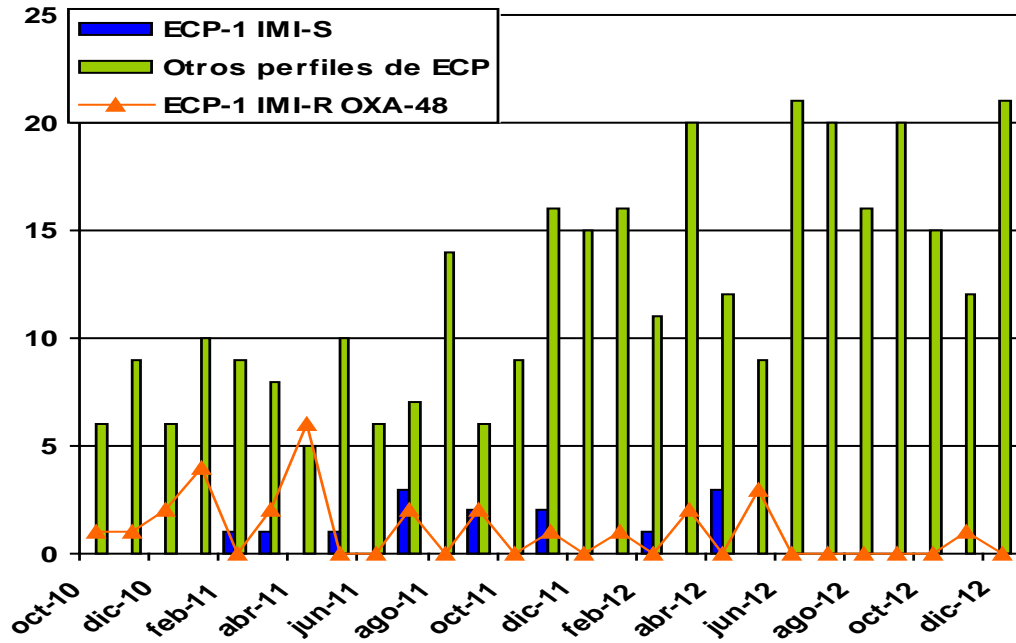


Figura 34. Detección de muestras clínicas (1 por paciente) de cepas *K. pneumoniae* con perfil de ECP-1 KP-RC, perfil ECP-1 KP-SC y con otros perfiles de ECP.

2.2.2. Caracterización de los aislamientos

Se detectó por PCR presencia del gen *bla*_{OXA-48} y de un gen de la familia *bla*_{CTX-M-1} que tras secuenciación se identificó como *bla*_{CTX-M-15} en los aislamientos KP-RC. Mientras que en los aislamientos KP-SC sólo se detectó el gen *bla*_{CTX-M-15}.

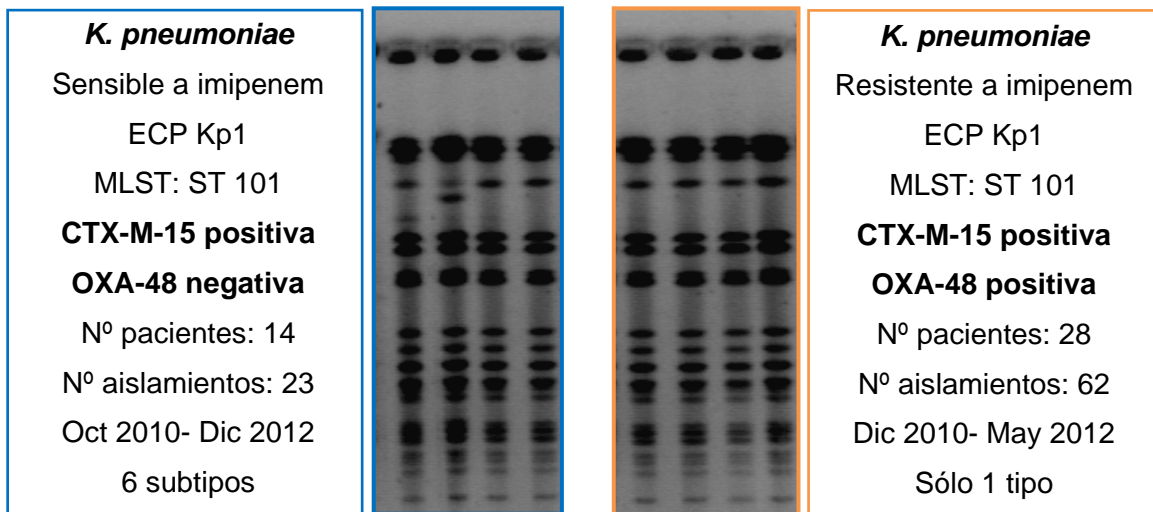


Figura 35. Características de las cepas de *K. pneumoniae* ST101, sensibles (KP-SC) y resistentes (KP-RC) a carbapenémicos.

Todos los aislamientos fueron resistentes a gentamicina, ciprofloxacino y cotrimoxazol. Los aislamientos KP-RC presentaban CMI de los carbapenémicos entre rangos intermedios y de resistencia. Mediante el test de Hodge se demostró la actividad hidrolítica frente a imipenem. Además, se observó sinergia entre el ácido clavulánico y los carbapenémicos, lo que sugirió la presencia de una carbapenemasa. Entre los aislamientos KP-SC las CMI de los carbapenémicos fueron $<2 \mu\text{g/ml}$, el test de Hodge fue negativo y no se observó sinergia entre los carbapenémicos y el ác. clavulánico. El intervalo de las CMI de los carbapenémicos para los aislamientos resistentes fue: imipenem (2- $>32 \mu\text{g/ml}$), meropenem (4- $>32 \mu\text{g/ml}$) y ertapenem (8- $>32 \mu\text{g/ml}$). Las cepas con CMI de imipenem más elevadas ($>32 \mu\text{g/ml}$) presentaron resistencia a la cefoxitina, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de resistencia adicional de pérdida de porinas (Tabla 27).

Tabla 27. Sensibilidad antibiótica de los aislamientos KP-RC y KP-SC

Antimicrobiano	Rango de CMI's (mg/L)	
	KP-RC	KP-SC
Amikacina	<8	<8
Cotrimoxazol	>4	>4
Ciprofloxacino	>2	>2
Imipenem	2 / >32	<2
Meropenem	4 / >32	<2
Ertapenem	8 / >32	<8

2.2.3. Determinación del análisis plasmídico

El análisis plasmídico y la localización genética de la carbapenemasa *bla*_{OXA-48} se estudió en 3 aislamientos de KP-RC (2 muestras clínicas del brote y una cepa control, *K. pneumoniae* 7680) y 2 de KP-SC. La extracción de ADN se realizó mediante columnas del kit “*Quiagen plasmid MidI*”.

Los extractos obtenidos fueron comparados con las cepas *Escherichia coli* NCTC 50193 (CECT678) y NCTC 59192 (CECT679), que portan plásmidos de tamaño conocidos (rango de 154 a 2 kb).

Se encontraron 6 plásmidos en los aislamientos KP-RC y 5 plásmidos en los aislamientos KP-SC, con un rango de tamaño de 1,9 kb a 70 kb. El perfil plasmídico fue idéntico en los aislamientos KP-RC de muestras clínicas y en la cepa control.

Este perfil plasmídico se encontró también en los aislamientos KP-SC a excepción de una estructura de 70 kb que aparecía en los aislamientos KP-RC y en la cepa control y que no se detectaba en los aislamientos KP-SC.

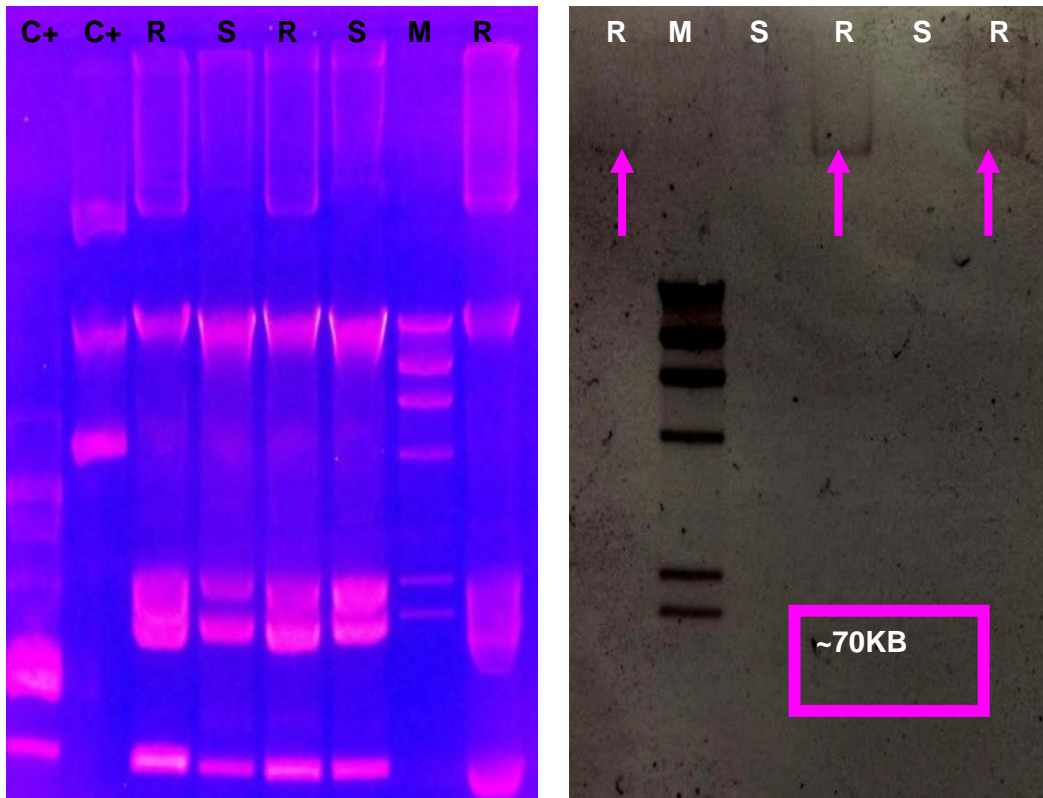


Figura 36: Análisis plasmídico. La hibridación de la sonda de *bla_{OXA-48}* con el gel en la posición del plásmido de aproximadamente 70 kb demostraron la presencia del gen *bla_{OXA-48}* en este plásmido no detectado en los aislamientos KP-SC.

M: marcador de peso molecular, R: aislamientos KP-RC, S: aislamientos KP-SC,

C+: controles positivos

La localización del gen *bla_{OXA-48}* se realizó mediante *Southern blot* e hibridando nuestro gel con la sonda preparada de *bla_{OXA-48}* con dUTP-digoxigenina y revelándola con el anticuerpo antidigoxigenina. La hibridación de la sonda con la

estructura de 70 kb demostró la presencia del gen *bla*_{OXA-48} en esta estructura de los aislamientos KP-RC y de la cepa control.

2.2.4. Características clínicas de los pacientes

Ocho de los 28 pacientes con aislamientos KP-RC manifestaron sólo colonización y los 20 restantes mostraron infección. De los pacientes infectados, 19 recibieron tratamiento antibiótico, considerándose tratamiento adecuado en 16 pacientes (tigeciclina, carbapenémicos, colistina, amikacina y fosfomicina). La tigeciclina fue un tratamiento eficaz en 5 de los 7 pacientes tratados con este antibiótico.

Entre los pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* sensibles a carbapenémicos (KP-SC) 5 mostraron colonización y 9 infección. En 8 de estos 9 pacientes el tratamiento de las infecciones causadas por KP-SC fueron los carbapenémicos, siendo la tigeciclina el antibiótico elegido para el último paciente, el cual tuvo una evolución favorable.

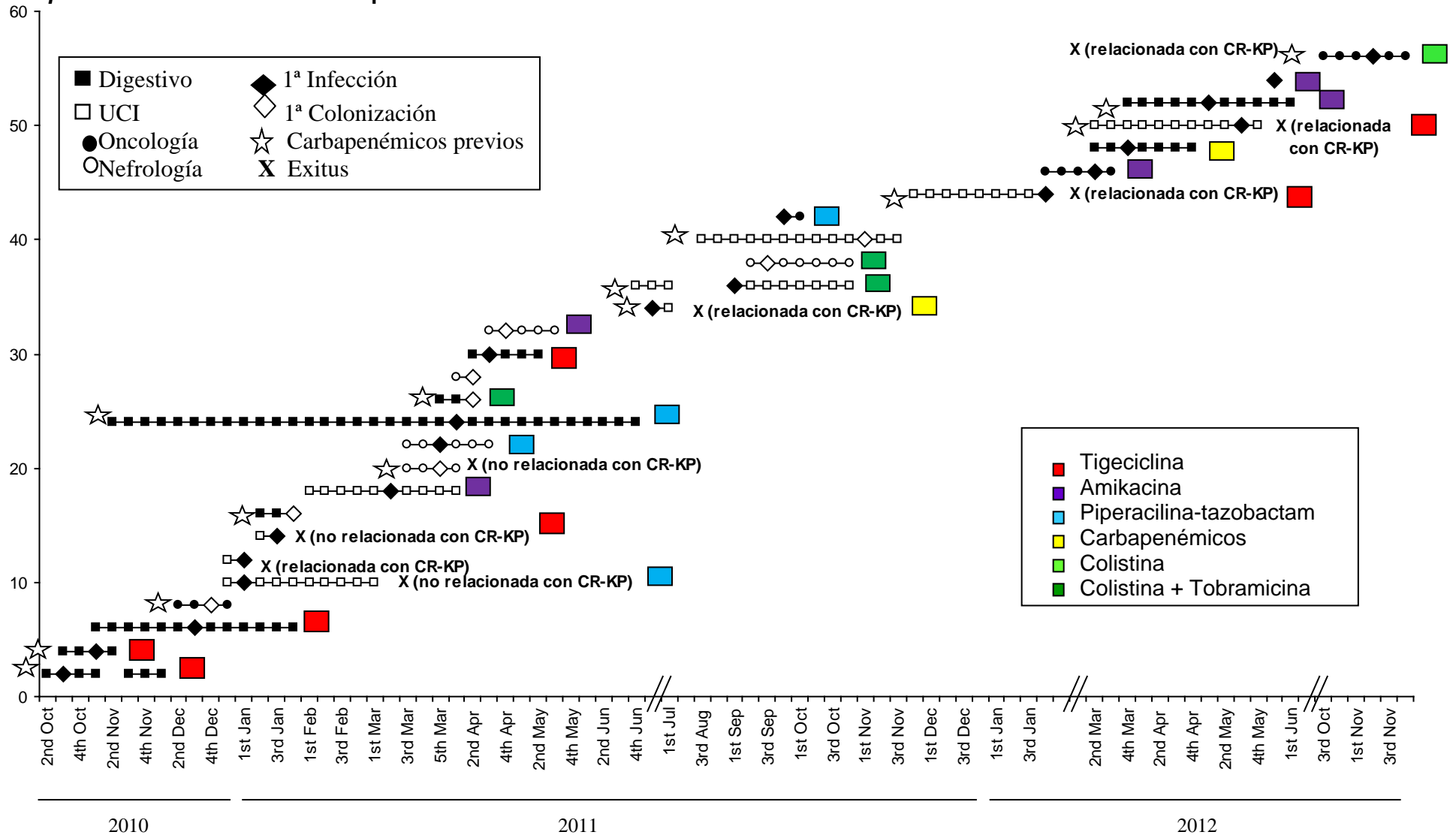
La tasa de mortalidad entre los pacientes infectados/colonizados para KP-RC fue de 8/28 (28,6%) y 2/14 (14,3%) para KP-SC. Dos pacientes con aislamiento KP-RC fallecieron dentro de las primeras 48 horas tras la detección de la infección. Uno de ellos había recibido piperacilina/tazobactam al cual la cepa era resistente y el otro no recibió tratamiento antibiótico. La mayoría de los pacientes infectados con KP-RC y tratados correctamente (n=11, 68,75%) evolucionaron satisfactoriamente. Cinco pacientes con tratamiento adecuado fallecieron: en uno de ellos la defunción no estuvo relacionada con la infección, mientras que la defunción se asoció a la infección en los otros cuatro casos.

Entre los paciente fallecidos, uno de ellos sufrió una neumonía asociada a ventilación mecánica y los otros tres presentaron cuadros clínicos compatibles con shock séptico de diferente origen.

Entre los pacientes con aislamientos KP-SC, hubo una muerte relacionada con la infección, a pesar de que el paciente fue tratado con carbapenémicos y otra no relacionada con la infección.

Considerando globalmente los 28 pacientes afectados por la cepa epidémica, todos los pacientes presentaron otras enfermedades de base y 17 de ellos (14 KP-RC y 3 KP-SC) habían recibido carbapenémicos previamente.

Figura 37: Presentación y evolución de los 28 pacientes afectados (8 colonizados y 20 infectados) por las cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos



DISCUSIÓN

OBJETIVO 1. Estudio de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con bacteriemia en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013)

1.1. Epidemiología clínica y molecular de la bacteriemia causada por *K. pneumoniae* (2007-2009)

K. pneumoniae es un importante patógeno Gram negativo causante de bacteriemias en todo el mundo y cuya epidemiología ha sido ampliamente estudiada en el ambiente hospitalario asociada a la diseminación de cepas multirresistentes (Haddy *et al.*, 1989; Tsay *et al.*, 2002; Bodró *et al.*, 2013; Tseng *et al.*, 2013; Koupetori *et al.*, 2014). Además de estas cepas multirresistentes, *K. pneumoniae* es una causa frecuente de otras infecciones nosocomiales de origen endógeno (bacteriemia de catéter, infección urinaria, infección quirúrgica, etc.) (Marschall *et al.*, 2009; Pien *et al.*, 2010). En la comunidad, *K. pneumoniae* es la segunda causa más frecuente de infección urinaria y también de la bacteriemia Gram negativa comunitaria (Ko *et al.*, 2002; Decré *et al.*, 2011; Isendahl *et al.*, 2014).

Con el objetivo de conocer las características clínicas y microbiológicas asociadas a la bacteriemia por *K. pneumoniae*, analizamos los episodios de bacteriemia nosocomiales (B-NOS), asociados a la asistencia sanitaria (B-ACS) y comunitarios (B-AC) durante un periodo de tres años (Friedman *et al.*, 2002). La mayoría (66%) de los episodios fueron nosocomiales.

Aunque la media de edad de los pacientes fue superior a 60 años en los tres grupos, los pacientes con bacteriemia comunitaria fueron los de mayor edad. Este hecho está relacionado con un aumento de enfermedades subyacentes en este grupo de pacientes. Por otro lado, los pacientes con bacteriemia B-NOS y B-ACS son más jóvenes y entre ellos es más frecuente la presencia de cáncer y además de enfermedad cardiovascular entre los pacientes con bacteriemia B-NOS.

En relación con el foco de la bacteriemia, el urinario y el biliar fueron los más frecuentes entre las B-AC y las B-ACS, mientras que en la B-NOS el foco más frecuente fue la bacteriemia de catéter. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios realizados (Ko *et al.*, 2002; Tsay *et al.*, 2002; Meatherall *et al.*, 2009). Finalmente, es destacable que la bacteriemia primaria estuvo presente en más del 10% de los episodios.

La producción de BLEEs entre los aislamientos bacteriémicos de nuestro estudio fue del 8,6%, siendo la familia CTX-M la mayoritaria ya que es la familia de BLEEs que predomina en nuestro entorno (Coelho *et al.*, 2009b; Coelho *et al.*, 2010a; Ruiz de *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2012; Calbo *et al.*, 2015). Aunque se detectaron cepas productoras de BLEEs en los 3 grupos de pacientes, la frecuencia fue superior entre la bacteriemia B-NOS y la B-ACS lo que refleja que el ambiente hospitalario es uno de los principales focos de este tipo de microorganismos como se ha descrito en otros trabajos (Paterson *et al.*, 2004; Marra *et al.*, 2006; Meatherall *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2011; Hongsuwan *et al.*, 2014). El aumento de la prevalencia de las cepas productoras de BLEEs se ha asociado con la estancia hospitalaria prolongada, los procesos invasivos y el tratamiento antibiótico previo.

Es destacable entre nuestros aislamientos el porcentaje de resistencia a quinolonas y a trimetoprim/sulfamethoxazol, lo que limita su uso como tratamiento empírico. Al igual que se ha descrito en *E. coli*, la resistencia a quinolonas está relacionada con el tratamiento previo con quinolonas. Además, en los últimos años es cada vez más frecuentes la co-resistencia entre fluoroquinolonas y cotrimoxazol, probablemente debido a la diseminación de integrones que albergan genes de resistencia a estos dos grupos de antibióticos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2007; Talan *et al.*, 2008; van der Starre *et al.*, 2011).

La diversidad genética de los aislamientos de *K. pneumoniae* no ha sido muy estudiada fuera de los brotes de infección nosocomial causados por cepas multirresistentes. Nuestro estudio muestra una elevada diversidad genética en los tres grupos de cepas estudiadas (B-NOS, B-AC y B-ACS). Esta heterogeneidad genética fue una limitación para establecer grupos clonales asociados a determinados focos de infección, algo similar a lo descrito en otro estudio reciente que no encontró ninguna relación entre la patogenicidad y los ST específicos (Lin *et al.*, 2014b).

Sin embargo, se encontró un *cluster* en la B-NOS que agrupó a 13 pacientes con episodios debidos al ST14 asociados a una cepa productora de OXA-1 y resistente a quinolonas y aminoglucósidos (Cubero *et al.*, 2013b).

Hay que destacar que 7 STs se encontraron en todos los grupos de bacteriemia, lo que indica la presencia de algunos clones mayoritarios entre las cepas de *K. pneumoniae* que son causa de infección endógena. Entre estos STs presentes en los tres grupos se encuentran los clones internacionales de

K. pneumoniae descritos por Brisse (ST13, ST15, ST17, ST35, ST37, ST42 y ST45) (Brisse *et al.*, 2009).

1.2. Análisis de la prevalencia de clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* como causa de bacteriemia

Desde los años 80, en el Sudeste Asiático y especialmente en Taiwan, se ha detectado un incremento de infecciones causadas por *K. pneumoniae* adquiridas en la comunidad. Estas infecciones se asociaron con abscesos hepáticos piogénicos de adquisición comunitaria (*community acquired pyogenic liver abscess*; CA-PLA) causados por cepas de *K. pneumoniae* con un fenotipo hipermucoviscoso. El fenotipo hipermucoviscoso se asocia con varias cepas de los serotipos K1 y K2 que son los clones más virulentos y se relacionan con el CA-PLA (Fang *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2007; Turton *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2012).

Otra característica de las cepas causantes de estas infecciones es la capacidad que tienen de causar metástasis sépticas (Fang *et al.*, 2004; Karama *et al.*, 2008; Rivero *et al.*, 2010; Decré *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2013).

Fuera de Asia, se han publicado casos en Norte América y en Europa en pacientes con CA-PLA causado por las cepas de *K. pneumoniae* hipermucoviscosas (Fang *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2007). En estudios realizados en varios países se ha detectado poca diversidad genética entre este tipo de cepas demostrando la existencia de unos clones mayoritarios (K1 y K2) entre las cepas hipermucoviscosas (Turton *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2013). Las

cepas pertenecientes a los serotipos K1 y K2 son más virulentas que las pertenecientes a otro serotipos, fundamentalmente debido a la resistencia a la fagocitosis que confieren estos dos tipos capsulares (Li *et al.*, 2014b). Aunque se describió un caso en 2007 en Madrid, nuestro estudio es el primero en España que estudia la prevalencia de este tipo de cepas (Gómez *et al.*, 2007).

