



Universidad de Oviedo

Departamento de Biología Molecular y Celular

**Resistencia a antimicrobianos de última línea en  
bacterias procedentes de dos hospitales del norte  
de España**

**Resistance to last-resort antimicrobials in bacteria from two  
hospitals in northern Spain**

**Carlos Rodríguez Lucas**

**Tesis Doctoral**

**2021**



## RESOLUCIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2020/2021

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Rodríguez Lucas	Nombre: Carlos	
DNI/Pasaporte/NIE:	Teléfono:	Correo electrónico:

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: Biología Funcional (Área de Microbiología)	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España	Inglés: Resistance to last-resort antimicrobials in bacteria from two hospitals in northern Spain
Rama de conocimiento: Ciencias de la Salud	
Señale si procede: <input type="checkbox"/> Mención Internacional <input type="checkbox"/> Idioma de presentación de la Tesis distinto al español <input checked="" type="checkbox"/> Presentación como compendio de publicaciones	

3.- Autorización del Presidente de la Comisión Académica	
D/D <sup>a</sup> : Álvaro Jesús Obaya González	DNI/Pasaporte/NIE:
Departamento/Instituto: Biología Funcional	

**Resolución:** La Comisión Académica del Programa de Doctorado de Biología Molecular y Celular en su reunión de fecha 22 de diciembre de 2020, acordó la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, previa comprobación de que la tesis presentada y la documentación que la acompaña cumplen con la normativa vigente, según lo establecido en el Art.32.8 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Además, informa:

	Favorable	Desfavorable
• Mención Internacional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Idioma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Presentación como compendio de publicaciones	X	<input type="checkbox"/>



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España	Inglés: Resistance to last-resort antimicrobials in bacteria from two hospitals in northern Spain
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: Carlos Rodríguez Lucas	DNI/Pasaporte/NIE: ...
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

### RESUMEN (en español)

Las bacterias resistentes a antibióticos suponen una seria amenaza para la salud pública, especialmente cuando afectan a antimicrobianos de última línea o presentan fenotipos de resistencia con escasas alternativas terapéuticas. Durante el desarrollo de esta tesis se estudió una selección de bacterias, con una o ambas características, que causaron, en los últimos años, brotes o epidemias en dos hospitales del norte de España: el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y el Hospital El Bierzo (HEB).

En primer lugar se evaluó el efecto a largo plazo de un paquete de medidas de control de la infección, instauradas para poner fin a una epidemia de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) en la UCI del HUCA. La intervención, implantada en 2016 y mantenida hasta la fecha (basada principalmente en medidas exhaustivas de limpieza), ha sido efectiva. De hecho, no se han producido nuevos brotes por CRAB en la UCI hasta la fecha, descendiendo además el consumo de colistina, que es un antibiótico de último recurso. El estudio molecular de 49 CRAB obtenidos aproximadamente un año después de la implantación de las medidas, demostró la presencia de un clon ST218 portador de los genes *bla<sub>OXA-51-like</sub>* y *bla<sub>OXA-23-like</sub>* (resistencia a carbapenémicos) y del gen transferible *armA* (resistencia a aminoglicósidos) en otras unidades del hospital. Estos resultados muestran la dispersión y establecimiento de un clon de CRAB fuera de la UCI, por lo que las medidas de control de la infección deberían extenderse al resto del hospital para conseguir la erradicación total de CRAB.

En el presente trabajo también se estudiaron 28 aislados de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina (VRE<sub>fm</sub>) recuperados de pacientes atendidos en el HEB en el año 2018. Estos aislados fueron sensibles únicamente a linezolid (100%) y sensibles dosis-dependiente a daptomicina (78,6%), positivos para el gen *vanA* y pertenecieron al complejo clonal (CC) 17 de alto riesgo. Debido a la alarmante situación del HEB en cuanto a VRE<sub>fm</sub> con escasas alternativas terapéuticas, en el año 2018 se estableció un cribado de rutina para la detección precoz de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas en enterococos con CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid (LZD). Los resultados mostraron una baja prevalencia de estos aislados (0,9%); sin embargo, tres de los cuatro aislados detectados fueron *E. faecalis optrA* positivos, resistentes a cloranfenicol y pertenecientes a tres clones diferentes [con secuencias tipo (ST) 7, 480 y 585]. La detección precoz de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas, como *optrA*, es esencial para evitar su dispersión, especialmente en entornos sanitarios con alta prevalencia de VRE<sub>fm</sub>.

En el HUCA se observó una elevada prevalencia de resistencia a LZD en aislados de *Staphylococcus epidermidis* (SERL) del periodo 2011-2017, especialmente en la UCI, donde su incremento mostró una relación estadísticamente significativa con el elevado consumo de LZD. En el resto de unidades del HUCA, con un consumo considerablemente inferior de este antibiótico, no se encontró relación estadísticamente significativa y la prevalencia de aislados resistentes fue menor. El estudio molecular de los primeros SERL disponibles (44, recuperados entre Junio 2013-Junio 2014), y de cinco aislados causantes de ventriculitis (2013-2016), mostraron perfiles de PFGE estrechamente relacionados, pertenecieron al clon ST2 y presentaron como principal mecanismo de resistencia a LZD la mutación G2576T en las seis copias del gen codificante del ARNr 23S. Los resultados muestran el establecimiento de un clon de SERL en el HUCA durante un periodo de siete años, no solo en una UCI con un elevado consumo de LZD, sino en todo el hospital a pesar del menor uso de este antimicrobiano.



La detección precoz de bacterias resistentes es esencial para la rápida instauración de tratamientos antimicrobianos efectivos y la implementación de medidas de control de la infección que eviten su dispersión. Por esta razón, en el último apartado de la tesis se evaluaron dos métodos para la detección precoz de bacterias resistentes en el HUCA. En el primer trabajo se evaluó la capacidad del *Sepsis Flow Chip* (SFC) para la identificación y detección de determinantes de resistencia en bacilos Gram-negativos obtenidos a partir de hemocultivos (HC) positivos, combinado con la identificación mediante MALDI-TOF tras subcultivo de cuatro horas. El SFC identificó correctamente el 94,4% de las bacterias presentes en HC monomicrobianos y un 100% cuando se combinó con MALDI-TOF. Además, obtuvo una concordancia del 98,8%, 98,9% y 99% para la detección de los genes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido y/o carbapenémicos. En un segundo trabajo se evaluó un nuevo algoritmo para la detección y confirmación de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasa (EPC), basado en la realización de un ensayo de disco difusión con temocilina y ertapenem. El algoritmo mostró un alto poder de discriminación entre EPC y no-EPC con sensibilidad disminuida a carbapenémicos.

## RESUMEN (en Inglés)

Antimicrobial resistant bacteria are a serious threat to public health, mainly when they affect to last-resort antimicrobials or display resistance phenotypes with few therapeutic alternatives. In this PhD thesis, we have studied a selection of such bacteria which caused outbreaks or endemic situations in the last years in two hospitals in northern Spain: *Hospital Universitario Central de Asturias* (HUCA) and *Hospital El Bierzo* (HEB).

First, we evaluated the long-term effect of a package of infection control measures, aimed to eradicate carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) isolates in the ICU of HUCA. The intervention, implemented in 2016 and maintained to date (mainly based in deep cleaning), proved to be effective, as no more ICU-outbreaks by CRAB have been detected to date. Moreover, a decrease in colistin (regarded as last-resort antimicrobial) consumption was also observed. The molecular study of a selection of 49 CRAB isolates, obtained approximately one year after the intervention, demonstrated the presence of a ST218 clone carrying the *bla<sub>OXA-51-like</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>* (resistance to carbapenems) and *armA* (resistance to aminoglycoside) genes in other HUCA wards. Thus, the results obtained showed the spread and establishment of a CRAB clone in wards other than ICU. Thereby, the infection control measures implemented in ICU must be extended to all wards to completely eradicate CRAB from the hospital.

The present work also studied 28 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE<sub>fm</sub>) isolates recovered from patients attended in 2018 at the HEB. These isolates were only susceptible to linezolid (LZD) (100%) and susceptible-dose dependent to daptomycin (78.6%), positive for the *vanA* gene and belonged to the high-risk clonal complex (CC) 17. Due to this worrisome situation in the HEB regarding VRE<sub>fm</sub> isolates with limited therapeutic alternatives, a routine screening of transferable oxazolidinones-resistance genes in enterococci with LZD MICs  $\geq 4$  mg/L, was implemented in 2018. The results obtained show a low prevalence of these isolates (0.9%); however, three of the four detected were *E. faecalis* *oprA*-positive, resistant to chloramphenicol, and belonged to three different clones [with sequence types (ST) 7, 480 and 585]. Prompt detection of transferable oxazolidinones-resistance genes, such as *oprA*, is crucial to avoid their spread, especially in healthcare areas with high VRE<sub>fm</sub> prevalence.

Regarding the HUCA, a high prevalence of LZD-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) were detected during the 2011-2017 period, especially in the ICU, where its increase had a statistically significant correlation with a high consumption of LZD. In wards other than ICU, LZD usage and LRSE prevalence were lower, and no significant correlation was observed. The molecular characterization of the first available LRSE isolates (44, recovered between June 2013 and June 2104) and of five isolates causing ventriculitis (2013-2016), showed closely-related PFGE patterns, belonged to clone ST2 and carried a G2576T mutation in the six copies of the rRNA 23S gene as the main LZD resistance mechanism. These findings show the establishment of a LRSE clone during seven years in the HUCA, not only in an ICU with high LZD consumption, but also in the whole hospital despite the lower LZD use in other wards.

Prompt detection of resistant bacteria is crucial for rapid implementation of both, effective antimicrobials treatments and infection control measures, in order to avoid their spread. Therefore, in the last section of this thesis, two assays aimed to the rapid detection of resistant bacteria were evaluated. In the first work, the *Sepsis Flow Chip* (SFC), alone and in combination with MALDI-TOF after four hours subculture, was evaluated for the identification of Gram-negative bacilli and detection of resistance determinants, directly from positive blood cultures (BCs). In the case of monomicrobial BCs, SFC alone correctly identified 94.4% of the bacteria, reaching 100% when combined with MALDI-TOF. Moreover, 98.8%,





Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

98.9% and 99% concordance was obtained for detection of the *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* genes, conferring resistance to cephalosporin and/or carbapenems. In the second work, a new algorithm for screening and confirmation of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE), based on a temocillin and ertapenem disc diffusion assay, was evaluated. The algorithm showed a high capacity to discriminate between CPE and non-CPE with reduced susceptibility to carbapenems.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO**



## FORMULARIO RESUMEN DE TESIS POR COMPENDIO

### 1.- Datos personales solicitante

Apellidos: Rodríguez Lucas	Nombre: Carlos
----------------------------	----------------

Curso de inicio de los estudios de doctorado	2016/17
--	---------

	SI	NO
Acompaña acreditación por el Director de la Tesis de la aportación significativa del doctorando	X	
<b>Acompaña memoria que incluye</b>		
Introducción justificativa de la unidad temática y objetivos	X	
Copia completa de los trabajos *	X	
Resultados/discusión y conclusiones	X	
Informe con el factor de impacto de la publicaciones	X	

Se acompaña aceptación de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como tesis por compendio	X	
Se acompaña renuncia de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como parte de otra tesis de compendio	X	

\* Ha de constar el nombre y adscripción del autor y de todos los coautores así como la referencia completa de la revista o editorial en la que los trabajos hayan sido publicados o aceptados en cuyo caso se aportará justificante de la aceptación por parte de la revista o editorial

### Artículos, Capítulos, Trabajos

#### Trabajo, Artículo 1

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity
17 de Agosto de 2020
11 de Agosto de 2020
SI
2,837

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor7 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

María Rosario Rodicio Rodicio
Xenia Vázquez Sánchez
Dolores Escudero Augusto
Brígida Quindós Fernández
Miguel Alaguero Calero
Javier Fernández Domínguez



**Trabajo, Artículo 2**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area
Pendiente de publicación

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor7 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Javier Fernández Domínguez
Carmen Raya Fernández
Alberto Bahamonde Carrasco
Antonio Quiroga Fernández
Rosario Muñoz Otero
María Rosario Rodicio Rodicio

**Trabajo, Artículo 3**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients
16 de Febrero de 2018
12 de Febrero de 2018
SI
3,271

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor7 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Javier Fernández Domínguez
Josu Antonio Boga Riveiro
Lucia López Amor
Lorena Forcelledo Espina
Eva Lázaro López
María Rosario Rodicio Rodicio



**Trabajo, Artículo 4**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital.
18 de Octubre de 2019
14 de Octubre de 2019
SI
3,271

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

María Rosario Rodicio Rodicio
Jordi Càmara Mas
M. Ángeles Domínguez Luzón
Miguel Alaguero Calero
Javier Fernández Domínguez

**Trabajo, Artículo 5**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i> -positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients
Pendiente de publicación

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor6 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor7 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor8 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Javier Fernández Domínguez
Xenia Vázquez Sánchez
María de Toro Hernando
Víctor Ladero Losada
Carlos Fuster Foz
María Rosaura Rodicio Rodicio
María Rosario Rodicio Rodicio





**Trabajo, Artículo 6**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures

14 de Febrero de 2018

10 de Febrero de 2018

SI

2,499

Coautor2	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor3	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor4	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor5	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor6	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos

María Rosario Rodicio Rodicio

Isabel Costales González

José Antonio Boga Riveiro

Fernando Vázquez Valdés

Javier Fernández Domínguez

**Trabajo, Artículo 7**

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Prospective evaluation of an easy and reliable work-flow for the screening of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in endemic settings

01 de Mayo de 2020

27 de Abril de 2020

SI

3,271

Coautor2	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor3	<input type="checkbox"/> Doctor	<input checked="" type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos
Coautor4	<input checked="" type="checkbox"/> Doctor	<input type="checkbox"/> No doctor .	Indique nombre y apellidos

María Rosario Rodicio Rodicio

Yaiza Rosete Uría

Javier Fernández Domínguez





## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Rodicio Rodicio	Nombre: M. Rosario	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vazquez F, Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> 2018; 91(3): 205-9.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. <i>J Hosp Infect</i> 2018;100(4):406-10.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Cámara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. <i>J Hosp Infect</i> 2020; 105(1):64-9.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Rosete Y, Fernández J. Prospective evaluation of an easy and reliable work-flow for the screening of OXA-48-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in endemic settings. <i>J Hosp Infect</i> 2020; 105(4):659-62.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i><sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> (In Press Accepted Manuscript)</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i>-positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)</p>

ACEPTACIÓN:
<p>Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"</p> <p>Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas</p> <p style="text-align: right;">En Oviedo, a 09 de Diciembre de 2020</p> <p style="text-align: center;">Firma</p>



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Fernández Domínguez	Nombre: Javier	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vazquez F, Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> 2018; 91(3): 205-9.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. <i>J Hosp Infect</i> 2018;100(4):406-10.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. <i>J Hosp Infect</i> 2020; 105(1):64-9.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Rosete Y, Fernández J. Prospective evaluation of an easy and reliable work-flow for the screening of OXA-48-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in endemic settings. <i>J Hosp Infect</i> 2020; 105(4):659-62.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i><sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> (In Press Accepted Manuscript)</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i>-positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)</p>

ACEPTACIÓN:
<p>Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"</p> <p>Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas</p> <p style="text-align: right;">En Oviedo, a 16 de Diciembre de 2020</p> <p style="text-align: center;">Firma</p>





## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Quiroga Fernández	Nombre: Antonio	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
Ponferrada, a 09 de Diciembre de 2020



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: BAHAMONDE CARRASCO	Nombre: ALBERTO	
DNI/Pasaporte/NIE (	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

ACEPTACIÓN:	
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España" Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas  Ponferrada, a 9 de diciembre de 2020          Fdo: Alberto Bahamonde Carrasco	



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Boga Riveiro	Nombre: Jose Antonio	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. <i>J Hosp Infect</i> 2018;100(4):406-10.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vazquez F, Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> 2018; 91(3): 205-9.</p>

ACEPTACIÓN:
<p>Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"</p> <p>Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas</p> <p style="text-align: right;">En Oviedo, a 28 de Septiembre de 2020</p> <p style="text-align: center;">Firma</p>



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Quindós Fernández	Nombre: Brígida	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying blaOXA-23-like and armA in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> (In Press Accepted Manuscript)

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
En Oviedo, a 28 de Septiembre de 2020





## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Raya Fernández	Nombre: Carmen	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
Ponferrada, a 09 de Diciembre de 2020



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Escudero Augusto	Nombre: Dolores	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)

FOR-MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Oviedo 7-X-20
Dolores Escudero
Firma



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Lázaro López	Nombre: Eva	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. J Hosp Infect 2018;100(4):406-10.

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
La Felguera, a 29 de Septiembre de 2020
Firma

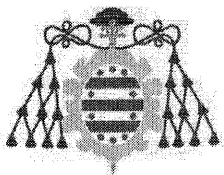


## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Vázquez Valdés	Nombre: Fernando	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vazquez F, Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 91(3): 205-9.

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Oviedo, 27 de septiembre de 2020
Firma



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Fuster Foz	Nombre: Carlos	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i> -positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España" Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
En Ponferrada, a 16 de Diciembre de 2020

FOR- MAT-VOA-035-2



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Costales González	Nombre: Isabel	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vazquez F, Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 91(3): 205-9.

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Oviedo, 8 de Octubre de 2020
Firma





## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Càmara Mas	Nombre: Jordi	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono:	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. J Hosp Infect 2020; 105(1):64-9.

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
Barcelona, 16 de octubre de 2020



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Forcelledo Espina	Nombre: Lorena	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. J Hosp Infect 2018;100(4):406-10.

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
En Oviedo, a 30 de Septiembre de 2020



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: López Amor	Nombre: Lucía	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. J Hosp Infect 2018;100(4):406-10.

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Oviedo, 30 de Septiembre de 2020
Firma



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Domínguez Luzón	Nombre: M. Ángeles	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. J Hosp Infect 2020; 105(1):64-9.


ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Hospitalet, 29 de Septiembre de 2020
Firma



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: de Toro Hernando	Nombre: María	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optxA</i> -positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)


ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España" Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
En Logroño, a 16 de Diciembre de 2020
Firma 



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Alaguero Calero	Nombre: Miguel	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. J Hosp Infect 2020; 105(1):64-9.</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i><sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)</p>

ACEPTACIÓN:
<p>Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"</p> <p>Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas</p> <p style="text-align: right;">Oviedo, a 5 de octubre de 2020</p> <p style="text-align: center;">Firma</p> <p style="text-align: center;"></p>





## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Muñoz Otero	Nombre: Rosario	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Firma
Ponferrada, a 09 de Diciembre de 2020



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Rodicio Rodicio	Nombre: María Rosaura	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

### 2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor

Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, *optrA*-positive isolates of *Enterococcus faecalis* recovered from community patients. (Pendiente de publicación)

### ACEPTACIÓN:

Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"

Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas

Firma

En Oviedo, a 16 de Diciembre de 2020



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Ladero Losada	Nombre: Víctor Manuel	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i> -positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España" Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
En Villaviciosa, a 16 de Diciembre de 2020
Firma
<hr/>



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Vázquez Sánchez	Nombre: Xenia	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
<p>Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i><sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)</p> <p>Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i>-positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)</p>

ACEPTACION:
<p>Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"</p> <p>Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas</p> <p>Oviedo, 10 de octubre de 2020</p> <p>Firmado: Xenia Vázquez Sánchez</p>



## ACEPTACIÓN COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Rosete	Nombre: Yaiza	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono:	Correo electrónico

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Rosete Y, Fernández J. Prospective evaluation of an easy and reliable work-flow for the screening of OXA-48-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in endemic settings. J Hosp Infect 2020; 105(4):659-62.

FOR- MAT-VOA-035-2

ACEPTACIÓN:
Acepto que las publicaciones anteriores formen parte de la tesis doctoral titulada "Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España"
Y elaborada por D. Carlos Rodríguez Lucas
Oviedo, a 29 de septiembre de 2020
Firma







## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Quiroga Fernández	Nombre: Antonio	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono €	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

RENUNCIA:	
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.	
Firma	Ponferrada, a 09 de Diciembre de 2020





## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Quindós Fernández	Nombre: Brígida	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying blaOXA-23-like and armA in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
En Oviedo, a 28 de Septiembre de 2020
Firma



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Raya Fernández	Nombre: Carmen	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

RENUNCIA:	
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.	
Firma	Ponferrada, a 09 de Diciembre de 2020



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Escudero Augusto	Nombre: Dolores	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Funcional y Molecular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Oviedo 7 -X-20
Firma Dolores Escudero Augusto



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Lázaro López	Nombre: Eva	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. J Hosp Infect 2018;100(4):406-10.

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
La Felguera, a 29 de Septiembre de 2020
Firma





## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Càmara Mas	Nombre: Jordi	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono:	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Funcional y Molecular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. J Hosp Infect 2020; 105(1):64-9.

RENUNCIA:	
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.	
Firma	Barcelona, 16 de octubre de 2020



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Forcelledo Espina		Nombre: Lorena
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by meticillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. J Hosp Infect 2018;100(4):406-10.

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
En Oviedo, a 30 de Septiembre de 2020
Firma




## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: López Amor	Nombre: Lucia	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by methicillin- and linezolid-resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in neurosurgical patients. J Hosp Infect 2018;100(4):406-10.

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Oviedo, 30 de Septiembre de 2020
Firma 



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Alaguero Calero		Nombre: Miguel
DNI/Pasaporte/NIE 1	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Funcional y Molecular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin- resistant clone of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in a tertiary hospital. J Hosp Infect 2020; 105(1):64-9.
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Oviedo, a 5 de octubre de 2020.
Firma



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Muñoz Otero	Nombre: Rosario	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Molecular y Celular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación)

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Firma
Ponferrada, a 09 de Diciembre de 2020



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Vázquez Sánchez	Nombre: Xenia	
DNI/Pasaporte/NIE	Teléfono	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Funcional y Molecular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> carrying <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> and <i>armA</i> in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long standing endemicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (In Press Accepted Manuscript)
Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, <i>optrA</i> -positive isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> recovered from community patients. (Pendiente de publicación)

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Oviedo, 1 de octubre de 2020
Firmado: Xenia Vázquez Sánchez



## RENUNCIA COAUTORES PRESENTACIÓN TRABAJOS FORMANDO PARTE DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Rosete	Nombre: Yaiza	
DNI/Pasaporte/NIE:	Teléfono:	Correo electrónico

2.- Tesis Doctoral
Título: Resistencia a antimicrobianos de última línea en bacterias procedentes de dos hospitales del norte de España
Autor: Carlos Rodríguez Lucas
Programa de doctorado: Biología Funcional y Molecular

2.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que es coautor
Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Rosete Y, Fernández J. Prospective evaluation of an easy and reliable work-flow for the screening of OXA-48-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in endemic settings. J Hosp Infect 2020; 105(4):659-62.

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores sean presentadas como parte de otra tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones.
Oviedo, a 29 de septiembre de 2020
Firma





## **AGRADECIMIENTOS**



Esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la ayuda y colaboración de muchas personas a las que querría dar mi agradecimiento. En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores de tesis, la Dra. Rosario Rodicio (“Charo”) y el Dr. Javier Fernández (“Javi”). Quisiera agradecerles la oportunidad que me dieron para realizar esta tesis bajo su dirección, su constante motivación y ayuda, su amplio conocimiento y su infinita paciencia. Pero sobre todo por haberme dejado ser partícipe del gran equipo que forman y que da sentido a la expresión “trabajo en equipo”.

A todas las personas del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias y del Hospital El Bierzo, donde me formé y di mis primeros pasos como microbiólogo y al departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. Lugares donde realicé esta tesis y no encontré más que personas dispuestas a ayudarme y aconsejarme.

A mis padres y hermanos. Por educarme y enseñarme que con constancia y esfuerzo todo es posible. Por darme la oportunidad de formarme sin reservas, y aconsejarme siempre la dirección a tomar sin marcarme un rumbo fijo.

A Sarai, porque sin ella esta tesis no habría sido posible, por su ayuda y comprensión. Porque no podría tener una compañera mejor para la vida y aunque esta tesis nos ha quitado muchas horas de estar juntos, tenemos una vida entera para recuperarlas.



# **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Contexto histórico de los antimicrobianos y del problema de la resistencia: Del <i>magic bullet</i> a la actualidad .....	3
1.2. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos: concepto, origen y tipos	
1.2.1. Concepto y origen.....	6
1.2.2. Tipos de resistencia.....	8
1.2.2.1. Resistencia intrínseca.....	9
1.2.2.2. Resistencia adquirida .....	9
1.3. Carbapenémicos: características y resistencia.....	11
1.3.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano .....	11
1.3.2. Mecanismos de resistencia y epidemiología.....	13
1.3.3. Epidemiología de las carbapenemasas en <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	15
1.4. Glicopéptidos: características y resistencia .....	19
1.4.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano .....	20
1.4.2. Mecanismos de resistencia y epidemiología.....	21
1.4.3. Mecanismos de resistencia y epidemiología en estafilococos .....	23
1.5. Oxazolidinonas: características y resistencia .....	25
1.5.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano .....	26
1.5.2. Mecanismos de resistencia y epidemiología.....	27
1.6. Métodos para la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos .....	31
<b>2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>

### 3. RESULTADOS

Objetivo 1: Artículo 1 ..... 41

**Rodríguez-Lucas C**, Rodicio MR, Vázquez X, Escudero D, Quindós B, Alaguero M, Fernández J. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *armA* in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long-standing endemicity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (*In press*)

Objetivo 2: Artículo 2 ..... 47

**Rodríguez-Lucas C**, Fernández J, Raya C, Bahamonde A, Quiroga A, Muñoz R, Rodicio MR. Establishment and persistence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area. (Pendiente de publicación).

Objetivo 3

Objetivo 3.1: Artículo 3 ..... 55

**Rodríguez-Lucas C**, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, Rodicio MR. Nosocomial ventriculitis caused by a meticillin- and linezolid-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* 2018; 100(4):406-10.

Objetivo 3.2: Artículo 4 ..... 61

**Rodríguez-Lucas C**, Rodicio MR, Càmara J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and meticillin-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital. *J Hosp Infect* 2020; 105(1):64-9.

Objetivo 3.3: Artículo 5 ..... 67

**Rodríguez-Lucas C**, Fernández J, Vázquez X, de Toro M, Ladero V, Fuster C, Rodicio R, Rodicio MR. Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal, *optrA*-positive isolates of *Enterococcus faecalis* recovered from community patients. (Pendiente de publicación).



Objetivo 4	
Objetivo 4.1: Artículo 6.....	79
<b>Rodríguez-Lucas C</b> , Rodicio MR, Costales I, Boga JA, Vázquez F, Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 91(3):205-9.	
Objetivo 4.2: Artículo 7.....	85
<b>Rodríguez-Lucas C</b> , Rodicio MR, Rosete Y, Fernández J. Prospective evaluation of an easy and reliable work-flow for the screening of OXA-48-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in endemic settings. J Hosp Infect 2020; 105(4):659-62.	
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	89
4.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos en el Hospital Universitario Central de Asturias (Artículo 1, Objetivo 1).....	93
4.2. <i>Enterococcus faecium</i> resistentes a vancomicina en el Hospital El Bierzo (Artículo 2 no publicado, Objetivo 2).....	99
4.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes a linezolid en el Hospital Universitario Central de Asturias (Artículos 3 y 4, Objetivos 3.1 y 3.2).....	105
4.4. <i>Enterococcus faecalis</i> con sensibilidad disminuida a linezolid en el Hospital El Bierzo (Artículo 5 no publicado, Objetivo 3.3).....	113
4.5. Evaluación de nuevos métodos y algoritmos para la detección precoz de mecanismos de resistencia de especial importancia o de bacterias procedentes de muestras invasivas (Objetivo 4).....	117
4.5.1. Evaluación de un nuevo microarray para la identificación y detección de genes de resistencia bacterianos a partir de hemocultivos positivos (Artículo 6, Objetivo 4.1).....	118
4.5.2. Evaluación de un nuevo algoritmo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Artículo 7, Objetivo 4.2).....	125
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	129
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	139

**FIGURAS**

Figura I: Evolución temporal del descubrimiento de nuevos antimicrobianos y la aparición de bacterias resistentes.....	4
Figura II: Resistoma antibiótico y contribución de sus componentes.....	8
Figura III: Estructura química de los principales carbapenémicos.....	12
Figura IV: Porcentaje de resistencia a carbapenémicos en aislados invasivos de <i>Acinetobacter baumannii</i> por país en la Unión Europea, año 2018.....	16
Figura V: Estructura química de los glicopéptidos naturales y semisintéticos.....	20
Figura VI: Porcentaje de resistencia a vancomicina en aislados invasivos de <i>Enterococcus faecium</i> por país en la Unión Europea, año 2019.....	22
Figura VII: Estructura química de las oxazolidinonas.....	25
Figura VIII: Protocolos de identificación y antibiograma para hemocultivos positivos para bacilos Gram-negativos, mostrando el tiempo de obtención de los resultados evaluados en el estudio.....	119
Figura IX: Algoritmo propuesto para la detección fenotípica y confirmación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de carbapenemasa en el HUCA.....	126

## TABLAS

Tabla I: Lista de patógenos prioritarios de la OMS para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos .....	5
Tabla II: Antimicrobianos pertenecientes a la clasificación <i>Watch</i> y <i>Reserve</i> de la OMS.....	6
Tabla III: Principales características de las carbapenemasas más frecuentes.....	14
Tabla IV: Principales subgrupos de carbapenemasas de la familia OXA .....	17
Tabla V: Tipos de resistencia a glicopéptidos en enterococos .....	21
Tabla VI: Interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en mg/L de linezolid y tedizolid según los puntos de corte del EUCAST y el CLSI .....	28
Tabla VII: Aislados bacterianos analizados y criterios de inclusión.....	91
Tabla VIII: Principales brotes por <i>Enterococcus faecium</i> resistentes a vancomicina en España .....	101
Tabla IX: Bacterias Gram-negativas y genes de resistencia detectados por el ensayo <i>Sepsis Flow Chip</i> .....	120
Tabla X: Características de los principales sistemas disponibles para la identificación de bacterias a partir de hemocultivo positivo .....	124



## **ABREVIATURAS**



**Abreviaturas**

ABC: Adenosina trifosfato *binding cassette*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AREfm: *Ampicillin-resistant Enterococcus faecium*

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

BGNF: Bacilo Gram-negativo no fermentador

BLEE: Beta-lactamasa de espectro extendido

CC: Complejo clonal

CHDL: *Carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase*

CI: Clon internacional

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CPT: Centro peptidil transferasa

CRAB: *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*

DDD: Dosis diaria definida

DHP-I: Dehidropeptidasa I

DOT: *Days of therapy*

EARs-Net: *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC: *European Centers for Disease Prevention and Control*

ECN: Estafilococo coagulasa-negativo

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos

EMAg: Enzima modificante de aminoglicósidos

ENVIN: Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva

## ABREVIATURAS

EPC: *Enterobacterales* productores de carbapenemasa

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA: *Food and Drug Administration*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

HC: Hemocultivo

HEB: Hospital El Bierzo

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

hVISA: *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

IC: Inmunocromatografía

IRAS: Infección relacionada con la asistencia sanitaria

IS: Insertion sequence

ITU: Infección del tracto urinario

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LEADER: *Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance*

LRSE: *Linezolid-resistant Staphylococcus epidermidis*

LZD: Linezolid

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*

MDR: *Multidrug resistant*

MLB: Metalo-beta-lactamasa

MLST: *Multilocus sequence typing*

MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MSSA: *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*

NGS: *Next-Generation Sequencing*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OXA: Oxacilinas

SFC: *Sepsis Flow Chip*



SNC: Sistema nervioso central

PBP: *Penicillin binding protein*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*

POCT: *Point-of-care-testing*

PROA: Programa de optimización del uso de los antimicrobianos

SCC: *Staphylococcal cassette chromosome*

SFC: *Sepsis Flow Chip*

ST: Secuencia tipo

TAAN: Técnica de amplificación de ácidos nucleicos

TGI: Tracto gastrointestinal

Tn: Transposon

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UE: Unión Europea

VISA: *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

VRE: *Vancomycin-resistant enterococci*

VREfm: *Vancomycin-resistant Enterococcus faecium*

VRSA: *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*

XDR: *Extensively drug-resistant*

ZAAPS: *Zyvox® Appraisal of Potency and Spectrum*



## **RESUMEN**

## RESUMEN

**ESPAÑOL**

Las bacterias resistentes a antibióticos suponen una seria amenaza para la salud pública, especialmente cuando afectan a antimicrobianos de última línea o presentan fenotipos de resistencia con escasas alternativas terapéuticas. Durante el desarrollo de esta tesis se estudió una selección de bacterias, con una o ambas características, que causaron, en los últimos años, brotes o epidemias en dos hospitales del norte de España: el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y el Hospital El Bierzo (HEB).

En primer lugar se evaluó el efecto a largo plazo de un paquete de medidas de control de la infección, instauradas para poner fin a una epidemia de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) en la UCI del HUCA. La intervención, implantada en 2016 y mantenida hasta la fecha (basada principalmente en medidas exhaustivas de limpieza), ha sido efectiva. De hecho, no se han producido nuevos brotes por CRAB en la UCI hasta la fecha, descendiendo además el consumo de colistina, que es un antibiótico de último recurso. El estudio molecular de 49 CRAB obtenidos aproximadamente un año después de la implantación de las medidas, demostró la presencia de un clon ST218 portador de los genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (resistencia a carbapenémicos) y del gen transferible *armA* (resistencia a aminoglicósidos) en otras unidades del hospital. Estos resultados muestran la dispersión y establecimiento de un clon de CRAB fuera de la UCI, por lo que las medidas de control de la infección deberían extenderse al resto del hospital para conseguir la erradicación total de CRAB.

En el presente trabajo también se estudiaron 28 aislados de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina (VREfm) recuperados de pacientes atendidos en el HEB en el año 2018. Estos aislados fueron sensibles únicamente a linezolid (100%) y sensibles dosis-dependiente a daptomicina (78,6%), positivos para el gen *vanA* y pertenecieron al complejo clonal (CC) 17 de alto riesgo. Debido a la alarmante situación del HEB en cuanto a VREfm con escasas alternativas terapéuticas, en el año 2018 se estableció un cribado de rutina para la detección precoz de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas en enterococos con CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid (LZD). Los resultados mostraron una baja prevalencia de estos aislados (0,9%); sin embargo, tres de los cuatro aislados detectados fueron *E.*

*faecalis optrA* positivos, resistentes a cloranfenicol y pertenecientes a tres clones diferentes [con secuencias tipo (ST) 7, 480 y 585]. La detección precoz de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas, como *optrA*, es esencial para evitar su dispersión, especialmente en entornos sanitarios con alta prevalencia de VREfm.

En el HUCA se observó una elevada prevalencia de resistencia a LZD en aislados de *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) del periodo 2011-2017, especialmente en la UCI, donde su incremento mostró una relación estadísticamente significativa con el elevado consumo de LZD. En el resto de unidades del HUCA, con un consumo considerablemente inferior de este antibiótico, no se encontró relación estadísticamente significativa y la prevalencia de aislados resistentes fue menor. El estudio molecular de los primeros LRSE disponibles (44, recuperados entre Junio 2013-Junio 2014), y de cinco aislados causantes de ventriculitis (2013-2016), mostraron perfiles de PFGE estrechamente relacionados, pertenecieron al clon ST2 y presentaron como principal mecanismo de resistencia a LZD la mutación G2576T en las seis copias del gen codificante del ARNr 23S. Los resultados muestran el establecimiento de un clon de LRSE en el HUCA durante un periodo de siete años, no solo en una UCI con un elevado consumo de LZD, sino en todo el hospital a pesar del menor uso de este antimicrobiano.

La detección precoz de bacterias resistentes es esencial para la rápida instauración de tratamientos antimicrobianos efectivos y la implementación de medidas de control de la infección que eviten su dispersión. Por esta razón, en el último apartado de la tesis se evaluaron dos métodos para la detección precoz de bacterias resistentes en el HUCA. En el primer trabajo se evaluó la capacidad del *Sepsis Flow Chip* (SFC) para la identificación y detección de determinantes de resistencia en bacilos Gram-negativos obtenidos a partir de hemocultivos (HC) positivos, combinado con la identificación mediante MALDI-TOF tras subcultivo de cuatro horas. El SFC identificó correctamente el 94,4% de las bacterias presentes en HC monomicrobianos y un 100% cuando se combinó con MALDI-TOF. Además, obtuvo una concordancia del 98,8%, 98,9% y 99% para la detección de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido y/o carbapenémicos. En un segundo trabajo se evaluó un nuevo algoritmo para la detección y confirmación de Enterobacterales productores

de carbapenemasa (EPC), basado en la realización de un ensayo de disco difusión con temocilina y ertapenem. El algoritmo mostró un alto poder de discriminación entre EPC y no-EPC con sensibilidad disminuida a carbapenémicos.

## RESUMEN



**ENGLISH**

Antimicrobial resistant bacteria are a serious threat to public health, mainly when they affect to last-resort antimicrobials or display resistance phenotypes with few therapeutic alternatives. In this PhD thesis, we have studied a selection of such bacteria which caused outbreaks or endemic situations in the last years in two hospitals in northern Spain: *Hospital Universitario Central de Asturias* (HUCA) and *Hospital El Bierzo* (HEB).

First, we evaluated the long-term effect of a package of infection control measures, aimed to eradicate carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) isolates in the ICU of HUCA. The intervention, implemented in 2016 and maintained to date (mainly based in deep cleaning), proved to be effective, as no more ICU-outbreaks by CRAB have been detected to date. Moreover, a decrease in colistin (regarded as last-resort antimicrobial) consumption was also observed. The molecular study of a selection of 49 CRAB isolates, obtained approximately one year after the intervention, demonstrated the presence of a ST218 clone carrying the *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (resistance to carbapenems) and *armA* (resistance to aminoglycoside) genes in other HUCA wards. Thus, the results obtained showed the spread and establishment of a CRAB clone in wards other than ICU. Thereby, the infection control measures implemented in ICU must be extended to all wards to completely eradicate CRAB from the hospital.

The present work also studied 28 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) isolates recovered from patients attended in 2018 at the HEB. These isolates were only susceptible to linezolid (LZD) (100%) and susceptible-dose dependent to daptomycin (78.6%), positive for the *vanA* gene and belonged to the high-risk clonal complex (CC) 17. Due to this worrisome situation in the HEB regarding VREfm isolates with limited therapeutic alternatives, a routine screening of transferable oxazolidinones-resistance genes in enterococci with LZD MICs  $\geq 4$  mg/L, was implemented in 2018. The results obtained show a low prevalence of these isolates (0.9%); however, three of the four detected were *E. faecalis* *optrA*-positive, resistant to chloramphenicol, and belonged to three different clones [with sequence types (ST) 7, 480 and 585]. Prompt detection of transferable oxazolidinones-resistance genes, such as *optrA*, is crucial to avoid their spread, especially in healthcare areas with high VREfm prevalence.

Regarding the HUCA, a high prevalence of LZD-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) were detected during the 2011-2017 period, especially in the ICU, where its increase had a statistically significant correlation with a high consumption of LZD. In

wards other than ICU, LZD usage and LRSE prevalence were lower, and no significant correlation was observed. The molecular characterization of the first available LRSE isolates (44, recovered between June 2013 and June 2104) and of five isolates causing ventriculitis (2013-2016), showed closely-related PFGE patterns, belonged to clone ST2 and carried a G2576T mutation in the six copies of the rRNA 23S gene as the main LZD resistance mechanism. These findings show the establishment of a LRSE clone during seven years in the HUCA, not only in an ICU with high LZD consumption, but also in the whole hospital despite the lower LZD use in other wards.

Prompt detection of resistant bacteria is crucial for rapid implementation of both, effective antimicrobials treatments and infection control measures, in order to avoid their spread. Therefore, in the last section of this thesis, two assays aimed to the rapid detection of resistant bacteria were evaluated. In the first work, the Sepsis Flow Chip (SFC), alone and in combination with MALDI-TOF after four hours subculture, was evaluated for the identification of Gram-negative bacilli and detection of resistance determinants, directly from positive blood cultures (BCs). In the case of monomicrobial BCs, SFC alone correctly identified 94.4% of the bacteria, reaching 100% when combined with MALDI-TOF. Moreover, 98.8%, 98.9% and 99% concordance was obtained for detection of the *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> genes, conferring resistance to cephalosporin and/or carbapenems. In the second work, a new algorithm for screening and confirmation of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE), based on a temocillin and ertapenem disc diffusion assay, was evaluated. The algorithm showed a high capacity to discriminate between CPE and non-CPE with reduced susceptibility to carbapenems.

# **1. INTRODUCCIÓN**



### **1.1. Contexto histórico de los antimicrobianos y del problema de la resistencia: Del *magic bullet* a la actualidad**

A principios del siglo XX, el científico alemán Paul Ehrlich desarrolló el concepto de “toxicidad selectiva” (actividad selectiva de ciertos compuestos frente a microorganismos, pero no frente a células del huésped), denominando a estos agentes *magic bullet*, lo que abriría las puertas a un nuevo abordaje farmacológico en el manejo de las enfermedades infecciosas: la quimioterapia antiinfecciosa. En 1910, Ehrlich sintetizó el primer agente quimioterapéutico (compuestos sintéticos con actividad antibacteriana), el salvarsán un derivado arsenical que fue el primer tratamiento efectivo de la sífilis (Gould, 2016). Pocos años después, en 1932, Gerhard Domagk descubrió la actividad del rojo de prontosil en el tratamiento de las infecciones por estreptococo en ratones de laboratorio y posteriormente en humanos. Tiempo después, se descubrió que la actividad del prontosil se debía a uno de sus metabolitos, la p-aminobenzosulfonamida (sulfanilamida), descubriéndose así la actividad antibacteriana de las sulfamidas. La ausencia de patente del prontosil (su metabolito activo, la sulfanilamida, había sido sintetizada previamente, en 1908, por el químico Paul Gelmmo y era de dominio público), permitió su rápido uso a nivel mundial y el desarrollo de nuevas sulfamidas (Otten, 1986).

En 1928 Alexander Fleming descubrió de manera fortuita la penicilina, cuando observó la acción bactericida de un hongo contaminante (*Penicillium notatum*) sobre unos cultivos de *Staphylococcus aureus* (Fleming, 1929). Sin embargo, el uso generalizado de la penicilina no se produjo hasta 1945, como consecuencia de los métodos desarrollados por Howard Florey y Ernst Chain en 1939 para su producción y purificación a gran escala (Aminov, 2010).

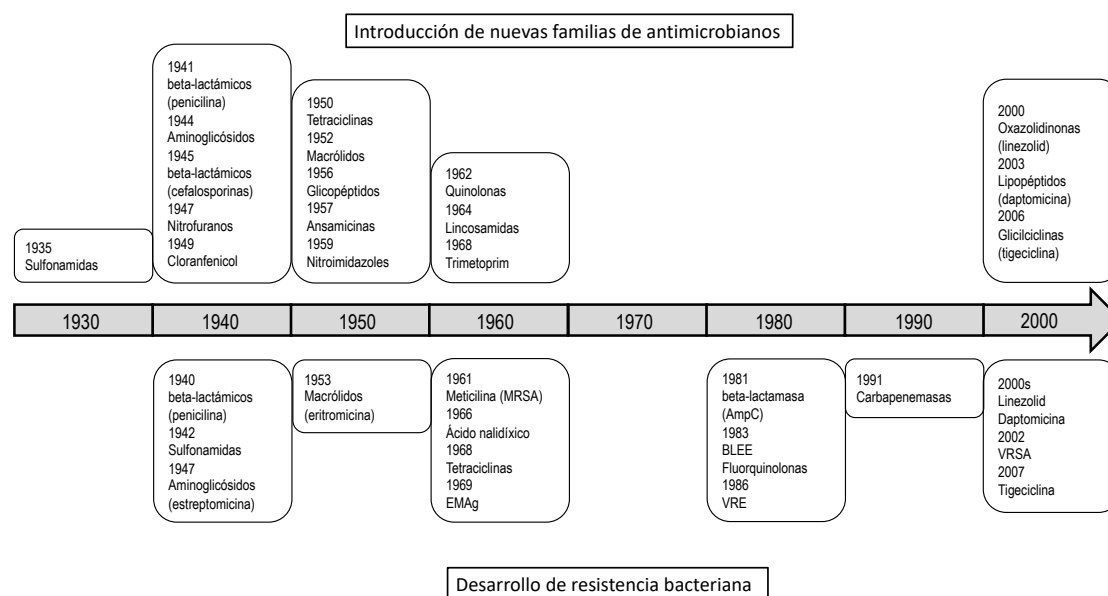
El descubrimiento de los tres primeros antimicrobianos: el salvarsán, las sulfamidas y la penicilina (primer antibiótico estrictamente hablando: compuestos con actividad antibacteriana producidos de forma natural por microorganismos), constituyó uno de los mayores avances de la medicina y supuso un antes y un después en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Tras este fulgurante inicio, comenzó la denominada “época dorada” de los antimicrobianos, iniciándose en los siguientes 20 años una carrera por parte de la industria farmacéutica para obtener nuevas moléculas con actividad antimicrobiana, preferentemente a partir de microorganismos vivos (antibióticos) pero también derivados semisintéticos y sintéticos (quimioterapéuticos). Esto condujo al descubrimiento de una gran cantidad de compuestos pertenecientes a

## INTRODUCCIÓN

diferentes familias (beta-lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, etc.) (Podolsky, 2018). La importante disminución de la mortalidad y morbilidad, especialmente la infantil, hizo creer que “la batalla” contra las enfermedades infecciosas estaba ya ganada.

Sin embargo, el descubrimiento y la introducción de nuevos antimicrobianos en la práctica clínica se ha visto acompañado de forma paralela a lo largo del tiempo, por la aparición y dispersión de bacterias capaces de sobrevivir a la acción de los mismos (bacterias resistentes) (Figura I).

Figura I: Evolución temporal del descubrimiento de nuevos antimicrobianos y la aparición de bacterias resistentes.



MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; EMAg: Enzimas modificantes de aminoglicósidos; BLEE: Beta-lactamasas de espectro extendido; VRE: *Vancomycin-resistant enterococci*; VRSA: *Vancomycin-resistant S. aureus*. Modificado de (Torres, 2012)

Por otro lado, el auge de la industria farmacéutica y el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antibacteriana sufrió un severo frenazo tras la “época dorada”, disminuyendo sustancialmente el descubrimiento de nuevas moléculas a partir de 1970. Esta situación puso fin al sobreestimado optimismo derivado de los grandes logros acaecidos con el descubrimiento de moléculas que permitían curar infecciones en pacientes que antes no contaban con un tratamiento efectivo. De hecho, desde el descubrimiento del trimetoprim en 1968, hasta el descubrimiento del linezolid en el año

2000, no se introdujo ninguna nueva familia a la práctica clínica y tan sólo se incorporaron derivados semisintéticos de las moléculas ya conocidas. Este hecho, junto con la continua emergencia de bacterias resistentes, ha provocado que en la actualidad la resistencia antimicrobiana suponga un grave problema de salud pública a nivel mundial. No es infrecuente que en la práctica clínica diaria nos encontremos pacientes con infecciones producidas por bacterias resistentes a la práctica totalidad de antimicrobianos disponibles, existiendo muchas veces escasas alternativas terapéuticas, no siempre idóneas ni exentas de importantes efectos tóxicos. Así la Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboró en el año 2017 una lista de bacterias resistentes a antimicrobianos con escasas alternativas terapéuticas, para las cuales es prioritaria la investigación y desarrollo de nuevas moléculas efectivas (Tabla I) (WHO, 2017).

Tabla I: Lista de patógenos prioritarios de la OMS para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos.

---

**Prioridad 1: Crítica**

*Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenémicos.

*Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenémicos.

*Enterobacterales*, resistente a carbapenémicos, resistente a cefalosporinas de 3ª generación.

**Prioridad 2: Alta**

*Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina.

*Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina, resistente o con sensibilidad intermedia a vancomicina.

*Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina.

*Campylobacter* spp., resistente a fluoroquinolonas.

*Salmonella* spp., resistente a fluoroquinolonas.

*Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas de 3ª generación, resistente a fluoroquinolonas.

**Prioridad 3: Media**

*Streptococcus pneumoniae*, no sensible a penicilina.

*Haemophilus influenzae*, resistente a ampicilina.

*Shigella* spp., resistente a fluoroquinolonas.