La frecuencia del fenotipo hipermucoviscoso fue bajo (6%); es más, si sólo se considera la presencia de los clones virulentos K1 (1,8% n=16) o K2 (0,9% n=8) la prevalencia todavía fue menor (2,7%; 24/878). Esta baja prevalencia detectada en nuestra área geográfica es similar a la encontrada en otros países europeos. Algunos estudios detectaron un mayor número de aislamientos pertenecientes al serotipo K2 (5,0%; 7/139) que al serotipo K1 (1,4%; 2/139), aunque dado el bajo número de aislamientos las diferencias no son significativas (Turton *et al.*, 2007; Maatallah *et al.*, 2014). De todos modos, la frecuencia de estas cepas en Europa es mucho más baja que la descrita en los países asiáticos. Por ejemplo, en un estudio realizado en Taiwan revela que el 18,2% (41/225) de los aislamientos de bacteriemia causadas por *K. pneumoniae* pertenece al serotipo K1 y el 16,4% (37/225) al serotipo K2 (Liao *et al.*, 2011).

Al igual que en otros estudios, encontramos cepas con fenotipo hipermucoviscoso que no albergaban ninguno de los dos genes asociados a dicho fenotipo. Estas cepas presentaban una elevada diversidad capsular y ninguna de ellas perteneció al serotipo K1 o K2.

Nuestros resultados son concordantes con otros descritos previamente (Yeh *et al.*, 2006; Turton *et al.*, 2007), por lo que se puede concluir que la hipermucoviscosidad no es un indicador 100% fiable en la detección de clones hipervirulentos que expresen los genes *magA* y/o *rmpA*. Según Shon, algunos

cambios en la composición del lipopolisacárido podría justificar la presencia del fenotipo hipermucoviscoso (Shon *et al.*, 2013).

Desde un punto de vista clínico, los episodios de bacteriemia causados por cepas hipermucoviscosas de *K. pneumoniae* se pueden dividir en dos grupos según la presencia de los genes *magA* y/o *rmpA*. Los pacientes del primer grupo [*magA*(+) y/o *rmpA*(+)] presentaban mayoritariamente PLA, neumonía y bacteriemia primaria, mientras que los pacientes del segundo grupo [*magA*(-)/*rmpA*(-)] presentaban características clínicas similares a las bacteriemias clásicas por *K. pneumoniae* asociadas principalmente con infecciones del tracto urinario y del tracto biliar (Turton *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2014a).

Las cepas del serotipo K1 se pueden clasificar en dos complejos clonales: el más prevalente CC23^{K1} asociado con CA-PLA y diseminado mundialmente y el CC82^{K1} asociado con infección respiratoria (Brisse *et al.*, 2009; Decré *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2012; Gundestrup *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015).

En nuestro estudio todas las cepas del serotipo K1 fueron del ST23-K1, que se incluye en el CC23^{K1}. Entre los aislamientos *magA*(-)/*rmpA*(+) se encontraron cepas del serotipo K2 y de otro serotipo no-K1/K2. Entre las cepas del serotipo K2 de nuestro estudio encontramos 5 STs diferentes: ST380, ST86, ST65, ST25 y ST493, lo que indica mayor diversidad genética. Sin embargo, todos los STs excepto ST493 pertenecían a los CC380, CC86 y CC65 (ST65 y ST25) y pertenecían a los alelos *wzi* 2 y 72 descritos previamente (Brisse *et al.*, 2009; Decré *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014). Además, las 3 cepas no-K1/K2 *magA*(-)/*rmpA*(+) pertenecían a un nuevo ST1013 y un nuevo alelo *wzi* 122.

El tercer grupo de cepas [*magA*(-)/*rmpA*(-)] mostró una gran diversidad genética con 23 STs diferentes en 25 aislamientos y gran variación entre los alelos *wzi*.

Nuestros resultados sugieren que el test del hilo no es suficiente para analizar la epidemiología de las infecciones causadas por cepas hipermucoviscosas de *K. pneumoniae* y que son necesarios estudios moleculares complementarios para identificar los clones virulentos (Li *et al.*, 2014b). Aun así, el test del hilo es un buen método de cribado para seleccionar las cepas a las que se debe realizar la caracterización molecular.

Las características asociadas a estos clones hipervirulentos se relacionan más con el genotipo que con el fenotipo. Un estudio reciente mediante la secuenciación del genoma completo de diferentes aislamientos de *K. pneumoniae* encuentra diferencias entre los diferentes grupos clonales con el perfil de multirresistencia y con la hipervirulencia (Bialek-Davenet *et al.*, 2014). En nuestro estudio sólo encontramos resistencia antibiótica entre las cepas hipermucoviscosas no relacionadas con los clones hipervirulentos. Además, los aislamientos de los serotipos K1 y K2 de nuestro estudio fueron completamente sensibles coincidiendo con trabajos previos (Chang *et al.*, 2013; Bialek-Davenet *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con otro estudio realizado en China que analizaba cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* por métodos moleculares y que no encontró cepas con resistencia a los antibióticos (Li *et al.*, 2014b).

En nuestro estudio, el 75% de los pacientes con clones hipervirulentos y bacteriemia presentaban enfermedades de base. Los pacientes con enfermedades de base como diabetes mellitus, cáncer o insuficiencia renal son más propensos a padecer infecciones causadas por *K. pneumoniae* y por otros microorganismos. Sin embargo, los pacientes sin enfermedades de base también pueden padecer bacteriemia asociada a las cepas hipermucoviscosas (Lee *et al.*, 2010). La mortalidad a los 30 días de los pacientes con bacteriemia por clones

hipervirulentos fue superior a la de los otros pacientes coincidiendo con resultados publicados previamente (Shon *et al.*, 2013).

En países asiáticos, donde hay mayor prevalencia de estas cepas, los clones hipervirulentos K1 y K2 se asocian a infecciones comunitarias. Sin embargo, en nuestro estudio más de la mitad de las infecciones fueron de origen nosocomial o relacionadas con la asistencia sanitaria. En Europa, algunos episodios causados por cepas hipervirulentas K1 y K2 se asociaron con pacientes asiáticos o con viajeros (Decré *et al.*, 2011). Desafortunadamente, no disponemos de datos de los pacientes infectados por cepas K1 y K2 sobre viajes previos a estas zonas asiáticas con alta endemia. Probablemente los pacientes estaban colonizados en el momento de la hospitalización y desarrollaron una infección endógena durante su estancia hospitalaria. De hecho, el foco de estas infecciones fue principalmente el tracto urinario (pacientes con catéter urinario) y la bacteriemia relacionada a catéter intravenoso. Aunque no existen muchos estudios de portadores, se ha descrito la colonización del tracto gastrointestinal de personas sanas por estos clones hipervirulentos (Chung *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014a). Hay que destacar que la resistencia a la fagocitosis de los serotipos K1 y K2 les confiere una ventaja en la colonización del tracto gastrointestinal (Lin *et al.*, 2014a). Un estudio describe un *cluster* familiar entre 2 miembros de una familia que presentaron absceso hepático piogénico y un tercero miembro con colonización gastrointestinal. Las tres personas tenían una cepa de *K. pneumoniae* idéntica (ST23 y serotipo K1), lo que sugeriría una transmisión familiar por contacto doméstico (Harada *et al.*, 2011).

1.3. Relación de las características fenotípicas de *K. pneumoniae* con los clones hipervirulentos y clásicos

K. pneumoniae es una enterobacteria comensal del tracto gastrointestinal de personas sanas que como oportunista causa infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

A pesar de que la mayoría de infecciones causadas por cepas de *K. pneumoniae* en los países occidentales son debidas a las cepas “clásicas” de *K. pneumoniae*, la variante hipermucoviscosa está emergiendo por todo el mundo (Shon *et al.*, 2013). El fenotipo hipermucoviscoso confiere unas ventajas de supervivencia y presenta unos factores de virulencia que hace que estas cepas sean fácilmente reconocibles. Entre los factores de virulencia mejor estudiados están la presencia de exopolisacáridos capsulares (CPS) o de adhesinas que confieren resistencia al suero humano (Podschun *et al.*, 1998).

El CPS está ampliamente estudiado en *K. pneumoniae* mediante el uso de antisueros, amplificación del *cluster* del antígeno capsular *cps* mediante PCR para determinar el serotipo K y/o la secuenciación del gen *wzi* (Brisse *et al.*, 2004; Brisse *et al.*, 2013).

Las adhesinas juegan un papel esencial en la adhesión inicial de la bacteria a una superficie requerida, para iniciar la formación de biopelícula y también para su posterior desarrollo promoviendo el contacto celular y la agregación bacteriana. Estas adhesinas son en su mayoría fimbrias de tipo 1 y de tipo 3. Aunque no se expresan simultáneamente, la expresión de estos tipos de

fimbrias en la biopelícula varía en función de las condiciones experimentales (Stahlhut *et al.*, 2012).

En este estudio, hemos caracterizado y comparado diferentes grupos de aislamientos de *K. pneumoniae* en función del fenotipo hipermucoviscoso o no hipermucoviscoso y de la presencia de los genes asociados al fenotipo hipermucoviscoso (*magA* y/o *rmpA*).

El test de la hipermucoviscosidad mostró que la mucoviscosidad de estas cepas estaba directamente asociada con la presencia de genes y era mayor en las cepas con los dos genes (*magA* y *rmpA*).

El CPS favorece la formación de biopelícula, ayudando inicialmente a la adhesión de la biopelícula y favoreciendo más tarde su maduración (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Estudios previos muestran una asociación entre el CPS de *K. pneumoniae* y la actividad de la anti-biopelícula frente a otros microorganismos, tanto Gram negativos como Gram positivos. Aunque es un hecho independiente del serotipo, algunos serotipos como K1, K2, K35 y K52 presentan una actividad modificada de la adhesión inicial de la bacteria al sustrato y de la posterior agregación bacteriana (Goncalves *et al.*, 2014).

De todos modos, se conoce poco sobre la capacidad de *K. pneumoniae* para adherirse y formar biopelícula, especialmente en los aislamientos con fenotipo hipermucoviscoso. Por esta razón, examinamos la capacidad de formar biopelícula en los diferentes grupos de aislamientos de *K. pneumoniae*. Se observó un nivel alto de formación de biopelícula entre los aislamientos de *K. pneumoniae* asociados a abscesos hepáticos piogénicos (PLA) (Wu *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados no demostraron diferencias

significativas entre la formación de biopelícula de los aislamientos que causaron PLA y los aislamientos de otros orígenes, como la neumonía y las infecciones de tracto urinario o de tracto biliar. Esta diferencia podría ser debida al bajo número de aislamientos de PLA con presencia de *magA* y/o *rmpA*. En nuestro estudio no encontramos una asociación entre la formación de biopelícula y la presencia o ausencia del fenotipo hipermucoviscoso ni tampoco con la presencia de genes *magA* y/o *rmpA*. Este hallazgo sugiere que estos dos genes no están involucrados en la formación de biopelícula *in vitro*. Recientemente se ha publicado un artículo en el que se asocia la formación de biopelícula de cepas de *K. pneumoniae* con el fenotipo hipermucoviscoso del serotipo K1 con la presencia de tres genes (*glnA*, *sucD* y *tag*) que no afectan la producción de cápsula o la resistencia al suero. En concordancia con nuestros estudios, defienden que los genes *magA* y *rmpA* de las cepas de *K. pneumoniae* hipermucoviscosas no afectan a la formación de biopelícula (Kong *et al.*, 2012).

A pesar de no encontrar asociación entre el fenotipo hipermucoviscoso y la formación de la biopelícula, en nuestro estudio hemos observado variaciones cuantitativas en la formación de biopelícula de algunos aislamientos hipermucoviscosos de *K. pneumoniae* K1. Esta observación nos llevó a estudiar la formación de biopelícula en tubo para analizar la formación de biopelícula entre el aire y una superficie líquida. Esta biopelícula flotante que denominamos biopelícula ALI o película, representa un buen nicho ecológico ya que aporta nutrientes desde el medio líquido y oxígeno desde el aire. La biopelícula ALI se ha descrito previamente en bacterias oportunistas y en bacterias patógenas como: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Salmonella enterica* o *Vibrio cholera* (O'Toole *et al.*, 1998; Spiers *et al.*, 2003; Armitano *et al.*, 2014).

También observamos una correlación entre la formación de ALI-biopelícula y la presencia del gen *magA*, con sólo dos aislamientos que no fueron capaces de generar una película completamente cerrada en la superficie del medio líquido o que dejaban una capa de biopelícula muy leve en el centro del tubo. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que este tipo de biopelícula flotante se describe asociado a *K. pneumoniae* con el gen *magA*. Así en las cepas con sólo el gen *mpA* o sin ningún gen, el porcentaje de formación de biopelícula ALI disminuía drásticamente.

La capacidad de adhesión bacteriana es beneficiosa para la formación de biopelícula lo que tiene graves consecuencias en la salud pública contribuyendo a la cronicidad de algunas infecciones (Bjarnsholt, 2013).

Sin embargo, nuestros resultados sugieren una relación inversa entre la adhesión y la hipermucoviscosidad. También se observó una menor adhesión en los aislamientos de *K. pneumoniae* que presentaban los dos genes (*magA* y *mpA*). Estos resultados sugieren que la hipermucoviscosidad puede interferir con la capacidad de la bacteria para adherirse a una superficie sólida *in vitro*, probablemente porque la cápsula oculte las adhesinas. En los aislamientos no hipermucoviscosos, la adhesión fue variable lo que sugiere que la capacidad de adhesión varía de un aislamiento a otro.

La capacidad de las cepas hipermucoviscosas para resistir al suero humano es otro factor de virulencia importante ya que les permite evadir las defensas del huésped favoreciendo la invasión. Hay dos posibles hipótesis sobre los

mecanismos que tienen las bacterias para no ser reconocidas y resistir frente a la actividad del suero. La primera hipótesis describe la actividad del CPS para enmascarar el lipopolisacárido (LPS) cambiando la estructura de la superficie para evadir ser reconocido y evitar así la activación del complemento. La segunda hipótesis está relacionada con el enmascaramiento de la cadena O que forma parte del LPS de forma que no queda expuesta en la superficie (Merino *et al.*, 1992).

En relación a la resistencia al suero, los niveles más altos también se encontraron entre las cepas que tenían los genes *magA* y/o *rmpA*. Sin embargo, en las cepas *magA(-)/rmpA(-)*, ya fuesen del fenotipo hipermucoviscoso o no, se detectó una gran variabilidad en la resistencia al suero.

No se han encontrado condiciones *in vitro* que puedan reflejar las condiciones del huésped humano, por lo que los resultados obtenidos *in vitro* deben tomarse con precaución. En diferentes modelos animales se ha observado que aunque se utilicen las mismas condiciones *in vivo*, se pueden obtener resultados dispares. La falta de un buen modelo animal es un obstáculo para investigar la patogenicidad de las cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo hipermucoviscoso así como la de las cepas resistentes a carbapenémicos (Diago-Navarro *et al.*, 2014).

OBJETIVO 2. Caracterización de *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y multirresistentes en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (2007-2013)

2.1. Caracterización de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-1}

Los patrones de multirresistencia encontrados en *K. pneumoniae* y en otras enterobacterias normalmente se encuentran asociados a determinantes de resistencia que se localizan en la región variable de los integrones. Estos determinantes de resistencia se pueden transferir de forma horizontal intra e interespecies (Lévesque *et al.*, 1995; Oteo *et al.*, 2009). Los integrones más frecuentes pertenecen a la clase 1 y tienen una estructura que incluye dos regiones conservadas (5'CS y 3'CS) que flanquean la región variable donde se localizan los casetes genéticos. La gran variabilidad de los casetes genéticos genera una elevada diversidad de resistencia antibiótica. Debido a la fácil adquisición de los casetes de resistencia y su transferencia bajo diferentes condiciones de presión antibiótica selectiva, hay muchas combinaciones de genes que codifican la resistencia antimicrobiana. El uso prolongado de algunos antimicrobianos podría seleccionar algunos determinantes genéticos de resistencia y favorecer la aparición y la persistencia de microorganismos multirresistentes (Lévesque *et al.*, 1995; Briales *et al.*, 2012).

En mayo de 2007, se detectó en nuestro hospital un posible brote de infecciones causadas por una cepa de *K. pneumoniae* multirresistente (Lévesque *et al.*, 1995; Cubero *et al.*, 2013c).

Durante los dos años del periodo estudiado (2007-2009), se aislaron cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de muestras clínicas que tenían un patrón de multirresistencia común; con resistencia a aminopenicilinas, ureidopenicilinas, tobramicina, amikacina, ciprofloxacina, amoxicilina/ác. clavulánico y piperacilina/tazobactam. Además presentaban sensibilidad disminuida a cefepime.

La tipificación molecular detectó un mismo patrón de ECP con secuenciotipo 14 (ST14). Este ST es el fundador del complejo clonal 14 (CC14), originalmente descrito entre los aislamientos nosocomiales de varios países (Diancourt *et al.*, 2005).

Las cepas del serotipo CC14/K2 se han asociado con brotes nosocomiales y con la diseminación global de resistencia antibiótica en *K. pneumoniae* (Diancourt *et al.*, 2005). Por ejemplo, la cepa epidémica detectada en Hungría que producía CTX-M-15 y pertenecía al CC14. A este mismo CC pertenecía la cepa epidémica productora de KPC aislada en varios centros del Medio Oeste de Estados Unidos (Hrabák *et al.*, 2009). A estos clones epidémicos se les ha comparado con las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina pertenecientes al clon USA300 y se les denominó como los “nuevos MRSA” (Damjanova *et al.*, 2008; Hrabák *et al.*, 2009). Estos antecedentes justifican la necesidad de vigilar no sólo las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs o de carbapenemasas sino también las otras cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes (MDR-*K. pneumoniae*).

En nuestro estudio todas las cepas epidémicas producían la β -lactamasa OXA-1. Esta enzima está ampliamente diseminada en la familia *Enterobacteriaceae* y es una causa muy común de la resistencia a amoxicilina/ác. clavulánico especialmente en *E. coli* y *Salmonella enterica* (Machado *et al.*, 2006; Oteo *et al.*, 2009). En estudios previos de *K. pneumoniae* aisladas en nuestro hospital, el gen OXA-1 se había asociado con la sensibilidad disminuida del cefepime en *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este hallazgo también se ha observado en la cepa epidémica (Aubert *et al.*, 2001; Briales *et al.*, 2012).

La resistencia a quinolonas se asoció con el gen *aac(6')/lb-cr* tanto en las cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes como en sus transconjugantes. La enzima *aac(6')/lb* es una enzima modificante de aminoglucósidos que confiere resistencia a tobramicina y amikacina (Miró *et al.*, 2013). La nueva variante de esta enzima, *aac(6')/lb-cr*, modifica quinolonas, confiriendo a las cepas de *K. pneumoniae* un bajo nivel de resistencia (Briales *et al.*, 2012). Además nuestra cepa epidémica tenía cambios en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de GyrA (Ser83Tyr) (Damjanova *et al.*, 2008). La mutación en GyrA y la presencia de la enzima *aac(6')/lb-cr* justifican los niveles de resistencia a quinolonas observados que son clínicamente relevantes (Briales *et al.*, 2012).

Los brotes nosocomiales debidos a las enterobacterias multirresistentes constituyen un serio problema a nivel mundial, debido especialmente a la diseminación de cepas productoras de BLEEs o de carbapenemasas (Peña *et al.*, 1998; Bradford, 2001; Coelho *et al.*, 2010b; Hendrik *et al.*, 2015). La β -lactamasa OXA-1 está ampliamente extendida entre las enterobacterias y se ha descrito en aislamientos de pacientes hospitalizados, de pacientes con infecciones adquiridas

en la comunidad e incluso de cepas aisladas en aguas residuales. La amplia diseminación del gen *bla*_{OXA-1} está asociada con integrones que frecuentemente portan además otros determinantes como es el caso de la enzima *aac(6')Ib*, o BLEEs de la familia *bla*_{CTX-M-15} o carbapenemasas (Coelho *et al.*, 2009a). Además, los integrones de clase I que portan los genes *bla*_{OXA-1} -*aac(6')Ib-cr* en su región variable y se han descrito en cepas de *E. coli* y *Salmonella enteritidis* multirresistentes (Brisse *et al.*, 2001; Briales *et al.*, 2012). Aunque las cepas de *K. pneumoniae* del CC14 han sido detectadas entre aislamientos productores de BLEE en España, nuestro estudio describe el primer brote epidémico causado por una cepa de *K. pneumoniae* del ST14 y que portaba los genes *bla*_{OXA-1} y *aac(6')Ib-cr* sin producción de BLEEs (Oteo *et al.*, 2009).

Las cepas multirresistentes del ST14, se han detectado en distintos países europeos, Estados Unidos, Tanzania y Argentina (Quiroga *et al.*, 2007; Oteo *et al.*, 2009; Mshana *et al.*, 2013). La presencia de pacientes colonizados o infectados por cepas multirresistentes durante un largo periodo supone un riesgo para la diseminación en el entorno hospitalario sobre todo en las unidades de alto riesgo como la UCI. En nuestro estudio *K. pneumoniae* fue adquirida en la UCI en más de un 25% de los pacientes.

La producción de OXA-1 no confiere resistencias a muchos antibióticos β -lactámicos, por lo que plantea un problema menor al de las cepas productoras de BLEEs. Sin embargo, la presencia de un integrón en las *K. pneumoniae* productoras de OXA-1, podría favorecer la incorporación de nuevos determinantes de resistencia con la consiguiente reducción de las opciones terapéuticas.

2.2. Caracterización molecular de un brote causado por *K. pneumoniae* productora de *bla*_{OXA-48}

La resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* es un problema creciente en el entorno hospitalario que limita el uso terapéutico de este grupo de antibióticos. Aunque hay varias familias de enzimas con actividad carbapenemasa, las más importantes son las KPC (carbapenemasa de clase A inhibida por ácido clavulánico) y las VIM (carbapenemasa de clase B inhibida por EDTA) (Tzouveleki *et al.*, 2012). Sin embargo, desde hace unos años, se observa un incremento progresivo de otras enzimas. Es el caso de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas del tipo OXA-48 (clase D), que se han asociado con brotes nosocomiales en países del área Mediterránea. La primera descripción de estas cepas se realizó en Turquía en el año 2004 y desde entonces se han diseminando rápidamente y se ha detectado la producción de OXA-48 también en otras especies como *E. coli*, *Enterobacter cloacae* o *Citrobacter freundii* (Poirel *et al.*, 2004; Carrer *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2013; Oteo *et al.*, 2014). En nuestro estudio documentamos un brote debido a la diseminación de una cepa de *K. pneumoniae* productora de la β -lactamasa CTX-M-15 y de la carbapenemasa OXA-48. La enzima OXA-48 se ha descrito en varios clones de *K. pneumoniae* (ST101, ST11, ST14, ST15, ST147, ST395 y ST405), distribuidos por Europa y sobre todo por algunos países mediterráneos (Paño-Pardo *et al.*, 2013; Voulgari *et al.*, 2013; Liapis *et al.*, 2014; Lopez-Cerero *et al.*, 2014; Oteo *et al.*, 2015; Gottig *et al.*, 2015). Los clones más prevalentes son ST101, ST11 y ST405. Nuestra cepa epidémica productora de los dos enzimas (CTX-M-15 y OXA-48) era del ST101,

el cual también se había detectado en otros países europeos y mediterráneos, sugiriendo una diseminación continental de este clon multirresistente que todavía no se ha conseguido erradicar (Carrer *et al.*, 2010; Pitart *et al.*, 2011; Adler *et al.*, 2011; Oteo *et al.*, 2015).