---

Modificado de (WHO, 2017)

La situación en la que nos encontramos actualmente, con bacterias multirresistentes y escasas alternativas terapéuticas disponibles, hace además necesaria la implementación de Programas de Optimización del uso de los Antimicrobianos (PROA o *Stewardship* en inglés) que promuevan un uso prudente de los mismos y preserven aquellos considerados como tratamiento de última línea (*last-resort*) frente a los

## INTRODUCCIÓN

patógenos de prioridad crítica y alta anteriormente mencionados. En relación con esto, la OMS clasifica a los antimicrobianos en tres grupos: *Access*, *Watch* y *Reserve* (AWaRe) como criterio para que los equipos PROA prioricen sus acciones frente a los antimicrobianos de los dos últimos grupos (WHO, 2019). Los antimicrobianos del grupo *Watch* deben usarse como primera o segunda opción para el tratamiento empírico de síndromes infecciosos específicos, mientras que los del grupo *Reserve* han de considerarse la última opción para el tratamiento de síndromes infecciosos causados, o con sospecha de ello, por bacterias multirresistentes cuando no exista otra alternativa efectiva o segura (Tabla II) (WHO, 2019).

Tabla II: Antimicrobianos pertenecientes a la clasificación *Watch* y *Reserve* de la OMS.

<b><i>Watch</i></b>	
Azitromicina	Ciprofloxacino
Cefixima	Claritromicina
Cefotaxima	Meropenem
Ceftazidima	Piperacilina + tazobactam
Ceftriaxona	Vancomicina
Cefuroxima	
<b><i>Reserve</i></b>	
Ceftazidima + avibactam	Meropenem + vaborbactam
Colistina	Plazomicina
Fosfomicina (intravenosa)	Polimixina B
Linezolid	

Modificado de (WHO, 2019)

## 1.2. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos: concepto, origen y tipos

### 1.2.1. Concepto y origen

La emergencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos fue pronosticada ya por los denominados padres de la quimioterapia y la antibioterapia, Ehrlich y Fleming, respectivamente. Ambos advirtieron que el uso inadecuado de estos conllevaría a la aparición y selección de bacterias resistentes. Dichas advertencias no tardaron en confirmarse y en 1940, antes incluso del uso generalizado de la penicilina, ya se



detectaron las primeras bacterias resistentes a la misma por la producción de una enzima penicilinas (Abraham *et al.*, 1940).

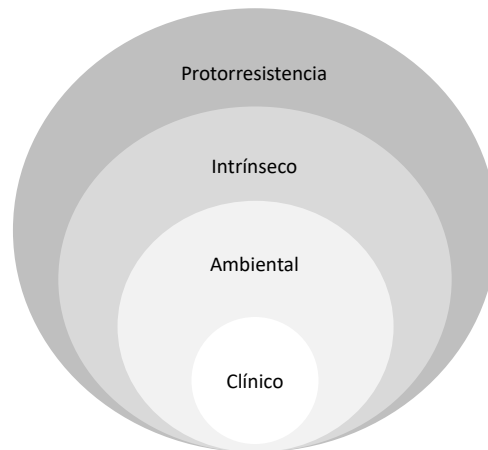
Actualmente sabemos que los genes implicados en la resistencia a los antimicrobianos son anteriores incluso al descubrimiento y uso terapéutico de los mismos (Aminov, 2010; D'Costa *et al.*, 2011). Respecto a su origen, durante mucho tiempo se ha creído que se encontraba en los propios microorganismos productores de antibióticos, que portaban dichos genes como mecanismo de defensa frente a las moléculas que ellos mismos sintetizaban, los cuales podrían ser posteriormente transferidos a bacterias patógenas (Martínez *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de múltiples genes de resistencia en bacterias ambientales no productoras de antibióticos y no sometidas a presión antibiótica, junto con la similitud estructural de muchas moléculas antimicrobianas con moléculas implicadas en el metabolismo bacteriano, han abierto nuevas teorías sobre el origen de los genes de resistencia (Alonso *et al.*, 2001).

De esta forma, en la actualidad nos referimos como resistoma antibiótico al conjunto de todos los genes que contribuyen de manera directa o indirecta a la resistencia a los antimicrobianos (Wright, 2010). Dentro del resistoma podemos diferenciar:

- Resistoma ambiental: Genes de resistencia de las bacterias ambientales, productoras o no, de antibióticos.
- Resistoma clínico: Genes de resistencia de las bacterias patógenas.
- Resistoma intrínseco: Genes de resistencia intrínsecos de forma natural en el cromosoma de ciertos géneros o familias bacterianas.
- Protorresistencia: Genes *housekeeping* o genes que codifican proteínas metabólicas, cuya función principal no es generar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, pero que pueden ser precursores de genes de resistencia a través de procesos evolutivos de adaptación.

El resistoma clínico ha sido ampliamente estudiado y documentado en la literatura científica desde el descubrimiento de los antimicrobianos; sin embargo, la contribución del mismo al conjunto del resistoma es mínima en comparación al resto (Figura II).

Figura II: Resistoma antibiótico y contribución de sus componentes.



Modificado de (Wright, 2010)

### 1.2.2. Tipos de resistencia

Las bacterias pueden utilizar diferentes mecanismos para conseguir que los antimicrobianos no alcancen su diana terapéutica, o no lo hagan a la concentración y tiempo necesarios para inhibir su crecimiento o causar su muerte, consiguiendo por tanto sobrevivir a la acción de los mismos. Los mecanismos básicos por los que una bacteria elude la acción de un antimicrobiano son los siguientes:

- Impedir que los antimicrobianos alcancen su diana terapéutica. Modificando la pared celular o la membrana bacteriana, haciéndola menos permeable a la difusión del antimicrobiano.
- Modificar o inactivar el antimicrobiano a través de enzimas bacterianas.
- Modificar la diana de acción del antimicrobiano impidiendo su interacción o disminuyendo su afinidad por el mismo.
- Expulsar el antimicrobiano al exterior de la bacteria, a través de mecanismos como bombas de eflujo.
- Proteger la diana o el antimicrobiano evitando la interacción entre ambos.

Además, en función de la naturaleza de estos mecanismos podemos clasificar la resistencia bacteriana en intrínseca y adquirida:

1.2.2.1. Resistencia intrínseca: Es aquella que de forma inherente poseen un grupo, género o especie bacteriana y es por tanto heredada y transmitida a la progenie de los distintos miembros de dicho grupo.

1.2.2.2. Resistencia adquirida: Es aquella no presente de forma natural y que sólo es adquirida por ciertas bacterias a través de modificaciones genéticas que producen alteraciones en la estructura o fisiología de la bacteria. Estas modificaciones genéticas han sido conseguidas por las bacterias a lo largo del tiempo mediante procesos evolutivos de adaptación, principalmente gracias a dos fenómenos:

- Mutaciones: La alta frecuencia de replicación de las bacterias les confiere una elevada tasa de mutación. Dichas mutaciones pueden generar al azar un “error útil”, que confiera una ventaja selectiva frente al resto de la población no mutada. Así, cuando una mutación genera en la bacteria la capacidad de sobrevivir a la acción de un antimicrobiano, ésta se vuelve resistente al mismo. Además, hoy sabemos que los antimicrobianos son capaces de elevar la tasa de mutación de las bacterias, aumentando la posibilidad de adquisición de resistencia y posteriormente seleccionar la población resistente. La resistencia a antimicrobianos por fenómenos mutacionales de genes intrínsecos sólo se transfiere de forma vertical, es decir de la cepa origen a su progenie (Torres, 2012).

- Adquisición de material genético exógeno: Las bacterias poseen plataformas genéticas, como integrones, transposones y plásmidos, que son sistemas altamente eficaces que les permiten adquirir y acumular genes exógenos del ambiente o de otras bacterias cercanas, y su posterior movilización y diseminación a otras bacterias incluso de especies y géneros diferentes.

- Integrones: Son piezas genéticas compuestas al menos por tres elementos (una integrasa, un lugar de recombinación sitio-específico y un promotor) que permiten captar e integrar de forma consecutiva genes de resistencia (casetes génicos) y expresarlos posteriormente generando fenotipos de multirresistencia (Sabaté *et al.*, 2002). En conjunto constituyen

## INTRODUCCIÓN

los sistemas integrón/casetes génicas, siendo estas últimas los elementos móviles.

- **Transposones:** Elementos genéticos móviles que frecuentemente contienen genes de resistencia. Codifican una transposasa que permite su traslado a otro lugar del genoma de una bacteria, manteniéndose o no en el sitio inicial (Normark *et al.*, 2002).

- **Plásmidos:** Elementos genéticos extracromosómicos y autorreplicativos, que contienen genes no esenciales para la bacteria pero que pueden conferir una ventaja para adaptarse y sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como la presencia de antibióticos (genes de resistencia) (Normark *et al.*, 2002).

Los integrones están frecuentemente incluidos en transposones y estos a su vez en plásmidos (aunque también pueden localizarse en el cromosoma), lo que genera una maquinaria genética con extraordinaria capacidad para adquirir y acumular material genético exógeno, en lo que se ha denominado “capitalismo genético” (Baquero, 2004). Además, los transposones conjugativos y los plásmidos pueden diseminarse entre bacterias muy diversas, mediante fenómenos de transferencia horizontal, confiriéndoles un alto poder de dispersión. Por todas estas razones cuando los genes de resistencia se albergan en estos elementos genéticos representan una importante amenaza epidemiológica y clínica debida, además, a los fenotipos de multirresistencia que frecuentemente expresan.

A continuación, nos centraremos en los agentes antibacterianos y las resistencias relevantes para esta Tesis Doctoral.

### 1.3. Carbapenémicos: características y resistencia

Los carbapenémicos o carbapenemas, pertenecen a la familia de los beta-lactámicos, unos de los antimicrobianos más ampliamente utilizados en la práctica clínica por su amplio espectro de acción y su baja toxicidad. El primer representante de este grupo fue la tienamicina, aislada a partir de *Streptomyces catleya* en 1976, molécula que presentaba una gran actividad antibacteriana y amplio espectro de acción, pero que era químicamente inestable. Modificaciones de la misma dieron lugar al imipenem (N-formimidoil tienamicina), que fue sintetizado en 1982 y que, formulado junto a la cilastatina [inhibidor de la dehidropeptidasa I (DHP-I) que bloquea el metabolismo renal del imipenem incrementando su concentración sérica], fue el primer carbapenémico incorporado en la práctica clínica en el año 1985 (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Posteriormente fueron introducidos otros representantes de esta familia entre los que destacan el meropenem (1994), el ertapenem (2001) y el doripenem (2008). Los carbapenémicos se encuentran entre los beta-lactámicos con mayor espectro de acción, por lo que son usados como antimicrobianos de última línea en el tratamiento de infecciones graves producidas, o con sospecha de ello, por bacterias resistentes. Sin embargo, la emergencia y dispersión de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en la década de los 80, así como de otras bacterias multirresistentes, ha conllevado un uso más frecuente de dichas moléculas, lo que ha favorecido la emergencia y dispersión de bacterias resistentes a los carbapenémicos.

#### 1.3.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

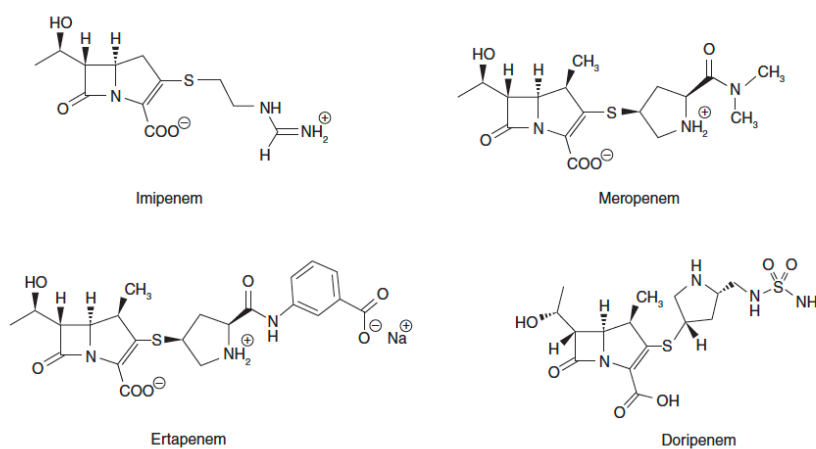
Todos los antimicrobianos pertenecientes a la familia de los beta-lactámicos presentan en común un anillo beta-lactámico que constituye el grupo farmacóforo de la familia al que debe su nombre. Los beta-lactámicos son potentes bactericidas que inhiben la formación de la pared celular de bacterias en fase de crecimiento. El anillo beta-lactámico actúa como un análogo estructural del dipéptido terminal D-ala-D-ala, inhibiendo las enzimas transpeptidasas, carboxipeptidasas, e indirectamente también las transglicosidasas, implicadas todas ellas en la síntesis del peptidoglicano. Este conjunto de enzimas recibe el nombre de proteínas de unión a la penicilina o PBP (*penicillin binding proteins*). Así, el anillo beta-lactámico actúa como un análogo del sustrato de las PBP uniéndose a ellas de forma covalente y con mayor afinidad que el dipéptido terminal,

## INTRODUCCIÓN

realizando una inhibición “suicida” de estas enzimas y, por tanto, inhibiendo la síntesis de la pared celular y deteniendo el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático). En una segunda fase, los beta-lactámicos producen una pérdida de ácidos lipoteicoicos, que son potentes inhibidores del sistema autolítico, lo que origina la liberación de las mureina hidrolasas y desemboca en la muerte celular (efecto bactericida) (Suárez *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010).

La estructura química de los carbapenémicos está formada por la condensación del anillo beta-lactámico con un anillo pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Este segundo anillo posee en posición 1 un átomo de carbono (*carba*), a diferencia del átomo de azufre del anillo tiazolidínico de las penicilinas, y un enlace no saturado entre 2 y 3 (*-em*). Estos cambios confieren una gran estabilidad frente a la mayoría de beta-lactamasas. Por último, diferentes sustituciones en las posiciones 1 y 2 del anillo pirrolidínico dan lugar a los diferentes carbapenémicos (Figura III) (Martínez *et al.*, 2010).

Figura III: Estructura química de los principales carbapenémicos.



Su espectro de acción es uno de los más amplios de la familia de los beta-lactámicos comprendiendo bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, incluso las anaerobias, presentando actividad sobre cepas productoras de la mayoría de beta-lactamasas. Entre las diferentes moléculas podemos encontrar pequeñas diferencias destacando que: i) el imipenem y el doripenem presentan mayor actividad frente a bacterias Gram-positivas; ii) el imipenem y el doripenem son más potentes que el meropenem frente a *Acinetobacter baumannii*; iii) el ertapenem presenta un menor

espectro de acción, ya que no es activo frente a bacilos Gram-negativos no fermentadores (BGNNF) (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

### 1.3.2. Mecanismos de resistencia y epidemiología

La resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram-negativas está causada principalmente por tres mecanismos: i) alteración de la permeabilidad de la membrana externa, ii) mecanismos de expulsión activa del antimicrobiano e iii) inactivación enzimática mediada por la producción de beta-lactamasas (Eichenberger *et al.*, 2019).

#### - Alteración de la permeabilidad:

Para que los carbapenémicos puedan alcanzar su diana de acción (las PBP) en las bacterias Gram-negativas, primero han de atravesar su membrana externa. Debido a su pequeño tamaño molecular y su naturaleza hidrófila, los carbapenémicos atraviesan la membrana externa a través de las porinas. Por tanto, la pérdida o modificación de ciertas de estas porinas conlleva una disminución de la permeabilidad de la membrana y la resistencia, en mayor o menor medida, a los carbapenémicos. Algunos ejemplos de porinas relacionadas con la resistencia a carbapenémicos son la OprD en *Pseudomonas aeruginosa*, la CarO en *Acinetobacter baumannii*, la OmpK36 en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, la OmpC en *Enterobacter aerogenes* y la OmpF en *E. aerogenes* y *Enterobacter cloacae* (Fernández *et al.*, 2012).

#### - Mecanismos de expulsión activa del antimicrobiano:

Las bacterias han desarrollado mecanismos dependientes de energía (ATP principalmente) que les permiten prevenir la acumulación de compuestos tóxicos mediante la expulsión de los mismos fuera de la célula. Estos sistemas de expulsión activa están involucrados también en la resistencia a antimicrobianos, pudiendo tener como sustrato un antimicrobiano de forma específica o afectar a varias familias de antimicrobianos diferentes, generando fenotipos multirresistentes. Los últimos están codificados mayoritariamente en el cromosoma, mientras que los sistemas específicos están codificados generalmente por genes localizados en plásmidos. Estos mecanismos de resistencia son especialmente importantes en bacilos Gram-negativos, destacando los

## INTRODUCCIÓN

BGNNF como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* donde pueden hacer sinergia con fenómenos de disminución de la permeabilidad (Fernández *et al.*, 2012).

### - Inactivación enzimática:

Uno de los principales mecanismos de resistencia a los beta-lactámicos, el principal en *Enterobacteriales*, es el mediado por enzimas inactivadoras de los mismos denominadas beta-lactamasas. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo beta-lactámico, generando compuestos acílicos sin capacidad de unión a las PBP y, por tanto, sin actividad antimicrobiana. En las bacterias Gram-negativas, dichas enzimas actúan en el espacio periplásmico. Se conocen cientos de beta-lactamasas diferentes que afectan a diferentes sustratos y presentan diferente capacidad hidrolítica. Aquellas beta-lactamasas con capacidad para hidrolizar carbapenémicos son denominadas comúnmente carbapenemasas, aunque en realidad muchas de ellas también hidrolizan a la mayoría de los beta-lactámicos. Las carbapenemasas pueden clasificarse según su estructura molecular en tres clases: beta-lactamasas de clase A, B y D de la clasificación de Ambler (Tabla III).

Tabla III: Principales características de las carbapenemasas más frecuentes.

Clase estructural de Ambler	Grupo Bush-Jacoby	Sitio activo	Inhibidores	Enzimas representativas	Características
A	2f	Serina	Inhibidores de beta-lactamasas	KPC GES	
B	3	Zinc	EDTA	GIM, IMP, NDM, SIM, SPM, VIM	No hidrolizan monobactams
D	2d	Serina	NaCl ( <i>in vitro</i> )	OXA-23 OXA-48 OXA-181	No hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido

Modificado de (Logan *et al.*, 2017)



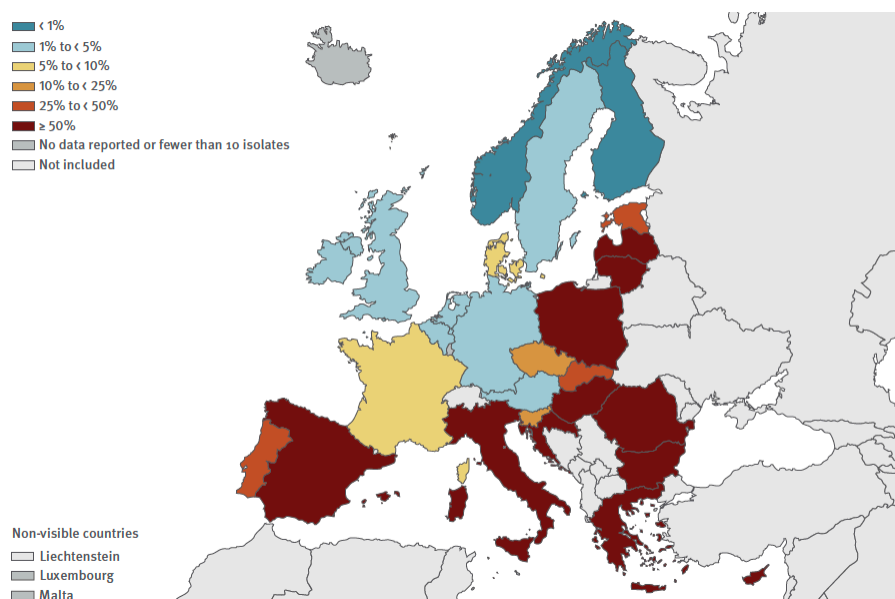
La dispersión y prevalencia de las carbapenemasas difiere mucho dependiendo del género y especie bacteriana, así como de la situación temporo-espacial. De especial importancia es la vigilancia de carbapenemasas en miembros del orden *Enterobacterales* (especialmente en *K. pneumoniae*), debido a su frecuente localización en elementos móviles como plásmidos, lo que les confiere una gran capacidad de dispersión y la frecuente co-expresión de otros mecanismos de resistencia como las BLEE, generando fenotipos de multirresistencia. Otra bacteria preocupante es *A. baumannii*, donde la expresión de carbapenemasas, junto con mecanismos de resistencia frente a diversos antimicrobianos, genera con frecuencia fenotipos extremadamente resistentes (XDR: *extensively drug-resistant*) con muy escasas, y a veces tóxicas, alternativas terapéuticas.

### 1.3.3. Epidemiología de las carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*:

*A. baumannii* es un patógeno oportunista caracterizado por expresar con frecuencia fenotipos de multirresistencia. Este hecho es en parte debido a fenómenos de resistencia intrínseca asociados a un menor número de porinas y expresión constitutiva de sistemas de expulsión activa. Además, posee una gran capacidad para adquirir elementos genéticos como plásmidos, transposones o integrones, que contienen determinantes de resistencia (Zarrilli *et al.*, 2013). Según el ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), en el año 2018, un 28,8% de los aislados invasivos de *A. baumannii* en la UE presentaban resistencia combinada frente a las fluorquinolonas, los aminoglicósidos y los carbapenémicos (ECDC, 2019). Durante mucho tiempo el tratamiento de primera línea frente a cepas multirresistentes (MDR: *multidrug resistant*) de *A. baumannii* fueron los carbapenémicos; sin embargo, en las últimas décadas el porcentaje de cepas resistentes a estas moléculas se ha visto incrementado (Dijkshoorn *et al.*, 2007). En un estudio multicéntrico, realizado en el año 2010 en 38 hospitales españoles, que incluía 143 cepas de *A. baumannii*, el 82,7% de las mismas presentaba resistencia a imipenem (Villar *et al.*, 2014). Según datos del año 2018, el porcentaje de resistencia a carbapenémicos en aislados invasivos en España es del 49,4% (ECDC, 2019) (Figura IV).

## INTRODUCCIÓN

Figura IV: Porcentaje de resistencia a carbapenémicos en aislados invasivos de *Acinetobacter baumannii* por país en la Unión Europea, año 2018.



Tomado de (ECDC, 2019)

El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* es la producción de carbapenemasas. Se han descrito cepas portadoras de beta-lactamasas de clase A, B y D de la clasificación de Ambler en todo el mundo, aunque las más frecuentes son las carbapenemasas de clase D u oxacilinasas. Dentro de la clase A se han encontrado cepas productoras de KPC-2, -3, -4 y -10 en Puerto Rico, y de enzimas tipo GES, como la GES-14 y la GES-11 en Francia y en Turquía, respectivamente. Por otro lado, en esta especie se han descrito 4 tipos diferentes de beta-lactamasas de clase B o metalo-beta-lactamasas (MLB): IMP, NDM, SIM y VIM. Las primeras cepas de *A. baumannii* productoras de MLB, en concreto de IMP-2, fueron aisladas en el año 2000 en Italia y desde entonces se han descrito, a nivel mundial, otras 7 variantes del gen: IMP-1, -4, -5, -6, -8, -11 y -19. De forma esporádica y con origen en diferentes países se han detectado cepas productoras de VIM-1, -2, -3, -4 y -11, mientras que de forma aislada, en Corea del Sur, han aparecido cepas productoras de SIM-1. Las primeras cepas de *A. baumannii* productoras de enzimas NDM fueron descritas en el año 2010 en la India y a partir de entonces han sido encontradas en todo el mundo, principalmente las productoras de la

variante NDM-1 pero también de la NDM-2 (Poirel *et al.*, 2006; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Robledo *et al.*, 2010; Djahmi *et al.*, 2014).

No obstante, como se comentó previamente, las carbapenemasas más prevalentes en *A. baumannii* son las beta-lactamasas de clase D u oxacilinasas (OXA). Dentro de estas enzimas, aquellas capaces de hidrolizar carbapenémicos son denominadas CHDL (*carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase*) (Poirel *et al.*, 2010). Se conocen más de 150 variantes de enzimas OXA y aquellas con capacidad carbapenemasa (CHDL) se agrupan en más de diez subgrupos diferentes, basándose en la comparación de las secuencias de aminoácidos (Tabla IV) (Queenan *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2009).

Tabla IV: Principales subgrupos de carbapenemasas de la familia OXA.

Subgrupo	Subfamilia	Principales enzimas OXA
1	OXA-23-like	OXA-23, OXA-27, OXA-49
2	OXA-24/40-like	OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72
3	OXA-51-like	OXA-51, OXA-64 a OXA-71, OXA-75 a OXA-78, OXA-83, OXA-84, OXA-86 A OXA-89, OXA-91, OXA-92, OXA-94, OXA-95
4	OXA-58-like	OXA-58, OXA-96, OXA-97
5	OXA-55-like	OXA-55, OXA-SHE
6	OXA-48-like	OXA-48, OXA-54, OXA-SAR2
7	OXA-50-like	OXA-50a a OXA-50d, PoxB
8	OXA-60-like	OXA-60a a OXA-60d
9	OXA-62-like	OXA-62
10	OXA-143-like	OXA-143

Modificado de (Queenan *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2010)

## INTRODUCCIÓN

En *A. baumannii* se han descrito CHDL pertenecientes a 5 subgrupos: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like y OXA-143-like.

- OXA-51-like: Es el subgrupo más grande habiéndose detectado más de 45 variantes. El gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> se encuentra de forma natural en el cromosoma de todas las cepas de *A. baumannii* y, en condiciones normales, presenta una actividad carbapenemasa débil. Sin embargo, la inserción de la secuencia de inserción *ISAba1* en el promotor del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> puede producir una sobreexpresión de la enzima, incrementado la capacidad hidrolítica sobre los carbapenémicos y generando así resistencia (Poirel *et al.*, 2006).

- OXA-23-like: La enzima OXA-23, inicialmente llamada ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*), fue la primera oxacilinasas con capacidad de hidrolizar carbapenémicos aislada en *A. baumannii*, en el año 1985 en Escocia. El subgrupo abarca también las enzimas OXA-27 y OXA-49, y los genes que las codifican se han encontrado principalmente en plásmidos. La enzima OXA-23 es la carbapenemasa más ampliamente diseminada en *A. baumannii* a lo largo de todo el mundo (Poirel *et al.*, 2006).

- OXA-24/40-like: Este subgrupo está formado por las enzimas OXA-24, -25, -26, -40 y -72. Las OXA-24 y -25 fueron descritas por primera vez en España y la OXA-26 en Bélgica. Durante décadas las enzimas OXA-24 y OXA-40 fueron altamente prevalentes en cepas multirresistentes de *A. baumannii* en varios países de la cuenca mediterránea, especialmente en la península ibérica (Poirel *et al.*, 2006; Grosso *et al.*, 2011).

- OXA-58-like: La OXA-58 fue descrita por primera vez en un aislado de *A. baumannii* multirresistente encontrado en Francia y desde entonces ha aparecido a lo largo de todo el mundo, a menudo asociada a brotes hospitalarios. Recientemente se han descrito dos nuevas variantes dentro de este grupo, la OXA-96 y la OXA-97, que fueron detectadas en cepas de *A. baumannii* en Singapur y Túnez, respectivamente (Poirel *et al.*, 2006, 2010).

- OXA-143-like: En el año 2009 se identificó una nueva CHDL denominada OXA-143, producida por una cepa de *A. baumannii* aislada en el año 2004 en Brasil, y que dio lugar a un nuevo subgrupo dentro de las CHDL (Higgins *et al.*, 2009).

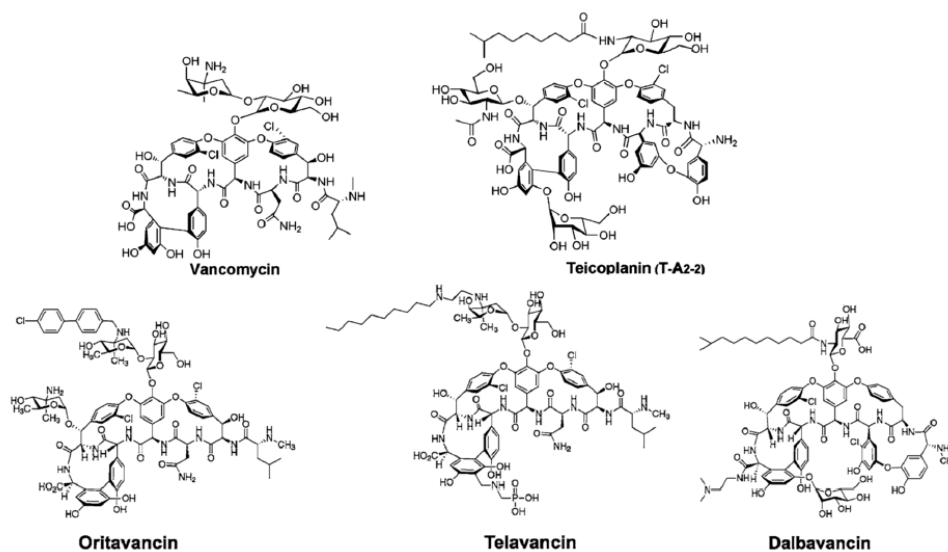
#### 1.4. Glicopéptidos: características y resistencia

Los glicopéptidos son una familia de antimicrobianos compuesta principalmente por la vancomicina y la teicoplanina, producidos por *Streptomyces orientalis* y *Actynoplanes teichomycetus*, respectivamente. La vancomicina fue descubierta en el año 1952, y aprobada por la *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) en el año 1958 para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la penicilina. Sin embargo, su elevada toxicidad (principalmente ótica y renal) y la aprobación en ese mismo año de la meticilina (primera penicilina resistente a penicilinasas), relegó su uso a pacientes alérgicos a beta-lactámicos. A comienzos de los 80 la confluencia de varios eventos provocó que el uso clínico de la vancomicina se incrementase más de 100 veces con respecto a las dos décadas anteriores (Kirst *et al.*, 1998). El primero de ellos fue la eficacia que mostró la vancomicina para el tratamiento de la enterocolitis pseudomembranosa, causada por *Clostridium difficile*. El segundo, fue la dispersión a nivel mundial de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA: *Methicillin-resistant S. aureus*) y el incremento de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina. La efectividad mostrada por la vancomicina para el tratamiento de estos patógenos ha supuesto que, desde la década de los 80 hasta la fecha, siga siendo el tratamiento de primera elección en la infección por *C. difficile*, uno de los fármacos de elección en la infección invasiva por MRSA y el tratamiento empírico de la meningitis neumocócica (junto a una cefalosporina de 3ª generación, hasta conocer la sensibilidad del patógeno a los beta-lactámicos) (Levine, 2006).

Recientemente se han incorporado nuevos derivados glicopéptidos semisintéticos a la práctica clínica, como la dalbavancina, oritavancina y telavancina (Figura V). Todos ellos son lipoglicopéptidos y se caracterizan principalmente por poseer una mayor vida media que permite mayores intervalos de tiempo entre dosificaciones. Además, la oritavancina es activa frente a algunas cepas de enterococo resistente a vancomicina (VRE: *Vancomycin-resistant enterococci*) (Binda *et al.*, 2014).

## INTRODUCCIÓN

Figura V: Estructura química de los glicopéptidos naturales y semisintéticos.



### 1.4.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

Los glicopéptidos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, impidiendo la polimerización del peptidoglicano. La diana de acción de los glicopéptidos es la D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala) terminal del N-acetil-muramil-pentapéptido. El complejo formado por la unión de la vancomicina a la terminación D-ala-D-ala provoca un impedimento estérico para las reacciones de transglicosidación y transpeptidación que son necesarias para conferir rigidez al peptidoglicano (Moellering, 1998).

Los glicopéptidos son bactericidas frente a bacterias Gram-positivas en fase de crecimiento, mientras que las bacterias Gram-negativas son intrínsecamente resistentes. Esto se debe a que los glicopéptidos son moléculas de elevado tamaño, que no pueden difundir a través de su membrana externa y que por tanto no alcanzan la diana terapéutica.

Los glicopéptidos son antimicrobianos de última línea para el tratamiento de infecciones graves por bacterias Gram-positivas como el MRSA, el *Enterococcus faecium* y el *C. difficile*.

1.4.2. Mecanismos de resistencia y epidemiología en enterococos

El principal mecanismo de resistencia a glicopéptidos en enterococos es la alteración de su diana de acción, la terminación D-ala-D-ala del pentapéptido precursor de la síntesis de la pared celular bacteriana. La eliminación de esta terminación y su sustitución por otras con menor afinidad por los glucopéptidos, como la D-alanil-D-lactato (D-ala-D-lac) y la D-alanil-D-serina (D-ala-D-ser), producen diferentes fenotipos de resistencia. Estas modificaciones estructurales están codificadas por diferentes genes del operon *van*. Hasta la fecha se conocen ocho: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* y *vanN*, además de *vanC* presente de forma intrínseca en las especies de *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* (Tabla V).

Tabla V: Tipos de resistencia a glicopéptidos en enterococos.

	Resistencia adquirida								Resistencia intrínseca
	Alto nivel		Variable	Moderado	Bajo nivel				Bajo nivel
	<i>vanA</i>	<i>vanM</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	<i>vanL</i>	<i>vanN</i>	<i>vanC</i>
Vancomicina	R	R	r-R	R	r	r	r	r	r
Teicoplanina	R	R	S	r-R	S	S	S	S	S
Transferible	Si	Si	Si	No	No	Si	No	Si	No
Terminación del pentapéptido	D-ala-D-lac				D-ala-D-ser				

R: resistencia de alto nivel (CMI > 16 mg/L); r: resistencia de bajo nivel (CMI= 8-16 mg/L); S: sensible. Modificado de (Cattoir *et al.*, 2013)

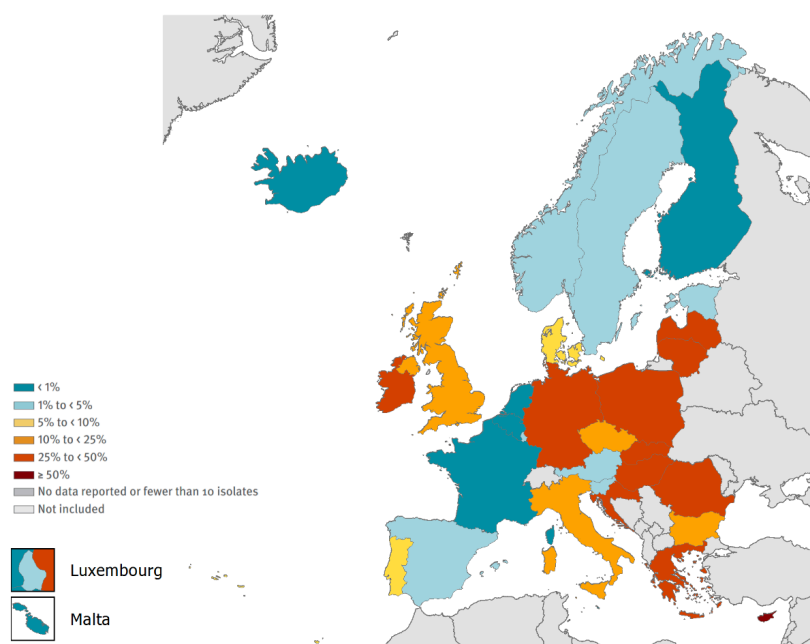
La resistencia a vancomicina en enterococos afecta principalmente a la especie *E. faecium* y es debida mayoritariamente a los genes *vanA* y *vanB* (Cattoir *et al.*, 2013). Además, ambos genes junto con otros del operon *van*, tienen la capacidad de transferirse entre bacterias de la misma o diferente especie, a través de elementos genéticos potencialmente móviles como plásmidos, transposones y sistemas de integrones/casetes génicos.

Los primeros aislados de VRE fueron descritos en *E. faecium* del Reino Unido y Francia a finales de la década de 1980 (Leclercq *et al.*, 1988; Uttley *et al.*, 1989). Desde entonces los VRE se encontraron en todo el mundo, siendo especialmente prevalentes en Estados Unidos (EEUU) desde el año 1990 y mostrando una tendencia al alza en la Unión

## INTRODUCCIÓN

Europea (UE) desde el año 2000 (Torres *et al.*, 2018). Sin embargo, existen importantes diferencias en cuanto a su origen y a su epidemiología. En EEUU los primeros VRE fueron obtenidos de muestras clínicas procedentes de pacientes con infecciones nosocomiales, hospitalizados principalmente en unidades de cuidados intensivos (UCI). La emergencia de estas cepas fue relacionada con el importante uso de antimicrobianos como la vancomicina, las cefalosporinas de tercera generación o el metronidazol en estas unidades. Por el contrario, en la UE los primeros aislados se obtuvieron de muestras procedentes de personas asintomáticas, pacientes con infecciones comunitarias, animales de producción, productos alimentarios y muestras ambientales. La emergencia de estas cepas a partir de 1990 en la UE se relacionó con el uso de la avoparcina, glicopéptido usado en la UE (nunca fue usado en EEUU) desde 1970 hasta 1997 como promotor del crecimiento en animales (Moellering, 1998; Torres *et al.*, 2018). En la actualidad, más del 80% de las cepas y el 60% de los aislados invasivos (bacteriemias), de *E. faecium* en EEUU son resistentes a vancomicina (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). En la UE el porcentaje medio de resistencia a vancomicina en cepas invasivas de *E. faecium* fue del 18,3% en el año 2019, lo que muestra un preocupante incremento comparado con el 10,5% del año 2015. Además, existe una alta variabilidad en función del país, con porcentajes entre el 0,0 y el 50,0% (Figura VI) (ECDC, 2020).

Figura VI: Porcentaje de resistencia a vancomicina en aislados invasivos de *Enterococcus faecium* por país en la Unión Europea, año 2019.



Tomado de (ECDC, 2020)



### 1.4.3. Mecanismos de resistencia y epidemiología en estafilococos

La resistencia a vancomicina en estafilococos fue inducida *in vitro* en laboratorios, incluso antes del uso clínico de dicho antimicrobiano. Sin embargo, la dificultad para desarrollarla hizo pensar que este fenómeno no se produciría en la práctica clínica, y así fue durante los primeros 20 años de uso. Fue en 1979 cuando se detectaron las primeras cepas de estafilococos coagulasa-negativa (ECN) resistentes a la vancomicina, aunque la verdadera preocupación surgió en 1996, cuando se detectó la primera cepa de *S. aureus* resistente a este antibiótico (Srinivasan *et al.*, 2002). Dentro de *S. aureus* podemos distinguir diferentes fenotipos de resistencia en función de las CMI que presenten frente a la vancomicina, según los puntos de corte establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Así, existen cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (VRSA: *vancomycin-resistant S. aureus*) que presentan CMI  $\geq 16$  mg/L; cepas con sensibilidad intermedia (VISA: *vancomycin-intermediate S. aureus*) con CMI comprendidas entre 4 y 8 mg/L; y cepas heterorresistentes (hVISA: *heterogeneous VISA*), es decir cepas sensibles a vancomicina (CMI  $\leq 2$  mg/L) pero que contienen subpoblaciones minoritarias ( $\leq 10^{-5}$  a  $10^{-6}$ ) con CMI entre 4 y 8 mg/L (CLSI, 2019). Sin embargo, el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) sólo distingue cepas sensibles (CMI  $\leq 2$  mg/L) y cepas resistentes (CMI  $> 2$  mg/L) a la vancomicina (EUCAST, 2019).

El mecanismo de resistencia a la vancomicina en cepas de VRSA se debe a la adquisición del operon *vanA* localizado en el transposon Tn1546 y donado por un plásmido conjugativo procedente de una cepa VRE. La posterior sustitución de la D-ala-D-ala terminal del pentapéptido por D-ala-D-lac, con menor afinidad por la vancomicina produciría el incremento de las CMI, como se comentó previamente. Las bases genéticas de los fenotipos hVISA/VISA, por el contrario, no están tan definidas, aunque parece claro que están desencadenados por la acumulación de múltiples mutaciones en sistemas reguladores. De especial importancia son las mutaciones en los genes reguladores *graSR*, *vraSR* y *walkKR* que controlan la expresión de más de 100 genes involucrados en la síntesis de la pared celular, procesos celulares y metabolismo. Las cepas que presentan estos fenotipos muestran una pared celular engrosada que dificulta la difusión de la molécula de vancomicina hacia su diana de acción, incrementándose por tanto su CMI,

## INTRODUCCIÓN

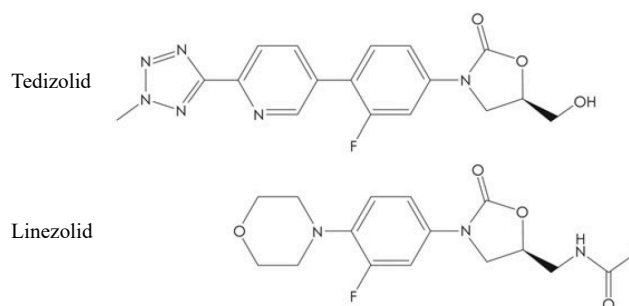
además de una actividad autolítica y virulencia disminuida (Howden *et al.*, 2010; Cong *et al.*, 2020).

Las primeras cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina (VISA y hVISA) fueron descritas en el año 1996 en Japón. Posteriormente, estas cepas han sido descritas con una prevalencia muy variable a lo largo de todo el mundo, principalmente en cepas resistentes a meticilina (MRSA) pero también en cepas sensibles (MSSA: *Methicillin-susceptible S.aureus*). Aunque las cepas VISA son infrecuentes, la prevalencia de cepas que presentan fenómenos de heterorresistencia podría ser mayor, especialmente en cepas que presentan CMI de 2 mg/L frente a la vancomicina (Howden *et al.*, 2010). Sin embargo, la verdadera prevalencia de estas cepas es desconocida, debido principalmente a la falta de un consenso general para definir las cepas como heterorresistentes y a la dificultad para su detección mediante métodos convencionales. Las primeras cepas de VRSA fueron descritas en EEUU, concretamente en Michigan y Pensilvania en el año 2002, y hasta la fecha se han publicado tan sólo 52 casos, incluyendo 14 en EEUU, 16 en la India, 11 en Irán, 9 en Pakistán, 1 en Brasil y 1 en Portugal (Cong *et al.*, 2020). Las cepas VISA y sus precursoras hVISA se han relacionado con infecciones persistentes, fracaso de tratamiento con vancomicina y peor pronóstico clínico. Sin embargo, a día de hoy, la contribución de estas cepas al peor pronóstico sigue siendo objeto de debate, puesto que muchas de ellas fueron descritas en pacientes que recibieron terapias prolongadas con vancomicina y presentaban material ortoprotésico, focos no drenados o infecciones complicadas (endocarditis infecciosa); situaciones todas ellas que aumentan la probabilidad de fracaso de tratamiento (Cercenado, 2000). De cualquier modo, el aislamiento de cepas de *S. aureus* con CMI elevadas a vancomicina ( $> 1,5$  mg/L) durante el tratamiento con este antibiótico en infecciones complicadas o la bacteriemia persistente deben de hacernos sospechar la presencia de estos fenotipos de resistencia (hVISA/VISA) (Cercenado, 2000).

### 1.5. Oxazolidinonas: características y resistencia

Las oxazolidinonas son una familia de antimicrobianos sintéticos compuesta hasta la fecha por el linezolid y el tedizolid. Las propiedades antimicrobianas de las oxazolidinonas fueron descubiertas en la década de los 80 por la farmacéutica DuPont, pero no fue hasta los años 90 cuando tras una reevaluación de la familia por la compañía Pharmacia, se sintetizó una molécula cuyas propiedades antibacterianas, farmacocinéticas y su perfil de toxicidad permitirían su uso en medicina humana, el linezolid. La FDA aprobó en el año 2000 este fármaco, lo que supuso la introducción de una nueva familia de antimicrobianos, después de 32 años (Bialvaei *et al.*, 2017). Tal y como se comentó previamente, la expansión del MRSA en los años 80 conllevó un importante incremento del uso de la vancomicina, que fue uno de los principales factores que contribuyeron a la dispersión en la década de los 90 de los VRE en EEUU. Por otro lado, la descripción de las primeras cepas VISA en Japón y EEUU causaron una gran preocupación en ese momento. En este contexto, la introducción en la práctica clínica de una nueva alternativa terapéutica frente a bacterias Gram-positivas multirresistentes supuso un gran alivio. En el año 2014 se aprobó la siguiente oxazolidinona actualmente disponible, el tedizolid, que muestra un perfil terapéutico muy similar al linezolid, con algunas ventajas frente al mismo como un mejor perfil de seguridad y una mayor potencia antibacteriana que permite su administración en una sola dosis diaria y duraciones de tratamiento menores (Burdette *et al.*, 2015).

Figura VII: Estructura química de las oxazolidinonas.



## INTRODUCCIÓN

### 1.5.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

Las oxazolidinonas actúan inhibiendo la síntesis de proteínas evitando la formación del complejo de iniciación en el que participan las subunidades 50S y 30S del ARN ribosómico (ARN<sub>r</sub>), el ARN de transferencia (ARN<sub>t</sub>), el ARN mensajero (ARN<sub>m</sub>) y los factores de iniciación. En concreto estos antimicrobianos se unen al sitio A del centro peptidil transferasa (CPT) de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, provocando un cambio conformacional que impide la entrada del ARN<sub>t</sub> y, por tanto, la formación del complejo de iniciación y la síntesis proteica (Long *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de esta familia de antimicrobianos fue considerado “único” por inhibir la síntesis proteica en la fase de iniciación, a diferencia de otros inhibidores como el cloranfenicol, los macrólidos, las lincosamidas o las tetraciclinas que lo hacen en una fase posterior, la elongación. Este mecanismo de inhibición temprano confiere ciertas propiedades a las oxazolidinonas, como la efectividad que muestran inhibiendo la síntesis de factores de virulencia de estafilococos y estreptococos (p.ej. la coagulasa, la exotoxina pirógena estreptocócica, la hemolisina, la proteína A o la leucocidina de Panton-Valentine) lo cual resulta especialmente útil en el tratamiento, por ejemplo, de las fascitis necrotizantes producidas por cepas virulentas de *S. aureus* o *Streptococcus pyogenes*. Además, el hecho de tener una diana de acción “única y diferente” al resto de antimicrobianos, y ser moléculas totalmente sintéticas, llevó a pensar que no se verían afectadas por metilasas modificantes del ARN<sub>r</sub> 23S, como otros inhibidores de la síntesis de proteínas, y que no existirían mecanismos de resistencia natural (Livermore, 2003). Sin embargo, actualmente sabemos que otros inhibidores de la síntesis de proteínas como el cloranfenicol, la clindamicina y las estreptogramineas del grupo A poseen sitios de unión superpuestos, pero no idénticos, al de unión de las oxazolidinonas en el sitio A del CPT. Los nucleótidos del CPT, aunque altamente conservados, se adaptan a la unión de los antimicrobianos mediante ligeros cambios en sus posiciones relativas. De esta forma, las diferencias en el modo de acción de dichas moléculas parecen radicar más que en un lugar de unión diferente en el ribosoma, en su afinidad por el sitio y las constantes de velocidad de asociación y disociación (Long *et al.*, 2012).

Las oxazolidinonas tienen actividad bacteriostática frente a la gran mayoría de bacterias Gram-positivas de interés clínico: estafilococos (incluido MRSA), enterococos (incluido VRE), estreptococos, corinebacterias, *Listeria monocytogenes* y bacterias Gram-positivas anaerobias; además también son activas frente a micobacterias y

nocardias. Las bacterias Gram-negativas son resistentes a las oxazolidinonas, debido a que estas son expulsadas a través de bombas endógenas de expulsión activa, impidiendo su interacción con el ribosoma (Livermore, 2003; Bialvaei *et al.*, 2017).

Los fármacos de esta familia son antimicrobianos de última línea aprobados para el tratamiento de la neumonía tanto comunitaria como asociada a cuidado sanitario, infecciones de piel y partes blandas, infecciones producidas por VRE y como cobertura empírica en infecciones que puedan estar producidas por bacterias Gram-positivas multirresistentes. Además, su elevada biodisponibilidad (>90%) permite su administración por vía oral, siendo las únicas moléculas con actividad frente a bacterias Gram-positivas multirresistentes que permiten la terapia secuencial de vía intravenosa a esta vía.

#### 1.5.2. Mecanismos de resistencia y epidemiología

Incluso desde antes de la aprobación del linezolid por la FDA, ya existían programas de vigilancia de la actividad del mismo en aislados clínicos, entre los que destacan el ZAAPS (*Zyvox® Appraisal of Potency and Spectrum*) y el LEADER (*Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance*). El programa ZAAPS comenzó a vigilar la resistencia al linezolid en EEUU durante los años 2002 y 2003; sin embargo, a partir del 2004 la vigilancia en EEUU la lleva a cabo el programa LEADER, mientras que el ZAAPS se centra en la vigilancia en otros países del mundo (Bialvaei *et al.*, 2017). Ambos programas han puesto de manifiesto la gran actividad que mantiene el linezolid frente a patógenos Gram-positivos (*S. aureus*, ECN, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *S. pneumoniae*, estreptococos del grupo viridans y beta-hemolíticos), mostrando unas tasas de resistencia inferiores al 1% desde su comercialización hasta los últimos datos publicados por ambos programas en los años 2015 (LEADER) y 2016 (ZAAPS) (Pfaller *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2018).

Según los puntos de corte vigentes, las cepas de estafilococos se consideran resistentes al linezolid cuando la CMI para el mismo es  $> 4$  mg/L. Para enterococos, el EUCAST y el CLSI consideran resistentes las cepas con CMI  $> 4$  mg/L, mientras que este último considera no-sensibles o con sensibilidad intermedia las cepas con CMI = 4 mg/L (Tabla VI).

## INTRODUCCIÓN

Tabla VI: Interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en mg/L de linezolid y tedizolid según los puntos de corte del EUCAST y el CLSI.

		EUCAST		CLSI		
		S	R	S	R	
Estafilococos	Linezolid	≤ 4	> 4	≤ 4	≥ 8	
	Tedizolid	≤ 0,5	> 0,5	≤ 0,5 <sup>1</sup>	≥ 2 <sup>1</sup>	<sup>1</sup> solo para <i>S. aureus</i>
Enterococos	Linezolid	≤ 4	> 4	≤ 2	≥ 8	
	Tedizolid	-	-	≤ 0,5	-	
Streptococos	Linezolid	≤ 2	> 4	≤ 2	-	
	Tedizolid	≤ 0,5	>0,5	≤ 0,5	-	beta-hemolíticos
		≤ 0,25	> 0,25	≤ 0,25	-	grupo <i>S. anginosus</i>

(CLSI, 2019; EUCAST, 2019)

La resistencia a las oxazolidinonas en bacterias Gram-positivas se puede dividir en función de su mecanismo de acción y su capacidad para transmitirse a través de elementos móviles:

- Modificaciones de la diana:

- o Mutaciones del gen codificante del ARNr 23S: Se han descrito multitud de mutaciones puntuales en nucleótidos del dominio V del gen codificante del ARNr 23S que confieren resistencia a las oxazolidinonas (linezolid y tedizolid). Las primeras cepas de origen clínico con resistencia a linezolid fueron descritas en el año 1999 en EEUU. Se trataba de cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina, que presentaban mutaciones en el dominio V, concretamente la mutación que origina el cambio G2576T (numeración en referencia al gen del ARNr 23S de *Escherichia coli*). Dichas cepas se aislaron de pacientes con infecciones graves previamente tratados con linezolid (Gonzales *et al.*, 2001). El número de copias del gen ARNr 23S es variable entre diferentes bacterias (p.ej. 4 en *E. faecalis*, 5-6 en *E. faecium*, ECN y *S. aureus*) (Meka *et al.*, 2004a). Además, existe una clara correlación entre la proporción de copias mutadas (nº de copias mutadas/nº de copias totales) y la CMI frente al linezolid, en lo que se conoce como efecto de dosis génica (*gene dosage effect*). Hay que tener en cuenta que la mutación de una primera copia puede, mediante fenómenos de recombinación homóloga, incrementar el número de copias mutadas, produciendo así un aumento de la CMI frente al linezolid. Este mecanismo de resistencia está asociado

a la adaptación de las bacterias al linezolid, durante tratamientos prolongados o en instituciones o servicios hospitalarios con un alto consumo de este antimicrobiano (Long *et al.*, 2012). Cabe destacar que las mutaciones en el gen que codifica el ARNr 23S (principalmente la G2576T) constituyen el mecanismo de resistencia a linezolid más frecuente en estafilococos y enterococos (Pfaller *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2018).

- Mutaciones en genes que codifican proteínas ribosomales: Alteraciones en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22, codificadas por los genes *rplC*, *rplD* y *rplV* respectivamente, también confieren resistencia a las oxazolidinonas. Parte de dichas proteínas están posicionadas en el entorno cercano al CPT, y mutaciones en los genes que las codifican pueden producir cambios en sus secuencias de aminoácidos que interfieren en la afinidad de las oxazolidinonas por el CPT. Se han descrito multitud de mutaciones/cambios aminoacídicos asociados con la resistencia a oxazolidinonas, principalmente en cepas de estafilococos y neumococos. Sin embargo, se ha demostrado que otros cambios aminoacídicos no interfieren en la actividad de estos antimicrobianos, mientras que en otros casos su relación directa con la resistencia no ha podido ser confirmada. Esto último se debe a que las mutaciones en genes de proteínas ribosomales se hayan con frecuencia en cepas que de forma simultánea presentan otros mecanismos de resistencia a oxazolidinonas o linezolid, como mutaciones en el gen ARNr 23S o cepas portadoras del gen *cfr* (que será tratado más adelante), lo que no permite esclarecer el papel que pudieran desempeñar en la resistencia (Long *et al.*, 2012).

- Metilación del ARNr 23S: La metilación de la adenina en la posición 2503 del ARNr 23S por una metiltransferasa codificada por el gen *cfr* (*chloramphenicol-florfenicol resistance*), produce un impedimento estérico que impide al linezolid interactuar con su diana terapéutica. Dicha metilación confiere resistencia cruzada frente a cinco clases de antimicrobianos: fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramineas del grupo A, generando un fenotipo de resistencia denominado PhLOPS<sub>A</sub> (Shen *et al.*, 2013). Sin embargo, la diferente estructura molecular del tedizolid hace que este fármaco no se vea afectado por dicha metilación, manteniendo la actividad frente a las cepas *cfr*-positivas (Locke *et al.*, 2010). El gen *cfr* fue descrito como el primer mecanismo de resistencia a linezolid potencialmente

## INTRODUCCIÓN

transferible a través de elementos genéticos móviles, como transposones y plásmidos. Fue detectado por primera vez en una cepa de *Staphylococcus sciuri* de origen animal en el año 2000 y desde entonces ha sido encontrado en otras especies de ECN, así como en *S. aureus* (tanto MSSA como MRSA), enterococos y en otras bacterias tanto Gram-positivas (*Bacillus* spp., *Jeotgalicoccus* spp., *Macrococcus* spp. y *Streptococcus suis*) como Gram-negativas (*Proteus* spp. y *Escherichia* spp.) de origen animal y humano (Schwarz *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2019). Recientemente se han descrito cuatro nuevas variantes del gen *cfr*: *cfr*(B), *cfr*(C), *cfr*(D) y *cfr*(E) que han sido halladas principalmente en cepas de *C. difficile*, pero también de *E. faecium* [*cfr*(B)] y de *Campylobacter coli* [*cfr*(C)] (Stojković *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). La prevalencia del gen *cfr* en bacterias Gram-positivas es en general baja, excepto en ECN donde se han descrito valores de hasta el 20% (Pfaller *et al.*, 2017). Este hecho hace de los ECN un importante reservorio de genes de resistencia a linezolid potencialmente transferibles, lo que puede desencadenar brotes de este gen en especies más patógenas, como los ocurridos en Madrid por cepas de MRSA *cfr*-positivas (Morales *et al.*, 2010).

### - Protección del ribosoma bacteriano:

En los últimos cinco años se han descrito dos nuevos genes, *optrA* y *poxtA*, que confieren resistencia tanto al linezolid como al tedizolid y son potencialmente transferibles a través de elementos móviles (Wang *et al.*, 2015; Antonelli *et al.*, 2018). Ambos codifican proteínas pertenecientes al linaje F de la superfamilia ATP-binding cassette (ABC) y confieren resistencia a las oxazolidinonas y otros antimicrobianos mediante la protección del ribosoma bacteriano (Sharkey *et al.*, 2016). Dichas proteínas impulsan la disociación de las moléculas de antimicrobiano de su diana terapéutica, pudiendo afectar a compuestos de diferentes familias siempre que compartan sitios de unión superpuestos (p. ej. fenicoles y tetraciclinas) (Sharkey *et al.*, 2016).

○ El gen *optrA* (*oxazolidinones-phenicols-transferible resistance*) fue el primer gen transferible responsable de resistencia a tedizolid descubierto. Se describió por primera vez en el año 2015, en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen humano y animal, recolectadas entre los años 2009 y 2014 en China (Wang *et al.*, 2015). Desde entonces ha sido documentado a lo largo del mundo, principalmente en *E. faecalis*



(sobre todo en China), pero también en otras especies de enterococos (*E. faecium*, *E. gallinarum* y *Enterococcus thailandicus*), en *S. sciuri*, *Streptococcus gallolyticus* y *S. suis* (Morrone *et al.*, 2017; Deshpande *et al.*, 2018; Sassi *et al.*, 2019). Según un estudio reciente, dicho gen ha pasado a ser el principal mecanismo de sensibilidad disminuida a linezolid (CMI  $\geq 4$  mg/L) en cepas de *E. faecalis* aisladas entre los años 2014-2016, por delante de las mutaciones que afectan al ARNr 23S (Deshpande *et al.*, 2018). Por otra parte, la prevalencia del gen es mayor en aislados de origen animal que en aislados de origen humano, quizás relacionado con el uso de fenicoles en medicina veterinaria, como el florfenicol, de uso exclusivo en animales (Cai *et al.*, 2019; Elghaieb *et al.*, 2019). Por último, se han descrito diferentes variantes del gen, algunas de las cuales guardan relación con el valor de la CMI frente al linezolid (Cai *et al.*, 2019).

- El gen *poxA* (*phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance*) fue descrito inicialmente en una cepa de MRSA-*cf*r positiva en el año 2018 en Italia (Antonelli *et al.*, 2018). El gen *poxA* codifica para una proteína ABC-F que mantiene una homología del 32% con la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el gen *optrA*. Además de resistencia a oxazolidinonas dicho gen confiere resistencia a los fenicoles y a las tetraciclinas (Antonelli *et al.*, 2018). Aunque la información sobre la dispersión y prevalencia del gen es aún escasa, ya se ha descrito en cepas de *E. faecalis*, *Enterococcus hirae* y *E. faecium* (mayoritariamente), principalmente relacionadas con animales en la UE, África y China (Elghaieb *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Papagiannitsis *et al.*, 2019; Ruiz-Ripa *et al.*, 2019).

## 1.6. Métodos para la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos

En los laboratorios clínicos de microbiología, la detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos se ha llevado a cabo tradicionalmente a partir de la lectura interpretada de las pruebas de sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos o antibiogramas. Este proceso conlleva una importante demora en el tiempo, de entre 48-72 horas desde la toma de la muestra. Por esta razón, se han desarrollado numerosas técnicas para la detección rápida de los principales mecanismos de resistencia. De especial importancia son aquellas que permiten su aplicación a partir de muestra directa en infecciones invasivas (hemocultivos y líquido cefalorraquídeo), por la radical

## INTRODUCCIÓN

importancia de instaurar un tratamiento antimicrobiano efectivo en las primeras horas del síndrome infeccioso. Destacan también aquellas técnicas capaces de detectar mecanismos de resistencia potencialmente transferibles que permitan la rápida instauración de medidas de control de la infección, evitando la dispersión de los mismos y el control de brotes hospitalarios.

Dentro de estas nuevas técnicas destacan las técnicas moleculares, las inmunocromatográficas, los métodos colorimétricos y la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*), entre otras.

- Técnicas moleculares: Desde el desarrollo de la PCR en la década de 1980 son numerosos los tipos y las aplicaciones de las técnicas de detección de ácidos nucleicos. Aunque inicialmente han sido usadas en investigación, desde hace unos años se han incorporado en los laboratorios de microbiología clínica. Su aplicación para la detección de genes de resistencia aporta importantes ventajas entre las que destacan: su rapidez en generar resultados en comparación con los métodos fenotípicos, su capacidad para detectar genes de resistencia a partir de la muestra directa sin necesidad de realizar cultivos bacterianos y su excelente sensibilidad y especificidad. Por esta última razón, las técnicas moleculares son consideradas el estándar de oro (*gold standard*) en la detección de genes de resistencia. Sin embargo, las técnicas moleculares no están exentas de generar resultados falsos negativos, debido a que no son capaces de detectar nuevos genes de resistencia; y falsos positivos, debido a que pueden detectar genes de resistencia inactivos o incompletos que no se expresen y no generen resistencia fenotípica. Entre las técnicas moleculares para la detección de genes de resistencia disponibles en los laboratorios de microbiología clínica actualmente destacan: i) las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), particularmente la PCR a tiempo real (RT-PCR); ii) las técnicas de hibridación de ADN, principalmente microarrays; iii) las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS: *Next-Generation Sequencing*) (Frickmann *et al.*, 2014).

**RT-PCR:** Las técnicas más usadas son las RT-PCR cuantitativas (qPCR), que permiten la detección simultánea de múltiples patógenos y genes de resistencia. Existen numerosas qPCR capaces de detectar los principales genes de resistencia a meticilina (*mecA*, *mecC*), vancomicina (*vanA*, *vanB*), BLEE (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*) y carbapenemasas (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*), entre otros muchos. Actualmente, existen equipos capaces de realizar la extracción y amplificación en un

mismo ensayo a partir de muestra directa, con una manipulación mínima que no requiere personal experimentado y que genera resultados en un tiempo reducido (a partir de 30 minutos), mostrando una elevada sensibilidad y especificidad, cercanas al 100%. Dichos sistemas permiten realizar las pruebas a pie de cama del paciente, *point-of-care-testing* (POCT), lo que asegura una rápida toma de decisiones (Frickmann *et al.*, 2014).

**Microarrays:** Estos métodos se basan en la detección, mediante el análisis de imagen, de la hibridación de la molécula objetivo con una sonda específica fijada en una base sólida. Son capaces de detectar un gran número de genes de resistencia en un solo ensayo al incorporar numerosas sondas en un espacio reducido. Como paso previo a la hibridación, es necesario realizar una PCR con iniciadores (*primers*) universales, marcados normalmente con biotina. Actualmente existen diferentes sistemas, como Verigen para la detección de genes de resistencia a partir de hemocultivos positivos. Estas técnicas presentan excelentes valores de sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, aportan resultados en unas 2,5-4 horas pero aún presentan un elevado coste (Ledeboer *et al.*, 2015; Opota *et al.*, 2015a).

**NGS:** Las técnicas de secuenciación de nueva generación permiten llevar a cabo la secuenciación del genoma completo de una bacteria en apenas unas horas. A través de un análisis bioinformático se puede identificar la presencia de genes de resistencia en los genomas secuenciados, por comparación con los genes disponibles en bases de datos. Aunque las aplicaciones de estas nuevas tecnologías son múltiples, la implantación de las mismas en la rutina de trabajo de un laboratorio de microbiología clínica es a día de hoy limitada debido a su alto coste (Frickmann *et al.*, 2014).

- Técnicas inmunocromatográficas: Son capaces de detectar enzimas bacterianas que hidrolizan antimicrobianos, como las BLEE y las carbapenemasas, o la presencia de dianas modificadas como las PBP2a para la detección de MRSA. Aunque inicialmente se diseñaron para ser realizadas sobre cepas bacterianas aisladas en cultivo, algunas de ellas han mostrado buenos resultados de sensibilidad y especificidad al hacerse directamente sobre hemocultivos positivos. Estas técnicas proporcionan resultados en aproximadamente 20 minutos, no requieren instrumentalización ni personal altamente especializado y además presentan un precio reducido (Fernández *et al.*, 2016a; Glupczynski *et al.*, 2016; March-Rosselló, 2017; Girlich *et al.*, 2018).

## INTRODUCCIÓN

- Métodos colorimétricos: Recientemente se han desarrollado varios test colorimétricos capaces de detectar diferentes mecanismos de resistencia basados en la detección de cambio del pH del medio mediante el cambio de color de un indicador tras la hidrólisis de un antibiótico. Existen en la actualidad varios “kits” capaces de detectar bacterias productoras de BLEE (ESBL NDP test y beta-lacta test) y carbapenemasas (CARBA NP test). Éstos se basan en la incubación previa de una suspensión bacteriana junto al antimicrobiano (cefalosporina o carbapenémico); si la bacteria posee la enzima, hidrolizará el antimicrobiano produciendo un cambio del pH del medio que hará virar el color del indicador. Estos métodos arrojan resultados en aproximadamente dos horas y presentan valores de sensibilidad y especificidad cercanos al 100% (Nordmann *et al.*, 2012a, 2012b; Renvoise *et al.*, 2013; Dortet *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2016).

- Espectrometría de masas MALDI-TOF: La espectrometría de masas es capaz de detectar mecanismos de resistencias principalmente a través de tres vías: i) detección de modificaciones del antimicrobiano por enzimas bacterianas; ii) detección de mecanismos de resistencia por el análisis del patrón de picos o masa de la bacteria; iii) detección de mecanismos de resistencia por medición semi-cuantitativa del crecimiento bacteriano en presencia del antimicrobiano. Mediante estos métodos se ha demostrado la capacidad de MALDI-TOF para la detección de: beta-lactamasas (incluidas BLEE, AmpC y carbapenemasas), resistencia a fluoroquinolonas mediada por la enzima AAC(6′)-Ib-cr, enzimas modificantes de aminoglicósidos, cepas de MRSA y resistencia a polimixinas. Los diferentes métodos de detección de mecanismos de resistencia mediante MALDI-TOF presentan ventajas y desventajas, alcanzando algunos de ellos sensibilidades y especificidades cercanas al 100%, en un tiempo de entre 30 minutos y tres horas y a un coste reducido (Oviaño *et al.*, 2019).

## **2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**



La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un grave problema de salud pública con dimensión global. En los últimos años, hemos asistido a un incremento alarmante de bacterias multirresistentes, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, con diferentes mecanismos de resistencia. Estos mecanismos están con frecuencia codificados por genes insertados en distintos elementos potencialmente móviles como plásmidos, transposones o integrones/casetes génicas, que facilitan su rápida dispersión entre miembros de la misma o diferentes especies bacterianas. Como agravante, la incorporación de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana a la práctica clínica en las últimas décadas ha sido escasa, por lo que en muchos casos las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes son muy limitadas.

Debido a la situación anteriormente comentada, en la actualidad nos encontramos con varios patógenos multirresistentes para los cuales la investigación y desarrollo de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana frente a ellos es crítica. Además, hemos de optimizar y reservar mediante los PROA (PRogramas de Optimización del uso de los Antimicrobianos) aquellos antimicrobianos de última línea, pues con frecuencia son las últimas alternativas terapéuticas frente a estas bacterias multirresistentes.

En este contexto, el objetivo principal de la tesis doctoral es el estudio epidemiológico de bacterias resistentes a antimicrobianos de última línea o con escasas alternativas terapéuticas, así como la investigación de sus mecanismos de resistencia en aislados procedentes de dos hospitales del norte de España: el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y el Hospital El Bierzo (HEB). Se pretende que el conocimiento generado ayude a disminuir la prevalencia y dispersión de estas bacterias en ambos entornos hospitalarios, disminuyendo así sus tasas de infección nosocomial y ayudando al control de brotes nosocomiales, para preservar la efectividad de los antimicrobianos de última línea.

En base a lo expuesto, el desarrollo de esta tesis doctoral se ha dirigido a la consecución de los siguientes objetivos:

**Objetivo 1.** Estudio de aislados de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos procedentes de muestras clínicas y de vigilancia epidemiológica recuperados en el HUCA durante el periodo Marzo-Septiembre de 2017.

## PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

**Objetivo 2.** Estudio de aislados de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina, recuperados de muestras clínicas y de vigilancia epidemiológica en el HEB durante el año 2018.

**Objetivo 3.** Estudio de la resistencia a oxazolidinonas en cocos Gram-positivos procedentes de muestras clínicas del HUCA y el HEB. Las bacterias investigadas en los diferentes sub-apartados de este objetivo 3 fueron las siguientes:

**3.1.** Aislados de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a linezolid procedentes de muestras de líquido cefalorraquídeo recuperados en el HUCA durante el periodo 2013-2016.

**3.2.** Aislados de *S. epidermidis* resistentes a linezolid procedentes de muestras clínicas recuperadas en el HUCA entre 2011-2017.

**3.3.** Aislados de enterococos con CMI  $\geq 4$  para linezolid procedentes de muestras clínicas recuperadas en el HEB entre Febrero y Diciembre de 2018.

En los tres objetivos anteriores, una vez seleccionados los aislados en base a pruebas fenotípicas, se estableció el fondo genético de la resistencia y se llevó a cabo la tipificación molecular, utilizando para ello técnicas moleculares (objetivos 1, 2, 3.1 y 3.2) o secuenciación genómica (objetivo 3.3).

**Objetivo 4.** Evaluación de nuevos métodos y algoritmos para la detección precoz de mecanismos de resistencia de especial importancia o de bacterias procedentes de muestras invasivas:

**4.1.** Evaluación de un nuevo microarray para la identificación y detección de genes de resistencia bacterianos a partir de hemocultivos positivos.

**4.2.** Evaluación de un nuevo algoritmo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas.



### **3. RESULTADOS**



# Objetivo 1: Artículo 1

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases  
<https://doi.org/10.1007/s10096-020-04009-0>

BRIEF REPORT



## Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *armA* in a hospital after an intervention in the intensive care unit which ended a long-standing endemicity

Carlos Rodríguez-Lucas<sup>1,2,3</sup> · M. Rosario Rodicio<sup>2,3</sup> · Xenia Vázquez<sup>2,3</sup> · Dolores Escudero<sup>3,4</sup> · Brígida Quindós<sup>4</sup> · Miguel Alaguero<sup>5</sup> · Javier Fernández<sup>3,6</sup>

Received: 23 May 2020 / Accepted: 11 August 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

The aim of the study was to evaluate for a long time the effectiveness of an intervention designed to reduce carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) and its impact on colistin usage in the ICU of a tertiary hospital in Spain. The rate of carbapenem resistance declined drastically during the period of study (2015 to 2018), from 93.57 to 74.65%, especially in the ICU. A significant decrease in colistin usage, from 1.16 to 0.39 DOTs, was observed. Forty-nine CRAB isolates recovered nearly 1 year after starting the intervention were characterized. Most of them were recovered from patients admitted in wards other than ICU and were extensively drug-resistant, carried *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *armA*, and belonged to ST218. Implementation of control measures is crucial to CRAB control in ICUs but must be extended to all wards in order to eradicate CRAB from hospitals.

**Keywords** *Acinetobacter baumannii* · Carbapenemase · OXA-23 · *armA* · Intensive care unit

### Introduction

*Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen responsible for nosocomial outbreaks worldwide, especially in intensive care units (ICUs) where its eradication is very difficult. Intrinsic antimicrobial resistance and capability to acquire new resistance determinants, together with persistence in the

environment for long periods of time, make *A. baumannii* one of the most important nosocomial pathogens which poses a significant threat to patients and healthcare systems [1–5]. Although carbapenems have long been the first-line treatment of multi-drug-resistant (MDR) *A. baumannii* infections, in the last decade, the rate of resistance to these drugs has been increasing worldwide [2–8]. Colistin, used either alone or in combination with other antimicrobials, is often currently the only remaining option for the treatment of infections caused by extensively drug-resistant (XDR) *A. baumannii* [9, 10].

The Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) is a tertiary hospital in northern Spain with about 1110 beds. The ICU ward of this institution suffered an endemic situation due to carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB), which lasted for almost 18 years. Fortunately, an intervention effort, which started in April 2016 in the ICU, redirected this worrisome situation [11]. In the present study, the effectiveness of the intervention and its impact on colistin usage were evaluated for a long time, not only in the ICU but also in other hospital wards. Molecular characterization of CRAB isolates recovered after the intervention was also performed, to identify the clones which are circulating at the hospital and the carriage of relevant resistance traits.

✉ Javier Fernández  
 javifdom@gmail.com

<sup>1</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes, 33394 Gijón, Asturias, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Grupo de Microbiología Traslacional, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Asturias, Spain

<sup>4</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Asturias, Spain

<sup>5</sup> Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Asturias, Spain

<sup>6</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain

**Material and methods**

The number of CRAB and carbapenem-susceptible *A. baumannii* (CSAB) isolates recovered between 2015 and 2018 from inpatients of the HUCA was retrospectively determined. Data on colistin utilization along the same period was also obtained and expressed as days of therapy (DOT) per 100 patient-days of bed occupancy.

Forty-nine consecutive CRAB isolates obtained from clinical samples or active surveillance cultures, recovered from different patients during a 9-month period (March–November 2017), were selected for molecular analysis. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed by the MicroScan System (MicroScan; Beckman Coulter, CA, USA). Identification was confirmed by MALDI-TOF MS (Microflex™; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Minimal inhibitory concentrations of colistin were determined using broth microdilution [12]. Identification of carbapenemase-encoding genes was achieved with the Antimicrobial Resistance Direct Flow Chip (Master Diagnóstica, Granada, Spain). Screening of the *armA* gene was accomplished in all isolates by PCR as previously described [10]. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Apal* and MLST (using Oxford scheme) were performed as reported [13, 14]. Similarity between *Apal* profiles was evaluated by the Sorensen’s coefficient ( $\mathcal{S}$ ), and cluster analysis was achieved by the unweighted pair-group method with arithmetic averages using the Multivariate Statistical Package for PCs (RockWare Inc., Golden, CO).

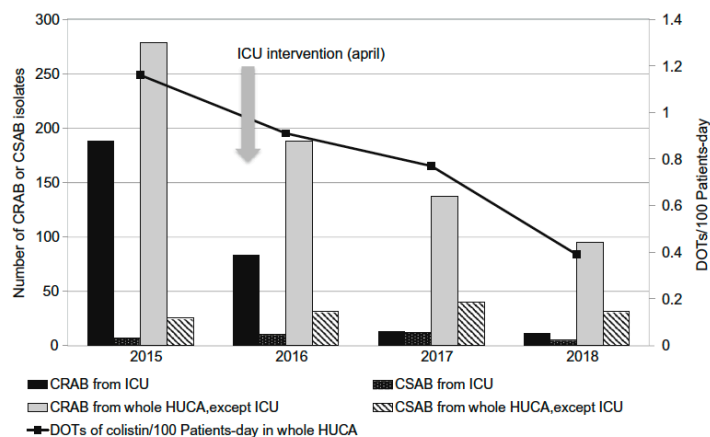
**Results and discussion**

During the 2015–2018 period, a total of 1154 *A. baumannii* were isolated, with 993 of them (86.05%) being carbapenem-

resistant; a high rate matching with that previously reported in Spain [8]. However, from the beginning to the end of this period, the number of CRAB isolates in this species decreased drastically in our hospital, from 93.57 to 74.65%, especially in the ICU (96.41 to 68.75%) but also in other wards (91.75 to 75.40%) (Fig. 1). This reduction was a consequence of the intervention effort carried out in April 2016 in the ICU ward, which ended the high prevalence of CRAB maintained for almost 18 years [11]. The intervention was mainly based on the implantation of deep room cleaning (including up to twelve terminal decontamination of a room after a colonized/infected patient was discharged and punctual decontamination with hydrogen peroxide), along with the standard measures of infection control (active surveillance of patients carriage, isolation of colonized/infected patients, hand hygiene, and educational programs) [11]. Our results show that the implemented measures, which were maintained throughout the study period and continued to date, have been effective. This was particularly true in the case of the ICU, where no more outbreaks have occurred, since all CRAB isolates recovered after the intervention belonged to patients infected or colonized before admission in this ward. A similar niche change was previously reported by Villar et al. [15] who documented a decrease of CRAB incidence in ICUs but also a rise in other hospital wards. Thus, efforts in infection control measures in ICUs are probably not useful to eradicate CRAB from hospitals, if such measures are not extended to the rest of the wards. Interestingly, the drastic reduction in the number of CRAB observed in our hospital was followed by a significant decrease in colistin usage, from 1.16 to 0.39 DOTs (Fig. 1), as was previously reported in other scenarios [16].

The 49 isolates characterized in detail were recovered from patients admitted in 13 different hospital wards, including ICU, from March to November of 2017, nearly 1 year after starting the intervention (April 2016). All but a single isolate were XDR

**Fig. 1** Comparison of the number of carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* isolates (CRAB and CSAB, respectively), and correlation with the days of therapy (DOT) of colistin per 100 patient-days of bed occupancy both in the ICU and other wards of the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Spain, from 2015 to 2018



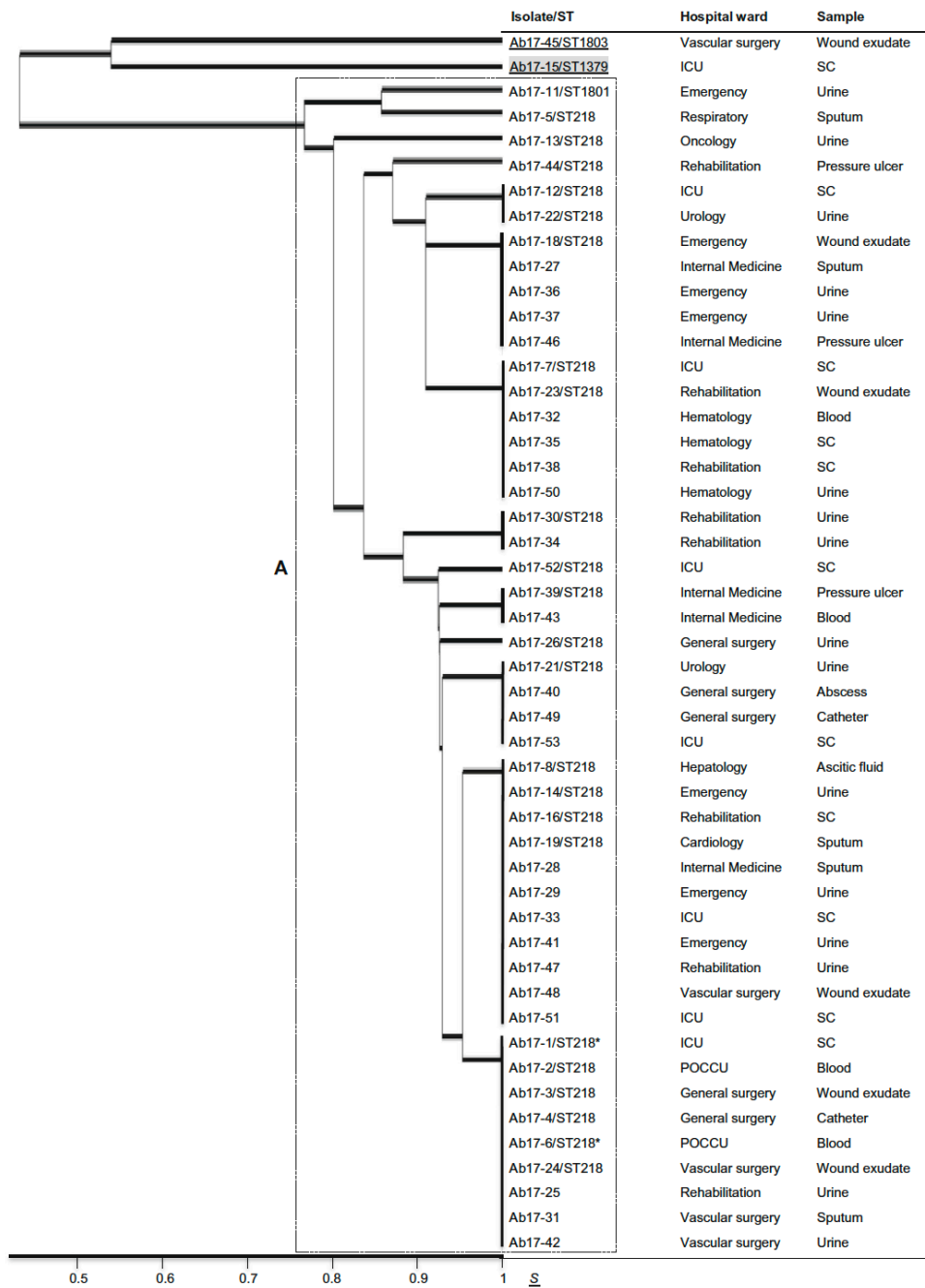


Fig. 2 Dendrogram of similarity showing the relatedness between the *Apal* pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the study. Their origin, with regard to hospital ward and sample, is shown to the right. The main cluster A is enclosed inside a dotted square. All but one of the isolates were positive for the intrinsic *bla*<sub>OXA-51-like</sub> and the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> carbapenemase-encoding genes. The remaining one (shaded) was only

resistant to carbapenems and harbored the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> and *bla*<sub>OXA-24-like</sub> genes. All isolates except two isolates (underlined) were positive for the *armA* gene. Two strains isolated from different samples of the same patient, with a difference in the time of more than 4 weeks, are marked with an asterisk. ICU, intensive care unit; POCCU, post operative critical care unit; SC, surveillance culture;  $\underline{S}$ , Sorensen's coefficient of similarity



(48/49) being only susceptible to colistin (48/48; 100%) or ceftazidime (7/48; 14.58%). All XDR isolates were positive for the intrinsic *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene and also for the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> carbapenemase-encoding gene, while the remaining isolate, which was only resistant to carbapenems, harbored the *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes. Carbapenem resistance can increase the risk of mortality in patients with *A. baumannii* infections [17]. This is probably due to the fact that patients infected by XDR CRAB have limited therapeutic alternatives (mainly colistin plus aminoglycoside or tigecycline) and are more likely to receive inappropriate empirical antimicrobial treatment [15, 17]. Although neither of our isolates was resistant to colistin, the XDR isolates were resistant to all the aminoglycosides tested including amikacin, being all but one positive for the 16S rRNA methylase gene *armA* (Fig. 2). This is the second description of this gene among *A. baumannii* in Spain. Interestingly, the only previous report of *armA* occurred in a hospital of a nearby region and was detected in an *A. baumannii* OXA-23-producing isolate [2].

Typing of the 49 isolates by PFGE yielded 16 different profiles. At  $S > 0.75$ , all except two isolates grouped in a single cluster (cluster A) as shown in Fig. 2. All the isolates tested from this cluster were ST218, except one which was ST1801, a single locus variant of ST218. The remaining two isolates belonged to ST1379 and to ST1803, with ST1801 and ST1803 being here described for the first time.

ST218 of the Oxford scheme is comprised within the ST2 clone of the Pasteur scheme, which belongs to clonal complex CC92/CC2, which is regarded as International Clone (IC) II [18]. ICH CRAB isolates were involved in the majority of outbreaks reported worldwide [8, 18], and ST2 (Pasteur scheme) was the most frequent clone over the last two decades in Spain [19, 20]. In Mediterranean regions, over the last two decades, OXA-23-producing *A. baumannii* isolates, mainly belonging to ICII, progressively replaced previously predominant isolates carrying other *bla*<sub>OXA</sub>-type genes [3, 21]. In Spain, CRAB isolates have been mostly associated with OXA-24/40 and OXA-58 at least since 1997 until 2010, when the first OXA-23-producing *A. baumannii* was detected [4, 19, 20, 22]. Thereafter, a limited number of studies reported OXA-23-producing *A. baumannii* isolates, generally related to ICU outbreaks caused by several clones [2–4, 23]. Recently, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub> were reported as the most prevalent carbapenemase genes detected among CRAB isolates in a hospital in Madrid, while only 11.86% (7/59) of the isolates carried *bla*<sub>OXA-23</sub> [8]. This information, together with the results of the present study, in which *bla*<sub>OXA-23</sub> was clearly predominant, reflects regional differences in the epidemiology of CRAB in Spain. The single OXA-24-producing CRAB from our hospital is an example of interregional spread. This isolate was recovered from a patient who had been living in Madrid and had been attended at a hospital in this city 2 months before admission to our institution.

In conclusion, herein we present the first description of *A. baumannii* ST218 carrying *bla*<sub>OXA-23-like</sub> gene in Spain, and the second report of this bacterium carrying the *armA* and *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes in our country. Our results show once again the spread and establishment of the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> gene in *A. baumannii* clones with XDR profiles, suggesting a switch in the mechanism of carbapenem resistance in Spain, such as it has occurred before in other European countries, although this replacement could have different prevalence depending on the region. Worldwide dissemination of CRAB clones carrying *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes and expressing XDR profiles is a cause of concern, mainly when also carrying other antimicrobial resistance genes transferable by plasmids, like *armA* or *mcr* genes, which could limit ever more the options for antimicrobial treatment [24]. Implementation of deep infection control measures and molecular studies of the isolates are crucial to CRAB eradication in ICUs and can contribute to decreasing the colistin usage, but these measures must be extended to the rest of the wards to eradicate CRAB from hospitals.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

1. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 5:939–951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
2. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J et al (2014) Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. Microb Drug Resist 20:259–263. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0127>
3. Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Álvarez-Lerma F et al (2013) Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing. Antimicrob Agents Chemother 57:5155–5157. <https://doi.org/10.1128/AAC.01486-13>
4. Espinal P, Macià MD, Roca I, Gato E, Ruiz E, Fernández-Cuenca F et al (2013) First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to Tn2006 in Spain. Antimicrob Agents Chemother 57:589–591. <https://doi.org/10.1128/AAC.01157-12>
5. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J et al (2017) High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. J Antimicrob Chemother 72:3277–3282. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx322>
6. Gavaldà L, Soriano AM, Cámara J, Gasull R, Arch O, Shaw E et al (2016) Control of endemic extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with a cohorting policy and cleaning procedures based on the 1 room, 1 wipe approach. Am J Infect Control 44:520–524. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.036>
7. Thattrimontrichai A, Pannaraj PS, Janjindamai W, Dissaneevate S, Maneenil G, Apisamthanarak A (2020) Intervention to reduce

- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*:1–6. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.35>
8. Dahdouh E, Gómez-Gil R, Pacho S, Mingorance J, Daoud Z, Suárez M (2017) Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. *PLoS One* 12:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176824>
  9. Ruiz M, Marti S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Vila J (2007) High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 13:1192–1198. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01825.x>
  10. Lowe M, Ehlers MM, Ismail F, Peirano G, Becker PJ, Pitout JDD et al (2018) *Acinetobacter baumannii*: epidemiological and beta-lactamase data from two tertiary academic hospitals in Tshwane, South Africa. *Front Microbiol* 9:1–9
  11. Escudero D, Cofiño L, Forcelledo L, Quindós B, Calleja C, Martín L (2017) Control of an *Acinetobacter baumannii* multidrug resistance endemic in the ICU. Recalling the obvious. *Med Intensiva* 41:497–499
  12. EUCAST (2016) Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group
  13. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Van Der Reijden T, Van Strijen B, Stefanik D et al (2005) Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43:4328–4335. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328>
  14. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Domínguez MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F (2005) Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43:4382–4390. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382>
  15. Villar M, Cano M, Gato E, Garnacho-Montero J, Cisneros J, Alegría C et al (2014) Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. *Medicine (Baltimore)* 93:202–210. <https://doi.org/10.1097/MD.000000000000036>
  16. López-Lozano JM, Lawes T, Nebot C, Beyaert A, Bertrand X, Hocquet D et al (2019) A nonlinear time-series analysis approach to identify thresholds in associations between population antibiotic use and rates of resistance. *Nat Microbiol* 4:1160–1172. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0410-0>
  17. Lemos E, de la Hoz F, Einarson T, McGhan W, Quevedo E, Castañeda C et al (2014) Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 20:416–423. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12363>
  18. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H (2016) Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. *PLoS One* 11:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153014>
  19. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA (2011) Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 49:875–882. <https://doi.org/10.1128/JCM.01026-10>
  20. Villalón P, Valdezate S, Cabezas T, Garrido N, Vindel A, Medina-pascual MJ et al (2015) Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol* 15:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0383-y>
  21. Grosso F, Quinteira S, Peixe L (2011) Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin Microbiol Infect* 17:1275–1279. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03469.x>
  22. Villalón P, Sáez-Nieto JA, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Valdezate S (2019) Dynamics of a sporadic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex population. *Front Microbiol* 10:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00593>
  23. Guerrero-Lozano I, Fernández-Cuenca F, Galán-Sánchez F, Egea P, Rodríguez-Iglesias M, Pascual Á (2015) Description of the OXA-23  $\beta$ -lactamase gene located within Tn2007 in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *Microb Drug Resist* 21:215–217. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0155>
  24. Palmieri M, D'Andrea MM, Pelegrin AC, Perrot N, Mirande C, Blanc B et al (2020) Abundance of colistin-resistant, OXA-23- and ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* belonging to international clone 2 in Greece. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00668>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## RESULTADOS



## **Objetivo 2: Artículo 2**

### **Establishment and persistence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium***

#### **ST80 clone within a healthcare setting located in a low prevalence area**

Carlos RODRÍGUEZ-LUCAS<sup>1,2,3</sup>, Javier FERNÁNDEZ<sup>3,4</sup>, Carmen RAYA<sup>5</sup>, Alberto BAHAMONDE<sup>6</sup>, Antonio QUIROGA<sup>7</sup>, Rosario MUÑOZ<sup>8</sup>, M. Rosario RODICIO<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>*Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes*

<sup>2</sup>*Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo*

<sup>3</sup>*Grupo de Microbiología Traslacional, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias*

<sup>4</sup>*Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias*

<sup>5</sup>*Unidad de Microbiología, Hospital El Bierzo*

<sup>6</sup>*Servicio de Medicina Interna, Hospital El Bierzo*

<sup>7</sup>*Servicio de Medicina Preventiva, Hospital El Bierzo*

<sup>8</sup>*Unidad de Enfermería Servicio de Medicina Interna, Hospital El Bierzo*

**Keywords:** *Enterococcus faecium*; vancomycin-resistant; VRE; ST80; *vanA*.

#### **Abstract**

**Introduction:** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) are one of the most important nosocomial pathogens with limited therapeutic alternatives. Although in Spain VREfm are uncommon, sporadic outbreaks have been reported.

**Aim:** To follow the trends of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* and *E. faecium*-producing bloodstream infections (BSIs) in a Spanish hospital.

**Material:** The trend of VREfm isolates recovered from 2011 to 2019 in Hospital El Bierzo (Spain), as well as the number of BSIs they caused were assessed. VREfm isolates recovered in 2018 were characterized.

**Results:** During the study period, 757 *E. faecium* were isolated, with 115 (13.7%) of them being vancomycin-resistant. Sixteen out of 90 BSIs (17.8%) caused by *E. faecium* were due to VREfm isolates. The number of BSI-producing *E. faecium* and the percentage of vancomycin-resistance in these invasive isolates, increased significantly in the last four years, being the later substantially higher in our hospital than the average values in Europe and especially in Spain. The 28 isolates from 2018 proved to be positive for *vanA*. Most of them (26) were assigned to ST80 while the remaining two were ST117, both belonging to the hospital-adapted CC17. The isolates studied were only susceptible to linezolid (100%) and susceptible-dose dependent to daptomycin (78,57%).

**Conclusion:** We report for the first time the establishment and persistence of the VREfm ST80 clone in a Spanish hospital. The spread of VREfm is a cause of concern, since the establishment of hospital-adapted multidrug resistant clones in healthcare settings may precede an increment in BSIs caused by them.

## Introduction

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are one of the most important nosocomial pathogens because of their ability to spread, colonize and become established in hospital settings for long periods of time. The scarcity of effective antimicrobial agents further complicates the management of infections caused by VRE [1]. Vancomycin resistance in enterococci is mainly mediated by the *vanA* and *vanB* genes, which are principally associated with *Enterococcus faecium* [1]. Most of the vancomycin-resistant *E. faecium* (VREfm) causing human infections belong to the hospital-adapted clonal complex 17 (CC17). This lineage is characterized by ampicillin and quinolones resistance, and often contains the *esp* gene which is involved in colonization and biofilm formation [1,2]. The prevalence of VREfm varies widely between continents and countries. In USA, more than 80% of the *E. faecium* isolates are vancomycin-resistant with more than 60% of the bloodstream infections (BSIs) caused by VREfm [3,4]. In European countries, the mean percentage of vancomycin-resistance in *E. faecium* isolates producing BSIs is lower (18.3% in 2019). However, a worrisome rising trend has been observed during the last years, and significant differences were found depending on the country, with national percentages ranging from 0.0% up to 50,0% [5]. In Spain, the rate of invasive VREfm isolates remains low, with values below 3% since 2011 [5,6]. Moreover, sporadic hospital outbreaks caused by both *vanA* [7–10], and also *vanB* VREfm isolates [2,11,12], have been reported. All of these isolates belonged to the CC17 lineage and to sequence type (ST) 17, ST18 or ST192. VREfm have a high capacity to massively colonize healthy carriers and patients in hospital settings, with a ratio of 2-10 patients colonized per infected patient [1]. Although enterococci usually display low levels of virulence, their capacity to cause severe infections, such as BSIs, increase in vulnerable patients like

those immunocompromised, undergoing invasive procedures (e.g. by urinary or blood catheters), or receiving previous multiple antimicrobials [13]. BSIs caused by VRE are associated with higher mortality, extended duration of BSI and longer hospital stay, as well as with a higher cost associated, compared to BSIs caused by vancomycin-susceptible enterococci [14]. Taken all this in consideration, the aims of the present study were i) to follow the trends of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* recovered in a Spanish hospital from 2011 to 2019; ii) to determine the number of bloodstream infections caused by vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *E. faecium* during the same study period; and iii) to characterize all vancomycin-resistant *E. faecium* isolates recovered during 2018. The study was addressed after noticing a remarkable increment in the number of BSIs produced by this resistant pathogen over the last two years.

## Material and methods

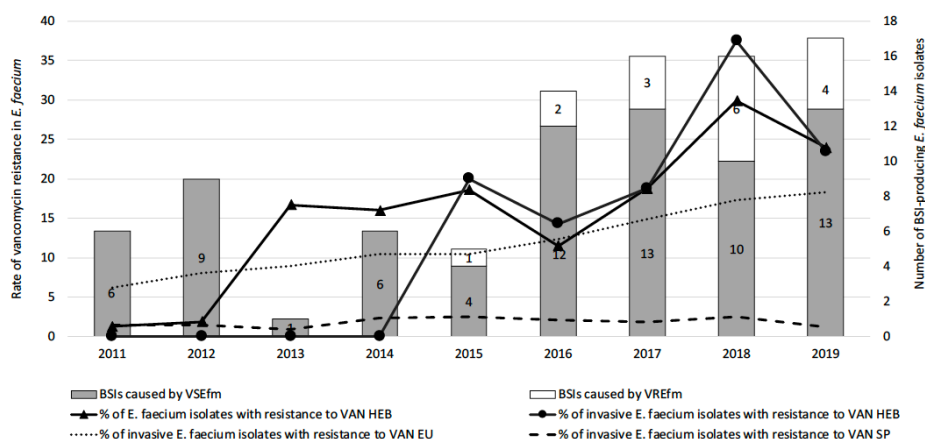
The number of *E. faecium* isolates recovered between 2011 and 2019 (including those producing BSI) in a Spanish hospital, “Hospital El Bierzo”, and the rate of vancomycin resistance were retrospectively determined using the Microbiology Laboratory records. Only non-duplicate isolates collected from clinical samples were included. Identification and antimicrobial susceptibility testing were performed by the MicroScan System (MicroScan; Beckman Coulter, CA, USA) and interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines [15] or to the Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints, for those antibiotics without breakpoint in the former (e.g. daptomycin) [16]. All VREfm isolates obtained from clinical samples during 2018 (25; with a single isolate per patient), were selected for molecular analysis. Three additional isolates recovered from

surveillance cultures of patients who also had VREfm in clinical samples, were also analyzed. For all of them, screening of vancomycin resistance genes (*vanA* and *vanB*) was accomplished by PCR, and MultiLocus Sequence Typing (MLST) was performed, both as previously reported [17–19].

### Results and discussion

During the study period, 757 *E. faecium* were isolated, with 115 (13.7%) of them being vancomycin-resistant. Furthermore, 16 (17.8%) out of 90 BSIs caused by *E. faecium* were due to VREfm isolates. The number of BSIs caused by vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant isolates each year, and the rate of vancomycin resistance in isolates recovered from all clinical samples and only from blood cultures, are represented in Figure 1.

It can be observed that the number of BSIs due to *E. faecium* increased significantly in the last four years, in line with the increment of enterococci as causal agent of healthcare-associated infections (HCAI). In fact, enterococci are currently the second and third most common cause of HCAI in USA and Europe, respectively [14]. It is also of note that, together with the increment in the number of BSIs, the rate of vancomycin resistance in the invasive isolates has also increased over the last four years. VREfm has caused infections in our institution at least since 2011, although the percentage of vancomycin-resistance was low until 2013, when it experienced a drastic increase (from 1.3% and 1.9% in 2011 and 2012, respectively, up to 16.7% in 2013). Similar high values were maintained along the following years, with a new substantial increment occurring in 2018 (29.9%) (Figure 1).



**Figure 1**

Number of bloodstream infections produced by vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *E. faecium*, and prevalence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* isolates recovered from clinical samples in the Hospital El Bierzo (HEB) during the 2011-2019 period. The rate of vancomycin resistance in *E. faecium* invasive isolates in the HEB was compared with the average percentage of vancomycin-resistant in *E. faecium* isolates causing BSIs reported by the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) for the European Union (EU) and Spain (SP).