Los pacientes admitidos en nuestro hospital con aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (KP-RC), compartían algunas características clínicas con otros pacientes admitidos en otros hospitales de nuestra zona geográfica, que tenían aislamientos de *K. pneumoniae* con el mismo patrón de resistencia y causaron brotes epidémicos similares (Carrer *et al.*, 2010; Pitart *et al.*, 2011; Oteo *et al.*, 2015). Se trataba de pacientes con enfermedades de base, que habían estado expuestos a una presión antibiótica que favoreció la infección por *K. pneumoniae* multirresistentes de adquisición hospitalaria. Estas infecciones se relacionaron con cirugía previa u otros procedimientos invasivos (como catéter venoso central o catéter urinario). Aunque no se ha publicado ningún estudio de casos y controles, el tratamiento previo con carbapenémicos se ha identificado como factor de riesgo en varios estudios (Cuzon *et al.*, 2011). En nuestro estudio, 14 pacientes habían recibido tratamiento con carbapenémicos previo al aislamiento de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos.

Durante el periodo de estudio (de octubre 2010 a diciembre 2012) se detectaron cepas de *K. pneumoniae* que compartían el mismo perfil de ECP, pero que sin embargo eran sensibles a carbapenémicos. Estas cepas expresaban la β -lactamasa CTX-M-15 pero no la carbapenemasa OXA-48 y pertenecían al mismo secuenciotipo (ST101).

La producción simultánea de una BLEE y la carbapenemasa OXA-48 en cepas de *K. pneumoniae* es frecuente y se asocia a la presencia de plásmidos (Villa *et al.*, 2014). En nuestro estudio la co-existencia de la cepa resistente a carbapenémicos y la cepa sensible se explica por la presencia de los genes *bla*_{OXA-48} y *bla*_{CTX-M-15} en elementos móviles o plásmidos independientes. De hecho, el gen *bla*_{OXA-48} se localizó en un plásmido de alrededor de 70kb del tipo IncL/M, previamente descrito (Carrer *et al.*, 2010; Potron *et al.*, 2013).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de carbapenémicos de nuestras cepas de *K. pneumoniae* productoras de OXA-48 abarcan un amplio rango. Siguiendo los criterios del *EUCAST*, las CMI de los carbapenémicos en estas cepas oscilaron desde el rango intermedio hasta el resistente, con la excepción de 7 aislamientos que tenían una CMI de imipenem de 2 µg/ml. Además, todos nuestros aislamientos presentaban CMI de ertapenem entre 4 y >32 µg/ml, que se consideran resistentes. Es bien conocido que las CMI de ertapenem se alteran fácilmente en aislamientos productores de carbapenemasas y este hecho se observa en nuestras cepas. Por lo tanto, la resistencia a ertapenem es una buena alerta microbiológica para detectar aislamientos productores de carbapenemasas. Por otro lado, los aislamientos con CMI elevadas a los carbapenémicos (por ejemplo, CMI imipenem >32 µg/ml) presentan también resistencia a cefoxitina, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos de resistencia como la pérdida de porinas (Ardanuy *et al.*, 1998; Queenan *et al.*, 2007; Pitart *et al.*, 2011).

Las opciones terapéuticas en pacientes infectados por cepas resistentes a carbapenémicos son limitadas en nuestro estudio y los clínicos a menudo deben recurrir a antibióticos con mayor toxicidad, como la colistina que en

nuestro estudio se usó satisfactoriamente en 4 pacientes (O'Brien *et al.*, 2011; Tasina *et al.*, 2011). Las β -lactamasas de la familia OXA se inhiben mal por los inhibidores de β -lactamasas, por lo que, las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas no pueden ser utilizadas en la clínica (Falagas *et al.*, 2011). Otros antibióticos β -lactámicos como el aztreonam y las cefalosporinas de espectro extendido son teóricamente útiles en infecciones causadas por cepas productoras de OXA-48, aunque la asociación con CTX-M-15 en nuestro brote excluyó su uso en nuestros pacientes (O'Brien *et al.*, 2011). Hay una experiencia limitada en cuanto al uso de la tigeciclina, la cual parece tener baja efectividad en el tratamiento de las infecciones causadas por cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (Falagas *et al.*, 2011). En nuestra experiencia este antibiótico fue efectivo en 5 de 7 pacientes que se curaron con tigeciclina, aunque en tres casos el antibiótico fue acompañado de drenaje quirúrgico del absceso. Otros dos pacientes tratados con tigeciclina murieron, en un caso la muerte no estuvo relacionada con la infección mientras que el otro falleció debido a un shock séptico. El uso de carbapenémicos para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de OXA-48 con CMIs de carbapenémicos en el rango intermedio de resistencia es un tema que genera controversia. En un brote descrito recientemente, algunos casos esporádicos se trataron con carbapenémicos sin obtener buenos resultados, aunque es cierto que la información respecto a este tratamiento es muy limitada (Pogue *et al.*, 2011). En nuestro estudio, 4 pacientes con infecciones causadas por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos recibieron tratamiento con carbapenémicos (casos en los cuales la cepa presentaba una sensibilidad intermedia frente al carbapenémico seleccionado

como tratamiento), mientras que en 2 de ellos el carbapenémico se asoció con otro antibiótico (amikacina o fosfomicina). En estos casos el efecto del inóculo es probablemente una variable importante que pudiese explicar el resultado favorable obtenido en estos pacientes (O'Brien *et al.*, 2011). La probable utilidad de la infusión continua no se probó entre nuestros pacientes a pesar de estar descrita previamente (Patel *et al.*, 2008).

Comentario final

En este trabajo se ha mostrado que *Klebsiella pneumoniae* es un importante patógeno nosocomial y comunitario causante de infecciones urinarias, abdominales y respiratorias. Las cepas clínicas que causan bacteriemia presentan una elevada variabilidad genética, sin embargo se han identificado algunos clones mayoritarios. Entre ellos, algunos agrupan a las cepas hipervirulentas y otros a las cepas multirresistentes. Los factores de virulencia son diversos en este género bacteriano algunos se relacionan con determinados genotipos y otros muestran mayor diversidad. *K. pneumoniae* es capaz de formar diferentes tipos de biopelículas y de resistir a la actividad bactericida del suero humano. La presencia de elementos genéticos móviles se asocia con la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y a otros grupos de antibióticos como las quinolonas y los aminoglucósidos. Los determinantes de virulencia y la resistencia antibiótica son dos factores importantes que marcan las infecciones causadas por este género bacteriano.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de *K. pneumoniae* que causan bacteriemia son genéticamente diversas con independencia del foco de infección y de la adquisición intra o extrahospitalaria.
2. La bacteriemia por *K. pneumoniae* aparece en pacientes con enfermedades de base. Los focos principales de la bacteriemia extrahospitalaria son urinario y biliar, mientras que en la nosocomial es la bacteriemia asociada a catéter.
3. La bacteriemia causada por clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* (CC23K1, CC86K2, CC65K2 y CC380K2) es muy poco frecuente en nuestra área geográfica.
4. El test de la hipermucoviscosidad (*string test*) es un buen método de cribado, pero es insuficiente para detectar los clones hipervirulentos. Los estudios moleculares (PCR de *magA* y *rmpA*) son necesarios para confirmar la hipervirulencia.
5. La bacteriemia por clones hipervirulentos se asocia a infecciones comunitarias y nosocomiales, siendo los focos principales el absceso piógeno hepático y la neumonía.
6. Las cepas hipervirulentas K1/K2 de *K. pneumoniae* presentan mayor hipermucoviscosidad, mayor resistencia al suero y mayor producción de biopelícula aire-líquido.
7. La adhesión a superficie sólida es más rápida en las cepas hipermucoviscosas no K1/K2 que en las cepas clásicas o en las hipervirulentas.

- 8.** La diseminación de una cepa de *K. pneumoniae* del ST14, productora de una β -lactamasa tipo OXA-1, causó un brote de infecciones nosocomiales en el Hospital Universitari de Bellvitge. La multirresistencia antibiótica de esta cepa se debió a la presencia de un integrón de clase I que albergaba los genes *bla*_{OXA-1} y *aac(6')Ib-cr*.
- 9.** La propagación de la cepa de *K. pneumoniae* ST101 productora de CTX-M-15 y OXA-48 fue la causa del aumento de resistencia a carbapenémicos en el periodo (2010-2012).
- 10.** La pérdida del plásmido que alberga la OXA-48 explica el aislamiento simultáneo de cepas isogénicas sensibles a carbapenémicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2015a;)
2. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2015b;)
3. **Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Dhaher Y, Edgar R, Solter E, Benenson S, Masarwa S, and Carmeli Y.** Introduction of OXA-48-producing Enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. *J.Antimicrob.Chemother.* **2011; 66** (2763-2766)
4. **Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, and Baddour LM.** Epidemiology and outcome of *Klebsiella* species bloodstream infection: a population-based study. *Mayo Clin.Proc.* **2010; 85** (139-144)
5. **Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, and Tay ST.** Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. *Biomed.Res.Int.* **2014; 2014** (601630)
6. **Alberti S, Marques G, Camprubi S, Merino S, Tomas JM, Vivanco F, and Benedi VJ.** C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect.Immun.* **1993; 61** (852-860)
7. **Allen BL, Gerlach GF, and Clegg S.** Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J.Bacteriol.* **1991; 173** (916-920)
8. **Álvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, and Alberti S.** Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect.Immun.* **2000; 68** (953-955)
9. **Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **1980; 289** (321-331)
10. **Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, and Martinez-Martinez L.** Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1998; 42** (1636-1640)
11. **Arena F, Rolfe PA, Doran G, Conte V, Gruszka S, Clarke T, Adesokan Y, Giani T, and Rossolini GM.** Rapid resistome fingerprinting and clonal lineage profiling of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates by targeted next-generation sequencing. *J.Clin.Microbiol.* **2014; 52** (987-990)
12. **Armitano J, Mejean V, and Jourlin-Castelli C.** Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ.Microbiol.Rep.* **2014; 6** (534-544)

13. **Asensio A, Oliver A, Gonzalez-Diego P, Baquero F, Perez-Diaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, and Canton R.** Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin.Infect.Dis.* **2000; 30** (55-60)
14. **Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, and Nordmann P.** Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2001; 45** (1615-1620)
15. **Aubron C, Poirel L, Ash RJ, and Nordmann P.** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. *Emerg.Infect.Dis.* **2005; 11** (260-264)
16. **Bagley ST.** Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect.Control.* **1985; 6** (52-58)
17. **Barr JG.** *Klebsiella*: taxonomy, nomenclature, and communication. *J.Clin.Pathol.* **1977; 30** (943-944)
18. **Barton BM, Harding GP, and Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal.Biochem.* **1995; 226** (235-240)
19. **Bascomb S, Lapage SP, Willcox WR, and Curtis MA.** Numerical classification of the tribe *Klebsiellae*. *J.Gen.Microbiol.* **1971b; 66** (279-295)
20. **Bascomb S, Lapage SP, Willcox WR, and Curtis MA.** Numerical classification of the tribe *Klebsiellae*. *J.Gen.Microbiol.* **1971a; 66** (279-295)
21. **Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, annoy-Vieillard AS, Garin B, Le HS, Arlet G, Nicolas-Chanoine MH, Decre D, and Brisse S.** Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg.Infect.Dis.* **2014; 20** (1812-1820)
22. **Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, Leflon-Guibout V, and Nicolas-Chanoine MH.** Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **2015; 70** (81-88)
23. **Bjarnsholt T.** The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* **2013; (1-51)**
24. **Bodró M, Sabe N, Tubau F, Llado L, Baliellas C, Roca J, Cruzado JM, and Carratala J.** Risk factors and outcomes of bacteremia caused by drug-resistant ESKAPE pathogens in solid-organ transplant recipients. *Transplantation.* **2013; 96** (843-849)

25. **Borer A, Saidel-Odes L, Eskira S, Nativ R, Riesenber K, Livshiz-Riven I, Schlaeffer F, Sherf M, and Peled N.** Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. *Am.J.Infect.Control.* **2012; 40** (421-425)
26. **Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin.Microbiol.Rev.* **2001; 14** (933-51, table)
27. **Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, and Pascual A.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6)-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Int.J.Antimicrob.Agents.* **2012; 39** (431-434)
28. **Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, and Grimont P.** Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS.One.* **2009; 4** (e4982)
29. **Brisse S, Grimont F, and Grimont PAD.** Prokaryotes .**2006; (159-196)**
30. **Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S, and Grimont PA.** Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *J.Clin.Microbiol.* **2004; 42** (3388-3398)
31. **Brisse S, Passet V, and Grimont PA.** Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **2014; 64** (3146-3152)
32. **Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, and Decre D.** *wzi* Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J.Clin.Microbiol.* **2013; 51** (4073-4078)
33. **Brisse S and Verhoef J.** Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **2001; 51** (915-924)
34. **Broberg CA, Palacios M, and Miller VL.** *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime.Rep.* **2014; 6** (64)
35. **Burckhardt I and Zimmermann S.** Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect

- carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J.Clin.Microbiol.* **2011**; **49** (3321-3324)
36. **Burne RA and Chen YY.** Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes.Infect.* **2000**; **2** (533-542)
37. **Bush K and Jacoby GA.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2010**; **54** (969-976)
38. **Bush K, Jacoby GA, and Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1995**; **39** (1211-1233)
39. **Cabellos C, Verdaguer R, Olmo M, Fernandez-Sabe N, Ciscal M, Ariza J, Gudiol F, and Viladrich PF.** Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: experience over 30 years. *Medicine (Baltimore).* **2009**; **88** (115-119)
40. **Calbo E and Garau J.** The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future.Microbiol.* **2015**; **10** (1063-1075)
41. **Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, and Nordmann P.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin.Microbiol.Infect.* **2012b**; **18** (413-431)
42. **Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, and Nordmann P.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin.Microbiol.Infect.* **2012a**; **18** (413-431)
43. **Carattoli A.** Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int.J.Med Microbiol.* **2011**; **301** (654-658)
44. **Carattoli A.** Plasmids and the spread of resistance. *Int.J.Med Microbiol.* **2013**; **303** (298-304)
45. **Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, and Nordmann P.** Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2010**; **54** (1369-1373)
46. **Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, and Walsh TR.** Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2004**; **48** (4654-4661)
47. **Cercenado E and Cantón R.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gram negativos.

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. 2011;)

48. **Chang L, Bastian I, and Warner M.** Survey of *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in two South Australian hospitals and detection of hypermucoviscous phenotype and *magA/rmpA* genotypes in *K. pneumoniae* isolates. *Infection*. **2013; 41** (559-563)
49. **Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hebraud M, and Bernardi T.** A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods*. **2007; 68** (605-612)
50. **Cheng KC, Lee MF, Chuang YC, and Yu WL.** First description of lung abscess caused by ST23 clone capsule genotype K1 *Klebsiella pneumoniae*. *J. Formos. Med Assoc*. **2015; 114** (379-380)
51. **Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, and Wang JT.** Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect. Immun*. **2004; 72** (3783-3792)
52. **Chung DR, Lee H, Park MH, Jung SI, Chang HH, Kim YS, Son JS, Moon C, Kwon KT, Ryu SY, Shin SY, Ko KS, Kang CI, Peck KR, and Song JH.** Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **2012; 31** (481-486)
53. **Coelho A, Gonzalez-Lopez JJ, Miro E, onso-Tarres C, Mirelis B, Larrosa MN, Bartolome RM, Andreu A, Navarro F, Johnson JR, and Prats G.** Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2010b; 36** (73-78)
54. **Coelho A, Gonzalez-Lopez JJ, Miro E, onso-Tarres C, Mirelis B, Larrosa MN, Bartolome RM, Andreu A, Navarro F, Johnson JR, and Prats G.** Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2010a; 36** (73-78)
55. **Coelho A, Mirelis B, onso-Tarres C, Nieves LM, Miro E, Cliville AR, Bartolome RM, Castaner M, Prats G, Johnson JR, Navarro F, and Gonzalez-Lopez JJ.** Detection of three stable genetic clones of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Barcelona metropolitan area, Spain. *J. Antimicrob. Chemother*. **2009a; 64** (862-864)
56. **Coelho A, Mirelis B, onso-Tarres C, Nieves LM, Miro E, Cliville AR, Bartolome RM, Castaner M, Prats G, Johnson JR, Navarro F, and Gonzalez-Lopez JJ.** Detection of three stable genetic clones of CTX-M-

- 15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Barcelona metropolitan area, Spain. *J.Antimicrob.Chemother.* **2009b**; **64** (862-864)
57. **Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, Kassis-Chikhani N, Arlet G, and Decre D.** Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J.Clin.Microbiol.* **2014**; **52** (4377-4380)
58. **Cowan ST, Steel KJ, Shaw C, and Duguid JP.** A classification of the *Klebsiella* group. *J.Gen.Microbiol.* **1960**; **23** (601-612)
59. **Cubero M, Calatayud L, Ayats J, Pena C, Martin R, Linares J, Dominguez MA, and Ardanuy C.** Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital. *Int.Microbiol.* **2013a**; **16** (227-233)
60. **Cubero M, Calatayud L, Ayats J, Pena C, Martin R, Linares J, Dominguez MA, and Ardanuy C.** Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital. *Int.Microbiol.* **2013b**; **16** (227-233)
61. **Cubero M, Calatayud L, Ayats J, Pena C, Martin R, Linares J, Dominguez MA, and Ardanuy C.** Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital. *Int.Microbiol.* **2013c**; **16** (227-233)
62. **Curello J and MacDougall C.** Beyond Susceptible and Resistant, Part II: Treatment of Infections Due to Gram-Negative Organisms Producing Extended-Spectrum beta-Lactamases. *J.Pediatr.Pharmacol.Ther.* **2014**; **19** (156-164)
63. **Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, and Nordmann P.** Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2011**; **55** (2420-2423)
64. **Dallenne C, Da CA, Decre D, Favier C, and Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J.Antimicrob.Chemother.* **2010**; **65** (490-495)
65. **Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, Milch H, and Fuzi M.** Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSAs'? *J.Antimicrob.Chemother.* **2008**; **62** (978-985)
66. **Decré D, Verdet C, Emirian A, Le GT, Petit JC, Offenstadt G, Maury E, Brisse S, and Arlet G.** Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J.Clin.Microbiol.* **2011**; **49** (3012-3014)

67. **Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, Nishino Y, Ishihara S, Ban Y, and Kawada Y.** Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1997; 41** (699-701)
68. **Di MP, Cafferini N, Joly B, and rfeuille-Michaud A.** *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res.Microbiol.* **2003; 154** (9-16)
69. **Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, Burack S, Ulacia-Hernando A, Kodiyanplakkal RP, Levi MH, Brisse S, Kreiswirth BN, and Fries BC.** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J.Infect.Dis.* **2014; 210** (803-813)
70. **Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, and Brisse S.** Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J.Clin.Microbiol.* **2005; 43** (4178-4182)
71. **Drancourt M, Bollet C, Carta A, and Rousselier P.** Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **2001; 51** (925-932)
72. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE, and Nordmann P.** Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future.Microbiol.* **2011; 6** (653-666)
73. **Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, and Wang JT.** A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J.Exp.Med.* **2004; 199** (697-705)
74. **Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, and Liu KL.** The function of *wzy_K1* (*magA*), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae cps* gene cluster. *J.Infect.Dis.* **2010; 201** (1268-1269)
75. **Fang FC, Sandler N, and Libby SJ.** Liver abscess caused by *magA*+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. *J.Clin.Microbiol.* **2005; 43** (991-992)
76. **Fang H, Ataker F, Hedin G, and Dornbusch K.** Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J.Clin.Microbiol.* **2008; 46** (707-712)
77. **Fisher JF, Meroueh SO, and Mobashery S.** Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem.Rev.* **2005; 105** (395-424)

78. **Flemming HC and Wingender J.** The biofilm matrix. *Nat.Rev.Microbiol.* **2010**; **8** (623-633)
79. **Freeman JT, Nimmo J, Gregory E, Tiong A, De AM, McAuliffe GN, and Roberts SA.** Predictors of hospital surface contamination with Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: patient and organism factors. *Antimicrob.Resist.Infect.Control.* **2014**; **3** (5)
80. **Friedländer C.** Mikkrokken der pneumonie. *Fortschr Med.* **1883**; **1** (715-733)
81. **Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, and Sexton DJ.** Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann.Intern.Med.* **2002**; **137** (791-797)
82. **Gajul SV, Mohite ST, Mangalgi SS, Wavare SM, and Kakade SV.** *Klebsiella Pneumoniae* in Septicemic Neonates with Special Reference to Extended Spectrum beta-lactamase, AmpC, Metallo beta-lactamase Production and Multiple Drug Resistance in Tertiary Care Hospital. *J.Lab Physicians.* **2015**; **7** (32-37)
83. **Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic AA, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, and Grundmann H.** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro.Surveill.* **2013**; **18**)
84. **Gómez C, Broseta A, Otero J, and Chaves F.** Primary pyogenic liver abscess caused by *magA+* *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Clinical Microbiology Newsletter.* **2007**; **29** (100-102)
85. **Goncalves MS, Delattre C, Balestrino D, Charbonnel N, Elboutachfaiti R, Wadouachi A, Badel S, Bernardi T, Michaud P, and Forestier C.** Anti-biofilm activity: a function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *PLoS.One.* **2014**; **9** (e99995)
86. **Gottig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, and Kempf VA.** In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin.Infect.Dis.* **2015**; **60** (1808-1815)
87. **Goudarzi M, Azad M, and Seyedjavadi SS.** Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants and *OqxAB* Efflux Pumps among Extended-Spectrum beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Patients with Nosocomial Urinary Tract Infection in Tehran, Iran. *Scientifica.(Cairo.).* **2015**; **2015** (518167)

88. **Gundestrup S, Struve C, Stahlhut SG, and Hansen DS.** First Case of Liver Abscess in Scandinavia Due to the International Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Clone ST23. *Open.Microbiol.J.* **2014; 8** (22-24)
89. **Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, and Saiman L.** Extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J.Perinatol.* **2003; 23** (439-443)
90. **Haddy RI, Lee M, III, Sangal SP, Walbroehl GS, Hambrick CS, and Sarti GM.** *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in the community hospital. *J.Fam.Pract.* **1989; 28** (686-690)
91. **Haeggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, and Brisse S.** Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2004; 48** (2400-2408)
92. **Hall-Stoodley L, Costerton JW, and Stoodley P.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat.Rev.Microbiol.* **2004; 2** (95-108)
93. **Han JH, Nachamkin I, Zaoutis TE, Coffin SE, Linkin DR, Fishman NO, Weiner MG, Hu B, Tolomeo P, and Lautenbach E.** Risk factors for gastrointestinal tract colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella species* in hospitalized patients. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **2012; 33** (1242-1245)
94. **Harada S, Tateda K, Mitsui H, Hattori Y, Okubo M, Kimura S, Sekigawa K, Kobayashi K, Hashimoto N, Itoyama S, Nakai T, Suzuki T, Ishii Y, and Yamaguchi K.** Familial spread of a virulent clone of *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess. *J.Clin.Microbiol.* **2011; 49** (2354-2356)
95. **Hendrik TC, Voor In 't Holt AF, and Vos MC.** Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella spp.*: A Systematic Review and Meta-Analyses. *PLoS.One.* **2015; 10** (e0140754)
96. **Hernández-Allés S, Alberti S, Alvarez D, Domenech-Sanchez A, Martínez-Martínez L, Gil J, Tomas JM, and Benedi VJ.** Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* **1999; 145 (Pt 3)** (673-679)
97. **Hongsuwan M, Srisamang P, Kanoksil M, Luangasanatip N, Jatapai A, Day NP, Peacock SJ, Cooper BS, and Limmathurotsakul D.** Increasing incidence of hospital-acquired and healthcare-associated bacteremia in northeast Thailand: a multicenter surveillance study. *PLoS.One.* **2014; 9** (e109324)
98. **Hrabák J, Empel J, Bergerova T, Fajfrlik K, Urbaskova P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, and Gniadkowski M.** International clones