BSI: Blood stream infection; VAN: Vancomycin; VSEfm: vancomycin-susceptible *E. faecium*; VREfm: vancomycin-resistant *E. faecium*. HEB: Hospital El Bierzo; EU: European Unit; SP: Spain.

**Table 1.** Microbiological and molecular features and MultiLocus Sequence typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered in 2018 in Hospital El Bierzo.

Isolate	MLST	Date of isolation	Unit	Ward	Sample	Antimicrobial susceptibility (MIC (mg/L) / Interpretation)									
						AMP	CIP	LXV	HLGR	Synercid	TET	LZD	DAP	TEC	VAN
VRE-2	ST80	02/02/18	2D	Medical	Blood	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	2/SDD	>16R	
VRE-3	ST117	21/02/18	2C	Surgery	Wound exudate	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	<=1S	2/S	2/SDD	>16R	
VRE-4*	ST80	28/02/18	3B	Surgery	Wound exudate	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	>4R	>16R	
VRE-6	ST80	13/03/18	1A	Medical	Wound exudate	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-8	ST80	19/03/18	2B	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	>500R	1/S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-9	ST80	06/04/18	AEC	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-10	ST80	09/04/18	1A	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-11*	ST80	12/04/18	ICU	ICU	SC	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	2/S	>4R	>16R	
VRE-15	ST80	21/06/18	PCC	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	<=1S	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-16	ST80	29/06/18	1B	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-17**	ST80	28/06/18	3B	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	<=1S	<=1S	>4R	>16R	
VRE-19**	ST80	10/07/18	1B	Medical	SC	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	<=1S	<=1S	>4R	>16R	
VRE-21	ST80	17/07/18	2A	Surgery	Urine	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-25	ST80	03/09/18	2C	Surgery	Wound exudate	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-26	ST80	04/09/18	3B	Surgery	Abscess	>8R	>2R	>4R	>500R	>2R	<=1S	2/S	2/SDD	>16R	
VRE-27***	ST80	12/09/18	1B	Medical	SC	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-28	ST80	24/09/18	3A	Medical	Blood	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-29	ST80	02/10/18	Emergency	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-30	ST80	02/10/18	1A	Medical	Blood	>8R	>2R	>4R	<=500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-31***	ST80	08/10/18	1B	Medical	Blood	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-32	ST80	10/10/18	1A	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	2/S	4/SDD	>16R	
VRE-33	ST80	22/10/18	1B	Medical	Urine	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-36	ST80	24/10/18	3A	Surgery	Bile	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-38	ST80	30/10/18	2C	Surgery	Drainage	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	2/S	>4R	>16R	
VRE-40	ST80	12/11/18	2C	Surgery	Drainage	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	2/S	>4R	>16R	
VRE-45	ST80	23/11/18	3A	Medical	Blood	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-47	ST80	11/12/18	2C	Surgery	Abscess	>8R	>2R	>4R	>500R	<=0.5S	>8R	<=1S	4/SDD	>16R	
VRE-50	ST117	26/12/18	3A	Medical	Blood	>8R	>2R	>4R	<=500S	<=0.5S	<=1S	<=1S	4/SDD	>16R	

MLST: Multi-locus sequence typing; AEC: Anesthesia external consult; ICU: Intensive care unit; PCC: Primary care center; SC: Surveillance culture; AMP: Ampicillin; CIP: Ciprofloxacin; LVX: Levofloxacin; HLGR: High-level gentamicin resistance; TET: Tetracycline; LZD: Linezolid; DAP: Daptomycin; TEC: Teicoplanin; VAN: Vancomycin; R: Resistant; S: Susceptible; SDD: Susceptible-dose dependent.

\*, \*\*, \*\*\*: Isolates with the same number of asterisks belonged to the same patient.



Our data on invasive VREfm were compared with the mean percentage of vancomycin-resistance reported by the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) for *E. faecium* isolates causing BSIs in the European Union and Spain. As shown in Figure 1, the rate in the last four years was substantially higher in our hospital than the average value in Europe and especially in Spain. Because of the low number of BSIs caused by *E. faecium* in our institution, these rates must be considered with caution. However, in the last reports of the EARS-Net corresponding to 2018 and 2019, Spain notified only 19 and nine VREfm invasive isolates, respectively, with six and four (31,6% and 44,5%) of them recovered from patients in our institution [5,6]. Thereby, although the number of invasive VREfm isolates in Hospital El Bierzo is low, it has a very high weight in the national percentage.

Twenty-eight VREfm isolates recovered from clinical samples (25) and surveillance cultures (3) during 2018 were selected for further characterization. The microbiological and molecular features of these isolates are shown in Table 1. All but two of the clinical isolates (92%) were obtained from hospitalized patients admitted to nine different hospital wards, either in medical (14/23; 60.87%) or surgery wards (9/23; 39.13%). The isolates were recovered from urines (10/25; 40%), blood cultures (6/25; 24%), wound exudates (4/25; 16%) and other intra-abdominal samples (5/25; 20%).

The 28 isolates from 2018 were resistant to ampicillin and quinolones, displayed high level resistance to vancomycin and teicoplanin, and proved to be positive for the *vanA* gene; 22 (78.57%) out of the 28 were susceptible-dose dependent to daptomycin, and 6 (21.43%) were resistant to this last-resort antimicrobial (Table 1). However, the 28 isolates (100%) were susceptible to linezolid.

Regarding MLST, most of the 2018 isolates (26/28, 92.86%) were assigned to ST80, with the remaining two being ST117,

a single locus variant of ST80 (Table 1). Both, ST80 and ST117 belong to CC17, a hospital-adapted lineage responsible for severe nosocomial infections and hospital outbreaks worldwide, including Spain [13]. VREfm isolates pertaining to ST80 and ST117 are the most frequent clones in several European countries, like Belgium, Germany, Netherlands, Norway and Poland [20–22]. As aforementioned, the percentage of VREfm in Spain remains low, although sporadic hospital outbreaks caused by isolates pertaining to CC17, mainly to ST17 and ST18, have been reported [7–10]. A previous study showed that BSIs caused by *E. faecium* in our country were mainly due to ampicillin-resistant, vancomycin-susceptible *E. faecium* isolates, with ST17 or ST18, at least from 1995 to 2006, when an increment of ST117 and ST80 isolates was observed [23]. However, as far as we know, this is the first report of an endemic situation caused by VREfm ST80 isolates in Spain.

Enterococci have a high colonization potential, but only causes BSI in vulnerable patients [1]. Thus, an increment in non-invasive infections and/or in patients colonized by VREfm could lead to an increase in VREfm BSIs, as shown by our results (Figure 1). Several kinds of interventions aimed to reduce the prevalence of VREfm in healthcare institutions have been reported, with not always encouraging results on eradication, decrease in prevalence of resistance, and cost/effectiveness [14]. However, implementation of aggressive infection control measures could lead to a decrease in the number of VREfm, and consequently in the number of infections, including BSIs [1]. In this line, we carried out an intervention in our institution, in order to reduce the worrisome trend of BSIs caused by VREfm. This intervention was implemented sequentially since February 2019 and was mainly based on: i) electronic label of VREfm-positive patients; ii) cohort isolation of VREfm-positive

patients; iii) active surveillance of roommates of new patients positive for VREfm; iv) routine chlorhexidine-baths of the patient's skin with antiseptic wipes; and v) improved procedures for the routine care, cleaning and disinfection of environmental surfaces. Moreover, together with the previous measures, the following actions were implemented during five months (February-July, 2019) in the medical unit with more infections by VREfm (unit 1A; Table 1): i) active surveillance, both after admission and weekly; and ii) reinforcement of hand hygiene and standard measures of infection control through educational programs. Further studies will be required to determine the effect of such measures on the worrisome trend of BSIs caused by *E. faecium* since 2015 in our hospital.

Antimicrobial stewardship programs are essential for an optimal management of severe infections caused by multi-drug resistant bacteria, such as BSIs produced by VREfm. The only active antimicrobials for treatment of the BSIs due to the isolates in the present study were linezolid and, for some of them, also a high dose of daptomycin. Worryingly, we had recently detected in our institution *E. faecalis* isolates harboring the transferable *optrA* gene, conferring linezolid resistance (to be published elsewhere). The possible transmission of this gene to the VREfm isolates, will limit ever more the options of antimicrobial treatment. This was already the case in a recent outbreak reported in Ireland, which was caused by an *optrA*-positive VREfm belonging to the ST80 clone, like our isolates [21].

In conclusion, the spread of VREfm is a cause of concern, since the establishment of hospital-adapted multidrug resistant clones in healthcare settings may precede an increment of the BSIs caused by them. Molecular studies of the isolates and implementation of aggressive infection control measures are crucial to limit their spread, especially in areas with low prevalence, avoiding the higher morbi-

mortality and cost associated with VREfm infections.

## References

- [1] Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: Is it time to divorce. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:731–42.
- [2] Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecón MA, Ortega M, Coque TM, et al. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:17–20.
- [3] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S, Seifert H, Wenzel R, Edmond M. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309–17.
- [4] Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019:1–18.
- [5] ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC; 2020.
- [6] ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
- [7] Valdezate S, Miranda C, Navarro A, Freitas AR, Cabrera JJ, Carrasco G, et al. Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like::Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:832–6.
- [8] Montesinos I, Campos S, Ramos MJ, Ruiz-Garbajosa P, Riverol D, Batista N, et al. Study of the first outbreak of vanA enterococcus faecium in the Canary Islands. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:430–4.
- [9] García Martínez de Artola D, Castro B, Ramos MJ, Díaz Cuevas Z, Lakhwani S, Lecuona M. Outbreak of vancomycin-resistant enterococcus on a haematology ward:

management and control. *J Infect Prev* 2017;18:149–53.

[10] Herrera S, Sorlí L, Pérez-Sáez MJ, Ruiz-Garbajosa P, Barrios C, Plasencia V, et al. Characterization and rapid control of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) outbreak in a renal transplant unit in Spain: The environment matters. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017;35:5–11.

[11] Nebreda T, Oteo J, Aldea C, García-Estébanez C, Gastelu-Iturri J, Bautista V, et al. Hospital dissemination of a clonal complex 17 vanB2-containing *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:806–7.

[12] Torres C, Escobar S, Portillo A, Torres L, Rezusta A, Ruiz-Larrea F, et al. Detection of clonally related vanB2-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. *J Med Microbiol* 2006;55:1237–43.

[13] Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:266–78.

[14] Humphreys H. Controlling the spread of vancomycin-resistant enterococci. Is active screening worthwhile? *J Hosp Infect* 2014;88:191–8.

[15] EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org> 2019.

[16] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.

[17] Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik Ø, Sundsfjord A. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1105–10.

[18] Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:24–7.

[19] Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1963–71.

[20] Eisenberger D, Tuschak C, Werner M, Bogdan C, Bollinger T, Hossain H, et al. Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. *J*

*Antimicrob Chemother* 2020;75:1398–404.

[21] Egan S, Corcoran S, McDermott H, Fitzpatrick M, Hoyne A, McCormack O, et al. A hospital outbreak of linezolid-resistant and vancomycin-resistant ST80 *Enterococcus faecium* harbouring an *optrA*-encoding conjugative plasmid investigated by whole-genome sequencing. *J Hosp Infect* 2020;105:726–35.

[22] Freitas AR, Tedim AP, Francia M V., Jensen LB, Novais C, Peixe L, et al. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother* 2016;71:3351–66.

[23] Tedim AP, Ruíz-Garbajosa P, Rodríguez MC, Rodríguez-Baños M, Lanza VF, Derdoy L, et al. Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995-2015) in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:48–55.

#### Acknowledgements

We are grateful to Gerencia de Asistencia Sanitaria del Bierzo (GASBI), Ponferrada, Spain by supported this work.

## RESULTADOS



## Objetivo 3.1: Artículo 3

Journal of Hospital Infection 100 (2018) 406–410



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Hospital Infection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhin](http://www.elsevier.com/locate/jhin)



# Nosocomial ventriculitis caused by a meticillin- and linezolid-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in neurosurgical patients

C. Rodríguez-Lucas<sup>a,b,c</sup>, J. Fernández<sup>b,c</sup>, J.A. Boga<sup>b,c</sup>, L. López-Amor<sup>c,d</sup>,  
L. Forcelledo<sup>c,d</sup>, E. Lázaro-López<sup>e</sup>, M.R. Rodicio<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>c</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>d</sup>Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>e</sup>Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 November 2017

Accepted 12 February 2018

Available online 16 February 2018

#### Keywords:

Ventriculitis

Cerebrospinal fluid drains

Linezolid resistance

G2576T

Staphylococcal infection

*Staphylococcus epidermidis*



### SUMMARY

**Background:** Postneurosurgical ventriculitis is mainly caused by coagulase-negative staphylococci. The rate of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) is increasing worldwide.

**Aims:** To report clinical, epidemiological and microbiological data from a series of ventriculitis cases caused by LRSE in a Spanish hospital between 2013 and 2016.

**Methods:** Cases of LRSE ventriculitis were reviewed retrospectively in a Spanish hospital over a four-year period. Clinical/epidemiological data of the infected patients were reviewed, the isolates involved were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multi-locus sequence typing, and the molecular bases of linezolid resistance were determined.

**Findings:** Five cases of LRSE ventriculitis were detected. The patients suffered from cerebral haemorrhage or head trauma that required the placement of an external ventricular drain; spent a relatively long time in the intensive care unit (ICU) (10–26 days); and three out of the five patients had previously been treated with linezolid. All LRSE had the same PFGE pattern, belonged to ST2, and shared an identical mechanism of linezolid resistance. Specifically, all had the G2576T mutation in the V domain of each of the six copies of the 23S rRNA gene, together with the Q136L and M156T mutations and the 71GGR72 insertion in the L3 and L4 ribosomal proteins, respectively.

**Conclusion:** The high ratio of linezolid consumption in the ICU (7.72–8.10 defined daily dose/100 patient-days) could have selected this resistant clone, which has probably become endemic in the ICU where it could have colonized admitted patients. Infection control and antimicrobial stewardship interventions are essential to prevent the dissemination of this difficult-to-treat pathogen, and to preserve the therapeutic efficacy of linezolid.

© 2018 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Address: Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain. Tel.: +34 985103562.

E-mail address: [rrodicio@uniovi.es](mailto:rrodicio@uniovi.es) (M.R. Rodicio).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.02.011>

0195-6701/© 2018 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Nosocomial ventriculitis is a severe complication associated with invasive procedures such as neurosurgery, complicated head trauma and foreign body placement, since disruption of the biological barriers of the patient can allow direct entry of the pathogen [1]. Insertion of cerebrospinal fluid (CSF) external drains are among the most common invasive procedures in this setting, and are frequently used for the treatment of hydrocephalus and infections of the central nervous system. The incidence of catheter-related CSF infection is variable (1–18%) depending on placement location (e.g. internal ventricular, external ventricular or ventriculoperitoneal) and additional risk factors [1].

Postneurosurgical meningitis and drain-associated infections are usually caused by bacteria from the patient's own skin microbiota, mainly coagulase-negative staphylococci (CNS) such as *Staphylococcus epidermidis*, which is the most common pathogen associated with these types of infection [1,2]. Nosocomial isolates of *S. epidermidis* are often resistant to the majority of antimicrobials available [2,3]. Most studies report a prevalence of methicillin resistance of approximately 75% in this species, which is often accompanied by resistance to many other antimicrobial agents belonging to different families [4]. In addition, this species can adhere to foreign device surfaces due to its ability to form biofilms, which protect the enclosed bacteria, hence hindering the action of antimicrobial agents [3]. Catheter removal and vancomycin therapy are the first-line recommendations for methicillin-resistant staphylococcal shunt-associated ventriculitis. However, vancomycin has poor diffusion in CSF, especially in meningitis without inflammation of the blood–brain barrier. Furthermore, vancomycin toxicity must also be considered in critically ill patients [1]. In addition, *S. epidermidis* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides have been reported in recent years [2]. Consequently, linezolid (LZD) is increasingly being used for the treatment of drain-associated ventriculitis due to its good CSF penetration, and efficacy against staphylococcal infections of the central nervous system [1,2].

LZD is an oxazolidinone with activity against Gram-positive micro-organisms, including methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci. It binds to the peptidyl transferase centre (PTC) of the bacterial ribosome, thereby blocking protein synthesis at the initial stage [4]. LZD resistance is increasing worldwide. In Spain, the rate of LZD-resistant *S. epidermidis* (LRSE) in intensive care units (ICUs) was 25% in 2015, according to the ICU-acquired infection Spanish study ENVIN-HELICS [4]. Mutations in the V domain of the 23S rRNA at the PTC constitute the major mechanism of LZD resistance. Alterations in ribosomal proteins L3, L4 and L22, encoded by the *rplC*, *rplD* and *rplV* genes, respectively, have also been associated with oxazolidinone resistance [4,5]. Moreover, the transferable *cfp* gene, which encodes a 23S rRNA methyltransferase, confers resistance to LZD and other antimicrobial families, such as phenicols, lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A [4,5], and the *optrA* gene encodes a newly described transferable mechanism of oxazolidinones and phenicol resistance, which provides active efflux of these antimicrobial compounds mediated by ABC transport [6]. All the aforementioned mechanisms of LZD resistance, except *optrA*, have been reported previously in LRSE.

Although several studies have investigated LRSE of clinical origin, only a few have included isolates recovered from CSF, without giving details on the clinical features of the infected patients [2,4]. The present study reports a series of nosocomial ventriculitis caused by a methicillin- and LZD-resistant *S. epidermidis* clone in a Spanish hospital, comprising clinical and epidemiological data of the infected patients as well as the microbiological features of the isolates involved. To the authors' knowledge, this is the first series of nosocomial ventriculitis by LRSE reported to date.

## Materials and methods

CSF cultures from hospitalized patients admitted to the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Spain, in 2013–2016, and positive for *S. epidermidis* were reviewed retrospectively. The medical records of the patients were also reviewed. Isolates with LZD minimal inhibitory concentration (MIC) >4 mg/L were considered to be resistant, according to Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints [7], and included in the study. Data on LZD utilization were obtained from the hospital pharmacy and expressed as defined daily dose (DDD) per 100 patient-days of bed occupancy.

Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed by the MicroScan System (Beckman Coulter, Porterville, CA, USA). Identification was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (microflex; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). MICs to LZD and tedizolid were determined using E-test strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Chromosomal DNA was extracted with Automated Nucleic Acid Extractor MagCore HF16 (RBC Bioscience Corp., New Taipei City, Taiwan), and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the six copies of the 23S rRNA gene of *S. epidermidis* was performed as described previously [5]. Nested PCR amplification of the central loop of the V domain of the six copies of the 23S rRNA gene (*rplA* to *rplF*), as well as amplification of the *rplV* gene (coding for ribosomal protein L22), were done as reported [5]. For amplification of the *rplC* and *rplD* genes (for ribosomal proteins L3 and L4, respectively), the following primer pairs were designed for the present study: L3-Fw (CATCGTTAATTCAACTGAACCTG), L3-Rv (CTTACCAT-CAGGTGTAGACATCGA), L4-Fw (GCACGAGTATCTACATCGAAAGTG) and L4-Rv (AAAGGCAATGTACCTGGACCTA). The obtained amplicons were sequenced and compared with the corresponding genes of the LZD-susceptible *S. epidermidis* reference strain RP62A (ATCC 35984). Screening of *cfp* and *optrA* was also accomplished by PCR [4,6].

PFGE with *Sma*I and multi-locus sequence typing (MLST) were performed as reported previously [8].

## Results

Over the study period (2013–2016), 30 *S. epidermidis* were isolated from CSF at HUCA. Seven of these (23.3%) were resistant to LZD, but only five could be recovered for further characterization. LZD and tedizolid MICs for these isolates were >256 mg/L and >32 mg/L, respectively, and all five isolates were also resistant to methicillin but susceptible to vancomycin. The five CSF infections were acquired nosocomially (>48 h after admission) [9], and confirmed as ventriculitis

Table 1

Clinical features of patients with nosocomial ventriculitis caused by linezolid (LZD)-resistant *Staphylococcus epidermidis*

Patient	Sex/age (years)	Date of bacterial isolation <sup>a</sup>	Ward	Length of ICU stay (days)	Underlying condition	Time between EVD implantation and infection (days)	Previous LZD use (no. of days of use)	Treatment/outcome
1	Male/50	25 <sup>th</sup> July 2013	ICU	17	CH	17	No	Vancomycin IV/discharged
2	Male/64	29 <sup>th</sup> July 2014	ICU	10	HIV/CH	9	No	Vancomycin IV/died <sup>c</sup>
3	Male/70	10 <sup>th</sup> July 2015	ICU	16	DM/CH	16	Yes (3)	Vancomycin IV/discharged
4	Male/42	2 <sup>nd</sup> September 2015	ICU	26	CH	19	Yes (19)	Vancomycin IV and IT/discharged
5	Male/86	1 <sup>st</sup> February 2016	Neurosurgery	23	CLL/HT	4 <sup>b</sup>	Yes (7)	Vancomycin IV and IT/discharged

ICU, intensive care unit; CH, cerebral haemorrhage; HIV, human immunodeficiency virus infection; DM, diabetes mellitus; CLL, chronic lymphoid leukaemia; HT, head trauma; EVD, external ventricular drain; IV, intravenous; IT, intrathecal.

<sup>a</sup> *S. epidermidis* isolates recovered from Patients 1–5 were termed Sep-HUCA1 to Sep-HUCA5, respectively. Two other isolates, which were not available for further characterization, were obtained in April 2013 and March 2015 from patients admitted to the ICU and postoperative ICU, respectively. The first patient was treated with LZD for 12 days before LRSE (LZD-resistant *S. epidermidis*) isolation. The second patient did not receive LZD therapy previous to the LRSE infection.

<sup>b</sup> Patient had multiple previous EVD removals.

<sup>c</sup> The patient died of heart failure unrelated to the infection.

according to Centers for Disease Control and Prevention definitions [10]. All the infected patients suffered from cerebral haemorrhage or head trauma, required external ventricular drain placement, and had prolonged stays in the ICU (10–26 days), and three of them had received LZD therapy previously (Table 1). These facts are known risk factors for selection of LRSE [11]. The use of LZD at HUCA was 7.72, 8.10, 8.10 and 7.91 DDDs/100 patient-days in the ICU, and 0.99, 1.21, 2.33 and 2.49 in other hospital wards, in 2013, 2014, 2015 and 2016, respectively.

All isolates shared the same mechanism of LZD resistance. First, they had the G2576T nucleotide mutation (*Escherichia coli* numbering will be used throughout) in the V domain of each of the six copies of the 23S rRNA gene. Second, the Q136L and M156T substitutions in ribosomal protein L3, and the 71GGR72 insertion in ribosomal protein L4 were also detected in all isolates. Finally, all of them displayed the previously described L94V silent mutation in L3 (L101V for *S. epidermidis* ATCC 12228), which does not confer LZD resistance [12], and were negative for the transferable *cfr* and *optrA* genes and wild type for the *rplV* gene (ribosomal protein L22). In addition to sharing the same mechanism of LZD resistance, the five LRSE showed identical PFGE profiles (Figure 1) and were assigned to clone ST2 by MLST.

## Discussion

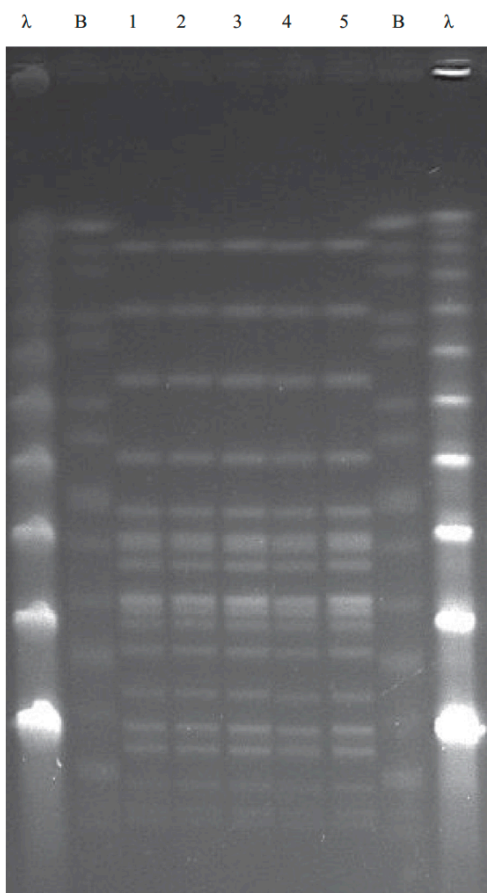
Between 2013 and 2016, seven isolates, all recovered from CSF and involved in ventriculitis, were resistant to LZD, which is an important choice for the treatment of this type of infection. Although the cases reported in this study occurred between 2013 and 2016, the rate of LRSE in the ICU increased drastically in 2012 (from 17% in 2011 to 27% in 2012), and has remained endemic since. LRSE isolates were associated with different types of infection, including ventriculitis and bacteraemia.

The five isolates available for the present study showed the most frequent mechanism for LZD resistance, namely the G2576T mutation in the V domain of the 23S rRNA gene. This change was found in all copies of the gene, which is enough in itself to justify the high MICs observed for LZD and tedizolid in the present study, due to 'gene dosage' as described previously [2,4,5,13]. Nevertheless, ribosomal protein mutations were also found in all isolates, consistent with the complexity of the genetic bases for LZD resistance in *S. epidermidis* [14].

The five isolates belonged to the same ST2 clone, which could have become endemic in the hospital. ST2 is mainly related to hospital care [3], and its ability to acquire and accumulate mutations in the 23S rRNA has been highlighted [15]. LRSE isolates pertaining to ST2 have been associated with outbreaks and long-term endemic situations in hospitals of different European countries, including Spain, as well as in the USA and other American countries [11,12,15–20]. However, none of the LRSE ST2 isolates were obtained from CSF and only a single case of meningitis caused by LRSE has been reported [2]. The latter study focused on daptomycin plus trimethoprim/sulfamethoxazole therapy, rather than clinical and microbiological features, and the sequence type of the isolate was not determined. In fact, to the best of the authors' knowledge, the present study reports the first cases of nosocomial ventriculitis by LRSE to date.

Some authors have suggested low variability of nosocomial *S. epidermidis* and a long temporal persistence of the ST2 clone, in contrast to the high diversity of *S. epidermidis* clones found in the community [3,12]. In agreement with this, the same clone was detected in the five patients admitted to HUCA over the four-year study period (2013–2016), although the hospital moved to a new building in June 2014. A retrospective study of the first available LRSE isolates that were recovered between June 2013 and June 2014 in the old building showed PFGE patterns identical or closely related to that reported in the present study, and also belonged to the ST2 clone (data not





**Figure 1.** Pulsed-field gel electrophoresis profiles generated from *Staphylococcus epidermidis* isolates by *Sma*I digestion. Lane λ, Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Beverly, MA, USA); Lane B, DNA from *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 digested with *Xba*I; both used as size standards. Lane 1, Sep-HUCA1; Lane 2, Sep-HUCA2; Lane 3, Sep-HUCA3; Lane 4, Sep-HUCA4; Lane 5, Sep-HUCA5.

published). According to Widerström *et al.*, the endemic situation of multi-drug-resistant nosocomial clones of *S. epidermidis* mirrors antimicrobial use in hospitals, especially in ICUs [3]. Strong antimicrobial pressure can select these clones and lead to rapid colonization of the skin of hospitalized patients [21]. The high consumption of LZD in the ICU of HUCA (7.72–8.10 DDDs) approximates the 13 DDD threshold considered by other authors as necessary for the occurrence of an outbreak of LZD-resistant bacteria [4]. Cross-transmission and high use of LZD in the ICU could have played a key role in the establishment of the ST2 LRSE clone at HUCA, increasing the risk of nosocomial drain-associated infections and decreasing therapeutic options. In fact, the isolates studied here were only susceptible to vancomycin, teicoplanin, daptomycin,

fosfomycin and tetracycline, thus complicating antimicrobial therapy. Although all patients were treated with vancomycin and all except one (who died due to heart failure unrelated to the LRSE infection) were discharged, the therapeutic options would have been extremely limited in the case of glycopeptide intolerance.

Infection control measures have been established over recent years in the ICU of HUCA due to the emergence of LRSE and the severity of the infections it causes, such as those reported in this study. First, LZD consumption in the ICU has been reduced, and it is now mainly used for targeted therapy. LZD has been replaced by vancomycin for empirical treatment of most nosocomial infections in which a Gram-positive bacterium could be involved. Moreover, as an antimicrobial stewardship intervention, since 2017, an expert assistant on infectious diseases has reviewed (on a weekly basis or on request) the use of broad-spectrum antimicrobials in the ICU. Following the implementation of these measures, both LZD consumption and the rate of LRSE decreased in 2017 to 6.34 DDDs and 13.6%, respectively.

This study highlights the importance of infection control measures and antimicrobial stewardship interventions to control the dissemination of difficult-to-treat LRSE nosocomial endemic clones, and to preserve the therapeutic efficacy of LZD.

**Conflict of interest statement**

None declared.

**Funding sources**

None.

**References**

- [1] van de Beek D, Drake JM, Tunkel AR. Nosocomial bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2010;362:146–54.
- [2] Vena A, Falcone M, Comandini E, Meledandri M, Novelli A, Campanile F, et al. Daptomycin plus trimethoprim/sulfamethoxazole combination therapy in post-neurosurgical meningitis caused by linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:99–102.
- [3] Widerström M, Monsen T, Karlsson C, Edebro H, Johansson A, Wiström J. Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scand J Infect Dis* 2009;41:642–9.
- [4] Baos E, Candel FJ, Merino P, Pena I, Picazo JJ. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:325–9.
- [5] Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5275–8.
- [6] Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, Manso E, Mingoa M, Giovanetti E, et al. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1118–9.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. 27<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: CLSI; 2017.
- [8] Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 2007;45:616–9.

- [9] Inweregbu K, Dave J, Pittard A. Nosocomial infections. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 2005;5:14–7.
- [10] 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.
- [11] Russo A, Campanile F, Falcone M, Tascini C, Bassetti M, Goldoni P, et al. Linezolid-resistant staphylococcal bacteraemia: a multicentre case–case–control study in Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:255–61.
- [12] Barros M, Branquinho R, Grosso F, Peixe L, Novais C. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, Portugal, 2012. *Emerg Infect Dis* 2014;20:903–5.
- [13] Bender J, Strommenger B, Steglich M, Zimmermann O, Fenner I, Lensing C, et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1630–8.
- [14] Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat* 2014;17:1–12.
- [15] de Almeida LM, Lincopan N, de Araújo M, Mamizuka EM. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:768–9.
- [16] O'Connor C, Powell J, Finnegan C, O'Gorman A, Barrett S, Hopkins KL, et al. Incidence, management and outcomes of the first *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a tertiary referral centre in the Republic of Ireland. *J Hosp Infect* 2014;90:316–21.
- [17] Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Villareal-Treviño L, Camacho-Ortiz A, González-González G, Llaca-Díaz J, et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. *Braz J Infect Dis* 2016;20:419–28.
- [18] Seral C, Sáenz Y, Algarate S, Duran E, Luque P, Torres C, et al. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol* 2011;301:354–8.
- [19] Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2329–35.
- [20] Lozano C, Aspiroz C, Gómez-Sanz E, Tirado G, Fortuño B, Zarazaga M, et al. Caracterización de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. haemolyticus* resistentes a meticilina y linezolid en un hospital español. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31:136–41.
- [21] Potoski BA, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C, et al. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis* 2006;43:165–71.

## RESULTADOS

## Objetivo 3.2: Artículo 4

Journal of Hospital Infection 105 (2020) 64–69



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Hospital Infection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhin](http://www.elsevier.com/locate/jhin)



# Long-term endemic situation caused by a linezolid- and meticillin-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital

C. Rodríguez-Lucas<sup>a, b, c</sup>, M.R. Rodicio<sup>b, c</sup>, J. Càmara<sup>d, e</sup>, M.Á. Domínguez<sup>d, f</sup>, M. Alaguero<sup>g</sup>, J. Fernández<sup>c, h, \*</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Microbiología, Hospital El Bierzo, Ponferrada, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>c</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>d</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitari de Bellvitge-Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias, Spain

<sup>f</sup>Spanish Network for Research in Infectious Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>g</sup>Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>h</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 July 2019

Accepted 14 October 2019

Available online 18 October 2019

#### Keywords:

*Staphylococcus epidermidis*  
ST2

Linezolid resistance

Stewardship programmes



### SUMMARY

**Background:** Linezolid (LZD)-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) are increasing, and are mainly associated with outbreaks in hospital wards with high LZD consumption.

**Aim:** To investigate the frequency of LRSE in a tertiary hospital in the context of LZD use.

**Methods:** The frequency of LRSE and the data on LZD usage [expressed as defined daily dose (DDD) per 100 patient-days], from 2011 to 2017, were analysed retrospectively. Selected LRSE were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and screened for transferable LZD resistance genes. Representative isolates were typed by multi-locus sequence typing, and ribosomal mechanisms of LZD resistance were investigated.

**Findings:** In total, 435 LRSE were detected, with frequencies ranging from 13.56% to 32.93% in the intensive care unit (ICU) where LZD consumption was high (6.34–8.10 DDDs), and from 2.48 to 6.80% in the remaining wards where LZD use was considerably lower (0.63–2.49 DDDs). The first 44 LRSE isolates recovered (June 2013–June 2014) were closely related according to PFGE patterns, and all except one were resistant to meticillin due to *mecA* production. Selected isolates belonged to ST2, carried SCC<sub>mec</sub> III, and had the G2576T mutation in the V domain of each of the six copies of the 23S rRNA gene. Five of the 44 isolates (11.36%) were positive for the *cf*r gene.

\* Corresponding author. Address: Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma s/n 33011, Oviedo, Spain. Tel.: +34 985108000.

E-mail address: [javifdom@gmail.com](mailto:javifdom@gmail.com) (J. Fernández).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.013>

0195-6701/© 2019 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



**Conclusion:** An ST2 LZD- and meticillin-resistant clone was found in the ICU and also in wards with low consumption of LZD. This highlights the need to implement and maintain infection control measures as well as antimicrobial stewardship programmes in all hospital units in order to preserve the efficacy of LZD.

© 2019 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are important nosocomial pathogens, mainly in immunocompromised patients or associated with the implantation of medical devices [1]. *Staphylococcus epidermidis* is the most common CoNS involved in nosocomial infections. According to the ENVIN-HELICS study (<http://hws.vhebron.net/envin-helics>), *S. epidermidis* is the most common Gram-positive bacterium isolated in intensive care units (ICUs) in Spain, and the third most common when considering both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Nosocomial isolates of *S. epidermidis* are frequently resistant to the majority of clinically relevant antimicrobials [1]. Consequently, last-resort antimicrobials are often one of the few options to treat infections caused by this species [1]. Linezolid (LZD) and tedizolid are among the last therapeutic options available to combat *S. epidermidis* infections [2]. These compounds belong to the oxazolidinone family and inhibit protein synthesis at the initial stage, by binding to the peptidyl transferase centre of the bacterial ribosome [2]. LZD has been used extensively in hospitals, especially in ICUs, primarily due to its broad spectrum against Gram-positive bacteria and its pharmacokinetic/pharmacodynamic features [1]. As a result, LZD resistance has emerged in Gram-positive bacteria, mainly *S. epidermidis*, from ICUs where they can become endemic [3]. The most common mechanism of LZD resistance is a point mutation in the V domain of the 23S rRNA gene, but changes in the ribosomal proteins L3, L4 and L22 can also be involved [4]. Furthermore, the *csr*, *optrA* and *poxtA* genes, which can be transferred between Gram-positive bacteria, have been associated with resistance to different antimicrobial agents, including oxazolidinones [3,5].

Although several studies have investigated LZD-resistant *S. epidermidis* (LRSE), they were mainly related to outbreaks and/or hospital wards with high use of LZD, and only a few endemic situations have been reported [1,6,7]. The present study reports a long-term endemic situation caused by a clone of LRSE in a Spanish hospital (Hospital Universitario Central de Asturias, Spain), analysing the relationship between the frequency of LRSE and LZD consumption over time.

## Materials and methods

The rate of LRSE (total number of LRSE/total number of *S. epidermidis* recovered per year x 100) from 2011 to 2017 was determined retrospectively using the Microbiology Laboratory informatics system at the study hospital. Data on LZD utilization for the same period were obtained from the hospital pharmacy and expressed as defined daily dose (DDD) per 100 patient-days of bed occupancy. Statistical analysis between prevalence of LRSE and LZD consumption was performed using Stata/IC 14.2 for Mac (StataCorp, College Station, TX, USA)

applying linear regression.  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

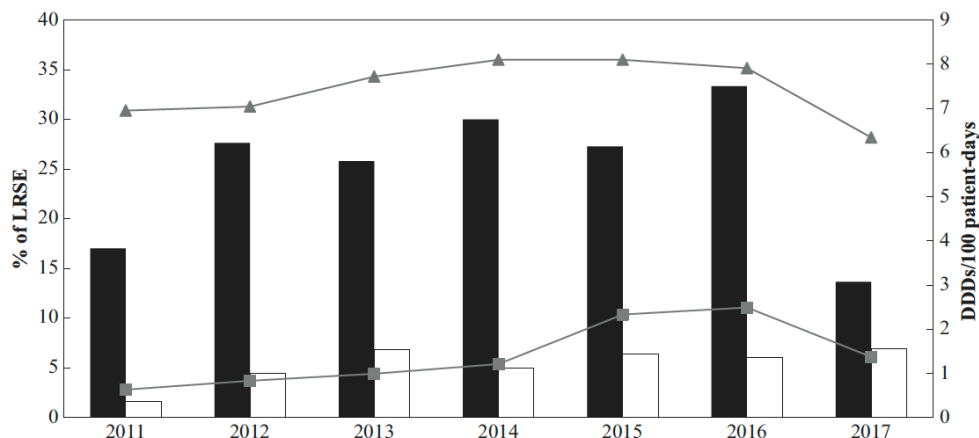
The first 44 LRSE isolates available from inpatients at the study hospital were recovered for further characterization. They were obtained from June 2013 to June 2014, each from a different patient. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) were performed using the Micro-Scan System (Beckman Coulter, Porterville, CA, USA) and interpreted according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [8]. Identification was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex™; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Meticillin-resistant isolates were screened for the *mecA* gene, and the *SCCmec* element was identified for representative isolates [9,10]. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of LZD and tedizolid were determined using E-test strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France and Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy). The breakpoints were: susceptible  $\leq 4$  mg/L and resistant  $\geq 8$  mg/L for LZD; and susceptible  $\leq 0.5$  mg/L, intermediate 1 mg/L and resistant  $\geq 2$  mg/L for tedizolid [8]. Amplification of the six copies of the 23S rRNA gene (*rrrA* to *rrrF*) and nested polymerase chain reaction (PCR) amplifications of the central loop of the V domain of each copy, as well as amplification of the *rplC*, *rplD* and *rplV* genes, were also performed [3]. The obtained amplicons were sequenced and compared with the corresponding genes of the LZD-susceptible *S. epidermidis* reference strain RP62A (ATCC 35984). Screening of potentially transferred genes was accomplished by PCR, using primers previously described for the *csr* and *optrA* genes [3], or primers designed in this study for *poxtA* (*poxtA*-F: TTCCACCTCTAAGGGAAGCTTGTG; *poxtA*-R: TATGCAGAGGAACAGCGGATT).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Sma*I and multi-locus sequence typing (MLST) were performed [11]. Similarity between *Sma*I profiles was evaluated by the Sorensen's coefficient ( $\bar{S}$ ), and cluster analysis was achieved by the unweighted pair-group method with arithmetic averages using the software program MVSP (Multivariate Statistical Package for PCs; RockWare Inc., Golden, CO, USA).

## Results

The relationship between the rate of LRSE and LZD consumption, both in the ICU and other hospital wards, over a 7-year period (2011–2017) is represented in Figure 1. During this period, a total of 5435 *S. epidermidis* were isolated at the study hospital, and 435 of these were LZD resistant (8.0%). In total, 832 *S. epidermidis* were found in the ICU and 4603 were found in the remaining wards, with 198 (23.80%) and 237 (5.15%) being LZD resistant, respectively. The number and frequency of LRSE between 2011 and 2017 ranged from 16 to 42 (13.56–32.93%) in the ICU where LZD consumption was high





**Figure 1.** Comparison of the rate of linezolid (LZD)-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) and correlation with the defined daily dose (DDD) of LZD per 100 patient-days of bed occupancy from 2011 to 2017 in the intensive care unit (ICU) and other wards at the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Spain. Squares indicate DDD of LZD/100 patient-days in HUCA wards except ICU; triangles indicate DDD of LZD/100 patient-days in ICU; solid bars, percentage of LRSE from ICU; open bars, percentage of LRSE from HUCA wards except ICU.

(6.34–8.10 DDDs), and from 18 to 56 (2.48–6.80%) in the remaining wards where LZD use was considerably lower (0.63–2.49 DDDs). Correlation between the prevalence of LRSE and LZD consumption was significant in the ICU ( $R^2=0.71$ ,  $p=0.02$ ) but non-significant in the remaining wards ( $R^2=0.30$ ,  $p=0.20$ ).

The first 44 LRSE isolates available in the hospital, which were recovered from June 2013 to June 2014, were selected for further characterization. It is of note that less than half of the LRSE were obtained from patients admitted to the ICU (19/44; 43.18%), while the rest belonged to patients admitted to 14 different wards (Figure 2).

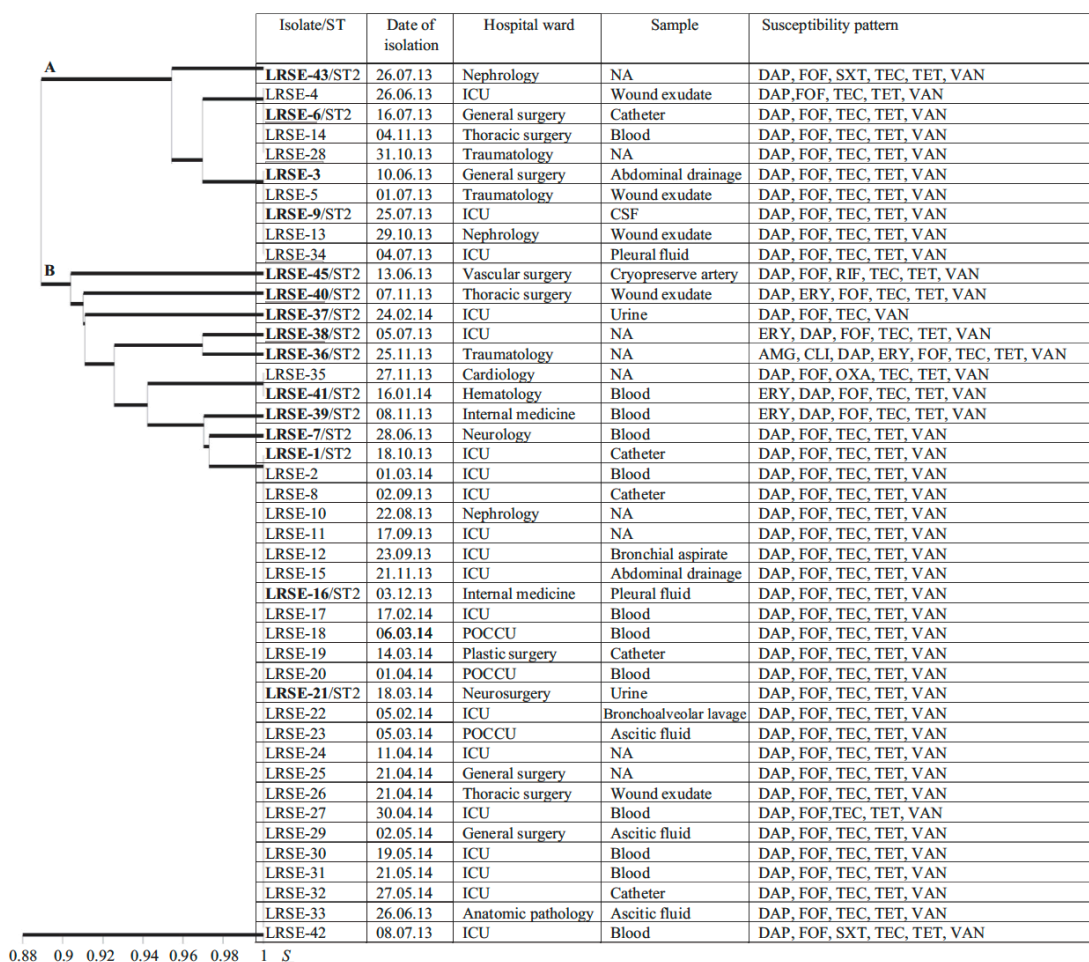
Forty-three of the 44 LRSE characterized in detail were resistant to oxacillin and methicillin, as well as the major families of antimicrobials tested. Thirty-four (77.27%) showed the same antimicrobial susceptibility pattern (only susceptible to daptomycin, fosfomicin, teicoplanin, tetracycline and vancomycin) (Figure 2). The *mecA* gene was detected in all the methicillin-resistant isolates carried by type III SCC*mec* in the analysed isolates.

PFGE typing of the 44 isolates yielded 12 different profiles which were closely related with  $\leq >0.88$ ; two clear sub-clusters, A and B, with  $\leq >0.95$  and  $>0.90$ , respectively, can be distinguished (Figure 2). At least one representative isolate of each PFGE pattern was typed by MLST and all of them belonged to ST2 (Figure 2). The ribosomal mechanisms of LZD resistance were also investigated for the same isolates (Table 1). All showed high MICs to LZD and tedizolid ( $>256$  and  $>32$  mg/L, respectively), and the same nucleotide mutation G2576T (*Escherichia coli* numbering) in the V domain of each of the six copies of the 23S rRNA gene. However, different substitutions/insertions were found in the L3 and L4 ribosomal proteins. Apart from additional mutations in L3, all isolates tested displayed the previously described L94V conservative mutation in L3 (L101V for *S. epidermidis* ATCC 12228), which does not confer LZD

resistance [7], and were wild type for L22 (Table 1). Finally, the 44 selected isolates were tested for potentially transferable genes that confer oxazolidinone resistance. None of them carried the *optrA* or *poxtA* genes, but five (11.36%; three and two belonging to sub-clusters A and B, respectively) were positive for the *cfr* gene: two from the ICU and three from other wards (Figure 2).

## Discussion

Over the 7-year study period (2011–2017), LRSE were detected consistently at the study hospital in numbers ranging from 42 to 94 per year. All isolates tested were closely related by PFGE and belonged to the ST2 clone. Nosocomial *S. epidermidis* are dominated by strains of clonal complex 5, and ST2 is the most widely disseminated type [1,12]. ST2 isolates are characterized by a high level of genetic plasticity, related to an increased recombination/mutation rate and the efficient acquisition of antimicrobial resistance genes [7,12,13]. Of particular interest is the rifampicin resistance of this lineage through dual mutations in *rpoB* (D471E and I527M substitutions) that have become fixed in the population and also confer glycopeptide heteroresistance [14]. This, together with the fact that it is difficult to detect glycopeptide heteroresistance by standard diagnostic methods, makes the high prevalence of rifampicin resistance found in the characterized isolates (43/44; 97.73%) a cause of concern. The isolates at the study hospital showed the chromosomal mutation G2576T in all copies of 23S rRNA, which is the main mechanism of LZD resistance in CoNS [1,4,6]. This nucleotide mutation has been associated with LZD adaptation, and the number of copies of the 23S rRNA mutated (i.e. the 'gene dosage') is correlated with the MICs of LZD [15]. Fortunately, only five of the 44 isolates tested (11.36%) were positive for the transferable gene *cfr* and, to date, no outbreak caused by other more virulent



**Figure 2.** Molecular typing and microbiological features of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates recovered between June 2013 and June 2014 in a Spanish hospital. Dendrogram of similarity showing relatedness between the *Sma*I pulsed-field gel electrophoresis profiles, with A and B indicating the two detected sub-clusters. LRSE, linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*; ICU, intensive care unit; POCCU, post-operative critical care unit; NA, data not available; CSF, cerebrospinal fluid; DAP, daptomycin; FOF, fosfomicin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TEC, teicoplanin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; RIF, rifampin; ERY, erythromycin; AMG, aminoglycoside; CLI, clindamycin; OXA, oxacillin; S, Sorensen's coefficient of similarity. The isolates for which ribosomal mutations involved in LZD resistance were identified are shown in bold, while the isolates positive for the *cfr* gene are underlined. None of the isolates were positive for *oprA* or *poxA*.

species carrying this gene, such as *Staphylococcus aureus*, has been reported.