- of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. *J.Clin.Microbiol.* **2009**; **47** (3353-3357)
99. **Hrabák J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, and Bergerova T.** Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J.Clin.Microbiol.* **2011**; **49** (3222-3227)
100. **Huovinen P, Huovinen S, and Jacoby GA.** Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1988**; **32** (134-136)
101. **Isendahl J, Manjuba C, Rodrigues A, Xu W, Henriques-Normark B, Giske CG, and Naucner P.** Prevalence of community-acquired bacteraemia in Guinea-Bissau: an observational study. *BMC.Infect.Dis.* **2014**; **14** (3859)
102. **Izquierdo Lázaro L.** Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*.**2003**;)
103. **Jacoby GA.** AmpC beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* **2009**; **22** (161-82, Table)
104. **Jacoby GA, Strahilevitz J, and Hooper DC.** Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol.Spectr.* **2014**; **2**)
105. **Jaurin B and Grundstrom T.** ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1981**; **78** (4897-4901)
106. **Jung HA, Ha YE, Kim D, Park J, Kang CI, Chung DR, Park SW, Sung KI, Song JH, and Peck KR.** Native valve endocarditis due to extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J.Intern.Med.* **2014**; **29** (398-401)
107. **Kachroo AH, Jayaram M, and Rowley PA.** Metabolic engineering without plasmids. *Nat.Biotechnol.* **2009**; **27** (729-731)
108. **Karama EM, Willermann F, Janssens X, Claus M, Van den WS, Wang JT, Verougstraete C, and Caspers L.** Endogenous endophthalmitis complicating *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Europe: case report. *Int.Ophthalmol.* **2008**; **28** (111-113)
109. **Khan FY, Abukhattab M, AbuKamar M, and Anand D.** Adult *Klebsiella pneumoniae* meningitis in Qatar: clinical pattern of ten cases. *Asian Pac.J.Trop.Biomed.* **2014**; **4** (669-672)
110. **Klebs E.** Beiträge zur Kenntniss der pathogen Schystomyceten. *Arch Exp Pathol Pharmakol.* **1875**; **4** (409-488)

111. **Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von GA, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, and Yu VL.** Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg.Infect.Dis.* **2002; 8** (160-166)
112. **Kong Q, Beanan JM, Olson R, Macdonald U, Shon AS, Metzger DJ, Pomakov AO, and Russo TA.** Biofilm formed by a hypervirulent (hypermucoviscous) variant of *Klebsiella pneumoniae* does not enhance serum resistance or survival in an in vivo abscess model. *Virulence.* **2012; 3** (309-318)
113. **Koupetori M, Retsas T, Antonakos N, Vlachogiannis G, Perdios I, Nathanail C, Makaritsis K, Papadopoulos A, Sinapidis D, Giamarellos-Bourboulis EJ, Pneumatikos I, Gogos C, Armaganidis A, and Paramythiotou E.** Bloodstream infections and sepsis in Greece: over-time change of epidemiology and impact of de-escalation on final outcome. *BMC.Infect.Dis.* **2014; 14** (272)
114. **Kuehn BM.** "Nightmare" bacteria on the rise in US hospitals, long-term care facilities. *JAMA.* **2013; 309** (1573-1574)
115. **Lee CH, Liu JW, Su LH, Chien CC, Li CC, and Yang KD.** Hypermucoviscosity associated with *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive syndrome: a prospective cross-sectional study in Taiwan. *Int.J.Infect.Dis.* **2010; 14** (e688-e692)
116. **Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, and Chong Y.** Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2005; 49** (4485-4491)
117. **Lee MK, Kim SH, Yong SJ, Shin KC, Park HC, Choi J, Choi YS, Seong JH, Jung YR, and Lee WY.** Clinical and microbiological features of patients admitted to the intensive care unit with nursing and healthcare-associated pneumonia. *J.Int.Med Res.* **2015;)**
118. **Lévesque C, Piche L, Larose C, and Roy PH.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1995; 39** (185-191)
119. **Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, and Zhou D.** Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future.Microbiol.* **2014a; 9** (1071-1081)
120. **Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, Jiao Y, and Wu H.** Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Clin.Infect.Dis.* **2014b; 58** (225-232)

121. **Li X, Zhang D, Chen F, Ma J, Dong Y, and Zhang L.** *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **2004; 54** (2131-2136)
122. **Liao CH, Huang YT, Chang CY, Hsu HS, and Hsueh PR.** Capsular serotypes and multilocus sequence types of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with different types of infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **2014; 33** (365-369)
123. **Liao CH, Huang YT, Lai CC, Chang CY, Chu FY, Hsu MS, Hsu HS, and Hsueh PR.** *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and capsular serotypes, Taiwan. *Emerg.Infect.Dis.* **2011; 17** (1113-1115)
124. **Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalie L, van dM-M, de CC, Aissa N, Eloy C, Blanc V, Guyeux C, Hocquet D, Lavigne JP, and Bertrand X.** Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin.Microbiol.Infect.* **2014; 20** (O1121-O1123)
125. **Lin JC, Koh TH, Lee N, Fung CP, Chang FY, Tsai YK, Ip M, and Siu LK.** Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathog.* **2014a; 6** (21)
126. **Lin WH, Kao CY, Yang DC, Tseng CC, Wu AB, Teng CH, Wang MC, and Wu JJ.** Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **2014b; 33** (1533-1539)
127. **Lin YT, Wang YP, Wang FD, and Fung CP.** Community-onset *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in Taiwan: clinical features of the disease and associated microbiological characteristics of isolates from pneumonia and nasopharynx. *Front Microbiol.* **2015; 9** (122)
128. **Little ML, Qin X, Zerr DM, and Weissman SJ.** Molecular epidemiology of colonizing and disease-causing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric patients. *J.Med Microbiol.* **2014; 63** (610-616)
129. **Liu YC, Cheng DL, and Lin CL.** *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern.Med.* **1986; 146** (1913-1916)
130. **Llobet E, Martinez-Moliner V, Moranta D, Dahlstrom KM, Regueiro V, Tomas A, Cano V, Perez-Gutierrez C, Frank CG, Fernandez-Carrasco H, Insua JL, Salminen TA, Garmendia J, and Bengoechea JA.** Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **2015; 112** (E6369-E6378)
131. **Lopez-Cerero L and Almirante B.** Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: reservoirs and transmission mechanisms. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **2014; 32 Suppl 4** (10-16)

132. **Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Naucier P, Brisse S, and Giske CG.** *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. *PLoS.One.* **2014;** **9** (e113539)
133. **Machado E, Coque TM, Canton R, Baquero F, Sousa JC, and Peixe L.** Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2006;** **50** (3220-3221)
134. **March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Perez-Gutierrez C, Tomas JM, Suarez T, Garmendia J, and Bengoechea JA.** Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS.One.* **2013;** **8** (e56847)
135. **Maroncle N, Rich C, and Forestier C.** The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Res.Microbiol.* **2006;** **157** (184-193)
136. **Marra AR, Wey SB, Castelo A, Gales AC, Cal RG, Filho JR, Edmond MB, and Pereira CA.** Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC.Infect.Dis.* **2006;** **6** (24)
137. **Marschall J, Fraser VJ, Doherty J, and Warren DK.** Between community and hospital: healthcare-associated gram-negative bacteremia among hospitalized patients. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **2009;** **30** (1050-1056)
138. **Martínez-Martínez L, Hernández-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, and Jacoby GA.** In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1996;** **40** (342-348)
139. **Martínez-Martínez L, Pascual A, and Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **1998a;** **351** (797-799)
140. **Martínez-Martínez L, Pascual A, and Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **1998b;** **351** (797-799)
141. **Mathers AJ, Peirano G, and Pitout JD.** The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin.Microbiol.Rev.* **2015;** **28** (565-591)
142. **Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, and Laupland KB.** Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am.J.Med.* **2009;** **122** (866-873)

143. **Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, and Tomas JM.** Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect.Immun.* **1992**; **60** (2529-2535)
144. **Miró E, Grunbaum F, Gomez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, and Navarro F.** Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb.Drug Resist.* **2013**; **19** (94-99)
145. **Mshana SE, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T, and Imirzalioglu C.** Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC.Infect.Dis.* **2013**; **13** (466)
146. **Nordmann P, Dortet L, and Poirel L.** Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol.Med.* **2012a**; **18** (263-272)
147. **Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, and Miriagou V.** Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin.Microbiol.Infect.* **2012b**; **18** (432-438)
148. **Nordmann P, Naas T, and Poirel L.** Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg.Infect.Dis.* **2011a**; **17** (1791-1798)
149. **Nordmann P and Poirel L.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin.Microbiol.Infect.* **2014**; **20** (821-830)
150. **Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, and Walsh TR.** How to detect NDM-1 producers. *J.Clin.Microbiol.* **2011b**; **49** (718-721)
151. **O'Brien DJ, Wrenn C, Roche C, Rose L, Fenelon C, Flynn A, Murphy V, FitzGerald SF, Fenelon LE, Crowley B, and Schaffer K.** First isolation and outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Irish hospital, March to June 2011. *Euro.Surveill.* **2011**; **16**)
152. **O'Toole GA and Kolter R.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol.Microbiol.* **1998**; **28** (449-461)
153. **Ontanilla G, Herrera JM, Alcivar JM, Gutierrez-Martin G, Marquez C, and Marquez JL.** Liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* and its relation to colon lesions. *Rev.Esp.Enferm.Dig.* **2015**; **107** (51-52)
154. **Oteo J, Cuevas O, Lopez-Rodriguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Perez-Vazquez M, Bautista V, Arroyo M, Garcia-Caballero J, Marin-Casanova P, Gonzalez-Sanz R, Fuentes-Gomez V, Ona-Compan S, Garcia-Cobos S, and Campos J.** Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11,

- 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J.Antimicrob.Chemother.* **2009**; **64** (524-528)
155. **Oteo J, Miro E, Perez-Vazquez M, and Navarro F.** Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **2014**; **32 Suppl 4** (17-23)
156. **Oteo J, Ortega A, Bartolome R, Bou G, Conejo C, Fernandez-Martinez M, Gonzalez-Lopez JJ, Martinez-Garcia L, Martinez-Martinez L, Merino M, Miro E, Mora M, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Rodriguez-Bano J, Ruiz-Carrascoso G, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Perez-Vazquez M, and Campos J.** Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2015**; **59** (3406-3412)
157. **Öztürk H, Ozkirimli E, and Ozgur A.** Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PLoS.One.* **2015**; **10** (e0117874)
158. **Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San FC, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, Fernandez-Romero N, Garcia-Rodriguez J, Perez-Blanco V, Moreno-Ramos F, and Mingorance J.** Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J.Antimicrob.Chemother.* **2013**; **68** (89-96)
159. **Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, and Calfee DP.** Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **2008**; **29** (1099-1106)
160. **Patel G, Shah N, and Sharma R.** Pyogenic Liver Abscess, Bacteremia, and Meningitis with Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: An Unusual Case Report in a Human T-Cell Lymphotropic Virus Positive Patient of Caribbean Origin in the United States. *Case.Rep.Infect.Dis.* **2013**; **2013** (676340)
161. **Patel PK, Russo TA, and Karchmer AW.** Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open.Forum Infect.Dis.* **2014**; **1** (ofu028)
162. **Paterson DL and Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin.Microbiol.Rev.* **2005**; **18** (657-686)
163. **Paterson DL, Ko WC, Von GA, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagener MM, McCormack JG, and Yu VL.** International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of

- extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. *Ann.Intern.Med.* **2004**; **140** (26-32)
164. **Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, Ariza J, and Gudiol F.** Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1998**; **42** (53-58)
165. **Peralta G, Lamelo M, varez-Garcia P, Velasco M, Delgado A, Horcajada JP, Montero M, Roiz MP, Farinas MC, Alonso J, Martinez LM, Gutierrez-Macias A, Alava JA, Rodriguez A, Fleites A, Navarro V, Sirvent E, and Capdevila JA.** Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. bacteremia. A multicentric cohort study. *BMC.Infect.Dis.* **2012**; **12** (245)
166. **Perianes-Diaz ME, Novo-Veleiro I, Solis-Diaz K, Prolo-Acosta A, Garcia-Garcia I, and onso-Claudio G.** [Bacteremia caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum betalactamases: mortality and readmission-related factors]. *Med Clin.(Barc.)*. **2014**; **142** (381-386)
167. **Pfaller MA, Acar J, Jones RN, Verhoef J, Turnidge J, and Sader HS.** Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin.Infect.Dis.* **2001**; **32 Suppl 2** (S156-S167)
168. **Pien BC, Sundaram P, Raof N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, Reller LB, and Weinstein MP.** The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Am.J.Med.* **2010**; **123** (819-828)
169. **Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, and Marco F.** First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2011**; **55** (4398-4401)
170. **Podschun R and Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.* **1998**; **11** (589-603)
171. **Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, Lephart P, and Kaye KS.** Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin.Infect.Dis.* **2011**; **53** (879-884)
172. **Poirel L, Heritier C, Tolun V, and Nordmann P.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2004**; **48** (15-22)
173. **Potron A, Nordmann P, Rondinaud E, Jaureguy F, and Poirel L.** A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* **2013**; **68** (476-477)

174. **Puig C, Marti S, Hermans PW, de Jonge MI, Ardanuy C, Linares J, and Langereis JD.** Incorporation of phosphorylcholine into the lipooligosaccharide of nontypeable *Haemophilus influenzae* does not correlate with the level of biofilm formation in vitro. *Infect.Immun.* **2014;** **82** (1591-1599)
175. **Pupo E and Hardy E.** Complexity and solutions to the isolation problem of Gram negative lipopolysaccharides' bacteria molecular species. *Bioteconología Aplicada.* **2009;** **26** (9-15)
176. **Queenan AM and Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* **2007;** **20** (440-58, table)
177. **Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, and Bush K.** SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2000;** **44** (3035-3039)
178. **Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistue AJ, Guerriero L, Vargas LJ, Zorreguieta A, Tokumoto M, Quiroga C, Tolmasky ME, Galas M, and Centron D.** Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2007;** **51** (4466-4470)
179. **Radice M, Power P, Gutkind G, Fernandez K, Vay C, Famiglietti A, Ricover N, and Ayala JA.** First class a carbapenemase isolated from enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2004;** **48** (1068-1069)
180. **Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, and Tolmasky ME.** Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the Paradigm. *Microbiol.Spectr.* **2014;** **2** (1-15)
181. **Regué M, Hita B, Pique N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedi VJ, and Tomas JM.** A gene, uge, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect.Immun.* **2004;** **72** (54-61)
182. **Rivero A, Gomez E, Alland D, Huang DB, and Chiang T.** K2 serotype *Klebsiella pneumoniae* causing a liver abscess associated with infective endocarditis. *J.Clin.Microbiol.* **2010;** **48** (639-641)
183. **Robicsek A, Jacoby GA, and Hooper DC.** The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect.Dis.* **2006a;** **6** (629-640)
184. **Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, and Hooper DC.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat.Med.* **2006b;** **12** (83-88)

185. **Rodríguez-Baño J, Miro E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, Bou G, Conejo MC, Pomar V, Aracil B, Larrosa N, Agüero J, Oliver A, Fernández A, Oteo J, Pascual A, and Navarro F.** Colonisation and infection due to Enterobacteriaceae producing plasmid-mediated *AmpC* beta-lactamases. *J.Infect.* **2012; 64** (176-183)
186. **Rodríguez-Martínez JM.** [Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **2005; 23** (25-31)
187. **Rodríguez-Martínez JM, az de AP, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez BJ, Martínez-Martínez L, and Pascual A.** Contribution of *OqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **2013; 68** (68-73)
188. **Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, García I, Cano ME, Martínez-Martínez L, and Pascual A.** Characterisation of integrons containing the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrA1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Int.J.Antimicrob.Agents.* **2007; 29** (705-709)
189. **Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, and Martínez-Romero E.** *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst.Appl.Microbiol.* **2004; 27** (27-35)
190. **Ruiz de AC, Rodríguez-Bano J, Cano ME, Hernández-Bello JR, Calvo J, Roman E, Díaz MA, Pascual A, and Martínez-Martínez L.** *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: microbiological and clinical features. *J.Clin.Microbiol.* **2011; 49** (1134-1136)
191. **Ruiz J, Pons MJ, and Gomes C.** Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int.J.Antimicrob.Agents.* **2012; 40** (196-203)
192. **Ruiz LA, Gomez A, Jaca C, Martínez L, Gomez B, and Zalacain R.** Bacteraemic community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacteria: incidence, clinical presentation and factors associated with severity during hospital stay. *Infection.* **2010; 38** (453-458)
193. **Sabaté M and Prats G.** [Structure and function of integrons]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **2002; 20** (341-345)
194. **Sader HS, Hollis RJ, and Pfaller MA.** The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin.Lab Med.* **1995; 15** (407-431)
195. **Sadowska-Krawczenko I, Jankowska A, and Kurylak A.** Healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit. *Arch Med Sci.* **2012; 8** (854-858)
196. **Sanchez M, Herruzo R, Marban A, Araujo P, Asensio MJ, Leyva F, Casado C, and Garcia-de-Lorenzo A.** Risk factors for outbreaks of

- multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critical burn patients. *J.Burn Care Res.* **2012**; **33** (386-392)
197. **Schwartz DC and Cantor CR.** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **1984**; **37** (67-75)
198. **Shankar-Sinha S, Valencia GA, Janes BK, Rosenberg JK, Whitfield C, Bender RA, Standiford TJ, and Younger JG.** The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect.Immun.* **2004**; **72** (1423-1430)
199. **Shon AS, Bajwa RP, and Russo TA.** Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* **2013**; **4** (107-118)
200. **Spiers AJ, Bohannon J, Gehrig SM, and Rainey PB.** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol.Microbiol.* **2003**; **50** (15-27)
201. **Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA, and Reisner A.** Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol.Med Microbiol.* **2012**; **65** (350-359)
202. **Stoodley P, Sauer K, Davies DG, and Costerton JW.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu.Rev.Microbiol.* **2002**; **56** (187-209)
203. **Struve C, Bojer M, and Krogfelt KA.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect.Immun.* **2008**; **76** (4055-4065)
204. **Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De AG, Falcone M, Frank U, Kahlmeter G, Pan A, Petrosillo N, Rodriguez-Bano J, Singh N, Venditti M, Yokoe DS, and Cookson B.** ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin.Microbiol.Infect.* **2014**; **20 Suppl 1** (1-55)
205. **Talan DA, Krishnadasan A, Abrahamian FM, Stamm WE, and Moran GJ.** Prevalence and risk factor analysis of trimethoprim-sulfamethoxazole- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* infection among emergency department patients with pyelonephritis. *Clin.Infect.Dis.* **2008**; **47** (1150-1158)
206. **Tasina E, Haidich AB, Kokkali S, and Arvanitidou M.** Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis. *Lancet Infect.Dis.* **2011**; **11** (834-844)
207. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA

- restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J.Clin.Microbiol.* **1995**; **33** (2233-2239)
208. **Tomas JM, Camprubi S, Merino S, Davey MR, and Williams P.** Surface exposure of O1 serotype lipopolysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* strains expressing different K antigens. *Infect.Immun.* **1991**; **59** (2006-2011)
209. **Tran JH and Jacoby GA.** Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **2002**; **99** (5638-5642)
210. **Tsay RW, Siu LK, Fung CP, and Chang FY.** Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern.Med.* **2002**; **162** (1021-1027)
211. **Tseng CP, Wu HS, Wu TH, Lin YT, and Fung CP.** Clinical characteristics and outcome of patients with community-onset *Klebsiella pneumoniae* bacteremia requiring intensive care. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* **2013**; **46** (217-223)
212. **Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, and Pitt TL.** Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. *FEMS Microbiol.Lett.* **2008**; **284** (247-252)
213. **Turton JF, Englender H, Gabriel SN, Turton SE, Kaufmann ME, and Pitt TL.** Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents. *J.Med Microbiol.* **2007**; **56** (593-597)
214. **Turton JF, Perry C, Elgohari S, and Hampton CV.** PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J.Med Microbiol.* **2010**; **59** (541-547)
215. **Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, and Daikos GL.** Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin.Microbiol.Rev.* **2012**; **25** (682-707)
216. **van der Starre WE, van NC, Paltansing S, van't Wout JW, Groeneveld GH, Becker MJ, Koster T, Wattel-Louis GH, Delfos NM, Ablij HC, Leyten EM, Blom JW, and van Dissel JT.** Risk factors for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in adults with community-onset febrile urinary tract infection. *J.Antimicrob.Chemother.* **2011**; **66** (650-656)
217. **Vandavelde A and Stepanovic B.** On a Boat: A Case in Australia of Endophthalmitis and Pyogenic Liver, Prostatic, and Lung Abscesses in a

- Previously Well Patient due to *Klebsiella pneumoniae*.
Case.Rep.Infect.Dis. **2014**; **2014** (137248)
218. **Villa J, Viedma E, Branás P, Mingorance J, and Chaves F.** Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP_ST11_OXA-48. *Genome Announc.* **2014**; **2**
219. **Vinogradov E, Frirdich E, MacLean LL, Perry MB, Petersen BO, Duus JO, and Whitfield C.** Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J.Biol.Chem.* **2002**; **277** (25070-25081)
220. **Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, and Tsakris A.** Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J.Antimicrob.Chemother.* **2013**; **68** (84-88)
221. **Webster DP, Young BC, Morton R, Collyer D, Batchelor B, Turton JF, Maharjan S, Livermore DM, Bejon P, Cookson BD, and Bowler IC.** Impact of a clonal outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the development and evolution of bloodstream infections by *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*: an 11 year experience in Oxfordshire, UK. *J.Antimicrob.Chemother.* **2011**; **66** (2126-2135)
222. **White PA, Mclver CJ, and Rawlinson WD.** Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2001**; **45** (2658-2661)
223. **Woodhead M.** Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur.Respir.J.Suppl.* **2002**; **36** (20s-27s)
224. **Wu MC, Lin TL, Hsieh PF, Yang HC, and Wang JT.** Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS.One.* **2011**; **6** (e23500)
225. **Xu J, Li W, Chen X, and Zhou Y.** *Klebsiella alba* sp. nov., a novel pesticide-tolerant bacterium from a heavily polluted environment. *J.Gen.Appl.Microbiol.* **2010**; **56** (241-247)
226. **Yali G, Jing C, Chunjiang L, Cheng Z, Xiaoqiang L, and Yizhi P.** Comparison of pathogens and antibiotic resistance of burn patients in the burn ICU or in the common burn ward. *Burns.* **2014**; **40** (402-407)
227. **Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, and Wu JJ.** Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2001**; **45** (2224-2228)

228. **Yeh KM, Chang FY, Fung CP, Lin JC, and Siu LK.** *magA* is not a specific virulence gene for *Klebsiella pneumoniae* strains causing liver abscess but is part of the capsular polysaccharide gene cluster of *K. pneumoniae* serotype K1. *J.Med Microbiol.* **2006; 55** (803-804)
229. **Yeh KM, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung CP, Lin JC, Chen TL, Chang FY, and Koh TH.** Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J.Clin.Microbiol.* **2007; 45** (466-471)
230. **Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, Fung CP, and Chuang YC.** Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin.Infect.Dis.* **2006; 42** (1351-1358)
231. **Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, and Wang M.** Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J.Antimicrob.Chemother.* **2012; 67** (1655-1659)

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

- **Cubero M**, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Dominguez MA, Liñares J, Ardanuy C.
“Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013)”
Clin Microbiol Infect. 2016 Feb;22(2):154-60. doi: 10.1016/j.cmi.2015.09.025.
Epub 2015 Oct 8.

- **Cubero M**, Cuervo G, Domínguez MA, Tubau F, Martí S, Sevillano E, Gallego L, Ayats J, Peña C, Pujol M, Liñares J, Ardanuy C.
“Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital”
BMC Microbiology. 2015 Sep 3;15(1):177. doi: 10.1186/s12866-015-0510-9.

- **Cubero M**, Calatayud L, Ayats J, Peña C, Martín R, Liñares J, Domínguez MA, Ardanuy C.
“Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital”
Int Microbiol. 2013 Dec; 16(4): 227-233.

PUBLICACIONES NO RELACIONADAS CON LA TESIS

- Grau I, Ardanuy C, **Cubero M**, Benitez MA, Liñares J, Pallares R.
"Declining mortality from adult pneumococcal infections linked to children's vaccination."
J Infect. 2016 Feb 9. pii: S0163-4453(16)00028-1. doi:
10.1016/j.jinf.2016.01.011.

- Brisse S, Brehony C, Conceição T, **Cubero M**, Glasner C, Le Gouil M, Renvoisé A, Sheppard S, Weinert LA.
“Microbial molecular markers and epidemiological surveillance in the era of high throughput sequencing: an update from the IMMEM-10 conference”

Res Microbiol. 2014 Feb-Mar; 165(2): 140-153.

- Rolo D, Fenoll A, Ardanuy C, Calatayud L, **Cubero M**, de la Campa AG et al.
“Trends of invasive serotype 6C pneumococci in Spain: emergence of a new lineage”

J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1712-1718.

PÓSTERS PRESENTADOS EN CONGRESOS

- Càmara J, Tubau F, **Cubero M**, Shaw E, Ciércoles P, Pujol M, Ardanuy C, Domínguez MA
“Diversity of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae colonizing hospitalized patients in a teaching hospital from Barcelona, Spain”

26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), April 2016, Amsterdam, Netherlands.

- **M. Cubero**, S. Martí, MA. Domínguez, J. Liñares, C. Ardanuy.

“Phenotypic virulence factors among hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection isolates, and their relation with the presence of magA and rmpA”

26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), April 2016, Amsterdam, Netherlands.

- J. Moreno, L. Calatayud, **M. Cubero**, J. Liñares, C. Ardanuy
“Canvis en la distribució de serotips i genotips en soques invasives de *Streptococcus pneumoniae* aïllats de pacients adults a Barcelona. Comparació entre els períodes 1999-2007 i 2008-2013”

Congrés de la societat catalana de microbiologia clínica i malalties infeccioses (SCMIMC), Octubre 2015, España

XVIJ. Moreno, A. Perales, **M. Cubero**, J. Liñares, C. Ardanuy
“Dinámica del complejo clonal 63 de *Streptococcus pneumoniae* en

7as Jornadas de Formación Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (Ciberes): Octubre 2014, Valladolid, España

- **M. Cubero**, I. Grau, F. Tubau, R. Pallarés, MA. Domínguez, J. Liñares, C. Ardanuy.

“Prevalence and Clinical characteristics of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* causing bacteraemia among adult patients in a teaching hospital in Barcelona”

24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Mayo 2014, Barcelona, España

- **M. Cubero**, G. Cuervo, MA. Domínguez, F. Tubau, J. Ayats, C. Peña, M. Pujol, C. Ardanuy

“Coexistence of ST101 - *Klebsiella pneumoniae* isolates with and without OXA-48 Beta-lactamase”

10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, IMMEM-10, Octubre 2013. Institut Pasteur, Paris, Francia

- J. Moreno, **M. Cubero**, L. Calatayud, A. Domenech, C. Ardanuy, J. Liñares

“Emergencia del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a múltiples antibióticos”

6as Jornadas de Formación Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (Ciberes), Octubre 2013, Mallorca, España

- **M. Cubero**, I.Grau, R. Pallarés, J Ayats, MA Dominguez, J. Liñares, C. Ardanuy.

“Molecular diversity of *Klebsiella pneumoniae* causing Bloodstream Infections”

23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Mayo 2013, Berlin, Alemania

- D.Berbel, **M. Cubero**, L. Calatayud, F. Tubau, J. Ayats, C. Ardanuy

“Producción de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de hemocultivos de pacientes atendidos en urgencias”

XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Mayo 2013, Zaragoza, España

- **M. Cubero**, I. Grau, R. Pallarés, J. Ayats, M. Císnal, J. Liñares, C. Ardanuy.
“Molecular Epidemiology of non-Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream (KpB) Infections”
52nd (ICAAC), Septiembre 2012, San Francisco, Estados Unidos

- **M. Cubero**, I. Grau, R. Pallarés, J. Ayats, M. Císnal, J. Liñares, C. Ardanuy.
“Epidemiología molecular de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* (2007-2009)”
V Jornadas de Formación del CIBERES, Ministerio de Ciencia e Innovación,
Octubre 2012, Palma de Mallorca, España

- M. Bodro, J. Ayats, C. Gudiol, C. Garcia-Vidal, C. Ardanuy, M. Císnal, **M. Cubero**, G. Orti, M. Antonio, J. Carratalá.
“Bacteremia due to *Enterococcus faecium* in cancer patients: clinical features, antimicrobial susceptibility and outcomes”
21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
2011, Milan. Italia

- D. Rolo, A. Fenoll, C. Ardanuy, L. Calatayud, **M. Cubero**, J. Liñares
“Emergence of a macrolide-resistant lineage among invasive serotype 6C pneumococci in Spain”
21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
2011, Milan. Italia

- **M. Cubero**, C. Ardanuy, L. Calatayud, F. Tubau, J. Ayats, M.A. Domínguez, C. Peña, R. Martín, J. Liñares.
“Emergence and clonal Spreads of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 14 in a Spanish tertiary hospital, 2007-2009”
20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
2010, Viena. Austria.

- D. Rolo, C. Ardanuy, L. Calatayud, F. tubau, I. Grau, R. Pallarés, **M. Cubero**, M. Alegre, A. Fenoll, R. Martín, J. Liñares.

“*Streptococcus pneumoniae* del serogrupo 6: evolución, de serotipos y genotipos en la enfermedad invasiva en adultos atendidos en el Hospital Universitari de Bellvitge (1994-2008)”

XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2010, Barcelona. España

- Rolo D, Fenoll A, Ardanuy C, Calatayud L, Alegre M, **Cubero M**, Martín R, Liñares J.

“Clonal spread of serotype 6C pneumococci causing invasive disease in the Barcelona area, Spain (1997-2008)”

MicroBiotec, Noviembre 2009, Vilamoura, Portugal

PRESENTACIONES ORALES

- **M. Cubero**, S. Martí, M.A. Dominguez, J. Liñares, C. Ardanuy.

"Phenotypic virulence factors among hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteraemia"

PhD Day, Noviembre 2015, L'Hospitalet de Llobregat, España

- **M. Cubero**, I.Grau, F. Tubau, R. Pallarés, M.A. Dominguez, J. Liñares, C. Ardanuy.

"Bacteraemia Episodes Caused by Hypermucoviscosity Phenotype of *Klebsiella pneumoniae* Isolates: Serotypes, Genotypes and Prevalence of *magA* and *rmpA* Genes "

Poster Walk at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Septiembre 2014, Washington DC, Estados Unidos

- J. Moreno, **M. Cubero**, L. Calatayud, A. Domenech, C. Ardanuy, J. Liñares.

“Genotipos de resistencia a macrólidos en aislamientos clínicos recientes de *Streptococcus pneumoniae*”

XXIV Congreso de Microbiología de la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Julio 2013, L'Hospitalet de Llobregat, España

- **M. Cubero**, G. Cuervo, C. Ardanuy, M. A. Domínguez, F. Tubau, J. Ayats, C. Peña, M. Pujol, R. Martín, J. Liñares.

“Epidemiología clínica y microbiológica de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos”

XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Junio 2011, Málaga, España

- **M. Cubero**, L. Calatayud, F. Tubau, A. Fernández, J. Ayats, R. Martín, C. Ardanuy.

“Enterobacterias productoras de extendido (EB-BLEE) aisladas en el hospital universitario betalactamasa de espectro de bellvitge (HUB) en 2009”

XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Mayo 2010, Barcelona, España

- **M. Cubero**, M. Alegre, S. Paccagnella, C. Ardanuy, J. Liñares.

“Diseminación clonal en UCI de *Klebsiella pneumoniae* portadora de un integrón de clase I con los genes *bla_{OXA}-1* y *aac (6') Ib-cr*”

II Jornadas de Formación del CIBERES, Ministerio de Ciencia e Innovación, Octubre 2009, Palma de Mallorca, España

PUBLICACIONES
RELACIONADAS CON LA
TESIS

Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital

Meritxell Cubero,^{1,2} Laura Calatayud,^{1,2} Fe Tubau,^{1,2} Josefina Ayats,^{1,2}
Carmen Peña,³ Rogelio Martín,¹ Josefina Liñares,^{1,2} M. Ángeles Domínguez,¹
Carmen Ardanuy^{1,2}

¹Microbiology Department and ³Infectious Diseases Department, University Hospital of Bellvitge-University of Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain. ²Network Biomedical Research Center in Respiratory Diseases (CIBERES)

Received 21 October 2013 · Accepted 18 December 2013

Summary. Multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates are associated with nosocomial infections, in which colonized patients act as a reservoir and source of cross-infection for other patients. In this study, the antimicrobial susceptibility of *K. pneumoniae* was tested by microdilution using the commercial method MicroScan (Siemens). The genetic relatedness of *K. pneumoniae* strains was determined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). PCR experiments were carried out to obtain primer sets and positive PCR products were purified and sequenced. From May 2007 until December 2009, 98 clonally related *K. pneumoniae* isolates were detected from clinical samples of 38 patients admitted to the University Hospital of Bellvitge, Barcelona, Spain, including 27 admitted to the intensive care unit (ICU). The most important sources of the isolates were: lower respiratory tract (n = 12), urine (n = 12), and blood (n = 11). The strains were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, tobramycin, amikacin, and ciprofloxacin, and had diminished susceptibility to cefepime. All the isolates shared a common PFGE pattern related to sequence type 14 after MLST analysis. In *K. pneumoniae* isolates and their transconjugants, the *bla*_{OXA-1} gene was located in the variable region of a class I integron that also contains the *aac(6)Ib-cr* gene. Sequencing of the quinolone resistance determinant regions of *gyrA* and *parC* revealed a S83F change in GyrA and no changes in ParC. [Int Microbiol 2013; 16(4):227-233]

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* · sequence type ST14 · gene *bla*OXA-1 · integrons · nosocomial outbreaks

Introduction

Klebsiella pneumoniae is a human pathogen that often colonizes the skin and mucosae of hospitalized patients, producing respiratory and urinary tract infections and bacteremia. Multi-

drug resistant isolates are associated with nosocomial infections, with colonized patients acting as a reservoir and source of cross-infection for other patients [3,16]. However, the genetic elements that encode resistance, especially betalactamases, are now spreading outside the hospital setting such that resistant isolates may also be recovered from patients with community-acquired infections [6]. The virulence of *K. pneumoniae* strains is related to several bacterial factors, including the polysaccharidic capsule, lipopolysaccharide, iron scavenging systems, and fimbrial and non-fimbrial adhesins [6]. While isolates causing severe community-acquired infections are usually associated with a restricted number of *K. pneumoniae*

*Corresponding author: C. Ardanuy
Departament de Microbiologia
Hospital Universitari de Bellvitge
08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
Tel. +34-932607930. Fax +34-932607547
E-mail: c.ardanuy@bellvitgehospital.cat

serotypes and clones, nosocomial isolates are highly diverse, suggesting that the bacterium is an opportunistic pathogen. Since the clonal complex is a good predictor of the virulence of *K. pneumoniae* isolates, the use of multilocus sequence typing (MLST) of the strains would improve investigations of nosocomial outbreaks [8].

Multidrug resistance patterns of *K. pneumoniae* and other enterobacteria are usually associated with the most frequently occurring integrons, those of class I, which carry different resistance determinants in the variable region and can be horizontally transferred intra- and inter-species [11,15]. The structure of class I integrons includes two conserved regions, 5'CS and 3'CS, that flank the gene cassette. The 5'CS conserved segment contains a gene coding for an integrase (*intI*), a recombination site (*attI*), and a promoter of the gene cassette. The 3'CS conserved segment contains the *qacEΔ1* and *sulfI* genes, which confer resistance to quaternary ammonium compounds and sulfamethoxazole, respectively [11]. The variable region of the integrons is located between these two conserved segments and integrates the resistance genes. The variability of the gene cassettes causes the high diversity of antibiotic resistance [4,11]. Because of the easy bacterial acquisition of gene cassettes and their exchanges under different pressure conditions, many antibiotic resistance combinations are possible. The prolonged use of certain antibiotics also aids in the selection of certain resistance elements and promotes the persistence of multidrug-resistant (MDR) bacteria [4,11].

In our hospital, an active surveillance program against MDR *K. pneumoniae* started in 1993, after a nosocomial outbreak. Resistance was ascribed to extended-spectrum betalactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae* [16]. In May 2007, a possible new MDR strain of *K. pneumoniae* was isolated from a patient admitted to the intensive care unit (ICU). This strain spread in the following years, causing clustered infections throughout the hospital. Here we describe and characterize the *K. pneumoniae* isolates obtained during the subsequent surveillance program.

Materials and methods

Study design and sampling. The present study was performed at the Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona), Spain, a university teaching hospital for adults, with an average yearly admission of 26,000 patients. The hospital has three 12-bed medical-surgical ICUs. The surveillance of MDR *K. pneumoniae* began in May 2007, after the detection of several MDR non-ESBL *K. pneumoniae* isolates, and continued until December 2009. Clinical charts of patients were reviewed and assessment was determined using previously described methods [16]. Clinical samples collected within a month of each other from the same patient and that yielded



Fig 1. Double disk synergy test of OXA-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. AMP: ampicillin; TIC: ticarcillin; CFO: ceftoxitin; NAL: nalidixic acid; AZT: aztreonam; CAZ: ceftazidime; CXM: cefuroxime; CIPR: ciprofloxacin; CTX: cefotaxime; AMC: amoxicillin/clavulanic acid; FO: fosfomicin; NI: nitrofurantoin; IMI: imipenem; FEP: ceftipime; GEN: gentamicin; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole. There are synergy of FEP and CTX with AMC.

isolates were considered as representative of different episodes. The isolation of *K. pneumoniae* from a patient without related signs or symptoms of infection was considered as a colonization. When *K. pneumoniae* was detected from a patient during an ICU stay or during the first week after ICU discharge, the infection was considered to be ICU-acquired. All other *K. pneumoniae* cases were considered as non-ICU-acquired.

Antimicrobial susceptibility and molecular typing.

Antimicrobial susceptibility was tested by microdilution using a commercial method MicroScan (Siemens). The multidrug resistance pattern was assessed by the disk diffusion method. The presence of an ESBL was screened by disk diffusion (Fig. 1) [1]. The genetic relatedness of *K. pneumoniae* strains was tested by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The entire DNA content was digested with *XbaI*. DNA-band analysis was performed by visual inspection following the criteria described by Tenover [18]. Strains differing in three or less bands were considered subtypes. Seven isolates were selected for multilocus sequence typing (MLST): two isolates with a common PFGE pattern (one isolated in August 2007 and the other in 2008) and one of each PFGE subtype pattern. MLST was performed following Protocol 2, which recommends universal sequencing primers, as described on the MLST web site of the Institut Pasteur [<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>]. The allele's number and sequence type (ST) were assigned according to the recommendations of this web site.

Characterization of the multidrug resistance pattern.

Isoelectric focusing of crude extracts was performed in accordance with previous procedures [1]. Strains of *K. pneumoniae* or their transconjugants were grown for 4 h in lysogeny broth (LB). The cells were then harvested by centrifugation, resuspended in distilled water, and sonicated. The resulting extracts were purified by ultracentrifugation. Isoelectric focusing was

Table 1. Primers used in this study

Gene	Primer	Size PCR product	Ref.
<i>bla_{SHV}</i>	SHV fw	5'CTTTATCGGCCCTCACTCAA3'	273 bp [9]
	SHV rev	5'AGGTGCTCATCATGGGAAAAG3'	
<i>bla_{TEM}</i>	TEM fw	5'CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA3'	445 bp [9]
	TEM rev	5'ACGCTCACCCGCTCCAGATTTAT3'	
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M fw	5'ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC3'	593 bp [9]
	CTX-M rev	5'TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG3'	
<i>bla_{OXA}</i>	OXA fw	5'ACACAATACATATCAACTTCGC3'	813 bp [9]
	OXA rev	5'AGTGTGTTTAGAATGGTGATC3'	
<i>aac(6')</i>	aac(6')-Ia	5'TAATTGCTGCATTCCGC3'	654 bp [11]
	aac(6')-Ib	5'TGTGACGGAATCGTTGC3'	
	5'CS	5'GGCATCCAAGCAGCAAAG3'	Variable [11]
	3'CS	5'AAGCAGACTTGACCTGA3'	Variable [11]
	IntI1-F IntI1-R	5'GGTCAAGGATCTGGATTTCG3' 5'ACATGCGTGTAATCATCGTC3'	Variable Variable [12]
	sulI	5'TGAAGGTTTCGACAGCAC3'	Variable [11]
<i>parC</i>	parC-up	5'CTGAATGCCAGCGCCAAATT3'	319 pb [5]
	parC-dn	5'TGCGGTGGAATATCGGTCGC3'	
<i>gyrA</i>	gyrA-up	5'CGCGTACTATACGCCATGAACGTA3'	589 pb [5]
	gyrA-dn	5'ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG3'	

performed using the PhastSystem apparatus and polyacrylamide gels with a pH range of 3–9. The gels were then stained with 500 mg nitrocefin/ml, and the isoelectric points (pIs) were obtained by comparison with a set of different betalactamases of known pIs.

Conjugation. These experiments were performed in LB using *Escherichia coli* J53-2 (rifampicin MIC \geq 100 μ g/ml) as recipient. Transconjugants were selected in trypticase soy agar plates containing both rifampicin (100 μ g/ml) and tobramycin (16 μ g/ml) and tested for antimicrobial susceptibility by disk diffusion and microdilution.

PCRs and characterization of integrons. A multiplex PCR assay, which includes detection of the TEM, SHV, OXA, CTX-M9 and CTX-M10 families of betalactamases, was used to characterize the betalactamase gene family members carried in *K. pneumoniae* strains and their transconjugants [9]. PCR experiments were repeated separately for primer sets that yielded a positive result and the PCR products were purified and sequenced (Table 1).

Characterization of ciprofloxacin resistance. Quinolone-resistance-determining regions (QRDR) of GyrA and ParC were amplified and sequenced using the primers and conditions described previously [5]. A PCR assay was performed to detect the presence of the *aac(6')-Ib-cr* gene. The PCR products were sequenced to detect the quinolone-modifying variant of this enzyme. The detection of class I integrons and the

characterization of their variable region were carried out using previously described procedures (Table 1) [11].

Results and Discussion

Description of the outbreak. During the study period (2007–2009), 366 *K. pneumoniae* strains were isolated from 222 patients. Of these, 98 isolates obtained from the clinical samples of 38 patients shared a multidrug resistance pattern (see below). The mean age of the patients was 60.0 (SD \pm 18.4; range 19–85 years), and 23 patients (60.5 %) were men. Among the 38 patients studied, the infectious episodes in order of frequency were respiratory tract infection (bronchial aspirate, 7; bronchoalveolar lavage, 3; and tracheal aspirate, 1), bacteremia (9), and urinary tract infection (8). In the remaining ten patients, the isolates were collected from catheter-related samples (4), abdominal samples (3), wounds (2) and cerebrospinal fluid (1).

Klebsiella pneumoniae infection was acquired in the ICU in 27 patients. Figure 2 shows the temporal detection pattern in

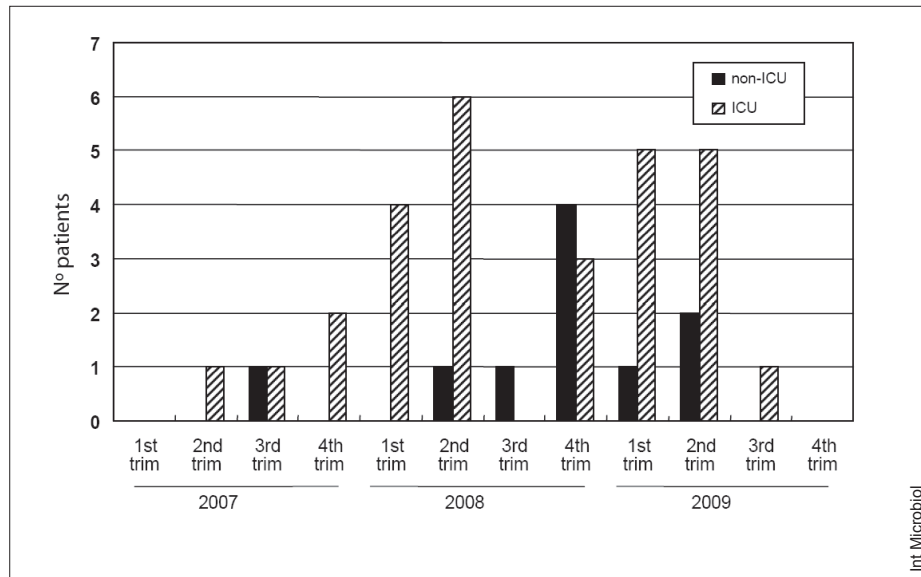


Fig. 2. Temporal distribution of newly admitted patients infected with *Klebsiella pneumoniae*. Striped bars represent patients with ICU-acquired *K. pneumoniae*, and black bars those patients with non-ICU-acquired *K. pneumoniae*.

newly admitted patients with clonally related *K. pneumoniae* infection over the study period.

Antibiotic susceptibility, molecular typing, and virulence profile. The isolates showed resistance to aminopenicillins, ureidopenicillins, amoxicillin/clavulanic acid, and piperacillin/tazobactam, and diminished susceptibility to cefepime (MIC range 2–4 µg/ml). They also showed resistance to tobramycin, amikacin, and ciprofloxacin (Table 2).

A common PFGE pattern with five different subtypes was observed in all *K. pneumoniae* strains analyzed. This pattern was different from those determined in other MDR and non-MDR *K. pneumoniae* strains isolated in the same period (Fig. 3) and was associated with ST14, as confirmed by MLST of seven representative strains (allelic profile: *gapA* 1, *infB* 6, *mdh* 1, *pgi* 1, *phoE* 1, *rpoB* 1, and *tonB* 1). This ST is the founder of clonal complex 14 (CC14), originally described as nosocomial, which has been detected in many countries [8]. The CC14/K2 clone is associated with reduced lethality in mice, most probably because of the absence of virulence determinants [6].

CC14/K2 strains have been implicated in nosocomial outbreaks related to the global spread of antibiotic resistance [8]. For instance, the Hungarian epidemic clone producing CTX-M-15 belongs to CC14, as does an epidemic carbapenemase-producing clone isolated in various facilities in the Midwestern United States [10]. These epidemic clones,

in analogy to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) USA300, have been called the “new MRSA” [7]. However, our results highlight the need for surveillance of all MDR *K. pneumoniae* strains, not only those that produce carbapenemase or ESBL.