ST2 LRSE have been mainly associated with ICU outbreaks, where the high LZD use, together with cross-transmission, could explain the establishment of these resistant bacteria [12,16–18]. Some of these outbreaks were caused by LZD- and methicillin-resistant *S. epidermidis* clones belonging to ST2 and carrying the SCCmec III element, similar to the isolates in the present study [16–18]. Although nearly half of the isolates (43.18%) were recovered from patients admitted to the ICU

where LZD consumption is high, the remaining isolates derived from many other wards (Figure 2) in which LZD use is significantly lower (Figure 1). This is consistent with the idea that LZD-resistant CoNS in the ICU might only represent the tip of the iceberg of LZD resistance [1]. Patients could be colonized by LRSE in hospital wards other than the ICU but go unnoticed because *S. epidermidis* is part of the skin microbiota and clinical importance is rarely ascertained, so AST is not performed when recovered from most clinical samples. However, when patients are admitted to the ICU, they are usually more

**Table 1**

Minimum inhibitory concentrations (MICs) to oxazolidinones and mechanisms of chromosomal resistance of representative *Staphylococcus epidermidis* isolates in the study

Isolate	Cluster	MIC of LZD (mg/L)	MIC of tedizolid (mg/L)	23S rRNA mutations <sup>a</sup> (no. of <i>rrn</i> alleles mutated)	Ribosomal protein mutation <sup>b</sup>		
					L3	L4	L22
LRSE-1	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; Q136L; M156T	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-3	A	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; H146Q	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-6	A	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; H146Q	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-7	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; Q136L; M156T	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-9	A	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; Q136L; M156T	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-16	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; Q136L; M156T	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-21	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; Q136L; M156T	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-36	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; H146Q	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-37	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; Q136L; M156T	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-38	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V	WT	WT
LRSE-39	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; V154L	WT	WT
LRSE-40	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; M156T	P28L	WT
LRSE-41	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; V154L	P28L	WT
LRSE-43	A	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V; H146Q	Insertion (71GGR72)	WT
LRSE-45	B	>256	>32	G2576T (6/6)	L94V	WT	WT

LRSE, linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*; MIC, minimum inhibitory concentration; LZD, linezolid; WT, wild type.

<sup>a</sup> The nucleotide positions of the mutations are listed according to *Escherichia coli* numbering.

<sup>b</sup> The amino acid positions of the mutations are listed according to *S. epidermidis* RP62A numbering.

vulnerable due to medical devices which act as a gateway for this micro-organism into sterile fluids and cavities. As such, AST is mostly performed for *S. epidermidis* detected in blood, cerebrospinal fluid and catheters, allowing the detection of antimicrobial resistance, including resistance to LZD. Thus, the amount of LRSE circulating in hospitals could be even more unnoticed in hospital wards than in ICUs.

Although the study hospital relocated to a new building in June 2014, a recent study on ventriculitis caused by LRSE revealed the presence of isolates pertaining to the ST2 clone in 2015 and 2016 [3]. Moreover, LRSE isolates obtained from blood cultures of patients admitted to the ICU and other wards in 2015, 2016 and 2017 were recently analysed and all of them belonged to the ST2 clone (unpublished data). These results strongly suggest that a successful LRSE clone has become established and was maintained over time in the new hospital, although only the LRSE isolates recovered between June 2013 and June 2014 were characterized in detail in the present study. To the best of the authors' knowledge, this is the first description of a long-term endemic situation due to an LRSE clone affecting an entire hospital, including wards with low exposure to LZD. In fact, LRSE have rarely been connected with long-term endemic situations, and in the few published studies, these were either associated with high LZD consumption or did not provide data about LZD usage [1,6,7]. With regard to the origin of the clone, an LZD-susceptible ST2 isolate could have acquired the G2576T 23S rRNA mutation in the ICU, where the selective pressure is stronger. As revealed by PFGE analysis, further micro-evolution of the clone originated two closely related sub-clusters. Isolates of the two sub-clusters were able to capture the transferable *cfr* gene and reach many other wards in the hospital, probably favoured by intrahospital patient movement. Infection control measures, including LZD restriction, via antimicrobial stewardship programmes were established in 2017 in the ICU at the study hospital, and the rate of LRSE in this ward has decreased drastically [3].

In conclusion, our results suggest that LRSE clones can become established in all hospital wards, including those with low LZD consumption, where they can colonize a large number of patients. When these colonized patients are admitted to ICU wards with high antimicrobial pressure, they are more likely to suffer infections by LRSE. These observations highlight the importance of implementing and maintaining infection control measures and antimicrobial stewardship programmes, not only in the ICU but in the whole hospital, to preserve LZD and tedizolid efficacy. At the study hospital, the reduction in the number of isolates in 2017 compared with previous years is encouraging and, although further surveillance is required, this may be indicative of the effectiveness of the antimicrobial stewardship programme.

**Conflict of interest statement**

None declared.

**Funding source**

A short stay of C.R-L at the Hospital Universitari de Bellvitge was supported by a grant from the Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

**References**

- [1] Dortet L, Glaser P, Kassis-chikhani N, Girtlich D, Ichai P, Boudon M, et al. Long-lasting successful dissemination of resistance to oxazolidinones in MDR *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates in a tertiary care hospital in France. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:41–51.
- [2] Bender J, Strommenger B, Steglich M, Zimmermann O, Fenner I, Lensing C, et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1630–8.
- [3] Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, et al. Nosocomial ventriculitis



- caused by a methicillin- and linezolid-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* 2018;100:406–10.
- [4] Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:603–12.
- [5] Antonelli A, Andrea MMD, Brenciani A, Galeotti CL, Morroni G, Pollini S, et al. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1763–9.
- [6] Morroni G, Brenciani A, Vincenzi C, Barocci S, Tili E, Manso E, et al. A clone of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* bearing the G2576T mutation is endemic in an Italian hospital. *J Hosp Infect* 2016;94:203–6.
- [7] Barros M, Branquinho R, Grosso F, Peixe L, Novais C. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, Portugal. *Emerg Infect Dis* 2014;20:903–5.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2017.
- [9] Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persingl DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:1768–72.
- [10] Zhang K, McClure J, Conly JM. Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 2012;26:218–21.
- [11] Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 2007;45:616–9.
- [12] Weßels C, Strommenger B, Klare I, Bender J, Messler S, Mattner F, et al. Emergence and control of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an ICU of a German hospital. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1185–93.
- [13] Widerström M, Monsen T, Karlsson C, Edebro H, Johansson A, Wiström J. Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scand J Infect Dis* 2009;41:642–9.
- [14] Lee JYH, Monk IR, Gonçalves A, Seemann T, Chua KYL, Kearns A, et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nat Microbiol* 2018;3:1175–85.
- [15] Meka VG, Gold HS, Cooke A, Venkataraman L, Eliopoulos GM, Moellering RC, et al. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:818–20.
- [16] Seral C, Sáenz Y, Algarate S, Duran E, Luque P, Torres C, et al. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol* 2011;301:354–8.
- [17] O'Connor C, Powell J, Finnegan C, O'Gorman A, Barrett S, Hopkins KL, et al. Incidence, management and outcomes of the first *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a tertiary referral centre in the Republic of Ireland. *J Hosp Infect* 2014;90:316–21.
- [18] Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM, Pichon B, Kinnevey PM, Earls MR, et al. Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother* 2018;72:3252–7.

## **Objetivo 3.3: Artículo 5**

**Clinical, microbiological and molecular characterization of polyclonal *optrA*-positive isolates of *Enterococcus faecalis* recovered from community patients.**

Carlos RODRÍGUEZ-LUCAS<sup>1,2,3</sup>, Javier FERNÁNDEZ<sup>3,4</sup>, Xenia VÁZQUEZ<sup>2,3</sup>, María de TORO<sup>5</sup>, Víctor LADERO<sup>6</sup>, Carlos FUSTER<sup>7</sup>, Rosaura RODICIO<sup>3,8</sup>, M. Rosario RODICIO<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes

<sup>2</sup>Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo

<sup>3</sup>Grupo de Microbiología Traslacional. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias

<sup>4</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias

<sup>5</sup>Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR)

<sup>6</sup>Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC)

<sup>7</sup>Unidad de Microbiología, Hospital El Bierzo

<sup>8</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo

### **Abstract**

**Background:** Dispersion of transferable oxazolidinone-resistance genes among enterococci poses a serious problem to human health. Prompt detection of bacteria carrying them is crucial to avoid their spread to multidrug-resistant bacteria.

**Aim:** To describe the presence of *optrA*-positive isolates among enterococci in a Spanish hospital, and to establish their genetic context and location by means of whole genome sequencing.

**Material and methods:** In all enterococci recovered at Hospital El Bierzo (HEB) from February to December 2018, with MICs to linezolid (LZD)  $\geq 4$  mg/L, the presence of the *cfi*, *optrA* and *poxtA* transferable genes was investigated by PCR. The genomes of three *optrA*-positive isolates detected were sequenced and analyzed.

**Findings:** Only four of the total enterococci recovered during the study period (0.9%) had LZD MICs  $\geq 4$  mg/L, and they were identified as *E. faecalis* resistant to chloramphenicol and florfenicol. None of them was positive for *cfi* or *poxtA* genes but the *optrA* gene was detected in three isolates recovered from urine samples of community patients. These isolates belonged to different clones: ST480, ST585 and ST7. The *optrA* genes of the three isolates were located on plasmids, associated with IS1226 in different arrays. In one isolate, the *optrA* plasmid co-resided with a second plasmid which carried multiple resistance genes arranged in a novel configuration. In addition to being detected in an isolate from a human clinical sample, it is also the first time the plasmid has been detected outside of China.

**Conclusions:** Spread of *optrA*-positive *E. faecalis* isolates in the community is a cause of concern. Spread of these bacteria in hospital settings, particularly in those, like the HEB, where vancomycin-resistant enterococci are endemic, should be avoided in order to preserve the efficacy of the last-resort oxazolidinones.

## 1. Introduction

The oxazolidinones linezolid (LZD) and tedizolid are effective last-resort antimicrobials for treating infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-positive bacteria, including vancomycin-resistant enterococci (VRE) [1]. Oxazolidinones inhibit protein synthesis at the initial stage, by binding to the peptidyl transferase centre of the bacterial ribosome. Oxazolidinones-resistance among Gram-positive bacteria (enterococci and staphylococci) remain low and it is mainly mediated by chromosomal mutations in the V domain of the 23S rRNA gene [2]. However, in the last years three potentially transferable genes: *cfi* (encoding a 23S rRNA methyltransferase) [3], *optrA* and *poxA* (encoding ribosomal protective proteins) [4,5], which confer resistance to oxazolidinones (and phenicols), and could be horizontally disseminated by plasmids and/or transposons, have been described [6]. The potential spread of these genes between MDR Gram-positive bacteria is a cause of concern, so a prompt detection of bacteria carrying them is required. Accordingly, the aim of the present study was to investigate the presence of transferable oxazolidinone-resistance genes among enterococci isolated from clinical samples analyzed at “Hospital El Bierzo” (HEB), a 400-bed teaching hospital in Northern Spain. Additionally, the genomes of the three *optrA*-positive isolates detected (*Efae*-HEB1, *Efae*-HEB2 and *Efae*-HEB3) were sequenced and the genetic environment of the *optrA* genes was established.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Identification of linezolid resistant isolates

From February 2018 to December 2018 all enterococci with minimal inhibition concentration (MICs) to LZD  $\geq 4$  mg/L detected at the HEB were recovered. They were obtained from either clinical samples of inpatients or from samples sent to the hospital by primary health centers dependent on it. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing was performed with the MicroScan System (MicroScan; Beckman Coulter, CA, USA) and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [7]. Enterococci with MICs of LZD  $\geq 4$  mg/L were tested for susceptibility to chloramphenicol by disc-diffusion, and MICs of tedizolid were determined by E-test strips (Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy). For all isolates, screening of *cfi* and *optrA* genes was accomplished by PCR as previously reported [8], and PCR detection of *poxA* was carried out with primers *poxA*-F (TTCCACCTCTAAGGGAACTTGTG) and *poxA*-R (TATGCAGAGGAACAGCGGATT) [9].

### 2.2. Whole genome sequencing of *optrA* positive isolates and bioinformatics analysis

The genomes of three *optrA* positive isolates of *E. faecalis* (*Efae*-HEB1, *Efae*-HEB2 and *Efae*-HEB3) were sequenced using the Illumina platform, and bioinformatic analysis was performed. Genomic DNA was extracted with the “GenElute Bacterial Genomic DNA Kit” (Sigma Aldrich), following the manufacturer’s instructions. Libraries (ca. 500 bp fragment size) were prepared with the TruSeq PCR-free DNA Sample Preparation Kit at the “Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de

Investigación Biomédica”, La Rioja (Spain), and sequenced on a HiSeq 2000 (Illumina) to generate 130-150 nt paired-end reads. Assembly of the reads into contigs was achieved with the Velvet VelvetOptimiser.pl script of Velvet software implemented in PLACNETw (<https://openebench.bsc.es/tool/placnetw>), which also allows plasmid reconstruction [10]. The assembled contigs were annotated by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)), MultiLocus Sequence Typing (MLST), as well as identification of resistance determinants, comprising chromosomal mutations in the 23S RNA gene and acquired resistance genes, was accomplished *in silico*, using online tools, including MLST, LRE-Finder, ResFinder and Plasmid Finder from the Center for Genomic Epidemiology ([www.genomicepidemiology.org](http://www.genomicepidemiology.org)) of the Technical University of Denmark, apart from PLACNETw. The genetic context of the *optrA* genes was established by detailed analysis of the annotated contigs using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Two resistance plasmids found in a single isolate (*Efae*-HEB2) were fully sequenced, by assembling contigs of plasmid origin through PCR amplification with primers shown in Tables S1 and S2, followed by Sanger sequencing (commercially performed at Stab vida, Lisbon, Portugal). Apart from using Plasmid Finder, plasmid replicon typing was attempted “*in silico*” for the two plasmids of *Efae*-HEB2, following the scheme proposed by Jensen *et al.*, [11] for classification of plasmids carried by *Enterococcus* and other Gram positive bacteria. The scheme is based on PCR amplification with primers designed to recognize 19 replicon

families, *rep*<sub>1</sub> to *rep*<sub>11</sub>, *rep*<sub>13</sub> to *rep*<sub>19</sub> and *rep*<sub>unique</sub>).

### 2.3. Accession numbers

The genomes of three *optrA*-positive *E. faecalis*, designated p*Efae*-HEB1, p*Efae*-HEB2 and p*Efae*-HEB3, have been deposited in the GenBank database under accession numbers JAAOEK000000000, JAAOEL000000000 and JAAOEM000000000 (biosamples SAMN14345144, SAMN14345145 and SAMN14345146, within BioProject: PRJNA611756).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Screening of transferable oxazolidinone-resistance genes shows a low though relevant prevalence of polyclonal *Enterococcus faecalis* carrying the *optrA* gene in community patients

During the period of study, a total of 443 enterococci were isolated, and assigned to *E. faecalis* (367) or *E. faecium* (76). Only four of the total enterococci (0.9%) had LZD MICs  $\geq 4$  mg/L, and they were identified as *E. faecalis* resistant to chloramphenicol and florfenicol. None of them was positive for *cfp* or *poxTA* genes but the *optrA* gene was detected in three out of the four isolates: *Efae*-HEB1, *Efae*-HEB2 and *Efae*-HEB3, all recovered from urine samples of patients attended at the HEB (Table 1). This gene encodes a ribosomal protection protein of the ABC-F family. It was first found in *E. faecalis* and *E. faecium* from humans and food animals in China [5]. Since then, isolates carrying this gene have been recovered from animal, human and environmental samples, mainly in China, but also in other countries of the Asia-Pacific region, Africa, North America, Latin America, and Europe, including Spain [5,12–15]



Table 1: Clinical, microbiological and molecular features of *optrA*-positive *Enterococcus faecalis* isolates detected during 2018 in a Spanish hospital.

Isolate	Isolation date	Sample	Sex/Age	MLST	MICs (mg/L)		MLS <sub>B</sub> L <sub>SaP</sub> L	Resistance determinants					OptrA variant
					LZD	TZD		AMG	TET	TMP	Oxazolidinones	Phenicolis	
<i>Efae</i> -HEB1	14 February	Urine	Female/57	ST480	4	1.5	<i>erm</i> (B) <i>lsa</i> (A) <i>InuB</i>	<i>ant</i> (6)-Ib	<i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>dfr</i> G	<i>optrA</i>	<i>fexA</i>	Tyr176Asp Thr481Pro
<i>Efae</i> -HEB2	4 June	Urine	Male/67	ST585	4	2	<i>erm</i> (B) <i>lsa</i> (A), <i>lsa</i> (E) <i>InuB</i>	<i>aac</i> (6)- <i>aph</i> (2''), <i>ant</i> (6)-Ia, <i>aph</i> (3)-IIIa, <i>aadE</i> , <i>apt</i> , <i>spw</i> , <i>sat4</i>	<i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>dfr</i> G	<i>optrA</i>	<i>fexA</i> , <i>cat</i>	wt
<i>Efae</i> -HEB3	15 June	Urine	Male/69	ST7	4	1	<i>erm</i> (A), <i>erm</i> (B) <i>lsa</i> (A), <i>lsa</i> (E) <i>InuB</i>	<i>aph</i> (3)-IIIa	<i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	-	<i>optrA</i>	<i>fexA</i>	Tyr176Asp Thr481Pro

HEB: "Hospital el Bierzo". MLST: Multilocus sequence typing; MIC: Minimal inhibitory concentration; LZD: Linezolid; TZD, Tedizolid; MLS<sub>B</sub>: Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B; L<sub>SaP</sub>, Lincosamides, Streptogramin A and Pleuromutilin; L, Lincosamides; AMG: Aminoglycosides; TET: Tetracyclines; TMP: Trimethoprim; wt, wild type.

Resistance determinants located in plasmids are highlighted in bold.

This frequency is lower than that obtained in the present study (i.e. 0.82% of the total *E. faecalis* isolates). The three *optrA* positive isolates reported in this study were obtained from urine samples of unrelated patients in the community (Table 1). None of them had antecedents of recent therapy with oxazolidinones, although two had received other antimicrobials, like quinolones, cefuroxime or azithromycin in the last 3 months. A sign of the spread of the *optrA* gene among *E. faecalis* in the community is the polyclonality of our isolates, as revealed by MLST performed *in silico*. *Efae*-HEB1 and *Efae*-HEB-2, belonged to clones previously associated with the *optrA* gene, i.e. ST480 and ST585, respectively [12–14,16–21]. The remaining isolate (*Efae*-HEB3) was assigned to the new ST7, which is a single locus variant (*pstS*) of ST317.

### 3.2. The *optrA* genes and encoded proteins

After sequencing the genome of the three isolates, analysis of the *optrA* genes identified two variants, resulting in two alternative forms of the encoded proteins (Table 1). The protein of *Efae*-HEB2 coincided with OptrA<sub>E349</sub>, considered as wild-type since it is encoded by plasmid pE349 where the *optrA* gene was originally detected [5].

In contrast, the OptrA proteins of *Efae*-HEB1 and *Efae*-HEB3 contain the Tyr176Asp and Thr481Pro substitutions corresponding to the DP variant previously reported in clinical isolates from hospitals in China [18,22,23] and recently found in Spain [21]. Regardless of the variant, the three *E. faecalis* had the same linezolid MIC of 4 mg/L, which was previously associated with some but not all of the isolates producing either the wild type protein or the DP variant in China. In fact, it has been already noticed that the number and type of amino acid substitutions in OptrA has little effect on the level of linezolid resistance [24]. It is also of note that both CLSI and EUCAST consider MICs >4 mg/L as "resistant", while a MIC equal to 4 mg/L is regarded as "intermediate" by CLSI and "susceptible" by EUCAST [7,25]. According to this, the dispersal of the *optrA* gene among enterococci may well be underestimated if present in isolates with MIC of 4 mg/L, mainly if EUCAST breakpoints are used. The recent introduction of chloramphenicol in the antimicrobial susceptibility testing (AST) panels for enterococci could aid to detection of transferable oxazolidinone-resistance genes. Alert messages can be created in the automated AST systems if a Gram-positive bacterium shows MICs to LZD



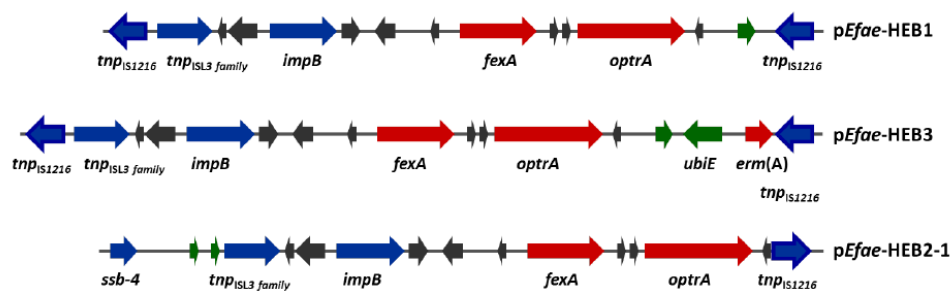
≥4 mg/L together with chloramphenicol resistance. Bacteria which fulfill this criteria can be analyzed by multiplex-PCR for simultaneous detection of transferable oxazolidinone-resistance genes [26].

### 3.3. Genetic context of *optrA* and other resistance genes

By using PLACNETw, the *optrA* genes of the three isolates were located on plasmids, named pEfae-HEB1, pEfae-HEB2-1 and pEfae-HEB3. Additional resistance genes carried by plasmids or the chromosome were also identified (Table 1). They confer resistance to aminoglycosides [*aac(6′)-aph(2′′)*, *ant(6)-Ia*, *aph(3′)-III*, *aadE*, *sat4* and *spw*], tetracyclines [*tet(L)* and *tet(M)*], trimethoprim [*dfr(G)*], fenicols (*fexA* apart from *optrA*) or antibiotics of the MLS<sub>B</sub> [macrolides-lincosamides-streptogramin B group; *erm(A)* and *erm(B)* genes], LS<sub>AP</sub> (lincosamide, streptogramin A and pleuromutilin group; *lsaA* and *lsaE*) and L (for lincosamide inactivation; *lmuB* genes) phenotypes.

The genetic context of the *optrA* genes is shown in Figure 1. In the three plasmids, the *fexA* gene, encoding a chloramphenicol/florfenicol efflux protein of the major facilitator

superfamily (MFS), was located upstream of *optrA*. In two of them, pEfae-HEB1 and pEfae-HEB3, the *optrA* region was flanked by IS1216 elements placed in the same orientation. However, the DNA comprised in between differed by an *erm(A)*-like gene and the *ubiE* gene (for ubiquinone/menaquinone C-methyltransferase), which were present in pEfae-HEB3 but not in pEfae-HEB1. The organization of pEfae-HEB3 *optrA* region coincides with that reported for p10-2-2, a plasmid carried by a pig isolate of *E. faecalis* ST59 from China [17], as well as for three plasmids characterized in a study of oxazolidinone resistance in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates [12]. In contrast, the structure of the pEfae-HEB1 *optrA* region, delineated by the two copies of IS1216, constitutes a novel locus that has not been previously reported. Finally, in the case of pEfae-HEB2-1, a single copy of IS1216 was detected downstream of the *optrA* gene, but not at the opposite end (Figure 1). This region showed the highest similarity with pEF10748 (see below), pXY17, p10-2-2, p29462, p1202, and pE121, all detected in *E. faecalis* from China.



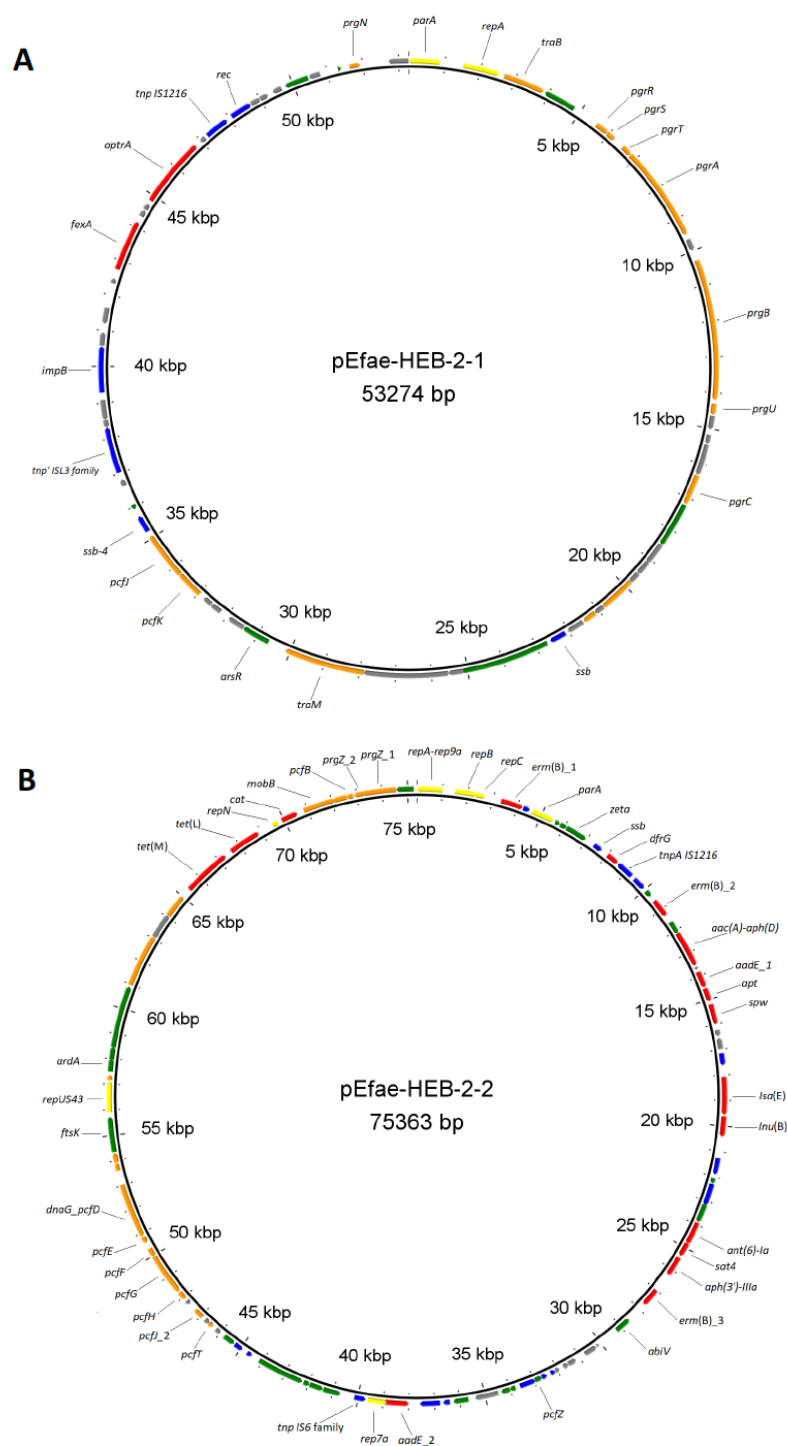
**Figure 1.** Genetic environment of the *optrA* gene in plasmids of three oxazolidinones resistant isolates of *Enterococcus faecalis* from patients attended at a Spanish hospital. Open reading frames are represented by arrows indicating the direction of transcription, and drawn to scale in different colors depending on their function: red, resistance; blue, DNA metabolisms including transposition; green, other functions; grey, unknown. The transposase gene of IS1216 is highlighted by a thick borderline.

### 3.4. The two resistance plasmids of *Efae*-HEB2

Together with p*Efae*-HEB2-1, a second plasmid termed p*Efae*-HEB2-2, was present in *Efae*-HEB2, and both were fully sequenced (Figure 2). Plasmid replicon typing performed “in silico”, following the scheme of Jensen *et al.*, [11], failed to provide a positive result for any of the two plasmids. Plasmid Finder also failed to identify the p*Efae*-HEB2-1 replicon, but a BLASTn search of the *repA* gene in this plasmid yielded 100% identity (with 100% coverage) with the *repA* genes of two *E. faecalis* plasmids, the *optrA* plasmid pEF10748 (assigned to the *rep9* family by the Zou *et al.*, [19], and the *optrA*, *poxA* co-carrying plasmid pE035 [27]. On the other hand, Plasmid Finder detected three different replicons, *rep7a*, *rep9a* and *repUS12*, in p*Efae*-HEB2-2 (showing 100%, 95.25% and 99.92% identity with genes of the prototype pS194, pAD1 and pDOP1 plasmids, respectively). It is of noteworthy that multiple *rep* genes were previously identified by Zou *et al.*, [19] in ten out of 44 *optrA* plasmids found in clinical isolates of *E. faecalis* from China.

p*Efae*-HEB2-1 (Figure 2A) consist of ca. 55 kb, with a GC content of 35%, similar to that of the *E. faecalis* genome (37-38%). It is a sex pheromone responsive plasmid, nearly identical to pEF10748, a conjugative plasmid with a high transfer frequency [19]. Like pEF10748, it contains multiple sex pheromone response genes, including *traB*, *prgA*, *prgB*, *prgC*, *prgU*, *prgR*, *prgS* and *prgT*. The *optrA* locus is placed between genes encoding a recombinase and a hypothetical protein (Figure 2A). Apart from pEF10748, only two other *optrA* plasmids with pheromone-inducible conjugation behavior (pE211 and pE508) were previously identified in *E. faecalis* [23]. The second plasmid found in *Efae*-HEB2, p*Efae*-HEB2-2 (Figure 2B),

consists of 75,363 bp with a GC content of 34.6%, and three replicon types (see above). It is closely related to pE508-2, a plasmid recently deposited in GenBank (accession no. MK465702), found in an ST256 isolate from a fecal swine sample in China [23]. As indicated before, *Efae*-HEB2 derives from a clinical sample and belonged to ST585 p*Efae*-HEB2-2 contains most of the resistance genes detected in the Spanish isolate, which are distributed into three clusters (Figure 2B). The largest cluster, found adjacent to IS1216, carries a wealth (13) of acquired resistance genes responsible for aminoglycoside resistance [*aac*(6′)-*aph*(2′′), *aadE*\_1, *apt*, *spw*, *ant*(6)-1*a*, *sat4* and *aph*(3′)-III*a*], and for the MLS [*erm*(B)\_2 and *erm*(B)\_3], LS<sub>AP</sub> [*lsaE*] and L [*lmu*(B)] phenotypes. Diverse multi-resistance gene clusters containing the *lsa*(E) and *lmu*(B) genes, which encode an ABC-F type ribosomal protection protein and a lincosamide nucleotidyltransferase, responsible for the LS<sub>AP</sub> and L phenotypes, respectively, are widely distributed in the chromosome or plasmids of Gram-positive bacteria, including *E. faecalis* [28]; (accession numbers AF408195 and MK465702). In the present study, they were also detected in p*Efae*-HEB3 as well as in the chromosome of *Efae*-HEB1, both displaying the *aadE*, *apt*, *spw*, *lsa*(E), *lmu*(B), *ant*(6)-1*a* configuration (not shown). In p*Efae*-HEB2-2, the IS1216 element upstream of *erm*(B)\_2 separates the major resistance cluster from the *dfrG* gene conferring trimethoprim resistance. Additionally, a third *erm*(B) gene and a second *aadE* gene [*erm*(B)\_3 and *aadE*\_2] are found close to the *rep9a* and *rep7a* replicons, respectively.



**Figure 2.** Structure of two resistance plasmids found in *Enterococcus faecalis* Efae-HEB2. (A) Plasmid pEfae-HEB2-1. (B) Plasmid pEfae-HEB2-2. Open reading frames are represented by arrows indicating the direction of transcription and having different fillings according to their function: yellow, plasmid replication, maintenance and segregation; orange, conjugative transfer; blue, DNA metabolism including transposition; red, resistance; other, other; grey, unknown.

Apart from the above mentioned resistance genes, tetracycline [*tet*(M) and *tet*(L), encoding a ribosome protective protein and a efflux protein of the major facilitator superfamily, respectively] and chloramphenicol (*cat*, encoding a chloramphenicol acetyltransferase) resistance genes were also carried by p*Efae*-HEB2-2. In Gram positive bacteria, *tet*(M) is often carried by conjugative transposons of the Tn*916* family, which can also harbor other antimicrobial resistance genes [29]. For instance, *tet*(L) and *cat* can co-reside with *tet*(M) in Tn*6248* (25,963 bp; GenBank accession no. KP834592), which shares a large part of its sequence with Tn*916* (18,032 pb). In p*Efae*-HEB2-2 these genes are carried by a truncated version of Tn*6248* (18,727 bp), in which the responsible for transposition, as well as for insertion and excision of the transposon are missing. Identical or nearly identical deleted variants of Tn*6248* were found in pE508-2 (GenBank accession no. MK465702), and p10-2-2 [17], respectively.

Taken together, results in this section reveal the presence of two plasmids in *Efae*-HEB2, one harboring the *optrA* gene conferring resistance to last-resort oxazolidinones, and the other carrying a wealth of genes encoding resistance to many other classes of antibiotics, arranged in a novel configuration. Although a closely related plasmid was found in a single ST256 isolate from a fecal swine sample in China, this is the first time the plasmid is detected in Europe, specifically in a clinical isolate with ST585. Therefore, these results provide evidence that the plasmid has already spread into different environments and clones.

### 3.5. Conclusions

*E. faecalis* could serve as a reservoir of the *optrA* gene, which is mainly located in plasmids and could be horizontally disseminated not only between members of this species but also to other MDR pathogens, such as *E. faecium*, including vancomycin resistant isolates. This would mimic the transfer of the *cfi* gene from coagulase-negative staphylococci into methicillin-resistant *S. aureus* [12,30]. *E. faecalis optrA*-positive isolates are usually susceptible to beta-lactams, which are still therapeutic alternatives to treat the infections they cause. However, the presence of a second plasmid in *Efae*-HEB2 carrying multiple resistance genes could jeopardize this favorable situation. So, prompt detection and surveillance of transferable oxazolidinone-resistance genes among enterococci, particularly in the context of MDR, are crucial to avoid their spread in hospital settings, especially in those where VRE are endemic, in order to preserve the efficacy of these last-resort antibiotics.

**Supplementary information accompanies this paper: Table S1, Table S2.**

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

### References

1. Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:113–9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2003.11.003
2. Mendes RE, Deshpande L, Streit JM, Sader HS, Castanheira M, Hogan PA, *et al.* ZAAPS programme results for 2016 : an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1880–7. doi: 10.1093/jac/dky099



3. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2530–3. doi: 10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000
4. Antonelli A, Andrea MMD, Brenciani A, Galeotti CL, Morroni G, Pollini S, *et al.* Characterization of *poxtA*, a novel phenicol – oxazolidinone – tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1763–9. doi: 10.1093/jac/dky088
5. Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, *et al.* A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2182–90. doi: 10.1093/jac/dkv116
6. Sadowy E. Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid* [Internet] 2018;99:89–98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.011>doi: 10.1016/j.plasmid.2018.09.011
7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019
8. Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Boga JA, López-Amor L, Forcelledo L, Lázaro-López E, *et al.* Nosocomial ventriculitis caused by a meticillin- and linezolid-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in neurosurgical patients. *J Hosp Infect* 2018;100:406–10. doi: 10.1016/j.jhin.2018.02.011
9. Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Càmarà J, Domínguez MÁ, Alaguero M, Fernández J. Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital. *J Hosp Infect* [Internet] 2019;doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.013>doi: 10.1016/j.jhin.2019.10.013
10. Vielva L, de Toro M, Lanza VF, Cruz F De. PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* 2017;33:3796–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btx462
11. Jensen LB, Garcia-Migura L, Valenzuela AJS, Løhr M, Hasman H, Aarestrup FM, *et al.* A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* [Internet] 2010;80:25–43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.10.012>doi: 10.1016/j.mimet.2009.10.012
12. Deshpande LM, Castanheira M, Flamm RK, Mendes RE. Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:2314–22. doi: 10.1093/jac/dky188
13. Argudín MA, Youzaga S, Dodémont M, Heinrichs A, Roisin S, Deplano A, *et al.* Detection of *optrA*-positive enterococci clinical isolates in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:985–7 doi: 10.1007/s10096-019-03504-3
14. Càmarà J, Camoez M, Tubau F, Pujol M, Ayats J, Ardanuy C, *et al.* Detection of the novel *optrA* gene among linezolid-resistant enterococci in Barcelona, Spain. *Microb Drug Resist* 2019;25:87–93. doi: 10.1089/mdr.2018.0028
15. Elghaieb H, Freitas AR, Abbassi MS, Novais C, Zouari M, Hassen A, *et al.* Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxtA* or *optrA* in

- retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:2865–9. doi: 10.1093/jac/dkz263
16. Sassi M, Guérin F, Zouari A, Beyrouthy R, Auzou M, Fines-Guyon M, *et al.* Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in enterococci from France, 2006–16. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1469–72. doi: 10.1093/jac/dkz097
17. He T, Shen Y, Schwarz S, Cai J, Lv Y, Li J, *et al.* Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* [Internet] 2016;71:1466–73. doi: <http://www.jac.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jac/dkw016>doi: 10.1093/jac/dkw016
18. Cai J, Wang Y, Schwarz S, Lv H, Li Y, Liao K, *et al.* Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010–2014. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:1095.e1–4. doi: 10.1016/j.cmi.2015.08.007
19. Zou J, Tang Z, Yan J, Liu H, Chen Y, Zhang D, *et al.* Dissemination of linezolid resistance through sex pheromone plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Front Microbiol* 2020;11:1185. doi: 10.3389/fmicb.2020.01185
20. Moure Z, Lara N, Marin M, Sola-Campoy P, Bautista V, Gómez-Bertomeu F, *et al.* Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxTA* genes. *Int J Antimicrob Agents* 2020;doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105977
21. Ruiz-Ripa L, Feßler AT, Hanke D, Eichhorn I, Azcona-Gutiérrez JM, Pérez-Moreno MO, *et al.* Mechanisms of linezolid resistance among enterococci of clinical origin in Spain—detection of *optrA*-and *cfi(D)*-carrying *E. faecalis*. *Microorganisms* 2020;8:1–17. doi: 10.3390/microorganisms8081155
22. Cui L, Wang Y, Lv Y, Wang S, Song Y, Li Y, *et al.* Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* spp. Isolates in China from 2004–2014. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:7490–3. doi: 10.1128/AAC.01256-16
23. Shang Y, Li D, Shan X, Schwarz S, Zhang S, Chen Y, *et al.* Analysis of two pheromone-responsive conjugative multiresistance plasmids carrying the novel mobile *optrA* locus from *Enterococcus faecalis*. *Infect Drug Resist* 2019;12:2355–62.
24. Morroni G, Brenciani A, Simoni S, Vignaroli C, Mingoia M, Giovanetti E. Commentary: Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014. *Front. Microbiol* 2017;8:1–5. doi: 10.1128/AAC.01256-16
25. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>. 2019;
26. Bender JK, Fleige C, Klare I, Werner G. Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cfi*, *optrA* and *poxTA* in enterococci of clinical origin. *J Microbiol Methods* [Internet] 2019;160:101–3. doi: 10.1016/j.mimet.2019.03.025
27. Hao W, Shan X, Li D, Schwarz S, Zhang S, Li X, *et al.* Analysis of a *poxTA* - and *optrA* -co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1771–5. doi: 10.1093/jac/dkz109
28. Si H, Zhang W, Chu S, Wang X, Dai L, Hua X, *et al.* Novel plasmid-borne multidrug resistance gene cluster

including *lsa(E)* from a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolate of swine. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7113–6. doi: 10.1128/AAC.01394-15.Address

29. Roberts AP, Mullany P. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:856–71. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x

30. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM, Pichon B, Kinnevey PM, Earls MR, *et al.* Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother* 2018;72:3252–7. doi: 10.1093/jac/dkx292

Table S1. Oligonucleotides used for the assembly of plasmid pEfae-HEB2-1

Name	Sequence (5'-3')
optrA-1*	TACTTGATGAACCTACTAACCA
optrA-2*	CCTTGAAGTACTGATTCTCGG
optrA-IS1216	CTGTCGTTGCAGAACCAGATTC
IS1216-F	CCCGAAAAGAAGGCACTCTCTTC
IS1216-R	GTATGAGAAACGTTAATGCCACG
00002-R	TGGTCGTGCATAACAGCCTATC
pcfK-R	GGCGAACTGATATAGCCTTGT
arsR-F	CGACGTTATAGTCAGGGTGTGT
traM-F	CGAAACGCACTCGAATGGTTAC
00002-F	GATAGGCTGTTATGCACGACCA
IS1216-rec	GTGTCTCTATTTGCACAGTCTAG
03605-F	GCAAGGACACACAACACTACAGCA
03595-F	ATGTCGTTGGTTATCGCACCGA
03595-R	AGGAGAAGGCAAGGGAAACAAC
asa1-F	AACCTCTAGGTCAGCCAACAGA
prgB-R1	CCCTGTATAGGTCAGTCTACT
prgB-F1	AGTGACAGTGACCTATACAGGG
prgB-R2	GTAGCGAAACTGCCAACTGT
arsR-F	ATTGGACGAGAAGTAGAGTGGC

Brenciani A., Morroni G., Vincenzi C., Manso E., Mingoia M., Giovanetti E., Varaldo P.E. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(4):1118-9. doi: 10.1093/jac/dkv438. Epub 2015 Dec 24.

## RESULTADOS

Table S2. Oligonucleotides used for the assembly of plasmid pEfae-HEB2-2

<b>Name</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
repB-F	CGAACAGAAGGGACGACTGCTA
00046-F	GAACCAGAGCAACGTACAATGT
00046-ermB	AAGGAGGGATTTCGTCATGTTGG
00046-ermB	CCAACATGACGAATCCCTCCTT
ermB AM-like-00024	CCGAGCGCTTAGTGGGAATTTG
parA-R	TCCTTCTCCATAACTACGCCCC
parA-R2	ACCGATCATATCTAGTCCAGGG
0045-F-0022-F	GTGATTGTGGGAAATTTAGGCG
drfG-F	CAATCGGAAGAGCCTTACCTGAC
IS1216-F	CCCGAAAAGAAGGCACTCTCTTC
IS1216-R2	GAAGAGAGTGCCTTCTTTTCGGG
IS1216-F2	CGTGGCATTACGTTTCTCATACT
IS1216-R	GTATGAGAAAACGTTAATGCCACG
00017-R	TTAGCCGTCATTTTCAGCACTCG
00017-F	CGAGTGCTGAAATGACGGCTAA
aac(A)- aph(D)-R	ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTG
sat4-F	AATCGGCTCCGTCGATACTATG
aph(3')-IIIa-F	AGTGCATCAGGCTCTTTCCTC
aph(3')-IIIa-ermB	ACATCCGCAACTGTCCATACTC
ermB-abiV	TTTGCTGCACTTAGAACACCGC
abiV-F	CACGATTACCTGAAGTCATTGG
abiV-R	CCAATGACTTCAGGTAATCGTG
abiV-00104-1	TCCACACCCTATCAACGCATAC
abiV-00104-2	GAAGGCAACTGCTTAGATTATCGG
00103-F	GGCATGGCTGAATTTGATGTCG
00088-R	TTACGTCTATCCCACGCATCTG
00086-F	AGGCACAACACCAGAAACGATC



# Objetivo 4.1: Artículo 6

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 91 (2018) 205–209



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)

Bacteriology

## Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures

Carlos Rodríguez-Lucas<sup>a,b,c</sup>, M. Rosario Rodicio<sup>a,c</sup>, Isabel Costales<sup>b,c</sup>,  
José Antonio Boga<sup>b,c</sup>, Fernando Vazquez<sup>b,c,d</sup>, Javier Fernández<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias<sup>c</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias<sup>d</sup> Instituto Universitario Oftalmológico Fernández-Vega

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 October 2017

Received in revised form 9 February 2018

Accepted 10 February 2018

Available online 14 February 2018

## Keywords:

Blood stream infection  
Gram-negative bacilli  
Extended spectrum  $\beta$ -lactamases  
Carbapenemases  
Multiplex PCR  
Microarray

## ABSTRACT

Blood stream infections are serious conditions associated with high morbi-mortality. In this study, the new Sepsis Flow Chip (SFC) assay for identification of Gram-negative bacteria and their antimicrobial resistance genes was evaluated in positive blood cultures (BCs). SFC is a microarray with a broad panel comprising the most frequent causative agents of sepsis and antimicrobial resistance genes associated with them. A total of 100 prospective BCs, positive for Gram-negative bacilli, were assessed in the routine of the clinical microbiology laboratory and also applying the SFC assay. Moreover, 19 BCs spiked with well-characterized enterobacterial isolates, harboring antimicrobial resistance genes, were analyzed by the latter. Among the monomicrobial BCs (90), the concordance between SFC identification and the reference method was 94.4%; however, it achieved 100% when SFC was combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry after 4-h incubation. Regarding polymicrobial BCs (10), 15 out of the 22 bacteria present (68.2%) were correctly identified, including all contained in 50% of the cultures. With regard to antimicrobial resistance genes, 98.8%, 98.9%, and 99% concordance was obtained for *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub>, respectively, in comparison with polymerase chain reaction amplification. SFC assay gives results in only 4 h and showed a high concordance rate with the reference method. Although further evaluation studies are necessary, SFC assay implementation, together with antimicrobial stewardship programs, could contribute to improve the therapeutic approaches and to reduce the morbi-mortality, length of hospital stay, and healthcare-associated costs in patients with sepsis.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Due to the severity of blood stream infections (BSIs), correct identification of the etiologic agent and prompt instauration of effective therapy can be critical for the patient (Huang et al., 2013; Ledebuer et al., 2015; Salimnia et al., 2016). It is well known that correct antimicrobial treatment in the first 6 h is pivotal to reduce morbi-mortality in septic patients (Opota et al., 2015a). However, the reference methodology, both for identification (ID) and for antimicrobial susceptibility testing (AST), is based on subculture of positive blood cultures (BCs), followed by phenotypic tests which frequently delay by 18–48 h the definitive diagnosis of BSI and the correct patient's management (Salimnia et al., 2016; Zboromyrska et al., 2015). For this reason, new technologies, such as those based on matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) or real-time polymerase chain reaction (PCR), have been developed for rapid bacterial ID and AST in positive BCs (Fernández et al., 2016; Galiana et al., 2017; Ledebuer et al., 2015). Among these tests, the Sepsis Flow Chip (SFC) (Master Diagnóstica, Granada, Spain) was recently implemented to detect the most frequent causative agents of BSI and the most common resistance determinants associated with them. The SFC is based on multiplex PCRs followed by automatic reverse hybridization with a large panel of microbial (Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, and *Candida* spp.) and antimicrobial resistance gene targets.

Gram-negative bacilli (GNB), especially those belonging to Enterobacteriaceae, are among the most common microorganisms involved in sepsis (Fernández et al., 2016; Opota et al., 2015b). The emergence of GNB harboring relevant resistance mechanisms, such as extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and carbapenemases, has complicated the empirical treatment of this syndrome (Fernández et al., 2016; Salimnia et al., 2016). In fact, according to recent studies, more than

\* Corresponding author. Tel.: +34-985108000.  
E-mail address: javifdom@gmail.com (J. Fernández).

**Table 1**  
Bacterial identification and antimicrobial resistance gene detection from clinical blood-cultures comparing the reference method and the Sepsis Flow Chip

N	MALDI-TOF MS and MicroScan (after subculture)	MALDI-TOF MS/4h <sup>a</sup>	Sepsis Flow Chip		Confirmatory PCR for antimicrobial resistance genes <sup>d</sup>
			Identification	Resistance gene	
1	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	(-) <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
1	<i>Ae. hydrophila</i>	<i>Ae. hydrophila</i>	(-)	(-)	
1	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>	Enterobacteriaceae	(-)	
34	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	(-)	
2	<i>E. coli</i> (AMP resistant)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> non-ESBL
3	<i>E. coli</i> ESBL	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
2	<i>E. coli</i> ESBL	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>
1	<i>E. coli</i> ESBL <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
1	<i>E. coli</i> CP	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
3	<i>En. cloacae</i>	<i>En. cloacae</i>	Enterobacteriaceae	(-)	
1	<i>En. kobei</i>	<i>En. kobei</i>	Enterobacteriaceae	(-)	
8	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> non-ESBL
2	<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> ESBL
1	<i>K. pneumoniae</i> (ESBL and CP)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> ESBL/ <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
1	<i>K. pneumoniae</i> (ESBL and CP)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> non-ESBL/ <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
1	<i>K. variicola</i>	<i>K. variicola</i>	<i>K. pneumoniae</i>	(-)	
1	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani</i>	<i>Proteus</i> spp.	(-)	
1	<i>M. morgani</i> ESBL <sup>c</sup>	<i>M. morgani</i>	(-)	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
5	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus</i> spp.	(-)	
1	<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Enterobacteriaceae	(-)	
5	<i>Se. marcescens</i>	<i>Se. marcescens</i>	<i>Se. marcescens</i>	(-)	
1	<i>Se. marcescens</i>	<i>Se. marcescens</i>	<i>Se. marcescens</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
8	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	(-)	
1	<i>Ps. aeruginosa</i>	(-)	<i>Ps. aeruginosa</i>	(-)	
1	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	(-)
1	<i>Ps. putida</i>	<i>Ps. putida</i>	(-)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
1	<i>Pa. multocida</i>	<i>Pa. multocida</i>	(-)	(-)	
1	<i>St. maltophilia</i>	<i>St. maltophilia</i>	<i>St. maltophilia</i>	(-)	
1	<i>E. coli</i> and <i>Ae. caviae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	(-)	
1	<i>E. coli</i> and <i>Ec. faecium</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> and <i>Enterococcus</i> spp.	(-)	
2	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>E. coli bla</i> <sub>SHV</sub> negative and <i>K. pneumoniae bla</i> <sub>SHV</sub> non-ESBL
1	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>E. coli bla</i> <sub>SHV</sub> negative and <i>K. pneumoniae bla</i> <sub>SHV</sub> non-ESBL
1	<i>E. coli</i> and <i>M. morgani</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	(-)	
1	<i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Ec. casseliflavus</i> and <i>Str. anginosus</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	(-)	
1	<i>E. coli</i> ESBL and <i>Ec. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>
1	<i>M. morgani</i> and <i>E. faecalis</i>	<i>M. morgani</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
1	<i>K. pneumoniae</i> ESBL and <i>St. maltophilia</i>	<i>St. maltophilia</i>	<i>K. pneumoniae</i> and <i>St. maltophilia</i>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>K. pneumoniae bla</i> <sub>SHV</sub> ESBL and <i>St. maltophilia bla</i> <sub>SHV</sub> negative

N, number of isolates; A, Acinetobacter; Ae, Aeromonas; C, Citrobacter; E, Escherichia; En, Enterobacter; K, Klebsiella; M, Morganella; P, Proteus; S, Salmonella; Se, Serratia; Ps, Pseudomonas; Pa, Pasteurella; St, Stenotrophomonas; Ec, Enterococcus; Str, Streptococcus; AMP, ampicillin; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; CP, carbapenemase-producing.