Characterization of resistance mechanisms. All strains were PCR-positive for the *bla*_{OXA} gene, identified as *bla*_{OXA-1} after sequencing. On isoelectric focusing, the OXA-1 betalactamase produced a band with a pI of 7.3. This enzyme is widely disseminated in Enterobacteriaceae and is a common cause of amoxicillin/clavulanic acid resistance, especially in *E. coli* and *Salmonella enterica* [12,15]. OXA-1 has also been associated with diminished susceptibility to cefepime in *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [2,4]. The transfer of this betalactamase by conjugation in *E. coli* J53-2 yielded transconjugants that also exhibited the MDR pattern, with the exception of ciprofloxacin MIC, in which resistance was diminished in the recipient strain (Table 2). PCR followed by sequencing confirmed the presence of the *aac(6')Ib-cr* gene in both MDR *K. pneumoniae* strains and their transconjugants. The resistance to tobramycin and amikacin was due to *aac(6')Ib*, encoding an aminoglycoside-modifying enzyme [14]. A new variant of this enzyme, encoded by *aac(6')Ib-cr*, has been recently shown to modify quinolones, thus conferring a low level of resistance [4]. QRDR sequencing of GyrA and ParC identified a S83F substitution in GyrA [7]. The presence of a

Table 2. Minimal inhibitory concentration to several antimicrobials of *Klebsiella pneumoniae* strain and its transconjugants

	<i>K. pneumoniae</i> strain 8260	<i>K. pneumoniae</i> strain 8260 TC1
Antimicrobial	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	≥ 32	≥ 32
Piperacillin	≥ 128	≥ 128
Ticarcillin	≥ 128	≥ 128
Amox/ clavulanic	$\geq 32/16$	$\geq 32/16$
Piper/ tazobactam	32	32
Cefuroxime	16	16
Cefotaxime	≤ 2	≤ 2
Ceftacidime	≤ 1	≤ 1
Cefepime	2	2
Aztreonam	≤ 1	≤ 1
Imipenem	≤ 2	≤ 2
Gentamicin	≤ 4	≤ 4
Tobramycin	≥ 16	≥ 16
Amikacin	32	32
Cotrimoxazole	$\geq 4/76$	$\geq 4/76$
Ciprofloxacin	2	0.5

GyrA mutation in the strain described here supports the role of the enzyme encoded by *aac(6')-Ib-cr* in achieving clinically relevant resistance levels to quinolones, by selection of mutations in QRDR (Table 1) [4]. Since *bla*_{OXA-1} is usually integron-located, specific amplifications of antibiotic resistance genes and integron-specific primers were performed (Table 3). These amplifications suggested the presence of a class I integron whose variable region contained two resistance genes: *aac(6')-Ib-cr* in the first part of the cassette and *bla*_{OXA-1} in the second.

Nosocomial outbreaks due to MDR enterobacteria have become a serious problem worldwide, especially given the spread of ESBL- or carbapenemase-producing strains [3,16]. The OXA-1 betalactamase is widespread among enterobacteria and it has been described in isolates from hospitalized patients, from patients with community-acquired infections, and from sewage. The widespread distribution of the *bla*_{OXA-1} gene is associated with integrons that frequently carry other determinants, such as *aac(6')Ib*, ESBLs of the CTX-M family, and carbapenemases. Moreover, class I integrons harboring

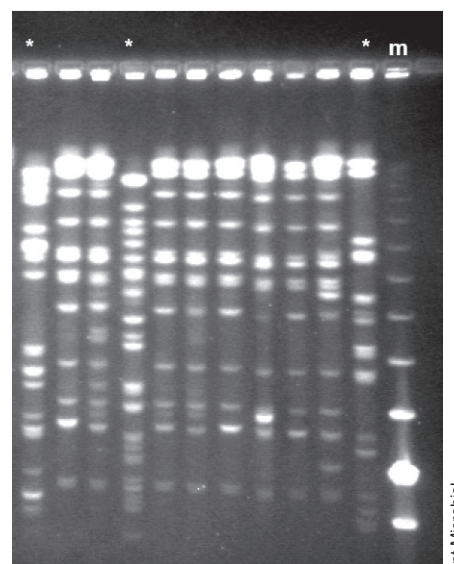


Fig. 3. PFGE patterns of OXA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates after restriction with *Xba*I. Asterisks (*) indicate contemporary non-clonally related *K. pneumoniae* strains. m: molecular weight marker.

Table 3. Results of PCR reactions performed to characterize the class I integron

Primer combination	Size of amplified fragment ^a
5'CS and 3'CS	2 kb
aac 6'Ib-cr-fw and OXA-rev	1655 pb
OXA-fw and aac 6'Ib-cr-rev	No amplification
5'CS and aac 6'Ib-cr-rev	500 pb
OXA-fw and 3'CS	700 pb
Intl-fw and aac 6'Ib-cr-rev	2,3 kb
OXA-fw and Sul3	500 pb

^aSize is approximate

*bla*_{OXA-1}-*aac(6')Ib-cr* in the variable region are frequently described in MDR *E. coli* and *Salmonella enteritidis* isolates [4,5]. *Klebsiella pneumoniae* strains of this CC14 have been detected among ESBL-producing isolates in Spain; however, to the best of our knowledge, ours is the first report of clustered infections caused by a non-ESBL-producing *K. pneumoniae* strain harboring *bla*_{OXA-1} and *aac(6')Ib-cr*. Moreover, the strain belonged to ST14 and was detected in a hospital setting in Spain [15]. In our studies of other non-MDR non-ESBL-producing *K. pneumoniae* strains we noted the high variability of these strains, a product of their multiclonality. In addition, the MDR strain belonged to ST14, which has been detected in European countries and in Tanzania, and Argentina [13,15,17]. The detection of these MDR strains in the community is a matter of concern because, in the clinical setting, the prolonged hospitalization of a colonized or infected patient in a high risk unit such as the ICU may allow their spread. These strains are not resistant to the majority of betalactam antibiotics used in clinical practice, and the problem is not as widespread as in the case of ESBL; however, since this multiresistance pattern is integron-located, new resistance determinants could be incorporated that threaten the effectiveness of the therapeutic options currently in use.

Acknowledgements. We thank the staff at the Microbiology Department of Hospital Universitari de Bellvitge, for daily contributions to this project. We thank the Institut Pasteur for the platform Genotyping of Pathogens and Public Health (Institute Pasteur, Paris, France), coding MLST alleles, and for the profiles available at [www.pasteur.fr/mlst]. This study was partially supported by Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), run by the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (CB06/06/0037), Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

Competing interests. None declared.

References

1. Ardanuy C, Liñares J, Domínguez MA, Hernández-Allés S, Benedi VJ, Martínez-Martínez L (1998) Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother* 42:1636-1640
2. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P (2001) Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1615-1620
3. Bradford PA (2001) Extended-spectrum betalactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933-951
4. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A (2012) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and *aac(6')Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 39:431-434
5. Brisse S, Verhoef J (2001) Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:915-924
6. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebise R, Diacourt L, Grimont P (2009) Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4:e4982
7. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother* 62:978-985
8. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Patrick A, Grimont D, Brisse S (2005) Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosomial isolates. *J Clin Microbiol* 43:4178-4182
9. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K (2008) Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clinical Microb* 46:707-712

10. Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfrlík K, Urbásková P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M (2009) International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases in a Czech hospital. *J Clin Microbiol* 47:3353-3357
11. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39:185-191
12. Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Sousa JC, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group (2006) Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6)-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3220-3221
13. Mshana SE, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T, Imirzalioglu C (2013) Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect Dis* 13:466
14. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F (2013) Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist* 2:94-99
15. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, et al., (2009) Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J. Antimicrob Chemother* 64:524-528
16. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F (1998) Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42:53-58
17. Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJ, Guerriero L, Vargas LJ, Zorreguieta A, Tokumoto M, Quiroga C, Tolmasky ME, Galas M, Centrón D (2007) Complex Class 1 Integrons with diverse variable regions, including *aac(6)-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4466-4470
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital

Meritxell Cubero^{1,2}, Guillermo Cuervo³, M. Ángeles Domínguez^{1,4}, Fe Tubau^{1,2}, Sara Martí^{1,2}, Elena Sevillano⁵, Lucía Gallego⁵, Josefina Ayats^{1,2}, Carmen Peña^{3,4}, Miquel Pujol^{3,4}, Josefina Liñares^{1,2} and Carmen Ardanuy^{1,2*}

Abstract

Background: In this study we describe the clinical and molecular characteristics of an outbreak due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-KP) producing CTX-M-15 and OXA-48 carbapenemase. Isogenic strains, carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* (CS-KP) producing CTX-M-15, were also involved in the outbreak.

Results: From October 2010 to December 2012 a total of 62 CR-KP and 23 CS-KP were isolated from clinical samples of 42 patients (22 had resistant isolates, 14 had susceptible isolates, and 6 had both CR and CS isolates). All patients had underlying diseases and 17 of them (14 patients with CR-KP and 3 with CS-KP) had received carbapenems previously. The range of carbapenem MICs for total isolates were: imipenem: 2 to >32 µg/ml vs. <2 µg/ml; meropenem: 4 to >32 µg/ml vs. <2 µg/ml; and ertapenem: 8 to >32 µg/ml vs. <2 µg/ml. All the isolates were also resistant to gentamicin, ciprofloxacin, and cotrimoxazole. Both types of isolates shared a common PFGE pattern associated with the multilocus sequence type 101 (ST101). The *bla*_{CTX-M-15} gene was detected in all the isolates, whereas the *bla*_{OXA-48} gene was only detected in CR-KP isolates on a 70 kb plasmid.

Conclusions: The clonal spread of *K. pneumoniae* ST101 expressing the OXA-48 and CTX-M-15 beta-lactamases was the cause of an outbreak of CR-KP infections. CTX-M-15-producing isolates lacking the *bla*_{OXA-48} gene coexisted during the outbreak.

Background

Nosocomial outbreaks due to multidrug-resistant enterobacteria have become a serious problem worldwide, especially due to the spread of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains and to the posterior emergence of carbapenemases [1]. In Europe, carbapenem resistance among *K. pneumoniae* isolates is related to the presence of multidrug-resistant isolates producing beta-lactamases belonging to the KPC, VIM, or OXA-48 families, making the treatment of infections difficult due to these microorganisms [1].

In Spain, carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CR-KP) strains have been described sporadically due to production of VIM-type enzymes and, more recently, OXA-48 [2, 3]. In addition, after whole genome sequencing of a ST101 OXA-48-producing *K. pneumoniae*, revealed that the *bla*_{OXA-48} gene was recently found in IncL/M plasmids previously described [4, 5].

In our hospital, a tertiary teaching hospital in Spain, an active surveillance program for ESBL- and carbapenemase-producing enterobacteria has been ongoing since the 1990s [6]. In this study we describe the clinical and molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to a *K. pneumoniae* clone producing CTX-M-15 and OXA-48. Interestingly, isogenic *K. pneumoniae* isolates producing the CTX-M-15 enzyme but lacking the *bla*_{OXA-48} gene were also detected during the same period of time.

* Correspondence: c.ardanuy@bellvitgehospital.cat

¹Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Methods

Ethics statement

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital (PR334/14). Written informed consent was not necessary for this retrospective study as it was part of our standard microbiological routine. Patient data were anonymized for the purposes of this analysis, and all confidential patient information was protected in accordance with Spanish law.

Hospital setting

The study was carried out in the Hospital Universitari de Bellvitge, a 900-bed university teaching hospital for adult patients in Barcelona (Spain) that provides medical and surgical care in all areas except pediatrics, obstetrics, and burns. The hospital serves an area of 600,000 inhabitants and admits an average of 24,000 patients per year.

Bacterial isolates and clinical data collection

This retrospective study was initially designed to identify CR-KP isolates, although the results obtained drew our attention to the importance of CS-KP present during the same period. Computerized clinical charts of patients with CR-KP or their clonally related CS-KP isolates were retrospectively reviewed in order to collect clinically relevant data: demographics, clinical features, treatments, and outcomes. From October 2010 to December 2012, all CR-KP and CS-KP isolates were selected from clinical samples.

The clinical relevance assessment was determined in accordance with the CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection in patients with samples from any body site positive for CR-KP, but without related signs or symptoms of infection. In those cases, patients were considered to be colonized [7].

Antimicrobial susceptibility testing and molecular typing

Antimicrobial susceptibility was tested by microdilution using the commercial method MicroScan® (Siemens, USA).

The presence of carbapenemases was tested by the double-disk synergy test between disks containing carbapenems and disks with amoxicillin/clavulanic acid, EDTA, and boronic acid.

The MICs of different antimicrobials were interpreted using the new EUCAST breakpoints valid from 2015 (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/): imipenem (IPM): susceptible, MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 8 $\mu\text{g/ml}$; meropenem (MEM): susceptible, MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 8 $\mu\text{g/ml}$; ertapenem: susceptible, MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 1 $\mu\text{g/ml}$; gentamicin (GEN): susceptible, MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 4 $\mu\text{g/ml}$; amikacin (AMK): susceptible MIC ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 16 $\mu\text{g/ml}$; trimethoprim-sulfamethoxazole

(SXT): susceptible, MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 4 $\mu\text{g/ml}$; and ciprofloxacin (CIP): susceptible, MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and resistant, MIC > 1 $\mu\text{g/ml}$.

The genetic relatedness of all multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates was tested by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of chromosomal DNA after restriction with *Xba*I. Band patterns were analyzed by visual inspection following the criteria described by Tenover et al. [8]. Strains differing in 3 or less bands were considered subtypes. Isolates from the different PFGE subtypes were selected for multi-locus sequence typing (MLST). MLST was performed as described on the MLST website of the Institute Pasteur: <http://bigsgdb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>. The allele number and sequence type (ST) were assigned using this MLST website.

Characterization of the multidrug-resistance pattern

Beta-lactamase characterization

A multiplex PCR assay described by Fang et al., which includes detection of *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV}, was used for beta-lactamase detection in all *K. pneumoniae* isolates [9]. For CTX-M enzymes a second PCR was performed to discriminate between *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{CTX-M-10} group, and *bla*_{CTX-M-1} group [10]. Other carbapenemase genes were detected by PCR amplification following previously published procedures: class A carbapenemases (KPC, IMI, NMC, GES) [11], metallo-beta-lactamases (IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, GIM, SIM, SPM) [11], and the oxacillinase (OXA-48) [12]. PCR products were purified and sequenced in both strands using the amplification primers at Macrogen Inc. (Korea).

Plasmid analysis

Plasmid analysis and location of the genetic support of the OXA-48 carbapenemase were performed. Plasmid DNA from two CR-KP and two CS-KP clinical isolates was extracted using the GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Scientific), and was analyzed by electrophoresis on 0.7 % agarose gels. Plasmid size was determined by comparison with those from the standard strains *Escherichia coli* NCTC 50193 (CECT678) and NCTC 59192 (CECT679), ranging in size from 163.3 to 2 kb. The *K. pneumoniae* 7680 strain, containing a plasmid with the *bla*_{OXA-48} gene, was used as a positive control. *Escherichia coli* strains CECT678 and CECT679 were used as molecular weight markers (<http://www.straininfo.net>). CECT678 contains natural plasmids of 54.38 kb, 7.30 kb, 5.56 kb, 5.14 kb, 3.98 kb, 3.08 kb, 2.71 kb, and 2.06 kb; CECT679 contains plasmids of 154 kb, 66.2 kb, 37.6 kb, and 7.4 kb [13]. To locate the *bla*_{OXA-48} gene, gels with plasmid DNA were transferred to a nylon membrane by the Southern technique and hybridized with a PCR-generated OXA-48 probe,

labeled with dUTP-digoxigenin. Detection of hybrids was done using an antidigoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase following the manufacturer's indications (Roche Diagnostics).

Results

Outbreak description

The first isolation of the carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-KP) occurred in late October 2010, in a patient who developed a surgical site infection (intra-abdominal abscess) due to a complication during surgery for colon cancer. A total of 62 CR-KP isolates were obtained from 28 hospitalized patients from October 2010 to December 2012. The outbreak was initially restricted to the Digestive Surgery Unit but it was subsequently spread throughout the Intensive Care Unit (ICU). A total of 42.85 % of infected patients were detected in the period January-April 2011 (maximum peak of incidence) (Fig. 1).

During a routine control of ESBL-producing *K. pneumoniae* by molecular typing (PFGE) we also detected some carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* (CS-KP) isolates, all of them with the same PFGE pattern as the CR-KP epidemic strain (denominated PFGE-1). The ESBL-CS-KP strains were isolated from February 2011 to May 2012 in 23 clinical samples from 14 patients, whereas the non-ESBL-CS-KP isolates were mainly detected between July and November 2011 (50 % of the isolates identified in 7 patients). However, their carbapenem-resistant counterparts were present until the end of the study period. Thereafter, a gradual decrease in new cases of CR-KP with the same PFGE pattern was detected in relation to general control measures implemented during the third trimester of 2011.

Throughout the whole period, six patients had CR-KP and CS-KP isolates in different clinical samples ($n = 26$ isolates). In four of these patients the resistant CR-KP isolates preceded the susceptible CS-KP one. In Fig. 1 a single isolate is represented for each patient; patients with both CR-KP and CS-KP isolates are represented just once as presenting the CR-KP isolate.

The clinical timelines for the 28 patients with isolation of CR-KP (22 CR-KP and 6 with both isolate types) are shown in Fig. 2. Fourteen of the patients with CR-KP isolates had previously received carbapenems (marked with a star). Most patients with CR-KP isolates were admitted to ICU and surgical wards.

Clinical characteristics, therapy, and outcomes

Table 1 shows the clinical characteristics and demographics of patients with clinical samples yielding CR-KP or CS-KP. Patients with both strains (CR- and CS-KP) were analyzed only in the group of CR-KP isolates. Overall, there were no differences in terms of demographics, site of isolation, or comorbid conditions.

Prior antibiotic therapy was more frequent among patients with CR-KP (28/28 vs. 11/14; $p = 0.032$) and especially involved carbapenems, although the difference in this latter respect did not reach statistical significance (14/28 vs. 3/14; $p = 0.102$).

Twenty out of 28 patients with clinical CR-KP samples were considered to have an infection due to this microorganism. Of these, 19 received antibiotic treatment (as well as other adjunctive therapies in some cases), which in 17 cases was considered appropriate according to the susceptibility test: tigecycline ($n = 7$, one of them in combination with AMK), carbapenems other than ertapenem ($n = 4$, in which cases the bacteria exhibited an intermediate sensitivity to the carbapenem selected, one

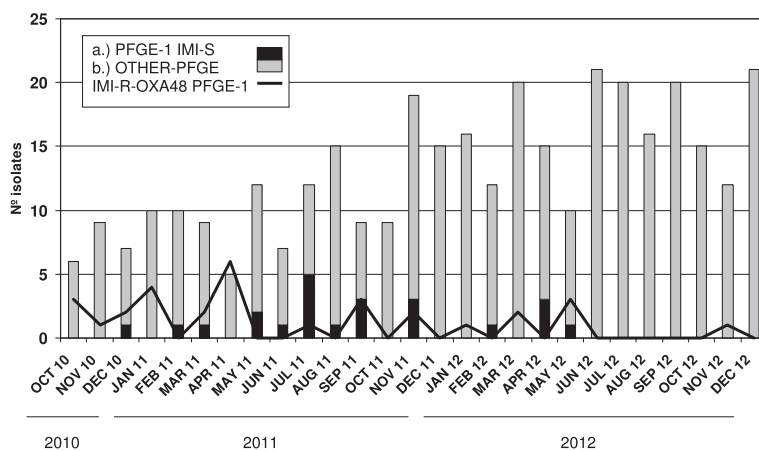
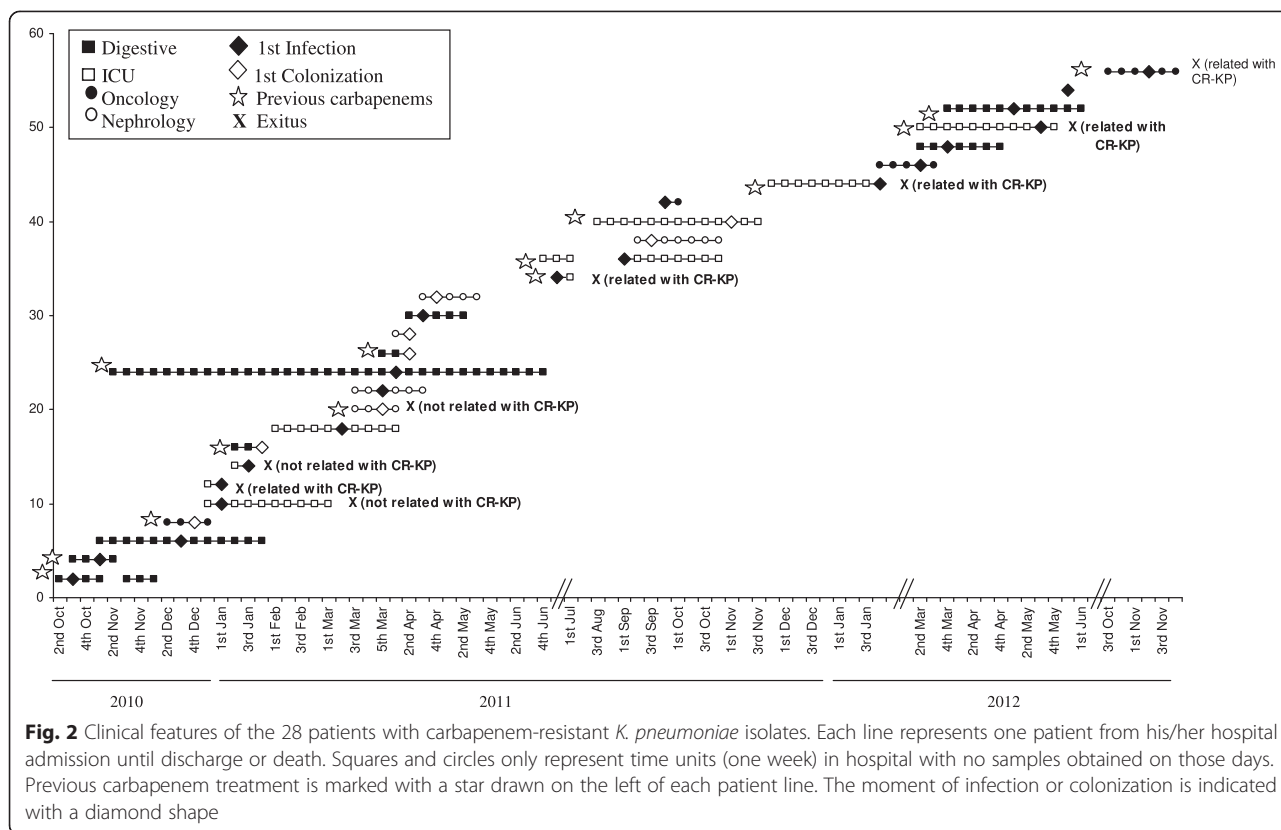


Fig. 1 Detection of clinical samples with ESBL-producing *K. pneumoniae* and non-ESBL-producing *K. pneumoniae*. Black bars represent CS-KP ESBL strains belonging to the PFGE-1 pattern and gray bars represent non-PFGE-1 pattern ESBL *K. pneumoniae*. Black line represents patients with CR-KP non-ESBL strains harboring the *bla*_{OXA-48} gene that belonged to the PFGE-1 pattern



of them in combination with AMK), colistin ($n = 4$), AMK ($n = 1$), and fosfomicin (FOF) ($n = 1$). Twelve of these 17 patients (70.58 %) recovered after treatment, while the other five died (three of them probably related to the CR-KP infection). The remaining three patients did not receive appropriate antimicrobial therapy: one patient treated with amoxicillin/clavulanic acid (AMC) survived, another treated with piperacillin/tazobactam (TZP) died due to a septic shock related to CR-KP, and the third did not receive treatment and died.