<sup>a</sup>MALDI-TOF MS performed after 4 h of incubation.

<sup>b</sup>*A. baumannii* OXA-51–positive result without identification result is presumptive of *A. baumannii* according to SFC manufacturer's instructions.

<sup>c</sup>Shaded genes highlight the discordant results.

<sup>d</sup>PCR performed from isolates recovered from positive samples to confirm antimicrobial resistance genes detected by Sepsis Flow Chip.

<sup>e</sup>MIC of ERT ≤0.5 mg/L.

one-third of the patients with sepsis are under ineffective empiric antimicrobial therapy (Ledebøer et al., 2015), thus incrementing the mortality rate from 10% to almost 40% (Salimnia et al., 2016). Taking this into account, the present study aimed to evaluate the new SFC for Gram-negative bacteria directly applied to BCs positive for GNB obtained at a tertiary Spanish hospital.

## 2. Material and methods

All BCs that proved to be positive for GNB according to Gram staining were prospectively collected over a 2-month period (February–March 2017) in the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA, Spain). A single BC bottle per patient was included in the study.

**Table 2**  
Sepsis Flow Chip results from spiked blood cultures

N	Species and resistance genes	Sepsis Flow Chip	
		Identification	Resistance genes
1	<i>En. asburiae bla<sub>KPC</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>NMC1</sub>/bla<sub>IM1</sub></i> <sup>b</sup>
1	<i>En. cloacae bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
1	<i>En. cloacae bla<sub>OXA-48</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>
1	<i>En. cloacae bla<sub>CTX-M-15</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>OXA-48</sub>/bla<sub>GES</sub></i> <sup>b</sup>
1	<i>E. coli bla<sub>CTX-M-15</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>E. coli</i>	<i>bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>
1	<i>E. coli bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>E. coli</i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>KPC</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>KPC</sub></i>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>NDM</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>NDM</sub></i>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>SHV-13</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>CTX-M-15</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>OXA-48</sub>/bla<sub>GES</sub></i> <sup>b</sup>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>VIM</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>VIM</sub>/bla<sub>OXA-23</sub></i>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>VIM</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>VIM</sub>/bla<sub>GES</sub></i> <sup>b</sup>
1	<i>K. pneumoniae bla<sub>VIM</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>VIM</sub>/bla<sub>OXA-48</sub></i>
1	<i>P. mirabilis bla<sub>CTX-M-32</sub></i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
1	<i>S. enterica bla<sub>CTX-M-10</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
1	<i>S. enterica bla<sub>CTX-M-14</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
1	<i>S. enterica bla<sub>SHV-12</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>SHV</sub></i>
1	<i>S. enterica bla<sub>SHV-2</sub></i>	Enterobacteriaceae	<i>bla<sub>SHV</sub></i>

N, number of isolates; En, *Enterobacter*; E, *Escherichia*; K, *Klebsiella*; P, *Proteus*; S, *Salmonella*.  
<sup>a</sup> Shaded genes highlight the discordant results.  
<sup>b</sup> *bla<sub>NMC/IMI</sub>* and *bla<sub>GES</sub>* genes were confirmed by PCR.

BCs were performed as part of routine practice in the Clinical Microbiology Laboratory of the HUCA using the Plus Aerobic/F BCs Plastic Bottles and the BD BACTEC FX system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). After subculture, bacterial ID was determined by MALDI-TOF MS (MicroflexTM; Bruker Daltonik GmbH, Bremen Germany). AST was done with the MicroScan System (MicroScan; Beckman Coulter, CA, USA), and results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

In parallel and as an objective of the present study, SFC assays were batch-performed directly on the positive BCs following the manufacturer's instructions (Master Diagnóstica). Briefly, 10 µL of each positive BC bottle was diluted 1/100 with distilled water, and 4 µL of this dilution was used for the amplification reaction and the reverse hybridization assay performed in an external thermal cycler and the hibrySpot HS24 platform, respectively. In addition, 200 µL of each positive BC was inoculated in a Mueller–Hinton plate (Becton Dickinson, Sparks, MD), and after 4-h incubation, MALDI-TOF MS identification was done as previously described (Fernández et al., 2016).

Antimicrobial resistance genes detected by SFC were confirmed by PCR amplification using primers specific for *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>* group, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* group, *bla<sub>GES</sub>*-like, *bla<sub>KPC</sub>*-like, *bla<sub>NDM</sub>*-like, *bla<sub>NMC/IMI</sub>*-like, *bla<sub>OXA-23</sub>*-like, *bla<sub>OXA-48</sub>*-like, *bla<sub>OXA-51</sub>*-like, and *bla<sub>VIM</sub>*-like, as reported (Bogaerts et al., 2010; Fernández et al., 2014; Nüesch-Inderbinen et al., 1996; Poirel et al., 2011; Turton et al., 2006; Voets et al., 2011). *bla<sub>SHV</sub>* amplicons were digested with the restriction enzyme *NheI* to discriminate between non-ESBL- and ESBL-SHV-encoding genes (Nüesch-Inderbinen et al., 1996).

In order to evaluate the ability of SFC to detect resistance genes other than those present in the BC samples under study, the aforementioned protocols were also applied to blood spiked with a collection of 19 previously characterized enterobacterial isolates producing diverse β-lactamases and carbapenemases. For each bacterium, vials containing

10 mL of sterile total human blood were inoculated with 10<sup>3</sup> CFU, as previously reported (Fernández et al., 2016).

### 3. Results

A total of 100 positive BCs, detected during the study period, were subjected to routine and SFC assays; 90 and 10 were monomicrobial and polymicrobial cultures, respectively (Table 1). Among the monomicrobial BCs, the most frequent bacteria identified by MALDI-TOF MS/Microscan after subculture (here used as reference method) were *Escherichia coli* (43/90; 47.8%), *Klebsiella pneumoniae* (12/90; 13.3%), and *Pseudomonas aeruginosa* (10/90; 11.1%), followed by *Serratia marcescens* (6/90; 6.7%), *Proteus mirabilis* (5/90; 5.6%), *Enterobacter cloacae* (3/90; 3.3%), *Morganella morganii* (2/90; 2.2%), and several other species each with a single isolate (1/90; 1.1%): *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *En. kobei*, *K. variicola*, *Pasteurella multocida*, *Ps. putida*, *Salmonella* spp., and *Stenotrophomonas maltophilia* (Table 1). In 85 out of the 90 monomicrobial BCs, bacterial identification by the direct SFC assay was in agreement with the reference method. This accounts for 94.4% of the present bacteria (and of the BCs). However, it should be indicated that *C. freundii*, *En. cloacae*, *En. kobei*, and *Salmonella* spp. were only identified as Enterobacteriaceae; a single isolate of the novel species *K. variicola* was identified as *K. pneumoniae* and accepted as correct because it belongs to one of the *K. pneumoniae* phylogenetic groups (KpIII) (Hæggen et al., 2004; Rosenblueth et al., 2004), and, although the single *A. baumannii* isolate found in the present study was not detected by SFC, the manufacturer's instructions indicate that a *bla<sub>OXA-51</sub>*-positive result, like that observed herein (see below), allows presumptive identification of this species. The five isolates which could not be identified correspond to bacteria that are not targeted by the kit (*Ae. hydrophila*, *Pa. multocida*, and *Ps. putida*; see Supplemental Table 1) or to detection failure in the case of



*M. morgani* which was either not identified or misidentified as *Proteus* spp. It is finally of note that all isolates contained in monomicrobial BCs were correctly identified when SFC was combined with MALDI-TOF after 4-h subculture, the time needed to obtain the SFC results. In the case of polymicrobial BCs, the SFC identified all bacteria present in 5 out of the 10 bottles (50%) (Table 1). In the remaining BCs, a single bacterium was identified either because the kit lacks the corresponding probes (*Ae. caviae*, *Ec. casseliflavus*, and *Str. anginosus*; Supplemental Table 1) or because of detection failure (Table 1). In all polymicrobial BCs, 15 out of the 22 bacteria present (68.2%) were correctly identified. In contrast, just a single bacterium was identified by MALDI-TOF in each of the polymicrobial BCs, so the SFC performance was comparatively better.

With regard to antimicrobial resistance determinants (Table 1), the most commonly found was *bla*<sub>SHV</sub>, identified in 18/100 BCs; 14 genes corresponded to non-ESBL-SHV and four to ESBL-SHV producers. *bla*<sub>CTX-M</sub> was detected in 11/100 BCs, 8 of them belonging to the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> group and 3 to the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group. Concerning carbapenemase-encoding genes, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> was identified in 5/100 BCs, while *bla*<sub>OXA-23</sub> together with *bla*<sub>OXA-51</sub> or *bla*<sub>VIM</sub> was found in single isolates of *A. baumannii* and *Ps. putida*, respectively. Among the monomicrobial BCs, 26/90 were positive for at least 1 of the resistance genes included in the SFC (Supplemental Table 1), and all but a single *bla*<sub>CTX-M</sub> gene in a *Ps. aeruginosa* isolate were confirmed by specific PCR (Table 1). Due to the discordance with the antimicrobial resistant phenotype obtained by AST, the sample positive for *Ps. aeruginosa* and *bla*<sub>CTX-M</sub> was reanalyzed by SFC, and a negative result for the resistance gene was obtained after repetition. All other ESBL or carbapenemase phenotypes revealed by MicroScan were in agreement with the SFC assay. Interestingly, an ESBL-producing *E. coli* and an ESBL-producing *M. morgani* harboring *bla*<sub>OXA-48-like</sub> did not express a carbapenemase phenotype (ertapenem MICs of  $\leq 0.5$  mg/L), so they were not detected in the laboratory AST routine. Regarding the polymicrobial BCs, 6 out of 10 were positive for some of the SFC-targeted resistance genes, with 2 of them being false positives (Table 1).

Finally, most of the ESBL- and carbapenemase-encoding genes represented in the spiked blood cultures were detected by the SFC (Table 2). In fact, only two discordant results were obtained: a false-positive *bla*<sub>OXA-23</sub> amplicon was generated for a VIM-producing *K. pneumoniae*, and a *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase gene could not be identified in an *En. asburiae* isolate. Interestingly, a *bla*<sub>NMC/IMI</sub> gene was found in the same isolate and further confirmed by PCR, although this gene had not previously been detected. Similarly, one *En. cloacae* and two *K. pneumoniae* isolates were positive by SFC for previously undetected *bla*<sub>GES</sub> genes, which were again confirmed by PCR.

#### 4. Discussion

Rapid bacterial identification and detection of antimicrobial resistance genes from positive BCs are essential to ensure prompt instauration of sepsis treatment with the adequate antimicrobial agents, which can in turn contribute to reduce broad-spectrum antimicrobial's usage and to limit resistant strain selection (Fiori et al., 2016; Huang et al., 2013; Opota et al., 2015a, 2015b). Several methods for bacterial identification and detection of antimicrobial resistance from positive BCs have been developed in the last years. Most of them are based on different technologies, such as MALDI-TOF MS, PCR, microarrays, or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Fernández et al., 2016; Galiana et al., 2017; Huang et al., 2013; Ledebøer et al., 2015; Opota et al., 2015b; Salimnia et al., 2016). SFC provides results in 3–4 h after BCs positivity. Although some other technologies, like MALDI-TOF or FISH, provide results in a shorter time, these techniques are mainly focused on microbial identification (Huang et al., 2013; Opota et al., 2015a, 2015b). Other PCR-based methods designed for direct performance on positive BCs give results in 1–2 h, including data of both microbial identification

and antimicrobial resistance genes. However, some of these platforms are designed for the detection of a single bacteria, for instance, Xpert MRSA/SA BC, while others like Filmarray only detect a very limited number of antimicrobial resistance genes, like *mecA*, *vanA/B*, and *bla*<sub>KPC</sub>, in addition to bacterial identification (Opota et al., 2015a, 2015b; Salimnia et al., 2016). The closest platform to SFC is the Verigene microarray, which can provide results in about the same time but only targets eight Gram-negative bacteria and six antimicrobial resistance genes (Ledebøer et al., 2015; Opota et al., 2015a, 2015b). Thus, among these methods, the SFC microarray has the more complete panel for both bacterial identification of the most common causative agents of sepsis and detection of highly relevant resistance genes in a single assay.

In this study, 85 out of 87 pathogens in monomicrobial and 15 out of 19 in polymicrobial BCs represented in the SFC panel were correctly identified, yielding 97.7% and 78.9% concordance with the reference method (MALDI-TOF MS/Microscan), respectively. However, considering all bacteria recovered in this study (including those targeted and untargeted by the SFC panel), 94.4% concordance and 68.2% concordance were obtained with the reference method for monomicrobial and polymicrobial BCs, respectively. The different concordance rates were due to the absence of the corresponding probes for 6 out of 112 pathogens (5.4%) in 3 and 2 monomicrobial and polymicrobial BCs.

According to the manufacturer instructions, SFC detects *M. morgani* and *Proteus* spp. using the same probe (PROT/MOR) but differentiates them by using the "Enterobacteriaceae" probe, which has to be positive for *M. morgani* and negative for *Proteus* spp. In the present study, *M. morgani* was misidentified as *Proteus* spp. in one of the samples due to the negative result with the "Enterobacteriaceae" probe. Other samples which were positive for *M. morgani* by conventional culture were negative for the PROT/MOR probe, which resulted in no detection of the bacterium. In a previous evaluation of the SFC, these discrepancies in *M. morgani* identification/detection were not reported, but a single BC with *M. morgani* was included (Galiana et al., 2017). Additional studies are necessary to evaluate the ability of SFC to detect *M. morgani* in positive BCs and to improve the kit if necessary.

Regarding antimicrobial resistance detection, 98.8%, 98.9%, and 99% concordance was achieved for CTX-M, OXA-48, and VIM resistance markers compared with PCR amplification, respectively. Although 100% concordance was obtained for *bla*<sub>SHV</sub> when compared with the specific PCR, only 4 out of 18 pathogens positive for the gene were ESBL-SHV producers. The lack of discrimination between ESBL- and non-ESBL-SHV producing Enterobacteriaceae is an important limitation of the SFC since they involve completely different therapeutic approaches. This distinction requires additional techniques, such as enzyme digestion or sequencing of the PCR amplicons (Ledebøer et al., 2015; Nüesch-Inderbinen et al., 1996). Recently, Master Diagnostica has developed a new SHV probe, which is able to discriminate between ESBL- and non-ESBL-SHV isolates. This probe will be included in a second generation of the AMR Direct Flow Chip, which is currently manufactured for the detection of resistance markers in both (BCs) and rectal swabs. Until now, SFC has only been evaluated in clinical BCs by Galiana et al. (2017), who included a high number and diversity of isolates but a low diversity of resistance genes (only seven *bla*<sub>CTX-M</sub>, two *bla*<sub>SHV</sub>, and no carbapenemase-encoding genes were represented). The present study comprises a wide variety of bacterial species contained in both clinical and spiked samples and harboring many different antimicrobial resistance genes. The SFC assay showed a high concordance with the reference method for bacterial identification in the case of monomicrobial BCs, as already reported by Galiana et al. (2017). In fact, the combination of SFC with MALDI-TOF after 4-h subculture provides fast and very reliable bacterial identification together with rapid detection of resistance genes. Moreover, MALDI-TOF MS identification after 4-h subculture allowed the differentiation of bacterial species targeted by the SFC-Enterobacteriaceae probe. This could be relevant, for instance, for detection of chromosomal-AmpC-producing Enterobacteriaceae, such as *Enterobacter* spp. or *C. freundii*. In comparison

with monomicrobial BCs, a lower concordance was obtained for polymicrobial BCs identification, which still remains a challenge for microarrays, MALDI TOF MS, and other technologies, as previously reported (Fernández et al., 2016; Fiori et al., 2016; Ledebøer et al., 2015; Salimnia et al., 2016).

With regard to antimicrobial resistance genes, three false-positive results were obtained. All of them were probably due to contamination at sample collection or to cross-contamination during the SFC assay since the presence of the genes could not be confirmed by PCR. Moreover, due to the low prevalence of *bla*<sub>KPC</sub>-producing Enterobacteriaceae in our country (Oteo et al., 2015), just two isolates could be tested in a spiked bottle, with only one of them detected by SFC. Consequently, further studies are necessary to evaluate the possibility of *bla*<sub>KPC</sub> detection by SFC in positive BCs. Furthermore, a negative result for a resistance gene by the SFC assay does not exclude the presence of other resistance genes which are not represented in the panel, so AST performed after subculture of the BCs bottle will be still necessary.

On the contrary, as an important advantage, the SFC assay detected *bla*<sub>OXA-48</sub> in single isolates of *E. coli* and *M. morgani* that would have not been identified as carbapenemase producers by the laboratory routine AST. According to our records, the patient infected with *E. coli* was not previous colonized by a carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. However, a week after the BSI episode, a rectal swab collected from the same patient tested positive for an ESBL- and OXA-48-producing *K. pneumoniae*, with reduced susceptibility to carbapenems. This supports the convenience of genotypic detection of resistance mechanisms in phenotypic sensitive bacteria for the clinical management of infected patients, a point that is still subject to debate (Tuite et al., 2014). Another advantage of SFC is the capacity to identify the novel *K. variicola* as *K. pneumoniae*, in contrast to the false-negative results obtained with other microarrays (Ledebøer et al., 2015). Moreover, identification of *K. pneumoniae* together with a *bla*<sub>SHV</sub>-negative result strongly supports the presence of *K. variicola* due to the association between *K. pneumoniae* phylogenetic groups and chromosomal β-lactamase genes (Hæggman et al., 2004).

In conclusion, SFC assay combined with MALDI-TOF MS after 4-h incubation showed a high concordance rate with the reference method for both identification and resistance gene detection in positive BCs bottles. The large SFC panel enables the prompt identification of the most frequent causative agents of sepsis and also of the more common antimicrobial resistance genes associated with them, particularly CTX-M and carbapenemase-encoding genes. Although the SFC requires low working hand and manipulation of the samples, giving results in only 4 h, it is optimized when performed in batch, so clinical microbiology laboratories could decide “how” and “when” would be worthwhile to implement the SFC assay in the routine workflow. Although further improvement would be convenient, early bacterial identification and detection of highly relevant antimicrobial resistance genes by implementation of the SFC assay in clinical microbiology laboratories, together with antimicrobial stewardship programs, could contribute to improve the therapeutic approaches and to reduce the morbidity and healthcare-associated costs in patients with sepsis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.004>.

#### Acknowledgments

We thank Master Diagnóstica for the supply of Sepsis Flow Chip used in this work.

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

#### References

- Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, et al. GES extended-spectrum β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4872–8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. 27th ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2017. p. 2017.
- Fernández J, Montero I, Fleites A, Rodicio MR. Cluster of *Escherichia coli* isolates producing a plasmid-mediated OXA-48 β-lactamase in a Spanish hospital in 2012. *J Clin Microbiol* 2014;52:3414–7.
- Fernández J, Rodríguez-Lucas C, Fernández-Suárez J, Vazquez F, Rodicio MR. Identification of Enterobacteriaceae and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton. *J Microbiol Methods* 2016;129:133–5.
- Fiori B, D'Inzeo T, Giaquinto A, Menchinelli G, Liotti FM, de Maio F, et al. Optimized use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for direct identification of microbial pathogens from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2016;54:576–84.
- Galiana A, Coy J, Gimeno A, Guzman NM, Rosales F, Merino E, et al. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. *PLoS One* 2017;12:1–12.
- Hæggman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2400–8.
- Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis* 2013;57:1237–45.
- Ledebøer N, Lopansri B, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll K, Granato P, et al. Identification of Gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the Verigene Gram-negative blood culture multiplex microarray-based molecular assay. *J Clin Microbiol* 2015;53:2460–72.
- Nüesch-Inderbinen M, Hächler H, Kayser F. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E Test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:398–402.
- Opota O, Jaton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect* 2015a;21:323–31.
- Opota O, Croxatto A, Prod G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect* 2015b;21:313–22.
- Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3406–12.
- Poiriel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119–23.
- Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:27–35.
- Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, Desjarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the filmarray blood culture identification panel: results of a multicenter controlled trial. *J Clin Microbiol* 2016;54:687–98.
- Tuite N, Reddington K, Barry T, Zumla A, Enne V. Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1729–33.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla* OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006;44:2974–6.
- Voets GM, Fluit AC, Scharinga J, Stuart JC, Leverstein-van Hall MA. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β-lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β-lactamases and OXA β-lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:356–9.
- Zboromyrska Y, Vergara A, Cosgaya C, Verger G, Mosqueda N, Almela M, et al. Rapid detection of β-lactamases directly from positive blood cultures using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assay. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:355–6.

## RESULTADOS



## Objetivo 4.2: Artículo 7

Journal of Hospital Infection 105 (2020) 659–662



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Hospital Infection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhin](http://www.elsevier.com/locate/jhin)



# Prospective evaluation of an easy and reliable work flow for the screening of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in endemic settings

C. Rodríguez-Lucas<sup>a,b,c</sup>, M.R. Rodicio<sup>b,c</sup>, Y. Rosete<sup>d</sup>, J. Fernández<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Microbiología, Hospital El Bierzo, Ponferrada, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>c</sup> Grupo de Microbiología Traslacional, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 March 2020

Accepted 27 April 2020

Available online 1 May 2020

#### Keywords:

OXA-48

Carbapenemase

Temocillin

Algorithm

Enterobacteriales



### SUMMARY

**Background:** Carbapenemase-producing Enterobacteriales (CPE) represent a serious threat to public health. Clinical microbiology laboratories (CMLs) need effective protocols for screening and confirmation of CPE.

**Aim:** To prospectively evaluate an algorithm for the screening of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an OXA-48 endemic hospital.

**Methods:** The algorithm was based on a disc diffusion assay using ertapenem and temocillin, which also served as a purity check for routine automated antimicrobial susceptibility testing. All isolates with minimal inhibitory concentrations >0.5 mg/L or zone inhibition diameters <25 mm for ertapenem (Criterion 1) and <12 mm for temocillin (Criterion 2) were tested sequentially by an OXA-48 lateral flow immunochromatographic assay and a multiplex polymerase chain reaction targeting VIM, KPC and OXA-48. If neither test was positive, the modified Hodge test or CARBA NP test was used.

**Findings:** Over 2 years, 2487 *K. pneumoniae* were assessed by the algorithm proposed, and 378 (15.20%) met both criteria. Of these, 98.68% (373/378) were either confirmed as OXA-48 producers or originated from patients with a previous CPE isolate that maintained the same resistance phenotype over time. The remaining three *K. pneumoniae* were VIM producers. Only two of the 378 isolates (0.53%) did not produce carbapenemase, despite meeting Criteria 1 and 2.

**Conclusion:** The algorithm described combined the most sensitive carbapenem for CPE detection with a cut-off for temocillin that was highly specific for detection of OXA-48. It is reliable and easy to apply in routine CML work flow, allowing rapid detection of CPE isolates and hence prompt implementation of infection control measures and targeted antimicrobial regimens.

© 2020 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Address: Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n, 33011 Oviedo, Spain. Tel.: +34 985108000.

E-mail address: [javifdom@gmail.com](mailto:javifdom@gmail.com) (J. Fernández).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.04.044>

0195-6701/© 2020 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Over the last decade, decreased susceptibility to carbapenems has been increasing worldwide in Gram-negative clinical

isolates, mainly in Enterobacterales [1]. The mechanisms conferring reduced susceptibility to carbapenems in Enterobacterales are mainly divided into two groups: (i) hyper-production of AmpC or extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) combined with altered membrane permeability; and (ii) production of carbapenemases [carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE)] [2–4]. The potential for spread of carbapenem resistance among Gram-negative bacterial species, and the multi-drug-resistant phenotype usually expressed by CPE isolates, mean that these bacteria are of particular concern as they represent a serious threat from a public health perspective [1,4]. Despite efforts to control their spread over recent years, CPE have disseminated and established in several countries worldwide, becoming endemic in many healthcare institutions [5]. Among them, *Klebsiella pneumoniae* is by far the most frequently encountered species worldwide, and OXA-48 is the most common carbapenemase reported in Spain and other countries in Europe, the Middle East and North Africa [5,6]. Rapid detection of CPE is the most important step to implement prompt infection control measures in order to initiate appropriate antimicrobial therapy and to prevent further dissemination [7]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines recommend the detection of carbapenemase producers among all Enterobacterales with minimum inhibitory concentrations (MICs) of ertapenem or meropenem  $\geq 0.125$  mg/L or disc diffusion zone diameters  $< 25$  mm and  $< 28$  mm, respectively [8]. In this context, several methods for carbapenemase detection have been developed, including phenotypic tests such as the combination disc test, colorimetric assays based on carbapenem hydrolysis, and lateral flow assays. Molecular tests based on polymerase chain reaction (PCR), which are still the reference standard, are also available [4]. Nonetheless, the phenotypic detection of carbapenemase producers with a low level of carbapenem hydrolysis, such as those positive for OXA-48, remains challenging [4,9]. As such, several authors have proposed temocillin resistance as a surrogate marker for detection of OXA-48 producers [1,4,7,9,10]. The increase of Enterobacterales with reduced susceptibility to carbapenems, CPE and non-CPE makes it necessary to implement algorithms for CPE detection in clinical microbiology laboratory (CML) work flows, providing prompt and accurate results with minimal cost and labour input. The aim of this study was to describe and evaluate an algorithm which incorporates testing of temocillin resistance for the screening and confirmation of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, performed in an OXA-48 endemic hospital [11].

## Methods

All *K. pneumoniae* isolates recovered from clinical samples of patients admitted to the Hospital Universitario Central de Asturias, Spain, from June 2017 to June 2019 were collected prospectively. The isolates were first identified with matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of flight mass spectrometry (Microflex; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), and antimicrobial susceptibility testing (AST) was performed subsequently using the MicroScan system (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA). The results were interpreted according to the breakpoints recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [12]. In parallel, a disc diffusion

assay with ertapenem (10  $\mu$ g) and temocillin (30  $\mu$ g) was performed in a Müller-Hinton agar plate (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). The same bacterial inoculum was used for the MicroScan and the disc diffusion assays, which served as a purity check for the automated AST. Zone diameters were measured after overnight incubation at 37°C, during the same period when AST results were produced by the automated methods. Isolates showing zone inhibition diameters  $< 25$  mm (or MICs  $> 0.5$  mg/L) for ertapenem (Criterion 1) and  $< 12$  mm for temocillin (Criterion 2) were subjected to the work flow described in Figure 1, unless a CPE isolate was recovered from the same patient in the last 6 months and its resistance phenotype was maintained over time. All other bacteria which met the two criteria were tested sequentially by a lateral flow immunochromatographic (IC) assay (OXA-48 K-SeT Coris Bio-Concept, Gembloux, Belgium) and a multiplex PCR targeting VIM-, KPC- and OXA-48-encoding genes (RealCycler, Progenie Molecular, Valencia, Spain). If neither of these tests were positive, the modified Hodge test or CARBA NP test was used [2]. Moreover, isolates which met Criterion 1 but showed zone inhibition diameters  $> 12$  mm for temocillin were assessed by the modified Hodge test or the CARBA NP test; if they were positive, they followed the same protocol as above (Figure 1).

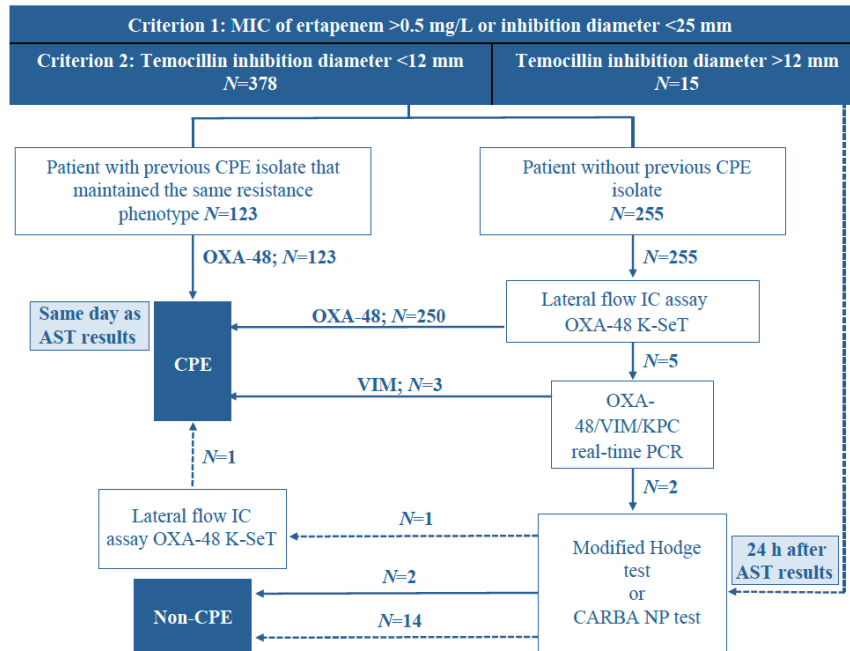
## Results and discussion

Over the study period, 2487 *K. pneumoniae* isolates were recovered from inpatients from the study hospital, and 378 (15.20%) met the two criteria. Of these, 373 (98.68%) were confirmed as OXA-48 producers ( $N=250$ ) or were recovered from patients in whom OXA-48-producing isolates had been detected in the previous 6 months ( $N=123$ ). These isolates were assumed to be OXA-48 producers if their resistance phenotype did not change over time. Two hundred and fifty-five isolates were subsequently analysed by the work flow proposed. Only five were negative for OXA-48 in the IC assay, but three tested positive for *bla*<sub>VIM</sub> using real-time PCR. In contrast, two isolates that met Criteria 1 and 2 of the algorithm (0.53%) were negative for all tests, including the modified Hodge test or CARBA-NP test, and were classified as non-CPE (Figure 1). Fifteen isolates met Criterion 1 but not Criterion 2 as the temocillin inhibition zone was  $> 12$  mm. Fourteen isolates were negative for the modified Hodge test or CARBA NP test and were therefore categorized as non-CPE. The remaining isolate had a MIC for ertapenem of 1 mg/L, a temocillin inhibition diameter of 14 mm, and was positive for the modified Hodge test and the OXA-48 IC assay (Figure 1). In most cases, implementation of the ertapenem and temocillin disc diffusion tests as purity checks for the automated AST and the work flow of the algorithm allowed confirmation of CPE within 24 h of bacterial identification.

According to the current EUCAST guidelines, all Gram-negative bacteria with MICs for ertapenem  $> 0.125$  mg/L or disc diffusion zone diameters  $< 25$  mm should be analysed for carbapenemase production [8]. However, most panels for automated AST systems only detect MICs for ertapenem  $\geq 0.5$  mg/L, and most CMLs do not perform disc diffusion assays as routine susceptibility tests. Therefore, bacteria producing enzymes with a low level of carbapenem hydrolysis, such as OXA-48, may not be detected [9]. The ability of OXA-48-producing isolates to hydrolyse temocillin has been suggested



*Klebsiella pneumoniae* isolated over the 2-year study period; N=2487



**Figure 1.** Algorithm proposed for the phenotypic screening and confirmation of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* performed in an OXA-48 endemic hospital in Spain. Solid line represents isolates that met Criteria 1 and 2; dashed lines represent isolates that met Criterion 1 alone. AST, antimicrobial susceptibility testing; CPE, carbapenemase-producing Enterobacterales; MIC, minimum inhibitory concentration; IC, immunochromatographic; PCR, polymerase chain reaction.

as a good marker for the screening of OXA-48 producers, particularly in regions with high prevalence of this carbapenemase, such as Spain [6,9,10]. The modified cut-off value for disc diffusion zone diameter (<12 mm) proposed by Huang *et al.* [10] shows high discriminatory power to distinguish between OXA-48 producers and carbapenemase-negative isolates. Previously, Dortet *et al.* proposed an algorithm based on faropenem and temocillin discs for the screening of CPE, which showed excellent specificity and positive predictive value (96.9% and 92.5%, respectively) for detection of OXA-48 producers. In this study, the authors highlighted the disadvantage that their algorithm is intended for CMLs using disc diffusion assays for routine susceptibility testing [7]. In the present algorithm, implementation of disc diffusion assays with ertapenem and temocillin is proposed in the purity checks of AST performed with automated systems, avoiding the aforementioned disadvantage. In the authors' opinion, this algorithm has several advantages: (i) ertapenem disc diffusion assays comply with the EUCAST recommendations for CPE detection, using the most sensitive carbapenem available; (ii) inclusion of temocillin gives high specificity for OXA-48 detection, avoiding the false-positive results that could be obtained with ertapenem disc diffusion due to ESBL or AmpC production in combination with altered membrane permeability; and (iii) results are obtained at the same time as those of AST (24 h). Moreover, it is well documented that IC assays detecting a

single target are less expensive than those detecting multiple targets or molecular techniques. Furthermore, IC assays for CPE detection from bacterial colonies are faster (~15 min) than other phenotypic or molecular methods (0.5–24 h) [3]. Therefore, inclusion of the IC assay for early detection of OXA-48 in the laboratory work flow during the study period reduced the requirement for further complementary testing to five isolates, saving time and resources. The algorithm presented shows high capacity to discriminate between CPE and non-CPE, although two isolates (0.53%) were non-CPE despite meeting the criteria for ertapenem and temocillin inhibition zones (or MICs). In contrast, a single isolate of *K. pneumoniae* did not meet the temocillin criteria but was shown to produce OXA-48. Moreover, although 98.68% (373/378) of the isolates that met the two criteria were confirmed as OXA-48 producers (or recovered from patients with previous CPE detection, maintaining the same resistance phenotype in the last 6 months), three isolates that met both criteria were VIM producers, an enzyme that has been shown to hydrolyse temocillin [10]. This result shows the need to confirm the carbapenemase type by IC assay or molecular techniques. However, the algorithm described – which, until now, had only been applied to *K. pneumoniae* – was designed for implementation in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers.

In conclusion, despite the above limitations, the algorithm proposed is easy to apply and reliable, and the results are

obtained within the same time scale as those for AST for most isolates. In healthcare settings with a high prevalence of OXA-48 producers, use of this algorithm could save unnecessary additional testing for confirmation of CPE, and labour and material costs, while providing rapid results that will allow prompt implementation of targeted antibacterial therapy and control measures to prevent CPE dissemination.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Funding sources

This work was supported, in part, by Project FIS PI17-00728 (Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain), co-funded by the European Regional Development Fund of the European Union: a Way to Making Europe.

#### References

- [1] Dortet L, Cuzon G, Plésiat P, Naas T. Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:135–40.
- [2] Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence* 2017;8:427–39.
- [3] Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, Göttig S, Saleh A, Stelzer Y, et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.003>.
- [4] Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:432–8.
- [5] Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Canton R, Sader HS, Jones RN. Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among Enterobacteriaceae isolates in 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis* 2019;6:23–33.
- [6] Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3406–12.
- [7] Dortet L, Bernabeu S, Gonzalez C, Naas T. Comparison of two phenotypic algorithms to detect carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:1–5.
- [8] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. Basel: EUCAST; 2019. Available at: <http://www.eucast.org> [last accessed May 2020].
- [9] Cavaco LM, Hansen F, Mushtaq S, Hill RLR, Woodford N, Le Hello S, et al. Evaluation of temocillin for phenotypic carbapenemase screening of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates in relation to the presence of genes encoding ESBLs and carbapenemase production. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:639–44.
- [10] Huang T, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:445–50.
- [11] Fernandez J, Poirel L, Rodicio M, Nordmann P. Concomitant and multiclonal dissemination of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1734–6.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29<sup>th</sup> ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2019.

## **4. DISCUSIÓN**



El propósito de esta tesis doctoral es el estudio epidemiológico de bacterias de especial interés, por ser resistentes a antimicrobianos de última línea o por las escasas alternativas terapéuticas disponibles frente a ellas. Se profundizó, además, en el estudio de las bases moleculares de sus mecanismos de resistencia. Todas las bacterias utilizadas fueron recuperadas de pacientes atendidos en dos hospitales del norte de España: el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y el Hospital El Bierzo (HEB). Complementariamente se han evaluado algoritmos y técnicas diagnósticas encaminados a la detección de algunas de ellas en los laboratorios de microbiología clínica.

Los estudios de epidemiología de la resistencia y de los mecanismos implicados se han enmarcado dentro de los tres primeros objetivos de la tesis. En ellos se han estudiado bacterias pertenecientes a géneros muy diversos, con resistencias adquiridas y escasas alternativas terapéuticas que además han causado brotes o situaciones de endemia en el HUCA o el HEB en los últimos años. Las bacterias estudiadas, los periodos de tiempo de selección y el hospital de recogida se muestran a continuación (Tabla VII).

Tabla VII: Aislados bacterianos analizados y criterios de inclusión.

Bacteria	Hospital	Periodo de estudio	N	Criterio de inclusión	Artículo <sup>a</sup>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	HUCA	Marzo-Septiembre 2017	49	Resistencia a carbapenémicos	1
<i>Enterococcus faecium</i>	HEB	2018	28	Resistencia a vancomicina	2 (No publicado)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HUCA	2013-2016	5	Resistencia a LZD en aislados invasivos (SNC)	3
	HUCA	2011-2017	44	Primeros aislados disponibles resistentes a LZD	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	HEB	Febrero-Diciembre 2018	3	Resistencia a LZD mediada por genes transferibles	5 (No publicado)

HEB: Hospital El Bierzo; HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias; N: Número de aislados caracterizados a nivel molecular; LZD: Linezolid; SNC: Sistema nervioso central.

<sup>a</sup>: Los artículos se numeran de acuerdo con el orden de presentación en el apartado de Resultados.

La heterogeneidad de las bacterias estudiadas en los diferentes objetivos de la tesis muestra, sin embargo, importantes puntos en común que mantienen la unidad temática de la misma. Entre ellos destacan los siguientes:

## DISCUSIÓN

- Se trata de bacterias con un importante papel en la infección relacionada con la asistencia sanitaria (IRAS) (EPINE, 2019).

- Se encuentran altamente adaptadas al entorno hospitalario, perteneciendo la mayoría a clones de alto riesgo.

- Debido a sus propiedades de resistencia, existen escasas alternativas terapéuticas para luchar contra ellas.

- En muchos casos, la resistencia frente a los antimicrobianos estudiados está codificada por genes potencialmente transferibles a través de elementos móviles.

A pesar de que el estudio a nivel molecular solo se llevó a cabo en aislados seleccionados en momentos concretos, en cada uno de los objetivos se realiza un amplio seguimiento temporal, que permite conocer la tendencia de la prevalencia de las resistencias y de las bacterias estudiadas a lo largo de los años, lo cual ayuda a contextualizar los datos. Los distintos análisis realizados nos permiten confirmar realidades preocupantes, que son diferentes en cada uno de los hospitales:

- Elevada prevalencia de la resistencia a vancomicina en aislados de *E. faecium* en el HEB.

- Importante reservorio de aislados de *S. epidermidis* y *A. baumannii* con resistencia a linezolid y carbapenémicos, respectivamente, en el HUCA.

Sin embargo, y como dato alentador, en ambos hospitales las medidas de control de infección instauradas, la implementación de programas PROA y la disminución del consumo de ciertos antimicrobianos ha tenido efectos positivos en cuanto a disminución de la prevalencia de estas bacterias multirresistentes, las IRAS producidas por las mismas y el descenso del consumo de otros antimicrobianos de última línea con efectos tóxicos considerables. Todo ello resalta la importancia que tienen el seguimiento epidemiológico, los estudios moleculares y la instauración de medidas eficaces para el control de las bacterias multirresistentes en el ambiente hospitalario, como ya se ha demostrado repetidamente en la literatura científica (Mulanovich *et al.*, 2010; Rodríguez-Baño *et al.*, 2012; Humphreys, 2014; Tacconelli *et al.*, 2014; Gavaldà *et al.*, 2016; Weßels *et al.*, 2018).

A continuación, se discutirán uno a uno los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos de la tesis.

#### **4.1. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en el Hospital Universitario Central de Asturias (Artículo 1, Objetivo 1)**

En el Artículo 1 se evaluó la eficacia a largo plazo de la implementación de un paquete de medidas (intervención) en la UCI del HUCA con el objetivo de reducir la prevalencia de un patógeno crítico, el *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB, *carbapenem-resistant A. baumannii*). Además, se analizó el impacto que tuvo dicha intervención en el consumo de un antimicrobiano de última línea, la colistina. Con el fin de conocer los clones de esta especie circulantes en el hospital y sus principales determinantes de resistencia una vez finalizada la intervención, un año aproximadamente después de esta se llevó a cabo un estudio molecular de los aislados recuperados en ese momento.

Durante el periodo de estudio (2015-2018) se recuperaron un total de 1.154 aislados de *A. baumannii*, de los cuales el 86,05% fueron resistentes a carbapenémicos. Se trata de un elevado porcentaje, en la línea con lo documentado en informes previos de prevalencia de CRAB en España (Fernández-Cuenca *et al.*, 2013; Villar *et al.*, 2014; Dahdouh *et al.*, 2017). La UCI del HUCA ha sufrido durante más de 18 años una endemia por CRAB, a pesar de aplicar las medidas estándar de control de infección: cultivos periódicos de vigilancia activa, aislamiento de contacto de pacientes infectados/colonizados, programas de descontaminación ambiental, higiene de manos y formación continuada del personal de la unidad (Garnacho-Montero *et al.*, 2015; Escudero *et al.*, 2017). Es bien conocida la dificultad para erradicar este microorganismo de las UCI, debido entre otros factores a su larga supervivencia en materiales inanimados, muchos de los cuales son además de difícil limpieza (respiradores, teclados, pantallas, esfigmomanómetros, etc.). La implementación de protocolos exhaustivos que mejoren la efectividad de los procedimientos de limpieza ambiental, como el *one room, one wipe* (Gavaldà *et al.*, 2016), han demostrado previamente su eficacia en la erradicación de CRAB en estas unidades. De esta forma, en Abril del año 2016 se implantó en la UCI del HUCA un protocolo de limpieza profunda que se ha mantenido hasta la fecha, con el objetivo de reducir la prevalencia de CRAB en la unidad. La intervención se basó principalmente en mantener las medidas de control de infección estándar anteriormente comentadas y bloquear los boxes durante dos días tras las altas de pacientes de la unidad, con el fin realizar al menos cuatro limpiezas terminales antes del siguiente ingreso, seis si el paciente dado de alta había estado colonizado/infectado por una bacteria

## DISCUSIÓN

multirresistente y hasta 12 si lo había estado por un CRAB. Además, en los boxes cerrados en los que se podía llevar a cabo la desinfección con peróxido de hidrogeno, ésta se realizó durante uno o dos días al mes (Escudero *et al.*, 2017). Como muestra la Figura 1 del Artículo 1, el número de aislados de CRAB se redujo drásticamente durante el periodo de estudio. Así, el porcentaje de resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* pasó de un 93,57 a un 74,65% en el HUCA, siendo este descenso especialmente marcado en la UCI (94,61 a 68,75%), pero también importante en el resto del hospital (91,75 a 75,40%). Estos resultados muestran que la intervención implementada en Abril del 2016 y mantenida hasta la fecha en la UCI, principal nicho de CRAB, ha sido efectiva a lo largo del tiempo, especialmente en esta unidad donde hasta la fecha no se han descrito nuevos brotes causados por esta bacteria. De hecho, los aislados de CRAB obtenidos en la UCI desde la intervención fueron recuperados de pacientes infectados o colonizados por CRAB previamente a su ingreso en la unidad. Aunque la intervención también tuvo un importante efecto en la disminución del número de CRAB en el resto del HUCA, se ha seguido detectando un número no desdeñable de aislados durante todo el periodo de estudio. Este cambio epidemiológico en el nicho de CRAB fue previamente documentado por Villar *et al.*, en cuyo trabajo se describió un descenso en la incidencia de CRAB en las UCI, debido probablemente a las medidas de prevención de la infección acometidas en estas unidades, y un incremento en el resto de unidades de los hospitales (Villar *et al.*, 2014). Esto supone un cambio en cuanto al reservorio de CRAB, ya que clásicamente se han considerado las UCI como reservorio principal, a partir de las cuales éstos microorganismos se dispersaban al resto de servicios del hospital a través de los pacientes dados de alta desde esta unidad (Apisarnthanarak *et al.*, 2008; Thatrimontrichai *et al.*, 2020). Dicho cambio de reservorio supone un reto importante para las actividades de control de la infección, debido a una mayor complejidad y diversidad de funcionamiento de los diferentes servicios, así como a una desigual uniformidad en cuanto a la aplicación de las medidas en los servicios no UCI (García-Ortega *et al.*, 2011). Los resultados de esta tesis muestran por tanto cómo la aplicación de medidas de control de la infección limitadas a la UCI no son suficientes para erradicar los CRAB de los hospitales, si estas no se amplían a todo el hospital al completo. Por el contrario, la aplicación de paquetes de medidas, como los implementados aquí en la UCI, adoptados en todo el entorno hospitalario sí han demostrado ser efectivos en el control de la dispersión de CRAB en los hospitales (Rodríguez-Baño *et al.*, 2009).



Un descenso de los microorganismos resistentes a antimicrobianos de amplio espectro en un determinado entorno debería llevar consigo un descenso en la prescripción de antimicrobianos de última línea. El presente trabajo es un paradigma de ello y, de hecho, tal y como se puede ver en la Figura 1 del Artículo 1, el descenso en el número de CRAB durante el periodo de estudio se vio acompañado de un descenso en el consumo de colistina, desde 1,16 a 0,39 días de tratamiento (DOT)/100estancias en el HUCA. La colistina es un antimicrobiano de última línea que ha resurgido en los últimos años y cuyo uso sistémico está reservado principalmente para el tratamiento de infecciones producidas por bacilos Gram-negativos multirresistentes en los que otros antimicrobianos de amplio espectro, como los carbapenémicos, ya no son efectivos. Recientemente un trabajo ha descrito una relación entre el incremento de incidencia de CRAB y un posterior aumento en el consumo de colistina (López-Lozano *et al.*, 2019), fenómeno inverso a lo observado en la presente tesis.