Nine of 14 patients with clinical samples yielding CS-KP were considered infected. Of these, eight were treated with carbapenems (one of them in combination with AMK) and one with tigecycline. Only one patient treated with IPM died (due to a urinary sepsis), although CS-KP did not appear to be the primary cause of death.

There was a significant difference in the use of carbapenems as antibiotic treatment among infected patients (3/20 vs. 7/9; $p = 0.002$). No other statistical difference was detected among CR-KP and CS-KP patients.

Phenotypic and molecular characterization of the isolates

By disk diffusion all CR-KP isolates showed synergy between AMC and carbapenems, and the Hodge test was positive, suggesting carbapenemase activity. By contrast, CS-KP isolates did not present these phenotypic characteristics. CR- and CS-KP isolates were multidrug resistant.

Table 2 shows the range of MICs of different antimicrobial agents. IPM MICs of CR-KP isolates ranged from 2 to >32 $\mu\text{g/ml}$, MEM MICs from 4 to >32 $\mu\text{g/ml}$, and ertapenem MICs from 8 to >32 $\mu\text{g/ml}$. All isolates with MICs of IPM >32 $\mu\text{g/ml}$ were resistant to cefoxitin (FOX) (MIC >16 $\mu\text{g/ml}$). Using current EUCAST breakpoints, all the isolates had ertapenem MICs in the resistant range (breakpoint for resistance MIC >1 $\mu\text{g/ml}$).

A common PFGE pattern was observed in all CR-KP and CS-KP isolates that was different to those observed in other ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates collected in the same period (data not shown). Among CR-KP isolates there was a single PFGE pattern type designated PFGE-1, whereas CS-KP isolates showed the same PFGE-1 pattern with six different subtypes (Table 2). Ten representative isolates from the different subtypes (4 CR-KP and 6 CS-KP isolates) were typed by MLST and showed an identical allelic profile: *gapA* (allele number 2), *infB* (allele number 6), *mdh* (allele number 1), *pgi* (allele number 5), *phoE* (allele number 4), *rpoB* (allele number 1), and *tonB* (allele number 6), associated with ST101.

The *bla*_{CTX-M} gene was detected by PCR in all CR-KP and CS-KP isolates, whereas the *bla*_{OXA-48} gene was only present in CR-KP isolates. After sequencing, the beta-lactamases were identified as CTX-M-15 and OXA-

Table 1 Epidemiological and clinical data of patients with CR-KP and CS-KP isolates

	CR-KP N = 28	CS-KP N = 14	p-value
Mean age (SD)	62.93 (+/- 14.491)	69.62 (+/- 16.717)	0.186
Male sex	18 (64.3 %)	7 (50 %)	0.508
Site of isolation			
Urine	10 (35.7 %)	9 (64.3 %)	0.107
Blood culture	6 (21.4 %)	2 (14.3 %)	0.697
Surgical wound	4 (14.3 %)	1 (7.1 %)	0.650
Abdominal samples	3 (10.7 %)	0	0.539
Respiratory samples	4 (14.3 %)	1 (7.1 %)	0.643
Others	1 (3.6 %)	1 (7.1 %)	1
Length of stay before acquisition (SD)	28.43 (+/- 31.319)	20.14 (+/- 31.705)	0.430
Overall mortality (related CR- or CS-KP) ^a	35 % [7/20] (20 % [4/20])	11.11 % [1/9] (0)	0.371 (0.280)
ICU acquisition	9 (32.1 %)	0	0.019*
Previous antibiotic therapy (treatment)			
Penicillins/Betalactamase Inhibitor	8 (28.6 %)	2 (14.3 %)	0.451
Carbapenems	14 (50 %)	3 (21.4 %)	0.102
Third generation cephalosporins/Monobactams	2 (7.1 %)	1 (7.1 %)	1
Fluoroquinolones	4 (14.3 %)	3 (21.4 %)	0.668
Trimethoprim-sulfamethoxazole	0	2 (14.3 %)	0.106
None	0	3 (21.4 %)	0.032*
Treatment			
Penicillins/Betalactamase Inhibitor	1 (3.6 %)	0	1
Carbapenems	3 (10.7 %)	7 (50 %)	0.008*
Carbapenems + Amikacin	1 (3.6 %)	1 (7.1 %)	1
Tigecycline	6 (21.4 %)	1 (7.1 %)	0.392
Tigecycline + Amikacin	1 (3.6 %)	0	1
Aminoglycosides	1 (3.6 %)	0	1
Colistin	4 (14.3 %)	0	0.283
Fosfomycin	1 (3.6 %)	0	1
None	1 (3.6 %)	0	1

*p < 0.05 being considered significant

^aPatients with non-significant isolation of CR-KP or CS-KP, considered colonized, were excluded from the mortality analysis

48. The remaining carbapenemase genes were not detected by PCR.

Plasmid analysis

Southern blot hybridization analysis of plasmid DNA from two resistant and two susceptible clinical isolates identified a plasmid of approximately 70 kb in the CR-KP isolates. This plasmid had the same size as the control strain (*K. pneumoniae* 7680). Southern blot hybridization with the OXA-48 probe demonstrated the presence of the *bla*_{OXA-48} gene within this plasmid (Fig. 3). Plasmid analysis of representative carbapenem

resistant and carbapenem susceptible clinical strains (2 of each) revealed the presence of 6 and 5 plasmids respectively, ranging in size from 1.9 Kb to 70 kb. Plasmid profile was identical in both CS-KP and CR-KP strains except for the presence of an extra 70 kb structure in the CR-KP isolates.

Discussion

In the present study the carbapenem MICs of the CR-KP isolates producing OXA-48 had a broad range. Following the EUCAST criteria, CR-KP isolates had carbapenem MICs in the intermediate or resistant range, with the

Table 2 Characteristics of CR-KP and CS-KP isolates

	CR-KP	CS-KP
Number of different patients	28	14
Period of isolation	Oct 2010- Dec 2012	Dec 2010- May 2012
Betalactamase production	CTX-M-15 and OXA-48	CTX-M-15
PFGE profile and subtypes	PFGE-1	PFGE-1 and 6 subtypes
MLST	101	101
Antimicrobial susceptibility		
Antimicrobial	MIC range (mg/L)	MIC range (mg/L)
Gentamycin	>8	>8
Amikacin	<8	<8
Cotrimoxazole	>4	>4
Ciprofloxacin	>2	>2
Imipenem	2 / >32	<2
Meropenem	4 / >32	<2
Ertapenem	8 / >32	<8

exception of seven isolates which had IPM MICs of 2 µg/ml. In addition, all OXA-48-producing isolates had ertapenem MICs ranging from 4 to >32 µg/ml, which is considered resistant. It is known that ertapenem MICs are easily altered in carbapenemase-producing isolates, and this is reflected in our observations here. Therefore, ertapenem resistance could be a good microbiological alert for detecting isolates with the presence of these enzymes. It should be noted that isolates with higher carbapenems MICs (for instance, IPM >32 µg/ml) were also FOX-resistant, suggesting that other mechanisms, such as the loss of porins could be involved in these

resistant strains, as previously described [2, 11]. Other authors have suggested the efficacy of temocillin for OXA-48 producers screening and quickly recognition. In our experience (data not shown), although both isolates were temocillin-resistant, OXA-48 producers had no inhibition zone while a small zone was observed in the other strains [14]. Therapeutic options in patients infected by CR-KP are very limited. Indeed, beta-lactam resistance mediated by OXA-family beta-lactamases is known to be poorly inhibited by beta-lactamase inhibitors [15]. Therefore, and based on our experience, combinations of a beta-lactam plus beta-lactamase inhibitor should not be used for the treatment of CR-KP-producing OXA-48 enzymes. Other beta-lactam antibiotics, such as aztreonam and expanded spectrum cephalosporins, are theoretically useful in infections caused by OXA-48-producing clones, although the association of a CTX-M-15 in this outbreak precluded their use in our patients [16].

According to recent reports, there is limited evidence to support the use of tigecycline, which appears to show low effectiveness for treating CR-KP infections [15]. In our experience this antibiotic was effective (5 of 7 patients cured), although in three cases a surgical drainage of the abscess was also needed. Two patients treated with tigecycline died, although in one case the death was not related to the infection, while the other death was due to a bacteremic septic shock. Therapeutic options in patients infected by CR-KP are, therefore, very limited, and clinicians must often resort to old antibiotics with a non-negligible toxicity, as is the case of colistin, which was successfully used in four patients in our series [16, 17].

The use of carbapenems to treat OXA-48-producing enterobacteria with MICs of carbapenems in the

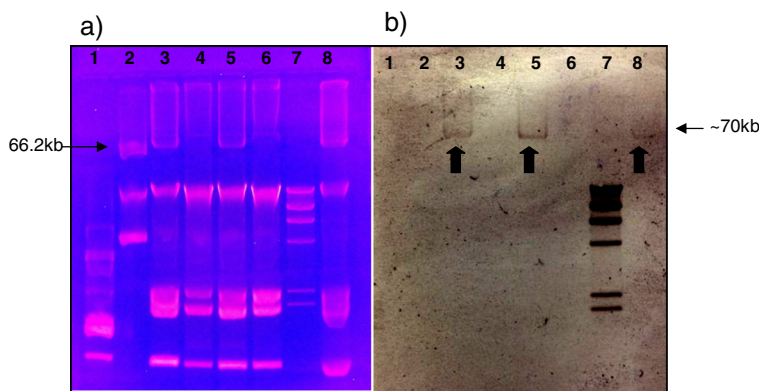


Fig. 3 Plasmid profile of CR-KP and CS-KP isolates. **a** Agarose gel electrophoresis of *K. pneumoniae* plasmid DNA, and **b** Southern blot hybridization using a *bla*_{OXA-48} specific probe. Arrows show the presence of a ~70 kb OXA-48-containing plasmid in the CR-KP samples. Lane 1: CECT 678 (54.38 kb, 7.30 kb, 5.56 kb, 5.14 kb, 3.98 kb, 3.08 kb, 2.71 kb, and 2.06 kb plasmids); Lane 2: CECT 679 (154 kb, 66.2 kb, 37.6 kb, and 7.4 kb plasmids); and Lane 7: Low range ladder as controls. Lanes 3 and 5: CR-KP clinical isolates. Lanes 4 and 6: CS-KP clinical isolates. Lane 8: Positive control *K. pneumoniae* strain (*K. pneumoniae* 7680)

intermediate range is a controversial issue. In recent outbreaks, sporadic cases of reported treatment have not shown good results [18], although the volume of information is very limited. In the present study, four patients with CR-KP infections received carbapenems (cases in which the bacteria exhibited an intermediate sensitivity to the carbapenem selected), and in two of these cases the carbapenem was associated with another active antibiotic (AMK or FOF). In this scenario the inoculum effect is probably an important variable that could explain the favorable outcome of our patients treated with carbapenems [16], in whom the antibiotic treatment supplemented the extraction of catheters and/or the drainage of collections, adjunctive therapies which undoubtedly meant a drastic reduction of the inoculum [19]. The probable usefulness of continuous infusion regimens was not tested in any of our patients [20].

Carbapenem resistance in *K. pneumoniae* is a growing problem in the hospital setting that limits the use of this antibiotic group for therapeutic purposes. There are several families of enzymes that are responsible for this increase in resistance, mainly KPC and VIM [1]. However, an increase in resistance to carbapenems due to OXA-48 carbapenemase-producing clones has recently been observed, especially associated with nosocomial outbreaks in Mediterranean countries, the first of which occurred in Turkey in 2004 [12].

This resistance determinant has now been detected worldwide in several bacterial species such as *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* [21], and *Citrobacter freundii* [4], although the predominant species are *E. coli* and *K. pneumoniae*. In the present study we documented a clonal outbreak due to *K. pneumoniae* producing CTX-M-15 and OXA-48 carbapenemase. The sequence type of the epidemic strain (ST101) producing both enzymes (CTX-M-15 and OXA-48) has also been detected in other European and Mediterranean countries such as Israel and Tunisia [2, 4, 22], suggesting a continental spread of this multidrug-resistant lineage that has not yet been eradicated [23]. The dissemination across Spain and Europe of the OXA-48 enzyme has been described in several studies [2, 24, 25]. The most prevalent *K. pneumoniae* clones are ST101, ST11, and ST405, although in our hospital we have only detected OXA-48 isolates with ST101. The OXA-48 enzyme has been detected in various well-described clones of *K. pneumoniae*: ST101, ST11, ST14, ST15, ST147, ST395, and ST405 have already been reported in European and Mediterranean countries [23–28].

Patients affected by CR-KP isolates in our hospital shared certain characteristics with those of other outbreaks in our geographic area [2, 24, 25]. They were patients with significant comorbidities who had been exposed to major antibiotic pressure and whose infection was hospital-acquired.

These infections were related to previous surgery or other invasive procedures (central venous catheters or urinary catheters). Fourteen patients received carbapenems prior to the CR-KP isolation. Although no case control studies have been published, previous carbapenem therapy has been identified in many studies describing CR-KP outbreaks [29]. In fact, this risk factor was more frequently identified in patients with CR-KP isolates than in those with CS-KP isolates.

The coproduction of ESBL with the *bla*_{OXA-48} gene is frequent and mainly related to the presence of plasmids [5]. In our study the co-existence of carbapenem-resistant and susceptible strains could be explained by the presence of the *bla*_{OXA-48} and *bla*_{CTX-M-15} genes in independent elements. The transmissibility of the plasmid-encoded *bla*_{OXA-48} favored the rapid spread of these strains, so the acquisition of *bla*_{OXA-48} by the carbapenem-susceptible strain could have occurred in our institution. The *bla*_{OXA-48} gene was detected located on a 62-kb IncL/M plasmid or on a 70-kb plasmid, indicating that a plasmid of variable size was mainly responsible for the spread of this gene [4, 21].

Conclusions

Multi-resistant isolates of European carbapenem-resistant OXA-48 *K. pneumoniae* clone (ST101), previously identified in other Spanish hospitals and harboring plasmids carrying the *bla*_{OXA-48} gene, have been producing an outbreak in our hospital in Barcelona (Spain). In conclusion, the European carbapenem-resistant OXA-48 *K. pneumoniae* clone (ST101) is spreading among Spanish hospitals. Previous carbapenem use was identified as a common factor in affected patients. These multidrug-resistant isolates were successfully treated with tigecycline, colistin, or carbapenems combined with other antibiotics and adjunctive therapies. The spread of these strains suggests a plausible scenario in which the acquisition of new resistance determinants may make a strain extremely drug-resistant. Thus, these results highlight the need for surveillance of all multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates, not only those that produce carbapenemase or ESBL.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MC, MP, JL, and CA conceived and participated in the design of the study. MC, GC, MP, and CA anonymized the patient data and had access to patient-identifying information. GC, MAD, FT, JA, CP, and MP participated in the acquisition of data (laboratory or clinical). MC, GC, and CA participated in the literature search and analysis of data. SM, ES, and LG made possible the plasmid profile study. All authors read, revised, and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES - CB06/06/0037), ISCIII - Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

We thank the Genotyping of Pathogens and Public Health Platform (Institute Pasteur, Paris, France) for coding MLST alleles and profiles available at <http://bigsdweb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>.

We would also like to thank Dr. Jordi Vila from the Hospital Clinic (Barcelona, Spain) for the *K. pneumoniae* strain (*K. pneumoniae* 7680) used as a positive control in our plasmid experiments.

Author details

¹Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain. ²Centro de Investigacion Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain. ⁴Spanish Network for Research in Infectious Diseases (RD06/0008), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁵Department of Immunology, Microbiology, and Parasitology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bizkaia, Spain.

Received: 13 May 2015 Accepted: 17 August 2015

Published online: 03 September 2015

References

- Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daiikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:682–707.
- Pitar C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4398–401.
- Tortola MT, Lavilla S, Miro E, Gonzalez JJ, Larrosa N, Sabate M, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two Enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3492–4.
- Carré A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:1369–73.
- Villa J, Viedma E, Branas P, Mingorance J, Chaves F. Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP_ST11_OXA-48. *Genome Announc* 2014, 2:e00737-14.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:53–8.
- Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36:309–32.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233–9.
- Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008;46:707–12.
- Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdét C, Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1249–55.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440–58. Table.
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:15–22.
- Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57:493–5.
- Woodford N, Pike R, Meunier D, Loy R, Hill R, Hopkins KL. In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* and *Enterobacter spp.* and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:564–7.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011;6:653–66.
- O'Brien DJ, Wrenn C, Roche C, Rose L, Fenelon C, Flynn A et al. First isolation and outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Irish hospital, March to June 2011. *Euro Surveill* 2011, 16:pii=19921.
- Tasina E, Haidich AB, Kokkali S, Arvanitidou M. Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:834–44.
- Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, et al. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis.* 2011;53:879–84.
- Maherault AC, Nordmann P, Therby A, Pangon B. Efficacy of imipenem for the treatment of bacteremia due to an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Clin Infect Dis.* 2012;54:577–8.
- Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1099–106.
- Potron A, Nordmann P, Rondinaud E, Jauregui F, Poirel L. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:476–7.
- Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Dhaher Y, Edgar R, et al. Introduction of OXA-48-producing Enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2763–6.
- Liapi E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalie L, van der Mee-Marquet N, et al. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O1121–3.
- Oteo J, Ortega A, Bartolome R, Bou G, Conejo C, Fernandez-Martinez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain: High in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406–12.
- Paño-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San FC, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:89–96.
- Gottig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VA. In Vivo Horizontal Gene Transfer of the Carbapenemase OXA-48 During a Nosocomial Outbreak. *Clin Infect Dis.* 2015;60(12):1808–15.
- Lopez-Cerero L, Almirante B. Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: reservoirs and transmission mechanisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32 Suppl 4:10–6.
- Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:84–8.
- Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2420–3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit



Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013)

M. Cubero^{1,2}, I. Grau^{2,3}, F. Tubau^{1,2}, R. Pallarés^{2,3}, M. A. Domínguez^{1,4}, J. Liñares^{1,2} and C. Ardanuy^{1,2}

1) Microbiology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona-IDIBELL, Barcelona, 2) CIBER de Enfermedades Respiratorias, ISCIII, Madrid, 3) Infectious Diseases Departments, Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona-IDIBELL, Barcelona and 4) Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract

Virulent hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains associated with the *magA* and *rmpA* genes have mainly emerged in Asia. We analysed the frequency and the clinical and molecular epidemiology of *K. pneumoniae* bacteraemia isolates obtained over a 7-year period (2007–2013). Fifty-three of 878 *K. pneumoniae* invasive isolates (5.4%) showed a hypermucoviscous phenotype (by the string test). Of these, 16 (30.2%) were *magA*⁺/*rmpA*⁺, 12 (22.6%) were *magA*⁻/*rmpA*⁺, and the remaining 25 (47.2%) were *magA*⁻/*rmpA*⁻. After multilocus sequence typing and *wzi* sequencing, all *magA*⁺/*rmpA*⁺ isolates were serotype K1 and sequence type (ST)23. Of the 12 *magA*⁻/*rmpA*⁺ isolates, nine were K2 (ST380, ST86, ST65, ST25 and ST493), and three *magA*⁻/*rmpA*⁺ isolates had the new *wzi* allele 122, an unknown serotype, and the new ST1013. The remaining isolates, which were *magA*⁻/*rmpA*⁻, showed different serotypes and STs. Patients with *magA*⁺/*rmpA*⁺ or *magA*⁻/*rmpA*⁺ *K. pneumoniae* bacteraemia more frequently had pyogenic liver abscesses (PLAs) and pneumonia than patients with *magA*⁻/*rmpA*⁻ *K. pneumoniae* bacteraemia (respectively: 21.4% vs. 8%, *p* 0.26; and 17.9% vs. 0%, *p* 0.05). In fact, *magA*⁻/*rmpA*⁻ isolates were similar to the those termed 'classic' *K. pneumoniae* isolates causing bacteraemia, the urinary and biliary tracts being the main foci of infection. In conclusion, hypervirulent clones (CC23K1, CC86K2, CC65K2, and CC380K2) were infrequent among *K. pneumoniae* isolates causing bacteraemia in our geographical area. A hypermucoviscous phenotype as determined with the string test is not enough to recognize these clones; additional molecular studies are needed. Patients with *magA*⁺ and/or *rmpA*⁺ *K. pneumoniae* bacteraemia more frequently had PLAs and pneumonia than patients without hypermucoviscosity genes.

© 2015 Clinical Microbiology and Infection published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: Bacteraemia, hypermucoviscous, hypervirulent clones, *Klebsiella pneumoniae*, Spain

Original Submission: 23 June 2015; **Revised Submission:** 16 September 2015; **Accepted:** 26 September 2015

Editor: M. Paul

Article published online: 8 October 2015

Corresponding author: C. Ardanuy, Microbiology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain
E-mail: c.ardanuy@bellvitgehospital.cat

Introduction

Klebsiella pneumoniae is an important human pathogen that can cause bacteraemia, urinary infections, and abscesses. These infections may be nosocomial, healthcare related, or

community acquired. Several virulence factors have been identified in *K. pneumoniae* isolates, including a polysaccharide capsule, which is the basis of the serotype classification (at least 78 different serotypes) [1]. Although the *K. pneumoniae* capsule acts as a determinant virulence factor, certain serotypes (K1, K2, K4, and K5) are known as hypervirulent clones. As well as being determined by serology, the capsular classification can also be determined by sequencing of the *wzi* gene of the *cps* cluster [1]. Besides the capsule, other virulence factors that are usually associated with the genotype have been described in *K. pneumoniae*. The most important clonal complex (CC) is CC23, which includes hypervirulent *K. pneumoniae* strains.

These strains have an easily recognizable hypermucoviscous phenotype.

The first hypervirulent *K. pneumoniae* strains with a hypermucoviscous phenotype were described in Taiwan in 2004 [2]. Since then, several reports worldwide have described these strains [3–8], but the highest incidence is found in Asian countries [9–11]. Although the most common focus of infection is pyogenic liver abscess (PLA) [2,7], they have been implicated in other infections, including metastatic abscesses [2,5,12–16]. Infections due to hypermucoviscous *K. pneumoniae* have been identified in patients with and without underlying diseases, and also in asymptomatic carriers [17].

The hypermucoviscous phenotype in *K. pneumoniae* is related to the presence of the chromosomally encoded hypermucoviscosity gene A (*magA*), which is characteristic of the K1 capsular operon, and/or to the plasmid gene regulator of the mucoid phenotype A (*rmpA*), which is a regulator of extracapsular polysaccharide synthesis [2,15].

In this study, we analysed the prevalence of hypermucoviscous *K. pneumoniae* as a cause of bacteraemia in adult patients over a 7-year period in a teaching hospital in Barcelona, Spain. We also characterized the strains and analysed the clinical characteristics of patients with bacteraemia according to genotype and phenotype.

Materials and methods

Hospital setting

The Hospital Universitari de Bellvitge is a tertiary-care teaching hospital located in the southern Barcelona area, Spain. It is a centre for adult patients that serves an area containing 600 000 inhabitants and receives approximately 30 000 hospital admissions per year. All bacteraemia episodes are prospectively recorded in a computerized database, which includes clinical and demographic data. A patient could be included more than once if the episodes occurred >30 days apart, unless they were considered to be relapses or persistence.

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital (PR037/15).