De los 49 aislados de CRAB, pertenecientes a pacientes ingresados en 13 servicios diferentes y recuperados durante un periodo de nueve meses (Marzo-Noviembre de 2017), aproximadamente un año después de la intervención en la UCI, un alarmante porcentaje de ellos (97,96%) cumplió criterios XDR (según los propuestos por Magiorakos *et al.*), siendo tan solo uno de ellos resistente únicamente a los carbapenémicos (Magiorakos *et al.*, 2012). Los aislados XDR fueron solamente sensibles a la colistina (100%) y siete de ellos a la ceftazidima (14,58%). En todos se detectaron los genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> (intrínseco en *A. baumannii*) y *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, mientras que en el único aislado no XDR se encontraron los genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y *bla*<sub>OXA-24-like</sub>. La resistencia a carbapenémicos puede incrementar la mortalidad de los pacientes con infecciones por *A. baumannii* (Lemos *et al.*, 2014). Esto puede ser debido a una mayor probabilidad de recibir un tratamiento antimicrobiano empírico inadecuado, debido al alto porcentaje de cepas CRAB expresando fenotipos XDR (Lemos *et al.*, 2014; Villar *et al.*, 2014). La colistina usada en monoterapia o combinada con aminoglicósidos, tigeciclina, rifampicina o sulbactam son con frecuencia las únicas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones producidas por aislados de CRAB multirresistentes (Ruiz *et al.*, 2007; Isler *et al.*, 2018; Lowe *et al.*, 2018). Ninguno de los aislados del presente estudio fue resistente a colistina; sin embargo, todos los aislados XDR lo fueron a todos los aminoglicósidos testados, incluida la amikacina, y en todos menos uno se detectó la presencia de la metilasa del ARNr 16S codificada por el gen *armA*. Este gen se ha asociado a un alto nivel de resistencia a aminoglicósidos y, aunque es más frecuente en

## DISCUSIÓN

especies pertenecientes al orden *Enterobacterales*, también ha sido descrito en aislados de *A. baumannii*, mayoritariamente en Asia (Doi *et al.*, 2007). Algunos autores han sugerido el cribado mediante PCR de este gen (y otros codificadores de metilasas del ARNr 16S) en *Enterobacterales* y BGNNF que presenten CMI elevadas ( $\geq 256$  mg/L) a los aminoglicósidos, debido a su capacidad de dispersión a través de elementos potencialmente móviles (Doi *et al.*, 2007). La expansión de clones de CRAB multirresistentes y portadores de genes de resistencia transferibles como el *armA* o el *mcr* (gen transferible responsable de resistencia a colistina) constituye un grave problema, puesto que limita seriamente las opciones de tratamiento (Doi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2019). Recientemente se han descrito brotes por clones CRAB *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y *armA* positivos en Italia y Grecia, en este último caso con un importante número de aislados resistentes también a la colistina (Brigante *et al.*, 2012; Palmieri *et al.*, 2020). Mientras, en España nuestro estudio supone la segunda descripción del gen *armA* en *A. baumannii*, destacando que la primera se produjo en aislados CRAB productores de OXA-23 en Galicia (Merino *et al.*, 2014).

Como se puede ver en la Figura 2 del Artículo 1, los 49 aislados presentaron 16 perfiles de PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) diferentes y todos excepto dos fueron agrupados en un cluster (A) con un coeficiente de similitud de Sorensen  $> 0,75$ . Todos los aislados de dicho Cluster pertenecieron al clon secuencia tipo (ST) 218 (según el esquema de MLST de Oxford) excepto uno que perteneció al ST1801. Los dos aislados restantes fueron asignados a ST1379 y ST1803, siendo las ST1801 y 1803 descritas por primera vez en este trabajo.

El clon ST218 del esquema Oxford se encuentra dentro del ST2 del esquema Pasteur, perteneciendo ambos al complejo clonal (CC) 92/2 (de acuerdo a los esquemas de Oxford y Pasteur, respectivamente), el cual es conocido como Clon Internacional (CI) II (Tomaschek *et al.*, 2016). En el presente trabajo se decidió realizar el tipado MLST mediante el esquema Oxford, debido a su mayor poder de discriminación comparado con el Pasteur, especialmente dentro del CI-II (Grosso *et al.*, 2011; Tomaschek *et al.*, 2016). Así, el esquema Oxford discrimina al menos 15 ST diferentes (incluido el ST218) dentro del ST2 del esquema Pasteur (Tomaschek *et al.*, 2016). Los aislados de CRAB del CI-II son responsables de la mayoría de brotes descritos a nivel mundial (Zarrilli *et al.*, 2013). En España, el clon ST2 (esquema Pasteur) ha sido el más prevalente durante las últimas dos décadas (Villalón *et al.*, 2011, 2015, 2019; Villar *et al.*, 2014). Tal y como se comentó, todos excepto uno de los aislados estudiados fueron productores de OXA-23,

que es la carbapenemasa más ampliamente diseminada en CRAB en todo el mundo (Poirel *et al.*, 2006; Dahdouh *et al.*, 2017). Durante las dos últimas décadas en los países de la cuenca mediterránea los aislados de CRAB productores de OXA-23, principalmente los pertenecientes al CI-II, han ido reemplazando progresivamente a aislados de *A. baumannii* productores de otros tipos de carbapenemasas OXA diferentes, que habían sido previamente predominantes (D'Arezzo *et al.*, 2011; Grosso *et al.*, 2011; Liakopoulos *et al.*, 2012; Manageiro *et al.*, 2012; Mezzatesta *et al.*, 2012; Minandri *et al.*, 2012; Saule *et al.*, 2013; Schleicher *et al.*, 2013). En la península ibérica, los aislamientos de CRAB han estado mayoritariamente asociados a clones endémicos productores de OXA-24/40 y OXA-58 hasta el año 2006 cuando en Portugal se describió un reemplazo del clon predominante (OXA-24/40) por un clon productor de OXA-23 (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2011; Grosso *et al.*, 2011; Martínez-Lamas *et al.*, 2014). Concretamente en España, los aislados de CRAB han estado mayoritariamente asociados a las enzimas OXA-24/40 y OXA-58 desde al menos el año 1997 hasta el 2010 (Ruiz *et al.*, 2007; Villalón *et al.*, 2011, 2013, 2015, 2019). A partir de la primera detección de *A. baumannii* productor de OXA-23 en nuestro país en el año 2010 (Espinal *et al.*, 2013), tan solo se ha descrito un número limitado de estos aislados. El primer aislado de CRAB productor de OXA-23 fue asignado al clon ST2 (CI-II), se obtuvo de una paciente ingresada en la UCI de un hospital de Palma de Mallorca y su origen epidemiológico se relacionó con un viaje reciente a Francia y Portugal (Espinal *et al.*, 2013). En ese mismo año 2010, se describieron los primeros brotes hospitalarios causados por aislados OXA-23 en España. El primero de ellos en mayo, en la UCI de un hospital de Cádiz por un clon ST1 (CI-I) (Guerrero-Lozano *et al.*, 2015) y el segundo en octubre, también en la UCI, esta vez en un hospital de Barcelona por un clon ST85 (CI-II) (Mosqueda *et al.*, 2013). Posteriormente se describió un nuevo brote en la UCI de un hospital de A Coruña, durante un periodo de un año (Julio de 2011-Julio de 2012), debido a un clon ST118 (en este último caso según el esquema Oxford) (CI-II), coproductor de *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y *armA* y cuyo caso índice fue una paciente trasladada desde un hospital de Portugal (Merino *et al.*, 2014). Recientemente, Dahdouh *et al.*, encontraron una mayor prevalencia de los genes *bla*<sub>OXA-24-like</sub> (62,71%) y *bla*<sub>OXA-58-like</sub> (13,56%) sobre el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (11,86%), en 59 aislados de *A. baumannii* recuperados de hemocultivos en un hospital de Madrid durante el periodo 2009-2013 (Dahdouh *et al.*, 2017). Estos datos, junto con los resultados de la presente tesis, en la cual todos a excepción de uno de los aislados de CRAB fueron productores de OXA-23, reflejan diferencias regionales en la

## DISCUSIÓN

epidemiología de estas bacterias en España. Los aislados de CRAB en España podrían estar disparándose interregionalmente y, de hecho, un ejemplo es la detección del aislado portador del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub> en nuestro estudio, que fue recuperado de una paciente que había estado viviendo en Madrid y había sido atendida en un hospital de esa ciudad dos meses antes de su ingreso en el HUCA.

Resulta interesante que el único aislado *bla*<sub>OXA-24-like</sub> encontrado fuese únicamente resistente a carbapenémicos, mientras que todos los aislados *bla*<sub>OXA-23-like</sub> fuesen XDR. Sin embargo, varios autores ya sugirieron la posibilidad de que el reemplazo de clones de CRAB productores de enzimas OXA de diferentes tipos por clones OXA-23 podría estar relacionado, entre otros factores, con los perfiles de multirresistencia expresados por estos últimos. Ello favorecería su establecimiento y dispersión en el ambiente hospitalario, especialmente en unidades con elevada presión antimicrobiana como las UCI (Grosso *et al.*, 2011; Mosqueda *et al.*, 2013).

Por tanto, y para concluir este apartado de la tesis, nuestro trabajo supone la primera descripción en España de aislados de *A. baumannii* pertenecientes al clon ST218 portadores del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y la segunda descripción en nuestro país de este microorganismo portando a la vez el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y el gen *armA*. Los resultados obtenidos muestran una vez más el establecimiento y dispersión del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> en clones de CRAB XDR y sugieren un cambio en el tipo de carbapenemasa en España, al igual que ocurriera previamente en otros países de Europa y la cuenca mediterránea, aunque este remplazo podría tener una prevalencia diferente en función de la región del país. La diseminación a nivel global de clones de CRAB portadores del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y expresando fenotipos XDR es un motivo de preocupación, especialmente si además son portadores de genes de resistencia potencialmente transferibles como el *armA* o el *mcr*, lo cual limitaría aún más las opciones de tratamiento de las infecciones que causan. Las medidas exhaustivas de control de la infección y los estudios moleculares de los aislados de CRAB son esenciales para la erradicación de estos microorganismos de las UCI, aunque deben de extenderse al resto de los servicios para la erradicación total en los hospitales. Además, estas medidas pueden contribuir a disminuir el consumo de colistina en los hospitales, preservando así la eficacia de uno de los últimos antimicrobianos efectivos para el tratamiento de las infecciones producidas por CRAB XDR y disminuir la toxicidad que conlleva su administración en los pacientes.

#### **4.2. *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina en el Hospital El Bierzo (Artículo 2 no publicado, Objetivo 2)**

En el Artículo 2 se estudiaron aislados de *E. faecium* resistentes a vancomicina (VREfm, *vancomycin-resistant E. faecium*) recuperados de pacientes atendidos en el HEB durante el año 2018. La razón de que el estudio se centrara en ese año no es otra que la disponibilidad de los aislados, puesto que hasta enero de 2018 no se recolectaban y congelaban de forma prospectiva y sistemática. No obstante, y como se puede observar en la Figura 1 del Artículo 2, para entender el contexto es necesario resaltar que los primeros aislados de VREfm en el HEB fueron detectados al menos desde el año 2011, aunque de forma muy anecdótica, mientras que en 2013 se produjo un importante incremento en el porcentaje de resistencia a vancomicina en esta especie. Desde entonces se ha mantenido un alto porcentaje de resistencia, principalmente en aislados no invasivos obtenidos de muestras de exudados de heridas, líquidos intra-abdominales y orinas. Además, el número de bacteriemias causadas por *E. faecium* en el HEB se ha incrementado muy notablemente. De hecho, durante el periodo 2011-2015 hubo una media de 5,4 bacteriemias al año causadas por este microorganismo, mientras que en el periodo 2016-2019 la media fue de 15,8, lo que supone prácticamente el triple. Este incremento en el número de bacteriemias producidas por *E. faecium*, está en línea con el cada vez más importante papel de los enterococos en las IRAS, que representan en la actualidad una de las principales causas de este tipo de infección tanto en EEUU como en la UE (Mendes *et al.*, 2016). De forma preocupante, el aumento en el número de bacteriemias por *E. faecium* en el HEB se ha visto acompañado por un incremento en la proporción de aislados resistentes a la vancomicina, alcanzándose una frecuencia del 37,5% en el año 2018.

Para contextualizar nuestros resultados sobre resistencia a vancomicina en *E. faecium*, estos se han comparado con el informe publicado por el EARs-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*), que recopila datos de resistencia en aislados invasivos en la UE. Según esta encuesta, el porcentaje medio de resistencia a vancomicina en aislados invasivos de *E. faecium* fue de un 18,3% en el año 2019 (ECDC, 2020). Aunque lejos de los porcentajes de resistencia de países como EEUU, donde el 60% de los aislados invasivos de *E. faecium* son resistentes a este antimicrobiano, lo cierto es que en la UE existe una clara tendencia al alza, si lo comparamos con datos de años anteriores (6,2 y 10,5% en 2011 y 2015, respectivamente) (Wisplinghoff *et al.*, 2004;

## DISCUSIÓN

ECDC, 2019, 2020). Como se comentó previamente, existe una alta variabilidad entre los distintos países europeos, con porcentajes de resistencia entre el 0,0 y el 50,0% (ECDC, 2020). Cabe destacar, además, que los porcentajes de resistencia en el año 2018 son aproximadamente dos veces mayores en los países del Norte y Este de Europa comparados con los del Sur y Oeste. Este hecho contrasta con el patrón clásico Norte/Oeste – Sur/Este de resistencia observado en la UE para otros microorganismos, como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (Ayobami *et al.*, 2020). Según datos del EARS-Net, el porcentaje de VREfm en España se ha mantenido siempre por debajo del 3% (ECDC, 2019, 2020). Por lo tanto, el porcentaje de resistencia a vancomicina en aislados invasivos del HEB (0%, 20% y 37,5% en los años 2011, 2015 y 2018, respectivamente) se encuentra muy por encima de la media de España y de la UE. Aunque la tendencia al alza del HEB es similar a la del resto del continente, hay que considerar que los porcentajes de resistencia del HEB están calculados sobre un número muy bajo de bacteriemias, de modo que la aparición de pocos aislados resistentes genera grandes oscilaciones en los porcentajes, como se puede ver en los datos correspondientes al año 2015 (20% de resistencia a vancomicina, 1/5 de las bacteriemias causadas por VREfm). De cualquier manera, debido a la baja prevalencia en España, los aislados de VREfm del HEB han tenido un gran impacto en el cómputo nacional, como demuestran los datos del EARS-Net de los años 2018 y 2019. En estos años España informó 19 y nueve aislados de VREfm, respectivamente, de los cuales seis y cuatro (31,6% y 44,5%) fueron recuperados de pacientes atendidos en el HEB (ECDC, 2019, 2020).

Aunque la prevalencia de este microorganismo en España es baja, a lo largo de las dos últimas décadas se han descrito brotes esporádicos en distintas localizaciones. En la Tabla VIII se describen las características más notables de los principales brotes ocurridos.

Tabla VIII: Principales brotes por *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina en España.

Referencia	Ciudad	Año	Gen <i>van</i>	Epidemiología	N (Colonizados/ Infectados)	MLST
(Nebreda <i>et al.</i> , 2007)	Soria	2004- 06	<i>vanB</i>	Brote hospitalario	34 (ND)	ST17
(Montesinos <i>et al.</i> , 2010)	Canarias <sup>a</sup>	2005	<i>vanA</i>	Brote hospitalario (Servicio de nefrología)	22 (12/10)	ST18
(Valdezate <i>et al.</i> , 2009)	Burgos	2006- 08	<i>vanB</i>	Brote hospitalario	50 (40/10)	ST17
(Valdezate <i>et al.</i> , 2012)	Granada	2008- 09	<i>vanA</i>	Brote hospitalario (Servicio de hematología)	13 (6/7)	ST17
(Herrera <i>et al.</i> , 2017)	Barcelona	2012- 13	<i>vanA</i>	Brote hospitalario (Servicio de nefrología)	13 (13/0)	ST17
(García Martínez de Artola <i>et al.</i> , 2017)	Tenerife	2015	<i>vanA</i>	Brote hospitalario (Servicio de hematología)	22 (20/2)	ND

N: Número de pacientes (colonizados/infectados) por *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina, MLST: MultiLocus Sequence Typing, ND: No disponible.

<sup>a</sup>: Aislados procedentes de tres hospitales de Canarias: La Laguna, Las Palmas de Gran Canaria y Tenerife.

Como se puede observar, todos los brotes están circunscritos al ámbito hospitalario y mayoritariamente limitados a servicios denominados de alto riesgo, como los de nefrología y hematología, situación frecuentemente descrita en la literatura (Humphreys, 2014). En nuestro estudio, aunque el 92% de los aislados obtenidos de muestras clínicas fueron recuperados de pacientes hospitalizados, estos se encontraban dispersos en nueve unidades diferentes, perteneciendo un 60,87% a unidades quirúrgicas y un 39,13% a unidades médicas. Esta situación se asemeja más al brote descrito por Valdezate *et al.* en el hospital de Burgos, donde los VREfm fueron aislados de pacientes ingresados en servicios quirúrgicos (70,2%), médicos (19,1%) y de cuidados intensivos (8,5%) (Valdezate *et al.*, 2009). Los principales brotes descritos por VREfm en España han sido clonales y producidos por cepas con ST 17 y 18 (Freitas *et al.*, 2016). Ambas ST pertenecen al CC17, linaje de alto riesgo adaptado al entorno hospitalario y principal responsable a nivel mundial de infección nosocomial y brotes hospitalarios (Arias *et al.*, 2012). Este linaje se caracteriza por la adquisición de múltiples mecanismos adaptativos,

## DISCUSIÓN

entre los que destaca la resistencia a ampicilina y quinolonas, y la presencia de islas de patogenicidad con múltiples genes que incrementan su virulencia y capacidad de colonización y transmisión (Leavis *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la emergencia de aislados de *E. faecium* resistentes a ampicilina y sensibles a vancomicina (AREfm: *ampicillin-resistant E. faecium*) y pertenecientes al CC17 en países con baja prevalencia de VREfm podría servir de sustrato para la aparición de brotes por este último microorganismo (Coque *et al.*, 2005; Leavis *et al.*, 2006). En un estudio longitudinal de aislados invasivos de *E. faecium* en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid, durante los años 1995-2015, se documentó un importante incremento en el número de bacteriemias anuales debidas al mismo, relacionadas con un aumento en el número de AREfm pertenecientes al CC17 (Tedim *et al.*, 2017). Así, mientras las bacteriemias causadas por aislados de *E. faecium* sensibles a la ampicilina pertenecían a diferentes clones, aquellas producidas por aislados resistentes fueron debidas a unos pocos clones pertenecientes en su mayoría al CC17 de alto riesgo. Destaca además en ese estudio que la mayoría de bacteriemias por AREfm durante los años 1995-2008 fueron causadas por aislados ST17 y 18; mientras que a partir del año 2009 hubo una fuerte irrupción de aislados ST80 y 117, también pertenecientes al CC17 (Tedim *et al.*, 2017). Sin embargo, el resto de brotes por VREfm descritos en España hasta la fecha han sido causados por aislados ST17 y 18 (Tabla VIII). En nuestro estudio, el 92,86% (26/28) de los VREfm presentaron la ST80 y los dos restantes fueron ST117, variante de un solo locus (*gyd*, de ST80), siendo la primera descripción en España de aislados de VREfm pertenecientes a estos clones. Todos los aislados de nuestro estudio fueron resistentes a ampicilina, quinolonas y presentaron resistencia de alto nivel a vancomicina y teicoplanina. En todos ellos se detectó el gen *vanA*, principal mecanismo de resistencia a vancomicina descrito en enterococos de Europa (Cattoir *et al.*, 2013; ECDC, 2019; Ayobami *et al.*, 2020). Debido al fenotipo de multirresistencia expresado por los clones VREfm de alto riesgo, con frecuencia, las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones producidas por ellos son antimicrobianos de última línea, como la daptomicina y el linezolid. La daptomicina es el tratamiento de elección en las bacteriemias por VREfm, aunque precisa dosis elevadas ( $\geq 9$  mg/Kg/día), e incluso de 8-12 mg/Kg/día en los aislados sensibles dosis-dependientes (CMI para daptomicina de 2-4 mg/L, según criterios del CLSI) (Chuang *et al.*, 2016; CLSI, 2019). Esto es debido a que el efecto bactericida de la daptomicina es concentración dependiente, por lo que en aislados con CMI  $\geq 4$  mg/L debe valorarse el tratamiento combinado con ampicilina o ceftarolina para



evitar fracasos terapéuticos (Sakoulas *et al.*, 2014; Santimaleeworagun *et al.*, 2019). Por esta razón es preocupante el elevado número de aislados con sensibilidad dosis-dependientes encontrados en nuestro estudio (21,43%). Por otro lado, todos los aislados fueron sensibles a linezolid, aunque este antimicrobiano ha demostrado una menor eficacia que la daptomicina en el tratamiento de las bacteriemias por VREfm, probablemente debido a su acción bacteriostática (Chuang *et al.*, 2016). Aunque la prevalencia de resistencia a estos antimicrobianos de última línea en enterococos y VREfm se mantiene baja, se ha incrementado en los últimos años (Bender *et al.*, 2018), preocupando especialmente la adquisición de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas como el gen *optrA* por parte de aislados VREfm, habiéndose descrito ya los primeros brotes causados por *E. faecium* resistentes a vancomicina y linezolid (*optrA* positivos) y pertenecientes a clones de alto riesgo como el ST80 detectado en nuestro estudio (Egan *et al.*, 2020a). Preocupa además el hallazgo del gen *optrA* en aislados de *E. faecalis* en el HEB, tal y como se describe en el Artículo 5 ya que de transferirse este gen a los VREfm las opciones terapéuticas frente a este microorganismo serían aún más limitadas.

La colonización del tracto gastrointestinal (TGI) por parte de *E. faecium* es crucial para el desarrollo de la infección y facilita en gran medida su posterior diseminación en los ambientes hospitalarios. Así sabemos que por cada paciente hospitalizado con una infección por VREfm existen de dos a 10 contactos colonizados (Cattoir *et al.*, 2013). Esto es en gran parte debido a la baja virulencia del *E. faecium*, lo que caracteriza su interacción con el hospedador que se basa en la colonización seguida de una larga persistencia, más que en una elevada agresividad. Este hecho se ve además agravado por la acción de ciertos antimicrobianos de amplio espectro, como las cefalosporinas o la piperacilina/tazobactam, los cuales generan cambios sustanciales sobre la microbiota intestinal, lo que favorece la colonización y el sobrecrecimiento de los VRE en el TGI (Arias *et al.*, 2012). En un modelo de colonización intestinal en ratones, se demostró cómo los bacilos Gram-negativos (incluidos los anaerobios) estimulan la producción de la lecitina REGIII $\gamma$ , la cual tiene una acción antimicrobiana frente a las bacterias Gram-positivas, incluidos los VRE. Así la reducción de las bacterias Gram-negativas por la acción de los antimicrobianos, disminuye la producción de REGIII $\gamma$  facilitando por tanto el sobrecrecimiento de VRE en el TGI (Brandl *et al.*, 2008).

La colonización y sobrecrecimiento de VRE en el TGI tiene dos importantes consecuencias:

## DISCUSIÓN

- La colonización del TGI precede e incrementa el riesgo de sufrir una bacteriemia por VRE, especialmente en pacientes onco-hematológicos, donde la translocación bacteriana a partir del TGI es más frecuente por el deterioro de la mucosa debido a la quimioterapia o a la propia enfermedad (Alevizakos *et al.*, 2017).

- El sobrecrecimiento de VRE en el TGI conlleva un importante aumento de la densidad de ERV en las heces, lo que se ha demostrado que está relacionado con un incremento en la contaminación de la piel de los pacientes y de las superficies ambientales de su alrededor. La contaminación fecal de la piel puede suponer un riesgo para el propio paciente colonizado, siendo el foco por ejemplo de infecciones asociadas a catéteres urinarios y vasculares. Además, la contaminación ambiental puede ser el origen de la colonización de otros pacientes y la dispersión de los VRE en los entornos hospitalarios (Doskey *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2012; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2012).

Este gran poder de colonización de los enterococos también se refleja en lo sucedido en el HEB. Así, en la Figura 1 del artículo 2 podemos ver cómo un incremento en el número de infecciones no invasivas y/o colonizaciones (el 34,4% de los aislados se obtuvieron de cultivos de orina, correspondiendo muchos de ellos probablemente a colonizaciones más que a infecciones), ha precedido a un incremento en el número de bacteriemias. Debido a la preocupante situación epidemiológica del HEB, en febrero del año 2019 se implementó un paquete de medidas de control de la infección con el objetivo de disminuir el número de VREfm y en paralelo el número de infecciones (Cattoir *et al.*, 2013). Entre las medidas implementadas destacan las siguientes:

- El marcaje en la historia médica electrónica de todos los pacientes con antecedentes de infección/colonización por VRE, realizándose a su ingreso un frotis rectal para búsqueda de VRE e ingresándose bajo medidas de aislamiento de contacto.

- Aislamiento en cohortes de los pacientes positivos para VRE.

- Vigilancia activa de los contactos de los nuevos casos.

- Limpieza de la piel con toallitas impregnadas en clorhexidina para disminuir la densidad bacteriana.

- Revisión y mejora de los productos y protocolos de limpieza y desinfección ambiental.

Además, durante el periodo de febrero a julio de 2019 se llevó cabo una vigilancia activa de todos los pacientes al ingreso y también de forma semanal en la unidad con mayor número de infecciones (unidad 1A, no de riesgo), hasta no detectarse ningún caso de transmisión nosocomial durante 14 días en dicha unidad. La implantación de vigilancia activa rutinaria fuera de las unidades de alto riesgo está en entredicho y no se recomienda de forma general, por no haber demostrado en muchos casos resultados satisfactorios en cuanto a erradicación, disminución de la prevalencia de la resistencia y de las IRAS y sobre todo por motivos de relación coste/efectividad (Humphreys, 2014). Sin embargo, la vigilancia activa en unidades no consideradas de riesgo, hasta eliminar la transmisión nosocomial durante dos semanas, y su aplicación sucesiva en otras unidades a lo largo del hospital, ha demostrado éxito en el control del MRSA (Rodríguez-Baño *et al.*, 2010). Aunque en nuestro centro no se pudo continuar la estrategia más allá de la primera unidad seleccionada, los datos del año 2019 son esperanzadores, mostrando una importante disminución de los porcentajes de resistencia a vancomicina en aislados de *E. faecium* tanto invasivos como no invasivos.

#### **4.3. *Staphylococcus epidermidis* resistentes a linezolid en el Hospital Universitario Central de Asturias (Artículos 3 y 4, Objetivos 3.1 y 3.2)**

El linezolid es un antimicrobiano de última línea con actividad frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo el MRSA y los estafilococos coagulasa-negativa (ECN) resistentes a meticilina. La elevada penetración del linezolid en el sistema nervioso central (SNC) hace que este antimicrobiano de última línea sea una efectiva alternativa para el tratamiento de las infecciones del SNC producidas por estas bacterias (Pintado *et al.*, 2020). Sin embargo, en los últimos años la prevalencia de resistencia a linezolid entre los ECN ha aumentado, especialmente en *S. epidermidis*, comprometiendo aún más el manejo de ese tipo de infecciones. En este contexto, en el marco del Objetivo 3.1 (Artículo 3) de la tesis se llevó a cabo una revisión retrospectiva de todas las infecciones del SNC producidas por *S. epidermidis* resistentes a linezolid (LRSE, *linezolid-resistant S. epidermidis*) durante los años 2013 a 2016 en el HUCA. Durante el periodo de estudio, se aislaron en el hospital siete LRSE en cultivos de LCR, todos ellos involucrados en procesos de ventriculitis, lo que supone un 23,3% del total de aislados de *S. epidermidis* recuperados de LCR en esos años (30). De los siete aislados detectados, tan solo cinco, obtenidos de pacientes que sufrieron una hemorragia cerebral (4) o un traumatismo

## DISCUSIÓN

cráneoencefálico (1) y que precisaron para su manejo clínico-terapéutico la colocación de un drenaje ventricular externo, pudieron recuperarse para el estudio molecular. Las cinco infecciones del SNC fueron categorizadas como ventriculitis nosocomiales según los criterios del *Center for Disease Control and Prevention* (Horan *et al.*, 2008). Además, todos los pacientes estuvieron ingresados entre 10 y 26 días en la UCI y tres de ellos recibieron linezolid antes del aislamiento de las cepas resistentes.

El porcentaje de infecciones del SNC asociadas con el uso de catéteres ventriculares externos es aproximadamente del 8% y se deben principalmente a la colonización del catéter por patógenos de la microbiota de la piel, como ECN y *Cutibacterium acnes*, siendo el *S. epidermidis* el principal agente etiológico (van de Beek *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta la fecha solamente se ha publicado un caso clínico de meningitis originada por un aislado de LRSE. Por otro lado, el estudio se centra en el tratamiento con daptomicina combinado con cotrimoxazol, más que en las características clínicas y microbiológicas del aislado (Vena *et al.*, 2013). Por tanto, cabe destacar que el trabajo de la presente tesis recoge la primera serie publicada de casos de ventriculitis nosocomial por LRSE, abordándose además la caracterización detallada de los aislados responsables.

En un estudio multicéntrico llevado a cabo por Russo *et al.*, en hospitales italianos, se analizaron tres grupos de pacientes para determinar, entre otros, los factores de riesgo para la selección de *Staphylococcus* spp. resistentes a linezolid (Russo *et al.*, 2015):

- *LIN-R group*: pacientes hospitalizados de los cuales se asiló durante el ingreso una cepa de *Staphylococcus* spp. resistente a linezolid de un hemocultivo.
- *LIN-S group*: pacientes hospitalizados de los cuales se asiló durante el ingreso una cepa de *Staphylococcus* spp. sensible a linezolid de un hemocultivo.
- *Control group*: pacientes sin infección y sin hemocultivos positivos para *Staphylococcus* spp. durante la hospitalización.

Los resultados de dicho estudio mostraron como factores de riesgo independientes para la selección de aislados resistentes a linezolid el tratamiento previo con este antimicrobiano y también con antimicrobianos de otras familias y la hospitalización en los 90 días previos. Asimismo, cuando se comparó el grupo LIN-R con el LIN-S, el primero mostró como principal origen de la bacteriemia el catéter venoso central ( $p < 0,001$ ), además de estar relacionado con una estancia media hospitalaria y de UCI mayor

( $p < 0,001$ ) y con un mayor porcentaje de mortalidad a los 30 días ( $p < 0,001$ ) (Russo *et al.*, 2015). La instrumentalización de los pacientes mediante la colocación de catéteres (tanto vasculares, como ventriculares externos), genera una disrupción de la piel que puede funcionar como una puerta de entrada de las bacterias de la microbiota cutánea hacia el torrente sanguíneo y el SNC. Por tanto, la colonización de la piel mediante fenómenos de transmisión cruzada y la selección por presión antibiótica juegan un papel crucial en la dispersión de ciertos clones de LRSE como el ST2 en el ambiente hospitalario (Russo *et al.*, 2015).

En nuestro trabajo, sólo tres de los cinco pacientes habían recibido tratamiento previo con linezolid. Sin embargo, todos ellos habían estado ingresados en la UCI del hospital con estancias prolongadas (10-26 días). Como muestran los datos del artículo, y al igual que sucede en otras UCI de nuestro país, el consumo de linezolid en estas unidades es muy superior al consumo en las unidades de hospitalización [7,71-8,10 vs 0,99-2,49 dosis diaria definida (DDD) de linezolid/100 pacientes día en UCI y resto de unidades del hospital durante el periodo de estudio, respectivamente]. Este alto consumo de linezolid en las UCI podría estar detrás del elevado porcentaje de resistencia a linezolid (25% en 2015) encontrado en aislados de *S. epidermidis* recuperados en estas unidades según datos del ENVIN-HELICS (<http://hws.vhebron.net/envin-helics>). En un reciente estudio, la estancia en UCI previa a la infección se identificó como un factor de riesgo independiente asociado al aislamiento de LRSE en hemocultivos (Bouiller *et al.*, 2020).

Los cinco aislados del presente estudio mostraron el mismo mecanismo de resistencia a linezolid, destacando la presencia de la mutación puntual G2576T en las 6 copias del gen que codifica el ARNr 23S, el cual es el principal mecanismo de resistencia a linezolid en ECN (Pfaller *et al.*, 2017; Dortet *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2018). La presencia de la mutación en todas las copias justifica por sí misma las elevadas CMI que presentaban los aislados frente al linezolid y al tedizolid (>256 y 32 mg/L, respectivamente), debido al efecto de dosis génica (*gene dosage effect*) comentado previamente en la introducción (Long *et al.*, 2012). Cabe destacar, además, que la ausencia de una copia silvestre impediría la reversión a la sensibilidad frente a linezolid mediante recombinación homóloga (Meka *et al.*, 2004b).

La tipificación molecular de los aislados utilizando macro-restricción genómica seguida de electroforesis de campo pulsado (PFGE) mostró patrones de bandas indistinguibles, y el MLST reveló que todos los aislados pertenecieron al clon ST2. Los aislados de *S. epidermidis* relacionados con el ámbito hospitalario pertenecen

## DISCUSIÓN

mayoritariamente al CC5, siendo dentro de este, el clon ST2 el más diseminado a nivel mundial (Widerström *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2014; Dortet *et al.*, 2018). El clon ST2 se caracteriza por un alto nivel de plasticidad genómica, relacionado con un alto porcentaje de fenómenos de recombinación/mutación y de adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos (Widerström *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2014). Todo ello genera con frecuencia fenotipos de multirresistencia que facilitan su supervivencia y establecimiento durante largos periodos de tiempo en el ambiente hospitalario. Este hecho justifica la baja variabilidad de aislados de *S. epidermidis* encontrados en los ambientes hospitalarios, en comparación con la alta diversidad de los mismos en la comunidad, siendo ello un reflejo del consumo de antimicrobianos en el entorno hospitalario (Widerström *et al.*, 2009). De esta forma, nuestros resultados, con cinco pacientes infectados por aislados estrechamente relacionados y pertenecientes al clon ST2 durante un periodo de cuatro años (2013-2016), sugieren un estado de endemidad clonal en la UCI del HUCA, a pesar de su traslado a un nuevo edificio en Junio del año 2014.

La transmisión cruzada y el alto consumo de linezolid en la UCI del HUCA podrían haber seleccionado el clon ST2 de LRSE y favorecido su establecimiento en esta unidad. Dicha situación es similar a los brotes por LRSE pertenecientes al clon ST2 documentados en otras UCI con consumos de linezolid elevados (Seral *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2015; Lazaris *et al.*, 2018; Weßels *et al.*, 2018). Algunos autores incluso han sugerido un umbral de 13 DDD de linezolid/100 pacientes día, a partir del cual la presión selectiva es tal que favorece la generación de brotes (Mulanovich *et al.*, 2010), cifra cercana al consumo de linezolid en la UCI del HUCA (7,71-8,10 DDD). El establecimiento de estos clones en las UCI, favorecido por la alta presión antibiótica, conduciría a la colonización de la microbiota de la piel de los pacientes, favorecida por la transmisión cruzada, lo que incrementaría el riesgo de infecciones nosocomiales asociadas al uso de catéteres.

El tratamiento de elección para las infecciones del SNC asociadas a catéter causadas por *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina es la vancomicina y la retirada del catéter (van de Beek *et al.*, 2010; Pintado *et al.*, 2018, 2020). Los cinco pacientes del estudio recibieron este tratamiento y todos fueron dados de alta, excepto uno de ellos que falleció por causas no atribuibles a la infección. Cada vez existe más evidencia de la eficacia del linezolid para el tratamiento de este tipo de infecciones del SNC, y aunque a día de hoy no es el tratamiento de elección, sí está recomendado en aquellos casos en los que no se pueden usar los glucopéptidos, por intolerancia o toxicidad renal, y cuando la infección está producida por aislados de MRSA con CMI  $\geq 1$  mg/L (Tunkel *et al.*, 2017;

Pintado *et al.*, 2018, 2020). El establecimiento de estos clones en las UCI y hospitales puede limitar severamente las opciones de tratamiento en casos de intolerancia a glucopéptidos o fracaso de tratamiento en infecciones causadas por aislados con CMI elevadas (Vena *et al.*, 2013; Pintado *et al.*, 2020).

La emergencia de aislados de LRSE en la UCI del HUCA y la descripción de infecciones graves como las descritas en el Artículo 3 llevaron a la implementación de un paquete de medidas de control de la infección en la UCI en el año 2017. Así, se redujo el consumo de linezolid en la unidad, limitando su uso mayoritariamente a tratamientos dirigidos y reemplazándose por vancomicina para el tratamiento empírico de las infecciones nosocomiales en las que se sospecha la implicación de bacterias Gram-positivas. Además, y como parte de una intervención PROA en el hospital, un experto en enfermedades infecciosas comenzó a revisar las prescripciones de antimicrobianos de última línea en la UCI. Tras la implementación de estas medidas, se observó un importante descenso en el consumo de linezolid y consecuentemente del porcentaje de resistencia a este fármaco en aislados de *S. epidermidis* en la UCI. El rápido descenso del número de aislados de LRSE tras la disminución del consumo de linezolid ya fue descrita previamente en otros escenarios similares (Mulanovich *et al.*, 2010; Dortet *et al.*, 2018; Weßels *et al.*, 2018; Bouiller *et al.*, 2020), destacando una vez más la importancia de la implementación de medidas de control como las aquí descritas para reducir la diseminación de clones de LRSE con escasas alternativas terapéuticas, preservando así la eficacia de un antimicrobiano de última línea como es el linezolid.

Algunos autores han sugerido que los brotes por LRSE en las UCI pueden representar tan solo la punta del iceberg de la situación, y que la resistencia a linezolid puede estar ocurriendo a niveles desconocidos en los ECN de la microbiota de la piel de los pacientes fuera de estas unidades (Dortet *et al.*, 2018). Esta hipótesis, junto con los resultados obtenidos en el Artículo 3, en el que se detectaron aislados de LRSE estrechamente relacionados, pertenecientes al mismo clon ST2 y con idéntico mecanismo de resistencia a linezolid durante cuatro años consecutivos (2013-2016) en la UCI, nos llevó a ampliar el estudio sobre los LRSE en el HUCA. Así, en el Artículo 4 se decidió estudiar la tendencia de la resistencia a linezolid en aislados de *S. epidermidis* obtenidos de muestras procedentes de la UCI y del resto del hospital y su relación con el consumo de linezolid en los respectivos entornos durante un periodo de siete años (2011-2017). Además, se llevó a cabo el estudio molecular de los primeros aislados de LRSE disponibles (44 en total, recuperados entre Junio del año 2013 y Junio del 2014). Como

## DISCUSIÓN

se puede observar en la Figura 1 del Artículo 4, los primeros aislados del LRSE han circulado en el HUCA al menos desde el año 2011 y durante el periodo de estudio (2011-2017) han mantenido una elevada prevalencia en la UCI (13,56-32,93%), donde el consumo de linezolid es mayor (6,34-8,10 DDD); y una prevalencia menor en el resto de unidades del hospital (2,48-6,80%), donde el consumo de linezolid es menor (0,63-2,49 DDD). La relación entre el consumo de linezolid y la prevalencia de aislados de LRSE en la UCI fue estadísticamente significativa ( $p= 0,02$ ). Aunque la prevalencia de LRSE en el resto del HUCA no mostró una relación estadísticamente significativa con el consumo de linezolid, y a pesar de que el consumo de este antimicrobiano fue muy inferior al de la UCI, durante el periodo de estudio se detectaron entre 18 y 56 aislados de LRSE al año. De los 44 LRSE recuperados entre Junio del año 2013 y Junio del 2014, tan solo el 43,18% (19/44) fueron aislados de pacientes ingresados en la UCI, mientras que el resto fueron obtenidos de pacientes ingresados en 14 servicios diferentes del HUCA. Los 44 aislados mostraron patrones de PFGE estrechamente relacionados, pertenecieron al clon ST2 y presentaron el mismo mecanismo principal de resistencia a linezolid, la mutación puntual G2576T en las seis copias del gen que codifica el ARNr 23S. Afortunadamente, tan solo en cinco aislados (11,36%) se encontró el gen transferible *cfr*, y hasta la fecha no se han detectado en el HUCA brotes por especies más virulentas, como *S. aureus*, portadoras de este gen de resistencia a linezolid, al contrario de lo que ya sucediera en otros hospitales de España (Morales *et al.*, 2010). Todos los aislados menos uno fueron resistentes a meticilina por mediación del gen *mecA* insertado dentro de un casete estafilocócico cromosómico (SCC)*mec* del tipo III, ya descrito previamente en aislados de LRSE pertenecientes al clon ST2 (Seral *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2015). Además, el 77,27% (34/44) de los aislados presentaron el mismo patrón de resistencia que los descritos en el Artículo 3, siendo únicamente sensibles a daptomicina, fosfomicina, teicoplanina, tetraciclina y vancomicina. Por otra parte, aislados de LRSE obtenidos de muestras de hemocultivo pertenecientes a pacientes ingresados tanto en la UCI como en otros servicios del HUCA durante los años 2015, 2016 y 2017, pertenecieron también al clon ST2 (datos no publicados). Estos datos sugieren que el clon de LRSE ST2 se ha establecido y ha permanecido a lo largo de 7 años (2011-17) en todo el HUCA, a pesar del traslado del hospital a un nuevo edificio en Junio de 2014. Como se comentó previamente, el establecimiento y permanencia de clones de LRSE se ha asociado mayoritariamente a unidades con altos consumos de linezolid (Seral *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2015; Lazaris *et al.*, 2018; Weßels *et al.*, 2018), y tan solo



ocasionalmente se han mantenido durante largos periodos de tiempo. La primera descripción fue en el año 2012 por Barros *et al.*, trabajo en el cual se detectaron cinco aislados de LRSE pertenecientes al clon ST2 en un hospital de Portugal durante un periodo de siete meses (Barros *et al.*, 2014). Más recientemente, Morroni *et al.*, documentaron en un hospital de Italia, durante un periodo de 12 años, 26 aislados de LRSE de los cuales 23 (88,46%) pertenecían al clon ST2 y mostraban como principal mecanismo de resistencia a linezolid la mutación G2576T, (Morroni *et al.*, 2016). A diferencia de estos estudios, que no aportaban datos sobre el consumo de linezolid, Dortet *et al.*, relacionaron la diseminación y establecimiento de aislados de LRSE pertenecientes a tres clones (ST2, ST5 y ST22) en un hospital de Francia, durante un periodo de tres años, con el elevado consumo de linezolid en el hospital (Dortet *et al.*, 2018). El estudio realizado en esta tesis describe por primera vez el establecimiento de un clon de LRSE no sólo en una unidad con elevado consumo de linezolid como la UCI, sino en el resto de unidades del hospital durante un largo periodo de tiempo. Estos resultados confirmarían la hipótesis de que existe una gran dispersión de clones de LRSE fuera de las UCI, con un gran número de pacientes colonizados en otras unidades hospitalarias. Estas cifras podrían estar subestimadas ya que, al formar parte de la microbiota de la piel, el aislamiento de *S. epidermidis* en muestras clínicas rara vez se considera de valor, salvo en muestras estériles, y por tanto no es frecuente la realización de pruebas de sensibilidad antibiótica sobre estos aislados. Sin embargo, cuando los pacientes se encuentran ingresados en UCI, están sometidos frecuentemente a la colocación de dispositivos médicos invasivos que funcionan como una puerta de entrada hacia líquidos y cavidades estériles a partir de la microbiota de la piel. El aislamiento de *S. epidermidis* en este tipo de muestras (hemocultivos, catéteres, LCR, etc.) tiene generalmente valor y por tanto a los aislados recuperados se les realizan pruebas de sensibilidad, lo que permite la detección de mecanismos de resistencia a linezolid y otros fármacos. Este fenómeno queda reflejado en los datos del ENVIN-HELICS que muestran como *S. epidermidis* es el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en pacientes de las UCI y el primero dentro de los Gram-positivos (<http://hws.vhebron.net/envin-helics>). Además, en la mayoría de series publicadas existe un importante porcentaje de aislados de LRSE procedentes de muestras invasivas como catéteres y hemocultivos: Barros *et al.*, 100% (5/5); Morroni *et al.*, 84,6% (22/26); Baos *et al.*, 60% (60/100), Weßels *et al.*, 57,1% (8/14) (Baos *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2014; Morroni *et al.*, 2016; Weßels *et al.*, 2018), de forma similar a nuestro estudio donde se obtuvo un 38,6% (17/44). Incluso se han

## DISCUSIÓN

descrito brotes de LRSE relacionados con infecciones asociadas a catéteres en UCI, como el ocurrido en un hospital de Zaragoza en el año 2008. En este estudio, el 21,1% de los *S. epidermidis* recuperados de muestras de catéteres y hemocultivos obtenidas de pacientes ingresados en la UCI, fueron resistentes a linezolid y meticilina, pertenecieron al clon ST2 y presentaron SCCmec tipo III (Seral *et al.*, 2011), al igual que en nuestro estudio. La relación entre las infecciones asociadas a catéteres y los clones de LRSE podría ir más allá del hecho de la colonización previa de la microbiota de la piel y la disrupción de esta por los dispositivos médicos. El uso de catéteres recubiertos con antimicrobianos como la rifampicina se ha postulado como un factor más en la selección de clones resistentes (Reitzel *et al.*, 2020). En esta Tesis, el 97,73% (43/44) de los aislados de LRSE del Artículo 4 y el 100% (5/5) del Artículo 3 fueron resistentes a rifampicina. Además, en un estudio reciente, Lee *et al.*, identificaron como principal mecanismo de resistencia a este antibiótico en cepas de *S. epidermidis* una doble mutación (D471E y I527M) en el gen *rpoB* que codifica la subunidad  $\beta$  de la enzima ARN-polimerasa bacteriana. Estas mutaciones se encontraron, de forma prácticamente exclusiva, en aislados pertenecientes a los clones ST2 y ST23 (Lee *et al.*, 2018). En este estudio además, se demostró una relación causal entre la resistencia a la rifampicina y la heterorresistencia a glucopéptidos (Lee *et al.*, 2018). La presencia en el HUCA de un clon ST2 de LRSE resistente a la meticilina y a la rifampicina, junto con la dificultad para detectar la heterorresistencia a glucopéptidos mediante los métodos convencionales de sensibilidad a antimicrobianos, remarcan la importancia del estudio y control de estos aislados con escasas alternativas terapéuticas. Las medidas de control de la infección y restricción del consumo de linezolid a través del programa PROA, implantadas en el año 2017 en la UCI del HUCA y descritas previamente, consiguieron una drástica disminución de la prevalencia de LRSE en la UCI. Sin embargo, a la luz de los resultados del Artículo 4, donde se describe el establecimiento de un clon de LRSE en todo el hospital durante un periodo de tiempo prolongado, se pone de manifiesto la importancia ampliar estas medidas a todo el hospital, con el fin de disminuir la tasa de resistencia y preservar la eficacia del linezolid.

#### 4.4. *Enterococcus faecalis* con sensibilidad disminuida a linezolid en el Hospital El Bierzo (Artículo 5 no publicado, Objetivo 3.3)

Tal y como muestran los resultados del Artículo 2 y como se discutió previamente, en el HEB existe una alta prevalencia de VRE con muy escasas alternativas terapéuticas (limitadas a linezolid y daptomicina). Por esta razón, a partir de Febrero del año 2018 se comenzó a realizar un cribado rutinario de todos los enterococos con CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid, con el fin de detectar la presencia de mecanismos de resistencia a oxazolidinonas potencialmente transferibles que pudiesen agravar aún más la situación. De esta forma, a todos los aislados que presentaban esas CMI se les realizó un ensayo de disco difusión con cloranfenicol, y un estudio mediante PCR de los genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas: *cfr*, *optrA* y *poxtA*. En el Artículo 5 se presentan los resultados del cribado realizado entre Febrero y Diciembre del año 2018, periodo durante el cual se aislaron un total de 443 aislados de enterococos (367 *E. faecalis* y 76 *E. faecium*) de los cuales tan solo cuatro (0,9%) presentaron CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid. Esta baja prevalencia de aislados con sensibilidad disminuida a este antibiótico (una CMI de 4 mg/L es categorizada como sensible por el EUCAST e intermedia por el CLSI) está en línea con estudios previos. Así, en el Programa de Vigilancia de Antimicrobianos SENTRY en el que se estudiaron 26.648 aislados de enterococos procedentes de diferentes países en el periodo 2008-2016, tan solo se encontraron 102 (0,38%) con CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid (Deshpande *et al.*, 2018). En otros estudios en los que se hicieron cribados similares al del presente trabajo, como el de Argudín *et al.*, en Bélgica o el de Càmara *et al.*, en España, el número de aislados que presentaban estas CMI también fue muy reducido con porcentajes inferiores al 1% del total [29/7.331 (0,40%) y 6/1.640 (0,37%), respectivamente] (Argudín *et al.*, 2019; Càmara *et al.*, 2019).