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility testing

A total of 983 *K. pneumoniae* bacteraemia episodes were detected among 880 patients from 2007 to 2013. Of these, 878 isolates (89.3%) were available for this study.

Antimicrobial susceptibility was tested by microdilution with MicroScan panels (Beckman Coulter, West Sacramento, CA, US), according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendations [18].

Characterization of the hypermucoviscous phenotype

The identification of the hypermucoviscous phenotype was performed with the string test [2]. Positive isolates were selected for molecular characterization (PCR of *magA* and *rmpA*, multilocus sequence typing (MLST), and *wzi* sequencing). In addition, all 357 *K. pneumoniae* isolates (including those with negative string test results) collected between 2007 and 2009 were also subjected to PCR of *magA* to confirm the absence of this gene when there was a negative string test result. PCR of *rmpA* was only performed when a positive string test result was obtained. *magA* and *rmpA* were detected by PCR as described previously [2,19].

Serotypes

Serotypes were identified by PCR and sequencing of the K-serotype specific *wzi* allele. The allele number and putative serotype (when possible) were assigned by use of the *K. pneumoniae* website (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/Klebsiella/Klebsiella.html>) [1]. New *wzi* sequences were sent to Institut Pasteur in order to obtain the new allele. PCR for serotype-specific targets was performed to confirm K1 and K2 serotypes [2,19].

Molecular typing

All string test-positive isolates were typed by MLST, with the protocol described on the *K. pneumoniae* MLST website (http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Kpneumoniae.html). Alleles and sequence types (STs) that had not previously been described were submitted for new designations.

Statistical analysis

Data were analysed with the statistical package SPSS for Windows version 18.0, by use of the chi-square test and Fisher's test when appropriate. A *p*-value of ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Bacterial strains, hypermucoviscous phenotype, and antimicrobial susceptibility

Among 878 isolates tested, 53 (collected from 50 patients) had a hypermucoviscous phenotype (positive string test result) and were included for further analysis (Fig. 1). All 340 isolates with negative string test results collected in the 2007–2009 period had a negative result for *magA* PCR.

The presence of both hypermucoviscous phenotype genes (*magA*⁺/*rmpA*⁺) was identified in 16 episodes. Twelve isolates

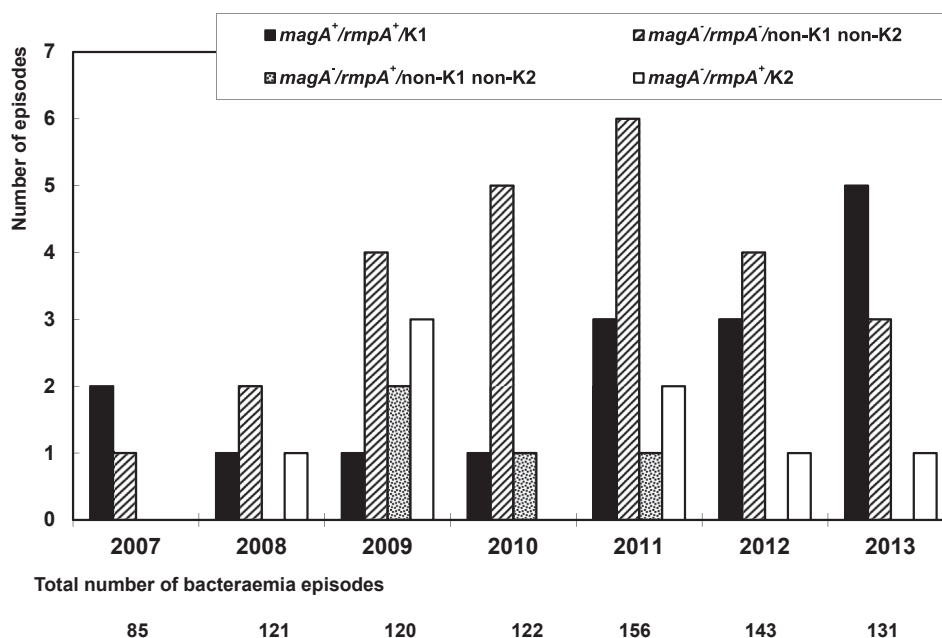


FIG. 1. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia episodes: annual distribution of the three genotypes (*magA*⁺/*rmpA*⁺, *magA*⁻/*rmpA*⁺, and *magA*⁻/*rmpA*⁻) and its relationship with serotype.

carried *rmpA* but not *magA* (*magA*⁻/*rmpA*⁺), and 25 isolates carried neither gene (*magA*⁻/*rmpA*⁻). Although there were no statistically significant differences, an increase in the number of *magA*⁺/*rmpA*⁺ isolates was observed in the last 3 years (Fig. 1). The overall prevalence of the hypermucoviscous phenotype was 53 of 878 (6%), and the prevalence rates of the different genotypes were 16 of 878 (1.8%) for *magA*⁺/*rmpA*⁺ isolates, 12 of 878 (1.4%) for *magA*⁻/*rmpA*⁺ isolates, and 25 of 878 (2.8%) for *magA*⁻/*rmpA*⁻ isolates.

All *K. pneumoniae* isolates harbouring *magA* and/or *rmpA* were susceptible to all antimicrobials tested, with the exception of ampicillin, piperacillin, and ticarcillin. Nearly half (11/25) of *magA*⁻/*rmpA*⁻ hypermucoviscous isolates had additional antimicrobial resistance (two isolates were extended-spectrum β -lactamase producers, and six isolates were fluoroquinolone resistant). On the other hand, 43.8% of non-hypermucoviscous isolates also had some additional antimicrobial resistance (15.5% of the isolates were extended-spectrum β -lactamase producers, and 29.6% were fluoroquinolone resistant).

Serotyping by *wzi* gene sequencing and MLST

All 53 hypermucoviscous isolates were typed by amplification and sequencing of the *wzi* gene [1]. Overall, we found 27 different *wzi* alleles; 16 alleles were associated with known serotypes, and 11 alleles were associated with unknown serotypes (four of them were new: *wzi* 116, *wzi* 122, *wzi* 130, and *wzi* 139).

By MLST, the 53 hypermucoviscous isolates were grouped into 30 different STs. Three of them were new (ST1013, three isolates; ST1007, one isolate; and ST1022, one isolate).

Table 1 shows the serotypes and STs of hypermucoviscous isolates. All 16 *magA*⁺/*rmpA*⁺ isolates were serotype K1 and ST23. Among 12 *magA*⁻/*rmpA*⁺ isolates, nine were serotype K2, with five distinct STs (ST380, three isolates; ST86, three isolates; and ST65, ST25, and ST493, one isolate each), and the remaining three had ST1013 (new) and *wzi* allele 122 (new); by PCR, these three isolates were not K1 or K2. Finally, the remaining 25 hypermucoviscous isolates (*magA*⁻/*rmpA*⁻) had 23 different STs. Twenty-three *wzi* alleles (including three new alleles) were found, but only 13 were associated with known serotypes.

Characteristics of patients with hypermucoviscous bacteraemia

Bacteraemia episodes due to hypermucoviscous *K. pneumoniae* occurred mainly in men (33/53, 62%) with a mean age of 67.04 years (\pm standard deviation 15.74), and were mainly community acquired (45.3%). Table 2 shows the demographic and clinical characteristics of these patients.

Table 2 shows the demographic and clinical characteristics of bacteraemia episodes caused by *K. pneumoniae* strains having *magA* and/or *rmpA*, by other hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains, or by non-hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains. The first group had higher frequencies of PLA and pneumonia.

TABLE 1. Characteristics of hypermucoviscous isolates and their relationship with *magA/rmpA*, serotype, and multilocus sequence type (ST)

Hypermucoviscous genotype	Related serotype	Multilocus sequence type	wzi allele	Number of isolates	
<i>magA⁺/rmpA⁺</i>	K1	ST23	1	16	
		ST380	2	3	
<i>magA⁻/rmpA⁺</i>	K2	ST86	2	3	
		ST65	72	1	
<i>magA⁻/rmpA⁻</i>	Non-K1/K2 ^a	ST25	72	1	
		ST493	2	1	
		ST1013	122 ^b	3	
		ST416	138	1	
		ST152	110	1	
		ST11	84	1	
		K28	ST17	113	1
		K26	ST29	115	1
		K54	ST35	37	1
		K22.37	ST36	173	1
		^a	ST37	50	1
		K15/17/50/51/52	ST45	101	2
		K24	ST21	130 ^b	1
		^a	ST101	137	1
		K17	ST104	102	1
		K31	ST234	114	1
		K30	ST321	113	1
		K3	ST42	186	1
		^a	ST460	162	1
		K35	ST622	193	1
		^a	ST719	186	1
		^a	ST895	173	2
		^a	ST993	186	1
		^a	ST1007	21	1
		K21	ST1022	139 ^b	1
		^a	ST1035	116 ^b	1
		^a			

^aAlleles with unknown serotype.
^bNovel wzi allele.

Episodes due to hypermucoviscous isolates were less frequently nosocomial. Septic shock was present in one-quarter of episodes (25.9%), and occurred in all patient groups. The presence of underlying conditions was most frequent in the

third group of patients, although it was high in general. The overall 30-day mortality rate was 20.7% (182/878).

Three patients had two episodes due to hypermucoviscous isolates. The first one had two episodes in June and December 2009, both caused by the same strain (ST1013 and *magA⁻/rmpA⁺*): the first one was associated with a biliary tract infection, and the second with a PLA. The second one had a primary bacteraemia in March 2011 and a PLA in October 2012 (both caused by an ST23-K1 *magA⁺/rmpA⁺* strain). The third one had a PLA in February 2011 and a biliary tract infection-associated bacteraemia in June 2011 (both ST895 and *magA⁻/rmpA⁻*).

Discussion

Since the 1980s, in Southeast Asia, especially in Taiwan, there has been an increase in the frequency of community-acquired *K. pneumoniae* infections, mainly community-acquired PLA (CA-PLA), caused by hypermucoviscous strains. Although this phenotype is present in several *K. pneumoniae* serotypes, serotypes K1 and K2 have been identified as the most virulent, and are also associated with CA-PLA [2,9,11,20].

Outside Asia, several case reports of CA-PLA related to hypermucoviscous *K. pneumoniae* have been published, including reports from North America and Europe [3,7]. Moreover, studies performed in several countries have found a high genetic similarity between these isolates, demonstrating the existence of major clones among hypermucoviscous strains [5,20]. Another characteristic of these infections is the ability to cause septic metastasis [2,13–16]. Although most of these

TABLE 2. Characteristics of patients with hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia

Characteristic	Hypermucoviscous		Non-hypermucoviscous
	<i>magA⁺/rmpA⁺</i> or <i>magA⁻/rmpA⁺</i>	<i>magA⁻/rmpA⁻</i>	
No. of cases	28	25	825
Mean age (years) ± SD	56.7 ± 8.3	69.3 ± 15.6	64.7 ± 14.6
Male sex, n (%)	20 (71.4)	13 (52)	550 (66.7)
Acquisition, n (%)			
CA	13 (46.4) ^a	11 (44) ^b	149 (18.1)
HC	8 (28.6)	12 (48) ^b	190 (23.1)
NOS	7 (25) ^a	2 (8) ^b	486 (58.9)
Source of infection			
Liver abscess	6 (21.4) ^a	2 (8) ^b	6 (0.7)
Pneumonia	5 (17.9) ^a	—	30 (3.6)
Urinary	8 (28.6) ^c	14 (56) ^b	233 (28.2)
CRB	2 (7.1)	1 (4) ^b	192 (23.3)
Abdominal	3 (10.7)	—	41 (4.9)
Biliary	1 (3.6) ^c	6 (24)	153 (18.5)
Primary	3 (10.7)	1 (4)	139 (16.8)
SBP	—	1 (4)	10 (1.2)
Others	—	—	21 (2.5)
Shock, n (%)	7 (25)	6 (24)	215 (26.1)
Underlying diseases, n (%)	21 (75) ^a	19 (76) ^b	739 (89.6)
30-day mortality, n (%)	7 (25)	2 (8)	173 (20.9)

CA, community acquired; CRB, catheter-related bacteraemia; HC, healthcare related; NOS, nosocomial; SBP, spontaneous bacterial peritonitis in patients with hepatic cirrhosis.

^ap < 0.05 for hypermucoviscous (*magA⁺/rmpA⁺* or *magA⁻/rmpA⁺*) vs. non-hypermucoviscous.

^bp < 0.05 for hypermucoviscous (*magA⁻/rmpA⁻*) vs. non-hypermucoviscous.

^cp < 0.05 for hypermucoviscous groups (*magA⁺/rmpA⁺* or *magA⁻/rmpA⁺* vs. *magA⁻/rmpA⁻*).

strains are related to the presence of *magA* (a part of the serotype-specific region of the K1 capsule) [21], a hypermucoviscous phenotype was also found in *magA*⁻ strains harbouring *rmpA* [6].

In the present study, we describe a series of bacteraemia episodes due to hypermucoviscous *K. pneumoniae* occurring in Barcelona, Spain, over a 7-year period (2007–2013). The overall frequency of the hypermucoviscous phenotype was low (6%), and it was lower still when only virulent clones of K1 (1.8%, *n* = 16) or K2 (0.9%, *n* = 8) were considered (2.7%, 24/878). This low prevalence is similar to that reported in other European countries [20,22]. Among virulent isolates, a recent study performed in Sweden reported a higher proportion of K2 isolates (5%) than of K1 isolates (1.1%), whereas, in our series, there were twice as many K1 isolates as K2 isolates (1.8% vs. 0.9%) [22]. However, the low number of virulent isolates found in these studies may be the cause of these variations. In any case, these frequencies are far lower than those found in Asian countries: in Taiwan, for instance, 18.2% of bacteraemia isolates were serotype K1 and 16.4% were serotype K2 [23].

Isolates belonging to the K1 and K2 serotypes are more virulent than those belonging to other serotypes, perhaps because of the higher resistance to phagocytosis conferred by these capsular types [10]. It seems that the occurrence of hypervirulent K1 and K2 *K. pneumoniae* isolates in Europe is rare, and some cases have been associated with Asian citizens or travellers [13]. Unfortunately, we have no data on the travel history of our patients.

Interestingly, half of the hypermucoviscous isolates in our study were *magA*⁻/*rmpA*⁻, with high capsular type diversity. In the light of these results, and as previously described in Asian [24] and in non-Asian [20] countries, we suggest that hypermucoviscosity (string test) is not a reliable indicator of the presence of virulent clones with *magA* and/or *rmpA*. In fact, some variations in the composition of lipopolysaccharide result in a hypermucoviscous phenotype that may resemble the one found in the virulent strains [25]. Nevertheless, the string test is a useful screening method for subsequent molecular characterization in order to detect possible hypervirulent strains.

In our study, all hypervirulent K1 strains belonged to ST23, which is included in the CC23^{K1} clone described by Brisse [19]. In fact, CC23^{K1} is the most prevalent clone worldwide [8,9,12,13,19,26], probably because it is associated with CA-PLA, whereas the CC82^{K1} clone (not detected) is related to respiratory infections [19]. The serotype K2 isolates in our study belonged to five STs, reflecting a higher genetic diversity. However, all of these STs but one were included in previously described K2 hypervirulent clones (CC380, CC86, and CC65) [19,26]. Moreover, the two most frequent (ST380 and ST86)

were recently associated with fatal invasive infections in France [13]. Finally, *magA*⁻/*rmpA*⁻ isolates were highly diverse, and did not belong to previously described *K. pneumoniae* virulent clones. In fact, most of the bacteraemia episodes caused by these strains (*magA*⁻/*rmpA*⁻) had urinary and biliary foci of infection, the two most frequent foci among *K. pneumoniae* bacteraemia in Europe and the USA [27].

A recent study that used whole genome sequencing of different *K. pneumoniae* isolates clearly distinguished clonal groups of multidrug-resistant and hypervirulent *K. pneumoniae* populations [28]. In fact, in our study, hypervirulent (K1 and K2) strains were fully susceptible, as previously described [5,28]. Moreover, another study performed in China, which also analysed hypervirulent *K. pneumoniae* isolates, and that included molecular methods, did not find antimicrobial resistance among CA-PLA strains [10,28].

In our experience, the clinical characteristics of hypermucoviscous *K. pneumoniae* bacteraemia episodes can be divided into two main groups related to the presence of *magA* and/or *rmpA*. Patients in the first group (*magA*⁺ and/or *rmpA*⁺) were more likely to have PLAs, pneumonia, and primary bacteraemia, as described previously [17,20], whereas patients in the second group (*magA*⁻/*rmpA*⁻) had characteristics similar to those caused by isolates termed 'classic' *K. pneumoniae* isolates, the urinary and biliary tracts being the major foci of infection.

Patients with underlying diseases such as diabetes mellitus, malignancy or renal failure are more easily infected by *K. pneumoniae* and other microorganisms. However, patients without underlying diseases have also been found to have bacteraemia due to hypermucoviscous strains [29]. In our series, 75% of patients with bacteraemia due to hypervirulent clones had underlying diseases. The 30-day mortality rate was high among patients with bacteraemia due to hypervirulent clones, as previously described [25].

In Asian countries, which have a higher prevalence of these strains, hypervirulent clones of K1 and K2 have been associated with community-acquired infections. Interestingly, in our series, more than half of the infections were nosocomial or healthcare related. Probably, patients had intestinal colonization at the moment of hospitalization, and developed the infection during admission. In fact, these infections were mainly urinary tract infections (in patients with urinary catheters) and catheter-related bacteraemia. Although the carrier status of these strains has not been widely studied, some reports have shown that hypervirulent clones can colonize the gastrointestinal tract of healthy people [9,17]. In addition, highly virulent clones (serotypes K1 and K2) were highly resistant to phagocytosis, conferring an advantage for intestinal tract colonization [17]. Another report described a family outbreak in which two family members had PLAs and another had digestive colonization; all

three strains were identical (ST23^{K1}), showing that transmission could occur through household contact [30].

The present study has two main limitations. First, it was performed at a single hospital, and second, the screening of the hypermucoviscous phenotype was performed retrospectively, and some cases were missing. However, the long time period and the high proportion of isolates recovered compensate, in part, for these deficiencies. To conclude, hypervirulent clones had a low prevalence among *K. pneumoniae* bacteraemia isolates, but they can cause infections in both the community and the hospital setting. As reported in other areas, PLAs, pneumonia and primary bacteraemia were frequent foci of infection. The string test is a quick and easy screening method that needs molecular confirmation to detect hypervirulent clones. Further prospective studies are needed to determine the frequency of hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains in other geographical areas.

Transparency declaration

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank the staff at the Microbiology Department of Hospital Universitari de Bellvitge for their daily contributions to this project. We thank the Genotyping of Pathogens and Public Health platform (Institut Pasteur, Paris, France) for coding MLST alleles and profiles available at <http://bigsdB.web.pasteur.fr/Klebsiella/Klebsiella.html>. We thank the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and/or isolates at <http://bigsdB.web.pasteur.fr>. These results were partially presented at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (poster C-117). This study was partially supported by Ciber de Enfermedades Respiratorias (CB06/06/0037 Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) and by a European Regional Development Found (ERDF).

References

- [1] Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol* 2013;51:4073–8.
- [2] Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med* 2004;199:697–705.
- [3] Fang FC, Sandler N, Libby SJ. Liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. *J Clin Microbiol* 2005;43:991–2.
- [4] Pepin J, Yared N, Alarie I, Lanthier L, Vanasse A, Tessier P, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in a region of Canada. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:141–6.
- [5] Chang L, Bastian I, Warner M. Survey of *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in two South Australian hospitals and detection of hypermucoviscous phenotype and magA/rmpA genotypes in *K. pneumoniae* isolates. *Infection* 2013;41:559–63.
- [6] ElFertat-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol (Paris)* 2013;61:209–16.
- [7] Gomez C, Broseta A, Otero JR, Chaves F. Primary pyogenic liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Clin Microbiol Newsl* 2007;29:100–2.
- [8] Gundestrup S, Struve C, Stahlhut SG, Hansen DS. First case of liver abscess in Scandinavia due to the international hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clone ST23. *Open Microbiol J* 2014;8:22–4.
- [9] Chung DR, Lee H, Park MH, Jung SI, Chang HH, Kim YS, et al. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:481–6.
- [10] Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Clin Infect Dis* 2014;58:225–32.
- [11] Yeh KM, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung CP, Lin JC, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol* 2007;45:466–71.
- [12] Cheng KC, Lee MF, Chuang YC, Yu WL. First description of lung abscess caused by ST23 clone capsule genotype K1 *Klebsiella pneumoniae*. *J Formos Med Assoc* 2015;114:379–80.
- [13] Decré D, Verdet C, Emirian A, Le GT, Petit JC, Offenstadt G, et al. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J Clin Microbiol* 2011;49:3012–4.
- [14] Karama EM, Willermain F, Janssens X, Claus M, Van den Wijngaert S, Wang JT, et al. Endogenous endophthalmitis complicating *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Europe: Case report. *Int Ophthalmol* 2008;28:111–3.
- [15] Patel G, Shah N, Sharma R. Pyogenic liver abscess, bacteremia, and meningitis with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: An unusual case report in a human T-cell lymphotropic virus positive patient of Caribbean origin in the United States. *Case Rep Infect Dis* 2013;2013: article ID676340, 4 pages.
- [16] Rivero A, Gomez E, Alland D, Huang DB, Chiang T. K2 serotype *Klebsiella pneumoniae* causing a liver abscess associated with infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 2010;48:639–41.
- [17] Lin JC, Koh TH, Lee N, Fung CP, Chang FY, Tsai YK, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathog* 2014;6:21.
- [18] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretations of MICs and zone diameters, version 5.0. EUCAST. 2015.
- [19] Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebise R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 2009;4:e4982.
- [20] Turton JF, Engleider H, Gabriel SN, Turton SE, Kaufmann ME, Pitt TL. Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents. *J Med Microbiol* 2007;56:593–7.
- [21] Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis* 2006;193:645–54.

- [22] Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Naucler P, et al. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. *PLoS One* 2014;9:e113539.
- [23] Liao CH, Huang YT, Lai CC, Chang CY, Chu FY, Hsu MS, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and capsular serotypes. *Taiwan Emerg Infect Dis* 2011;17:1113–5.
- [24] Yeh KM, Chang FY, Fung CP, Lin JC, Siu LK. *magA* is not a specific virulence gene for *Klebsiella pneumoniae* strains causing liver abscess but is part of the capsular polysaccharide gene cluster of *K. pneumoniae* serotype K1. *J Med Microbiol* 2006;55:803–4.
- [25] Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* 2013;4:107–18.
- [26] Liao CH, Huang YT, Chang CY, Hsu HS, Hsueh PR. Capsular serotypes and multilocus sequence types of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with different types of infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:365–9.
- [27] Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von GA, Mohapatra S, et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis* 2002;8:160–6.
- [28] Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, annoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1812–20.
- [29] Lee CH, Liu JW, Su LH, Chien CC, Li CC, Yang KD. Hypermucoviscosity associated with *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive syndrome: A prospective cross-sectional study in Taiwan. *Int J Infect Dis* 2010;14:e688–92.
- [30] Harada S, Tateda K, Mitsui H, Hattori Y, Okubo M, Kimura S, et al. Familial spread of a virulent clone of *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess. *J Clin Microbiol* 2011;49:2354–6.



Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización
de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*

Meritxell
Cubero González

Tesis Doctoral

Facultad de Medicina
Departamento de Patología y Terapéutica Experimental



Epidemiología molecular,
factores de virulencia y caracterización
de los mecanismos de resistencia de
Klebsiella pneumoniae



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



2015

Meritxell Cubero González