Los cuatro aislados encontrados en el estudio fueron *E. faecalis* resistentes a cloranfenicol y con una CMI de 4 mg/L para linezolid. En tres de los cuatro se detectó el gen *optrA*, aunque todos fueron negativos para los otros genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas conocidos (*cfr* y *poxtA*). El gen *optrA* fue descrito por primera vez en el año 2015 por Wang *et al.*, en una colección de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen animal y humano recuperadas entre 2009 y 2014 en China (Wang *et al.*, 2015). Desde su descripción, este gen ha sido encontrado en cepas de origen animal, humano y en muestras ambientales a lo largo de todo el mundo (África, América del Norte y del Sur, Asia y Europa), aunque en mayor proporción en China (Wang *et al.*, 2015; Deshpande *et al.*,

## DISCUSIÓN

2018; Argudín *et al.*, 2019; Càmara *et al.*, 2019; Elghaieb *et al.*, 2019; Ruiz-Ripa *et al.*, 2019, 2020; Moure *et al.*, 2020). En España, hasta la fecha tan solo existen tres publicaciones en las que se describa la detección de dicho gen en muestras clínicas de origen humano (Càmara *et al.*, 2019; Moure *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). En estudios recientes se ha puesto de manifiesto que dicho gen es el principal mecanismo responsable de la resistencia a linezolid en *E. faecalis*. De hecho, en el estudio SENTRY el 72,2% (26/36) de los aislados de *E. faecalis* con CMI  $\geq 4$  mg/L portaban este gen (Deshpande *et al.*, 2018). También en nuestro país, en un estudio realizado por el Centro Nacional de Microbiología con un número importante de aislados con sensibilidad disminuida a linezolid, el gen *optrA* fue encontrado en el 83,6% (51/61) de las cepas de *E. faecalis* (Moure *et al.*, 2020). En cuanto al origen de los aislados *optrA* positivos de nuestro trabajo, todos fueron obtenidos de muestras de orina de pacientes que presentaban infección del tracto urinario (ITU), al igual que en las series previamente descritas en España (Càmara *et al.*, 2019; Moure *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). Esto no es de extrañar ya que las ITU son una de las principales infecciones que producen los enterococos. A diferencia del estudio de Càmara *et al.*, donde todos los aislados *optrA* positivos (5) fueron obtenidos de muestras procedentes de pacientes ingresados (Càmara *et al.*, 2019), los aislados de la presente tesis fueron recuperados de pacientes en la comunidad. De la misma manera, en el estudio llevado a cabo por Moure *et al.*, el 53,4% de los 45 aislados de *E. faecalis* positivos para el gen *optrA* (procedentes de 17 hospitales de 13 provincias diferentes), fueron recuperados de pacientes comunitarios (Moure *et al.*, 2020). Muestra de esta dispersión comunitaria es la variabilidad clonal de los aislados encontrada en nuestro estudio, al igual que fue descrito en los otros trabajos (Argudín *et al.*, 2019; Càmara *et al.*, 2019; Moure *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). Dos de ellos pertenecieron a los clones ST480 y ST585, siendo éstos los más predominantes a lo largo del mundo en aislados de *E. faecalis optrA* positivos (Cai *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2018; Argudín *et al.*, 2019; Sassi *et al.*, 2019; Egan *et al.*, 2020b) y también en España (Càmara *et al.*, 2019; Moure *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). El tercer aislado perteneció al clon ST7, variante de un solo locus (*pstS*) del ST317, y descrito por primera vez en este trabajo.

El gen *optrA* confiere resistencia a varios antimicrobianos: fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramineas del grupo A, generando un fenotipo de resistencia denominado PhLOPSA. Se ha propuesto como hipótesis que el uso de un fenicol, el floranfenicol, en veterinaria podría ser la causa de

la mayor prevalencia de enterococos *optrA*-positivos encontrados en cepas de origen animal frente a las de origen humano (Cai *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). El uso de estos fenicoles en los animales de producción podría favorecer la co-selección de aislados *optrA*-positivos, los cuales a su vez han sido detectados también en productos cárnicos, lo que pone de manifiesto la importancia que puede tener la cadena alimentaria en la dispersión del gen *optrA* (Freitas *et al.*, 2017; Elghaieb *et al.*, 2020), así como la importancia de una aproximación *One Health* para luchar contra esta resistencia (Walsh, 2018). Además, el uso de otros antimicrobianos en medicina humana, como las quinolonas, también ha sido sugerido como mecanismo de co-selección de aislados *optrA*-positivos (Càmara *et al.*, 2019). Estos dos hechos podrían estar detrás de la elevada prevalencia (3,50%) de portadores fecales de enterococos *optrA*-positivos encontrada en voluntarios sanos en China (Cai *et al.*, 2019). Ninguno de los pacientes de nuestro estudio había sido previamente tratado con oxazolidinonas, aunque dos de ellos sí que habían recibido otros antimicrobianos como azitromicina, cefuroxima y quinolonas en los últimos tres meses. Este hecho podría haber favorecido la co-selección de los aislados *optrA*-positivos, aunque son necesarios más estudios para conocer con certeza los reservorios de este gen, así como la relevancia del uso de antimicrobianos en medicina humana como factor selector de los aislados que lo portan.

La secuenciación del genoma de los tres aislados portadores del gen *optrA* permitió su asignación a diferentes clones: ST480, ST585 and ST7, para *Efae*-HEB1, *Efae*-HEB2 y *Efae*-HEB3, respectivamente. Demostró, además, la localización plasmídica de los genes *optrA* que, junto con el gen *fexA* de resistencia a fenicoles, se encuentra en entornos genéticos diferentes en cada uno de los plásmidos, asociados a una o dos copias de la secuencia de inserción *IS1216*. Esto apoya el papel de *IS1216* en la movilización de *optrA* (y *fexA*), previamente sugerido por otros autores (Shang *et al.*, 2019). En uno de los tres aislados, *Efae*-HEB2, se detectó un segundo plásmido que porta numerosos genes que confieren resistencia frente a aminoglicósidos [*aac(6')*-*aph(2')*], *ant(6)-Ia*, *aph(3')*-III, *aadE*, *sat4*, *apt* y *spw*], tetraciclinas [*tet(L)* y *tet(M)*], cloranfenicol (*cat*) y trimetoprim [*dfr(G)*], o son responsables de los fenotipos MLS<sub>B</sub> [macrólidos-lincosamidas-estreptograminas del grupo B; *erm(B)*], LS<sub>AP</sub> (lincosamida, estreptogramina A y pleuromutilinas; *lsaE*) y L (lincosamidas: *lnuB*). Un plásmido estrechamente relacionado con este se encontró en un aislado ST256 de *E. faecalis*, obtenido de heces de cerdo en China (número de acceso MK465702). Sin embargo, esta es la primera vez que dicho plásmido se detecta fuera de China, en concreto en un aislado

## DISCUSIÓN

ST585 de origen clínico, demostrando así su presencia en diferentes clones, ambientes y países. El análisis de la secuencia del gen *optrA* identificó dos variantes diferentes, correspondiendo con dos formas alternativas de la correspondiente proteína. *Efae*-HEB2 presentó la proteína OptrA<sub>E349</sub>, considerada como silvestre ya que fue encontrada en el primer aislado *optrA* positivo, codificada por el plásmido pE349 (Wang *et al.*, 2015). Los otros dos aislados (*Efae*-HEB1 y *Efae*-HEB3) mostraron las sustituciones Tyr176Asp y Thr481Pro que corresponden a la variante DP, previamente descrita en aislados clínicos en hospitales de China (Cai *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2016; Shang *et al.*, 2019) y también muy recientemente en España (Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). Independientemente de la variante, los tres aislados del HEB presentaron una CMI de 4 mg/L para linezolid, la cual ha sido descrita previamente tanto en aislados con la variante salvaje como con la variante DP. De hecho, se ha sugerido que el número y tipo de sustituciones aminoacídicas en la proteína OptrA no tiene un claro efecto sobre el nivel de resistencia a linezolid (Morrone *et al.*, 2017). Además, tanto el CLSI como el EUCAST consideran los aislados como resistentes cuando presentan una CMI > 4 mg/L, mientras que los aislados con una CMI de 4 mg/L son considerados como sensibilidad intermedia (CLSI) o sensibles (EUCAST) (CLSI, 2019; EUCAST, 2019). Según esto, la dispersión del gen *optrA* en enterococos podría estar subestimada, debido a la pequeña alteración que genera en las CMI frente al linezolid, que con frecuencia se sitúan en 4 mg/L y pueden ser categorizadas como sensibles según el EUCAST.

La fuerte asociación de CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid junto con la resistencia al cloranfenicol, podrían ser un gran marcador conjunto subrogado de la presencia del gen *optrA*. Teniendo en cuenta que en muchos de los nuevos paneles de estudio de sensibilidad a antimicrobianos de los equipos automatizados se ha incluido el cloranfenicol, en nuestro trabajo se sugiere la creación de una alerta en los mismos cuando una bacteria Gram-positiva muestre una CMI  $\geq 4$  mg/L para linezolid además de resistencia a cloranfenicol. Las bacterias que cumplan estos criterios podrían ser estudiadas posteriormente para la presencia de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas, mediante PCR múltiples desarrolladas previamente (Bender *et al.*, 2019). Al igual que en el presente estudio, el gen *optrA* ha sido descrito principalmente en aislados de *E. faecalis* sensibles a varios antimicrobianos, incluidos los beta-lactámicos. Sin embargo, estos aislados pueden servir de reservorio para la dispersión del gen a otras especies más virulentas y/o con menos alternativas terapéuticas (como los *E. faecium* resistentes a vancomicina); al igual que sucede con los ECN, el gen *cfr* y *S. aureus*. De

hecho, existen ya publicadas descripciones de brotes de *E. faecium* resistentes a vancomicina positivos para el gen *optrA*, lo cual supone un serio problema desde el punto de vista terapéutico (Lazaris *et al.*, 2018; Egan *et al.*, 2020a). Considerando todo lo anteriormente mencionado es esencial la vigilancia y detección precoz de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas, especialmente en entornos sanitarios con alta prevalencia de VRE como es el HEB, así como una estrategia *One Health* para evitar la dispersión de los mismos y mantener la eficacia de estos antimicrobianos de última línea.

#### **4.5. Evaluación de nuevos métodos y algoritmos para la detección precoz de mecanismos de resistencia de especial importancia o de bacterias procedentes de muestras invasivas (Objetivo 4)**

En el Objetivo 4 de la tesis se evaluaron nuevos métodos y algoritmos para la detección precoz de mecanismos de resistencia a beta-lactámicos, fundamentalmente carbapenemasas, en bacilos Gram-negativos, a partir de muestras o aislados de pacientes atendidos en el HUCA. Todo ello con el fin de incorporarlos a la rutina de trabajo del Servicio de Microbiología. Estudios previos confirmaron la preocupante situación epidemiológica de este hospital, que se había convertido en un importante reservorio de enterobacterias multirresistentes productoras de carbapenemasas y/o BLEE (Fernández *et al.*, 2014, 2015, 2016a, 2016b, 2016c; Poirel *et al.*, 2016). En este contexto, es de vital importancia la detección precoz de dichas bacterias, para instaurar lo más pronto posible un tratamiento efectivo en los pacientes infectados por las mismas, especialmente en el caso de infecciones invasivas, y para la rápida implementación de medidas de control de la infección que permitan reducir su dispersión. Tal y como se comentó previamente, existen en la actualidad numerosas técnicas para la detección de mecanismos de resistencia, basadas en diferentes tecnologías y con importantes diferencias en cuanto a su aplicabilidad en la rutina de los laboratorios de microbiología clínica, tiempos de respuesta y coste. Por estas razones, es necesario elaborar algoritmos de trabajo que resulten costo-efectivos y se adapten a la rutina del laboratorio y a la epidemiología del hospital.

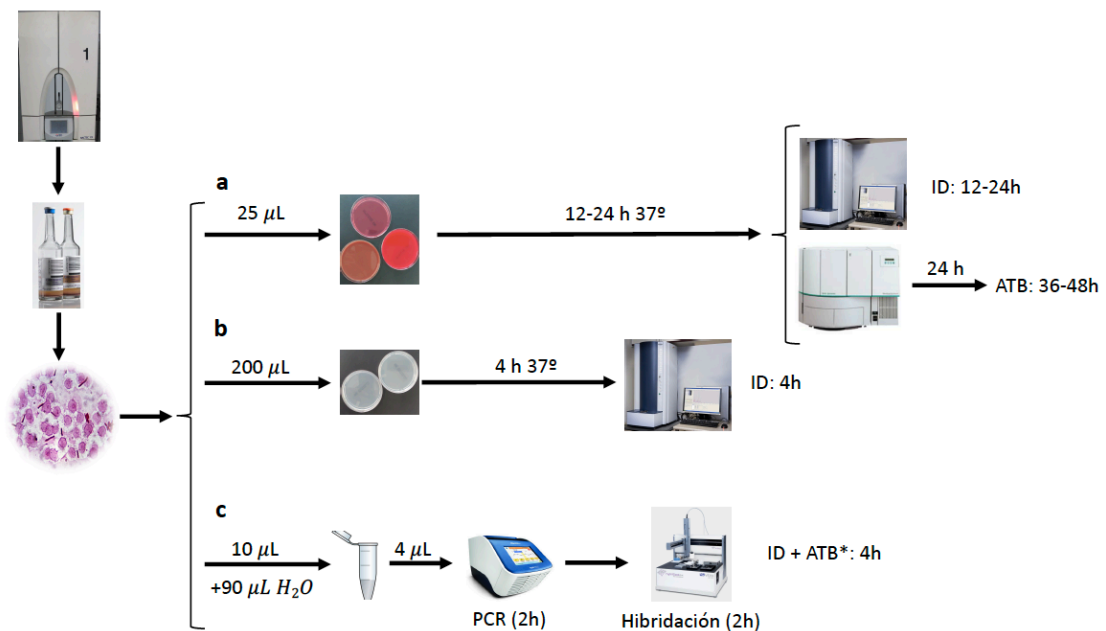
#### **4.5.1. Evaluación de un nuevo microarray para la identificación y detección de genes de resistencia bacterianos a partir de hemocultivos positivos (Artículo 6, Objetivo 4.1)**

Los bacilos Gram-negativos, especialmente aquellos pertenecientes al orden *Enterobacterales*, se han convertido en una de las principales causas de bacteriemia (Opota *et al.*, 2015a; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2017). La emergencia de mecanismos de resistencia, como las BLEE o las carbapenemasas, en estas bacterias hace cada vez más compleja la instauración de tratamientos antimicrobianos empíricos efectivos para el manejo de las infecciones invasivas que causan (Fernández *et al.*, 2016c; Salimnia *et al.*, 2016). De hecho, según estudios recientes, un tercio de los pacientes con sepsis reciben un tratamiento antimicrobiano empírico no efectivo (Ledeboer *et al.*, 2015), lo que puede incrementar la mortalidad desde un 10% hasta un 40% (Salimnia *et al.*, 2016). Además, es bien conocido que la instauración de un tratamiento antimicrobiano efectivo en las seis primeras horas es crucial para reducir la morbi-mortalidad de los pacientes con sepsis (Opota *et al.*, 2015b). Por estas razones, existen cada vez más técnicas para la identificación y detección de determinantes de resistencia que se pueden aplicar directamente sobre las muestras de hemocultivo (HC) positivo (Ledeboer *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2016c; Galiana *et al.*, 2017). En el Artículo 6 se llevó a cabo la evaluación de una nueva técnica, el *Sepsis Flow Chip* (SFC) (Master Diagnóstica, Granada, Spain), para la identificación y detección de determinantes de resistencia de los principales agentes causales de bacteriemia. La evaluación se llevó a cabo de forma prospectiva durante un periodo de dos meses (Febrero-Marzo del 2017), en aquellos HC positivos en los que se observaron bacilos Gram-negativos (100). Además, se analizaron 19 frascos de HC inoculados artificialmente con aislados de enterobacterias, portadoras de diferentes genes de resistencia, que habían sido caracterizadas previamente. La razón de excluir los HC con cocos Gram-positivos fue evitar incluir un número importante de HC con estafilococos coagulasa-negativa sin relevancia clínica (contaminaciones), Además, la detección de resistencias por parte del kit está centrada fundamentalmente en bacilos Gram-negativos. La evaluación del SFC (Figura VIII-c) se realizó en paralelo con el protocolo de rutina del laboratorio (Figura VIII-a) y con el protocolo de identificación mediante MALDI-TOF previa incubación corta de cuatro horas descrito por Fernández *et al.* (Fernández *et al.*, 2016c) (Figura VIII-b).



El sistema SFC se basa en una PCR múltiple seguida de una hibridación reversa automatizada en la plataforma hibrySpot HS24, con una capacidad máxima de 24 muestras. Los resultados pueden obtenerse en aproximadamente cuatro horas trabajando a máxima capacidad (24 muestras).

Figura VIII: Protocolos de identificación y antibiograma para hemocultivos positivos para bacilos Gram-negativos, mostrando el tiempo de obtención de los resultados evaluados en el estudio.



a: Protocolo de rutina del laboratorio de microbiología del HUCA para la identificación y antibiograma de hemocultivos positivos; b: Protocolo de identificación de hemocultivos positivos con MALDI-TOF previa incubación corta (4h) descrito por Fernández *et al.* (Fernández *et al.*, 2016c); c: Protocolo de identificación y detección de determinantes de resistencia mediante el *Sepsis Flow Chip*; ID: Identificación; ATB: Antibiograma; ATB\*: Detección de determinantes de resistencia.

El sistema SFC consiguió detectar 85 de las 90 bacterias incluidas en su panel (Tabla IX) presentes en los HC monomicrobianos y 15 de 19 en los polimicrobianos, resultando un 97,7% y un 78,9% de concordancia con el método de referencia (MALDI-TOF/Microscan), respectivamente. Sin embargo, al considerar todas las bacterias recuperadas en el estudio (tanto las incluidas en el panel del SFC como las no incluidas), el porcentaje de concordancia disminuyó al 94,4% y 68,2% en los HC monomicrobianos y polimicrobianos, respectivamente. Estas diferencias se deben a que 6 de las 112 (5,4%) bacterias detectadas por el método de referencia no están incluidas en el panel del SFC (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Pasteurella multocida* y *Pseudomonas putida*, entre

## DISCUSIÓN

los Gram-negativos, así como *Enterococcus casseliflavus* y *Streptococcus anginosus* entre los Gram-positivos de las infecciones polimicrobianas). Sin embargo, la mayor parte de estos últimos microorganismos son agentes etiológicos poco frecuentes de bacteriemia y no se encuentran habitualmente en los paneles comerciales de diagnóstico de sepsis. En definitiva, los microarray siguen siendo las técnicas con mayor capacidad de detección en cuanto a patógenos diferentes se refiere, siendo capaces de detectar entre el 90 y 95% de los agentes causales de bacteriemia (Opota *et al.*, 2015a).

Tabla IX: Bacterias Gram-negativas y genes de resistencia detectados por el ensayo *Sepsis Flow Chip*.

Bacterias Gram-negativas	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Citrobacter</i> spp.*, <i>Enterobacter aerogenes</i> ,*†, <i>Enterobacter cloacae</i> *, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> *, <i>Morganella morganii</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> *, <i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Genes de resistencia	<i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>GIM</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-3</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-15</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-19</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>NMC/IMI</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> , <i>bla</i> <sub>SIM</sub> , <i>bla</i> <sub>SME</sub> , <i>bla</i> <sub>SPM</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>

\* Especies identificadas solo como *Enterobacteriales* por la sonda “*Enterobacteriaceae*”

† Actualmente *Klebsiella aerogenes*.

Los resultados del estudio en cuanto a identificación bacteriana fueron similares a los obtenidos en la única evaluación previa del SFC, en la que se obtuvo un porcentaje de concordancia de un 96,2% y un 89,1% en la identificación de HC monomicrobianos y polimicrobianos, respectivamente (Galiana *et al.*, 2017). A pesar de la buena concordancia encontrada en nuestro estudio para los HC monomicrobianos (94,4%), hay que reseñar que algunas bacterias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter kobei* y *Salmonella* spp.) fueron identificadas solo como “*Enterobacteraceae*”. Este hecho es de importancia, especialmente en aquellas especies del orden *Enterobacteriales* que de forma natural expresan beta-lactamasas cromosómicas como las AmpC. El tratamiento de estas bacterias presenta importantes diferencias en relación a otras especies del mismo orden que no producen AmpC de forma natural. Además, ninguno de los aislados de *Morganella morganii* de nuestro estudio (4) fueron correctamente identificados por el SFC. Aunque en el estudio previo de Galiana *et al.*

(Galiana *et al.*, 2017) se había conseguido la identificación correcta de esta bacteria, hay que tener en cuenta que en su trabajo tan solo se incluyó un aislado. Por tanto, serían necesarios nuevos estudios para evaluar la fiabilidad del SFC para la identificación de *M. morgani*. Estas deficiencias en cuanto a identificación fueron subsanadas en nuestro estudio con la incorporación del análisis por MALDI-TOF tras incubación corta. De esta manera se consiguió identificar de forma correcta no sólo los aislados de *M. morgani* sino también llegar a nivel de especie en todas las bacterias identificadas como “*Enterobacteraceae*” por el SFC, aumentando así el porcentaje de concordancia del 94,4% al 100%. Cabe destacar que la aplicación de este protocolo de MALDI-TOF, por sí solo, consiguió una concordancia del 98,9% con el método de referencia, siendo capaz de identificar todas menos una de las bacterias presentes en los HC monomicrobianos (*Pseudomonas aeruginosa*), como ya se demostró previamente (Fernández *et al.*, 2016c).

Por el contrario, la concordancia en cuanto a los HC polimicrobianos fue claramente inferior, pudiendo lograr en tan solo el 50% la identificación correcta de todas las bacterias. Como ya había sido descrito previamente, la aplicación del protocolo de identificación con MALDI-TOF tras incubación de cuatro horas no aportó aquí ninguna ventaja (Fernández *et al.*, 2016c), permitiendo identificar tan solo una de las bacterias presentes en los HC polimicrobianos. La correcta identificación de todas las bacterias presentes en los HC polimicrobianos continúa siendo un importante reto para las diferentes técnicas desarrolladas con esta finalidad (Ledebøer *et al.*, 2015; Fiori *et al.*, 2016; Salimnia *et al.*, 2016). Algunos autores han sugerido que en los HC polimicrobianos uno de los microorganismos puede crecer más rápido que los demás, generando la positividad del frasco de HC en los sistemas de cultivo automatizados. De esta forma, el resto de microorganismos presentes podrían no haber alcanzado la concentración suficiente para ser detectados por los métodos moleculares aplicados posteriormente, provocando resultados falsos negativos (Blaschke *et al.*, 2012).

Respecto a la detección de determinantes de resistencia, el sistema SFC mostró una concordancia del 98,8%, 98,9% y 99% para *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> respectivamente, cuando se comparó con la amplificación por PCR de los mismos genes. Además, todos los fenotipos de bacterias productoras de BLEE o carbapenemasa por el sistema Microscan mostraron concordancia con los resultados del SFC (excepto un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* que había resultado *bla*<sub>CTX-M</sub> positivo pero que, tras reanalizarse, resultó negativo para este gen). La evaluación previa del SFC llevada a cabo por Galiana *et al.* mostró una sensibilidad de un 81,8% para la detección de BLEE (siete

## DISCUSIÓN

aislados *bla*<sub>CTX-M</sub> y dos *bla*<sub>SHV</sub>) en bacilos Gram-negativos (Galiana *et al.*, 2017). Sin embargo, en ninguno de los hemocultivos incluidos se habían encontrado bacterias productoras de carbapenemasas, aunque sí habían utilizado HC inoculados artificialmente (Galiana *et al.*, 2017). Por tanto, nuestro estudio es el primero en mostrar la efectividad del SFC para la detección de carbapenemasas en muestras clínicas de HC. Debido a la baja prevalencia de *bla*<sub>KPC</sub> en nuestro país (Oteo *et al.*, 2015), tan solo se incluyeron dos HC inoculados artificialmente con aislados de enterobacterias que portaban este gen (*Enterobacter asburiae* y *Klebsiella pneumoniae*), siendo tan solo uno de ellos (*Klebsiella pneumoniae*) detectado por el SFC, por lo que serán necesarios nuevos estudios para validar la eficacia de esta técnica para la detección de *bla*<sub>KPC</sub>.

Una limitación importante del SFC es la no diferenciación de las variantes de *bla*<sub>SHV</sub>. Algunos miembros de esta familia codifican beta-lactamasas de espectro reducido mientras que otros codifican BLEE (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 1996). Aunque se encontró un 100% de concordancia en la detección del gen *bla*<sub>SHV</sub> entre el SFC y la PCR específica, tan solo cuatro de los 18 aislados positivos para este gen fueron confirmados como productores de una SHV de tipo BLEE. Esto representa una importante limitación, ya que el manejo terapéutico de aislados *bla*<sub>SHV</sub>, productores o no de BLEE, es completamente diferente. Además, en los aislados de *Klebsiella pneumoniae*, la presencia del gen *bla*<sub>SHV-1</sub> de localización cromosómica daría siempre un resultado positivo, sin poder diferenciar aquellos aislados sensibles a cefalosporinas de amplio espectro de aquellos con una sobreexpresión del gen *bla*<sub>SHV-1</sub> y que podrían expresar un fenotipo de BLEE (Calvo *et al.*, 2011). Por otra parte, se detectaron tres resultados falsos positivos respecto a la detección de genes de resistencia. Estos resultados probablemente fueron debidos a una contaminación durante la recolección de la muestra o su procesamiento, ya que no pudo confirmarse la presencia de estos genes de resistencia mediante la PCR específica. Cabe destacar, además, que alguna mutación en la diana de la sonda podría dar lugar a un falso negativo, por lo que siempre será necesaria la realización de un antibiograma tras el subcultivo del HC. Finalmente, es evidente que la ausencia de detección de genes de resistencia mediante el SFC no excluye la presencia de otros que no estén incluidos en el panel.

Como ventajas destacables, el sistema SFC detectó dos aislados productores de *bla*<sub>OXA-48</sub> que no habrían sido revelados mediante el procedimiento de rutina del laboratorio de microbiología. De hecho, en base a las bajas CMI que mostraban, habían sido categorizados como sensibles en el antibiograma, probablemente debido a un bajo

nivel de expresión del gen. La detección de genes de resistencia en bacterias que muestran fenotipo sensible podría tener un cierto valor. Sin embargo, existe debate en torno a ello y aún no se conoce el papel que puede jugar en el correcto manejo clínico-terapéutico y epidemiológico de los pacientes que sufren infecciones por dichas bacterias (Tuite *et al.*, 2014). Otra importante ventaja del SFC es la capacidad de detectar a *Klebsiella variicola* como *K. pneumoniae*, frente a otros microarray que directamente obtienen falsos negativos para la primera especie (Ledeboer *et al.*, 2015). La detección de *K. pneumoniae* junto con un resultado negativo para el gen *bla<sub>SHV</sub>*, que como se dijo anteriormente es intrínseco en *K. pneumoniae*, podría sugerir la presencia de *K. variicola* (Hæggman *et al.*, 2004).

En la actualidad, además del SFC, existen otras plataformas para la identificación de bacterias y sus determinantes de resistencia a partir de HC positivos, basadas en diferentes tecnologías como los microarray, la PCR múltiple o el FISH (*fluorescence in situ hybridization*) (Opota *et al.*, 2015a; Duncan *et al.*, 2019). Entre ellas, las basadas en PCR específicas o múltiples, como el sistema Xpert MRSA/SA BC o el FilmArray, son capaces de ofrecer resultados en una hora. Sin embargo, el primero sólo detecta la presencia de *Staphylococcus aureus* y del gen *mecA*, y el segundo, aunque con un panel de identificación más amplio, sólo detecta tres genes de resistencia (Tabla X).

## DISCUSIÓN

Tabla X: Características de los principales sistemas disponibles para la identificación de bacterias a partir de hemocultivo positivo.

Sistema	Método	Tiempo de resultados	Microorganismos detectados	Determinantes de resistencia detectados	Sensibilidad Especificidad (%)
PNA FISH y QuickFISH	FISH	>1-3 h	4 Gram-positivas	-	97-100
			4 Gram-negativas 5 Hongos		90-100
Verigene	Microarray	2,5 h	12 Gram-positivas	<i>mecA, vanA/B, KPC, NDM, CTX-M, VIM, IMP, OXA-12</i>	81-100
			8 Gram-negativas		98-100
Prove-it Sepsis	Microarray	3,5 h	60 Bacterias	<i>mecA</i>	95
			13 Hongos		99
FilmArray	PCR Múltiple	1 h	8 Gram-positivas	<i>mecA, vanA/B, KPC</i>	95-97
			11 Gram-negativas 5 Hongos		91-98
Xpert MRSA/SA BC	RT-PCR	1 h	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	100 99-100

FISH: *fluorescence in situ hybridization*; RT-PCR: PCR a tiempo real.

Modificado de (Opota *et al.*, 2015a).

La plataforma más similar al SFC es el microarray Verigene, que es capaz de identificar en un tiempo similar (2,5 horas) ocho bacterias Gram-negativas y seis genes de resistencia diferentes (de estas bacterias) (Tabla X).

En conclusión, el sistema SFC presenta el panel de identificación bacteriana y detección de determinantes de resistencia más amplio del mercado, aportando resultados en 3-4 horas (en función del número de HC trabajados de forma simultánea), tras la positivización del HC. Aunque precisa poca manipulación, el sistema se optimiza mediante el trabajo por lotes de HC, por lo que los laboratorios deberían determinar cómo y cuándo instaurar esta tecnología en su rutina de trabajo. Por otro lado, detección precoz de determinantes de resistencia con técnicas como el SFC, junto a programas PROA, pueden contribuir a mejorar el manejo clínico-terapéutico y epidemiológico de los pacientes con sepsis y, por tanto, reducir la morbi-mortalidad y los costes asociados a este síndrome infeccioso.

#### 4.5.2. Evaluación de un nuevo algoritmo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Artículo 7, Objetivo 4.2)

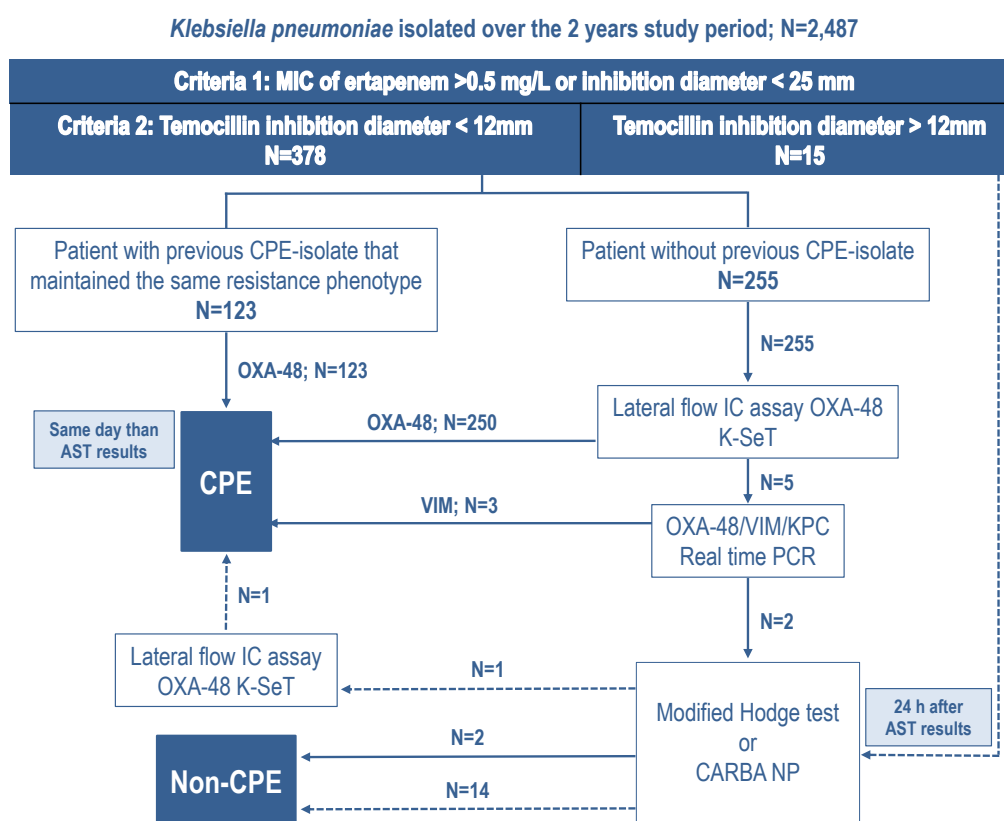
El HUCA sufre desde hace años una situación endémica de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 (Fernández *et al.*, 2014, 2015, 2016a, 2016b, 2016c; Poirel *et al.*, 2016). El aumento durante la última década de los bacilos Gram-negativos con sensibilidad disminuida a carbapenémicos, especialmente aquellos pertenecientes al orden *Enterobacterales*, es un fenómeno global (Dortet *et al.*, 2016). La sensibilidad disminuida a carbapenémicos en enterobacterias está fundamentalmente causada por dos mecanismos: i) la hiperproducción de beta-lactamasas de tipo AmpC o BLEE combinadas con alteraciones de la membrana externa y ii) la producción de carbapenemasas (Nordmann *et al.*, 2012c; Banerjee *et al.*, 2017; Baeza *et al.*, 2019). La detección precoz de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC) es un punto crítico para prevenir su diseminación e instaurar tratamientos antimicrobianos efectivos de forma rápida (Dortet *et al.*, 2017). Por ello, se hace necesaria la implementación de algoritmos en la rutina de trabajo de los laboratorios de microbiología con el fin de detectar la presencia de EPC de forma coste-efectiva y ágil.

En el Artículo 7 se describe y evalúa un nuevo algoritmo basado en la incorporación de la prueba de disco difusión de temocilina y ertapenem en paralelo con las pruebas de antibiograma automatizadas. El ensayo de disco difusión se llevó a cabo con el mismo inóculo de la bacteria preparado para la realización del antibiograma mediante el sistema automatizado y sirvió a la vez como cultivo de pureza del mismo. Este punto es de especial importancia, pues permite disponer de los resultados del antibiograma y la lectura de los halos de inhibición al mismo tiempo. Según el EUCAST, en todas las enterobacterias con CMI para ertapenem  $\geq 0,125$  mg/L o halo de inhibición  $< 25$  mm debería analizarse la presencia de carbapenemasas (EUCAST, 2019). Sin embargo, la mayoría de paneles de los sistemas automatizados de antibiograma sólo detectan las CMI  $\geq 0,5$  mg/L para ertapenem, y pocos laboratorios realizan pruebas de disco difusión de forma rutinaria. Por tanto, las bacterias productoras de enzimas con un nivel de hidrólisis de carbapenémicos bajo, como la OXA-48, podrían no ser detectadas (Cavaco *et al.*, 2019). La capacidad de los aislados productores de OXA-48 para hidrolizar la temocilina ha sido sugerido como un buen marcador para la detección de enterobacterias productoras de OXA-48, especialmente en regiones con una elevada prevalencia de esta enzima, como España (Huang *et al.*, 2014; Oteo *et al.*, 2015;

## DISCUSIÓN

Fernández *et al.*, 2016b; Cavaco *et al.*, 2019). Huang *et al.*, propusieron un punto de corte de <12 mm para el halo de inhibición de la temocilina que demostró un gran poder de discriminación entre aislados productores de OXA-48 y no productores de carbapenemasas (Huang *et al.*, 2014). En base a lo expuesto, se definieron los siguientes criterios para la inclusión de aislados de *K. pneumoniae* en el algoritmo de detección y confirmación de los productores de carbapenemasa en el HUCA: i) Criterio 1: CMI para ertapenem  $\geq 0,5$  mg/L o halo de inhibición <25mm; ii) Criterio 2: halo de inhibición de temocilina <12mm (Figura IX).

Figura IX: Algoritmo propuesto para la detección fenotípica y confirmación de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa en el HUCA.



Las líneas continuas representan los aislados que cumplieron los criterios 1 y 2; las líneas discontinuas representan los aislados que cumplieron solo el criterio 1. AST: *Antimicrobial susceptibility testing*; CPE: *Carbapenemase-producing Enterobacterales*; MIC: *Minimal inhibitory concentration*; N: *number of isolates*.

Durante el periodo de estudio (Junio del 2017-Junio del 2019), se obtuvieron 2.487 aislados de *K. pneumoniae*, de las cuales 378 (15,20%) cumplieron los criterios 1 y 2 propuestos. De ellos, el 98,68%, (373/378) fueron confirmados como productores de



OXA-48 (255) o recuperados de pacientes con aislamientos previos de EPC con el mismo fenotipo de resistencia (123). Resultados similares fueron obtenidos por Dortet *et al.*, en un algoritmo análogo al propuesto aquí, pero basado en discos de temocilina y faropenem, donde obtuvieron excelentes resultados de especificidad y valor predictivo positivo (96,9% y 92,5%, respectivamente) para la detección de aislados productores de OXA-48 (Dortet *et al.*, 2017). El algoritmo propuesto por estos autores mostraba como desventaja que estaba diseñado para su implementación en laboratorios que realicen de forma rutinaria los pruebas de sensibilidad a antimicrobianos mediante la técnica de disco difusión, algo no frecuente en nuestro país y que nuestro algoritmo no precisa (Dortet *et al.*, 2017). Los 123 aislados que fueron recuperados de pacientes con antecedentes de aislamientos positivos para OXA-48 en los seis meses previos, y cuyo fenotipo de resistencia no había variado a lo largo de ese periodo, fueron considerados directamente como productores de la enzima. Los 255 aislados restantes, que cumplieron los criterios 1 y 2 y no fueron obtenidos de pacientes con antecedentes de EPC, se sometieron de forma secuencial a las pruebas del algoritmo propuesto en la Figura IX. En un primer paso, se estudió la presencia de OXA-48 mediante una inmunocromatografía (IC) específica para esta enzima, siendo todos los aislados excepto cinco positivos. Estas pruebas de IC habían demostrado previamente sensibilidades y especificidades del 100% para la detección de OXA-48 (Fernández *et al.*, 2016a). Además, las pruebas de IC de una sola diana resultan más económicas en comparación a las que incluyen la detección de varias enzimas (Baeza *et al.*, 2019). Por otro lado, la detección de EPC a partir de cultivo mediante IC es más rápida (aprox. 15 minutos) que otras pruebas fenotípicas o moleculares (0,5-4 horas) (Baeza *et al.*, 2019). De esta forma, la inclusión de la IC en el primer paso del algoritmo permitió que tan solo cinco aislados tuviesen que ser sometidos a pruebas suplementarias, ahorrando tiempo y costes. Sin embargo, de estos cinco aislados, tres fueron confirmados como VIM positivos mediante PCR múltiple. La capacidad de esta enzima para hidrolizar la temocilina ya se había demostrado anteriormente (Huang *et al.*, 2014), por lo que se hace necesario confirmar el tipo de carbapenemasa de los aislados que cumplen los criterios 1 y 2, bien mediante ensayos de IC o bien con pruebas moleculares. Los dos aislados restantes fueron negativos para la PCR múltiple (OXA-48, VIM y KPC) y el test de Hodge modificado o el Carba NP por lo que fueron considerados como no productores de carbapenemasas. El algoritmo presentado mostró, por tanto, un alto poder de discriminación entre EPC y no-EPC, ya que tan solo dos (0,53%) de los aislados que cumplían los dos criterios fueron no

## DISCUSIÓN

productores de carbapenemasas. Durante el periodo de estudio hubo además 15 aislados que cumplieron el Criterio 1, pero presentaron halos de inhibición de temocilina >12mm. De ellos, todos menos uno (*K. pneumoniae* productora de OXA-48) dieron negativo el test de Hodge modificado o el Carba NP y fueron por tanto considerados como no productores de carbapenemasa.

El algoritmo presentado presenta en nuestra opinión grandes ventajas:

- El uso de disco difusión con ertapenem cumple con las recomendaciones del EUCAST para la detección EPC, usando además el carbapenémico más sensible para este propósito.
- La inclusión de la temocilina aporta una alta especificidad para la detección de OXA-48, evitando los falsos positivos del cribado con ertapenem en bacterias con hiperproducción de AmpC o BLEE combinadas con alteraciones de la membrana externa.
- Los resultados son obtenidos en las primeras 24 horas y a la vez que el antibiograma.
- Es fácil de implementar en la rutina de trabajo del laboratorio de microbiología.
- Su incorporación en áreas con alta prevalencia de OXA-48 evitaría pruebas adicionales para la confirmación de EPC, ahorrando tiempo y costes.

En definitiva, la implementación en los laboratorios de microbiología de algoritmos como el presentado en esta tesis permite obtener resultados rápidos que posibilitan la iniciación precoz de tratamientos antimicrobianos dirigidos adecuados y la instauración de medidas de control de la infección que ayuden a prevenir la diseminación de EPC.

## **5. CONCLUSIONES**



**ESPAÑOL**

1) Las exhaustivas medidas de limpieza y control de la infección (intervención) llevadas a cabo desde abril del año 2016 en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), para reducir el número de aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos (CRAB), han resultado ser efectivas a lo largo del tiempo. No se han detectado nuevos brotes en dicha unidad hasta la fecha, terminando así una epidemia que se había prolongado durante más de 18 años.

2) El estudio de aislados de CRAB recuperados en el HUCA aproximadamente un año después de la intervención en la UCI ha demostrado la dispersión en todo el hospital de un clon extremadamente resistente (XDR), perteneciente a la secuencia tipo (ST) 218 y portador de los genes *bla<sub>OXA-23-like</sub>* y *armA*. Este hecho pone de manifiesto que las medidas implantadas en la UCI, aunque efectivas en esta unidad y con un impacto importante en el resto del hospital, deben ser implantadas en todas las unidades para conseguir la erradicación total del CRAB.

3) La drástica disminución del número de CRAB en el HUCA, especialmente en la UCI, se ha visto acompañada de un descenso importante del consumo de colistina. Esto ayuda a preservar la eficacia de un antibiótico de última línea, como es la colistina, evitando además su importante toxicidad para los pacientes.

4) El Hospital El Bierzo (HEB) sufre una prevalencia alarmantemente elevada de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina (VRE<sub>fm</sub>), portadores del gen *vanA* y pertenecientes al complejo clonal (CC) 17 de alto riesgo, en concreto a las ST80 y ST117. Las escasas alternativas terapéuticas derivadas del fenotipo multirresistente expresado por estas cepas, que se limitan a linezolid y, en algunos casos, también a daptomicina, suponen un riesgo para la seguridad de los pacientes infectados, especialmente en los que padecen infecciones invasivas (bacteriemias).

## CONCLUSIONES

5) El paquete de medidas implantado en el HEB para reconducir la preocupante situación relativa a los VREfm ha mostrado resultados alentadores en el año 2019, aunque será necesaria su evaluación a más largo plazo. Además, las medidas implantadas de forma temporal en la unidad con mayor número de infecciones (1A) deberían ser instauradas de forma secuencial en el resto de las unidades del hospital, para conseguir la erradicación total de estas bacterias.

6) La instauración en el HEB de un programa de cribado de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas (como linezolid y tedizolid) demostró la presencia del gen *optrA* en tres aislados pertenecientes a diferentes clones de *Enterococcus faecalis* (ST480, ST585 y ST7), obtenidos de muestras de orina de pacientes comunitarios. Aunque la prevalencia encontrada fue baja y los aislados portadores de *optrA* no planteaban problemas de tratamiento (eran sensibles a beta-lactámicos), la vigilancia y detección precoz de genes transferibles de resistencia a oxazolidinonas es esencial para evitar su dispersión a otras bacterias más virulentas y/o con menos opciones de tratamiento. Esto es de vital importancia en el HEB debido a la elevada prevalencia de VREfm.

7) Los genes *optrA* de los tres aislados del HEB se localizaron en plásmidos, todos ellos asociados con *IS1216* en diferentes entornos genéticos. En un aislado se encontró un segundo plásmido portador de numerosos genes de resistencia frente a antibióticos de diferentes familias. Esta es la primera vez que este plásmido se detecta tanto en un aislado de origen clínico como fuera de China.

8) En la UCI del HUCA se ha establecido de forma endémica un clon ST2 de *Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid (LRSE) y meticilina. Este clon ha provocado infecciones invasivas graves (como ventriculitis asociada a catéter), estando seriamente limitadas las opciones de tratamiento de los pacientes.

9) Se ha demostrado una relación estadísticamente significativa entre el elevado consumo de linezolid en la UCI del HUCA (aproximadamente siete veces mayor que en el resto de unidades) y la prevalencia de resistencia a linezolid en *S. epidermidis*. A pesar del consumo mucho menor de linezolid en otras unidades, también se comprobó la persistencia de dicho clon durante un periodo de al menos 7 años.

10) Las medidas de control de la infección, y en especial la restricción de la utilización de linezolid, a través del programa de optimización del uso de antimicrobianos (PROA), en la UCI del HUCA, han conseguido una drástica disminución de la prevalencia de LRSE durante el año 2017. Dichas medidas deben trasladarse al hospital en su conjunto para preservar la eficacia de este antimicrobiano de última línea.

11) El sistema *Sepsis Flow Chip* (SFC) mostró un elevado porcentaje de concordancia (94,4%) con el método de referencia en la identificación de bacilos Gram-negativos a partir de hemocultivos positivos asociados a infecciones monomicrobianas. Cuando la identificación mediante SFC se combinó con MALDI-TOF tras una incubación de cuatro horas el porcentaje de concordancia aumentó al 100%. Sin embargo, este sistema solo consiguió identificar todos los microorganismos presentes en el 50% de los hemocultivos correspondientes a infecciones polimicrobianas.

12) El SFC posee el panel para la detección de genes de resistencia más amplio del mercado, pudiendo proporcionar resultados en cuatro horas a partir de un hemocultivo positivo. Utilizando este sistema se obtuvo un 98,8%, 98,9% y 99% de concordancia con el método de referencia para los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>, respectivamente. Sin embargo, la sonda para la detección del gen *bla*<sub>SHV</sub> debe optimizarse para distinguir las variantes que codifican BLEE. Además, los laboratorios de microbiología clínica deberán adaptar a su rutina un sistema que se optimiza mediante el trabajo por lotes.

13) El algoritmo propuesto para la detección y confirmación de *Enterobacterales* productores de carbapenemasa (EPC), mostró un alto poder de discriminación entre EPC y no-EPC con sensibilidad disminuida a carbapenémicos. Su implementación en áreas con alta prevalencia de OXA-48 evitaría pruebas adicionales para la confirmación de EPC, ahorrando tiempo y recursos.

## CONCLUSIONES



**ENGLISH**

1) Deep room cleaning and infection control measures (intervention) implemented since April 2016 in the intensive care unit (ICU) of *Hospital Universitario Central de Asturias* (HUCA), in order to reduce the number of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB), have been effective. No more outbreaks caused by these bacteria have been reported to date, ending a long-standing endemicity which has lasted for almost 18 years.

2) The molecular study of CRAB isolates obtained from HUCA nearly one year after the intervention showed the spread in a whole hospital of a XDR clone belonging to the sequence type (ST) 218 and carrying the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> and *armA* genes. This finding highlight that the measures established in the ICU, although effective in this ward, must be extended to the rest of wards to eradicate CRAB.

3) The drastic decline in the number of CRAB from HUCA, mainly in the ICU, was followed by a significant decrease in the colistin usage, preserving the therapeutic efficacy of this last-resort antimicrobial and avoiding its toxicity for the patients.

4) *Hospital El Bierzo* (HEB) suffered a worrisome high prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm), harboring *vanA* gene and belonging to the high risk clonal complex (CC) 17, specifically to the ST80 and ST117 clones. The multi-drug resistance phenotype expressed by these strains, represent a threat for the infected patients, particularly when suffering invasive infections (bacteremia), because their treatment is limited to linezolid and in some cases also to daptomycin.

5) The package of infection control measures implemented in the HEB to reconduct the worrisome VREfm situation showed encouraging results in 2019, although further long-term surveillance will be required. Moreover, the temporal measures implemented in the ward with more infections (1A) must be sequentially applied to the other wards to eradicate VREfm from the whole hospital.

## CONCLUSIONES

6) A screening of transferable oxazolidinone-resistant genes carried out in the HEB showed the presence of *optrA* in three isolates belonging to different clones of *Enterococcus faecalis* (ST480, ST585 and ST7), obtained from urine samples recovered from community patients. Although the prevalence of these genes was low, and there are still therapeutic alternatives to treat infections caused by the isolates (as they were susceptible to beta-lactams), surveillance and prompt detection of transferable oxazolidinone-resistant genes are crucial to avoid their spread to more virulent and/or to multi-drug resistance bacteria. This is especially important in HEB, due to the high prevalence of VREfm.

7) In the HEB isolates, the *optrA* genes were located in plasmids, associated with IS1216 in different genetic contexts. A second plasmid, found in one of the isolates, carried a wealth of genes encoding resistance to many other classes of antibiotics. In addition to being detected in an isolate from a human clinical sample, it is also the first time this plasmid was detected outside of China.

8) A methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* (LRSE) ST2 clone has been established in the ICU of the HUCA, causing serious invasive infections (such as catheter-related ventriculitis), with limited therapeutic options.

9) A statistically significant relation was found between the high linezolid consumption in the ICU (nearly seven times higher than in other wards) and the prevalence of linezolid-resistance in *S. epidermidis*. Despite the lower use of linezolid in other wards, the presence of the same clone has been demonstrated for almost seven years.

10) A drastic decline in the prevalence of LRSE was observed in 2017 due to the infection control measures implemented, and especially to the restriction of linezolid usage in the ICU from HUCA via the antimicrobial stewardship initiative. These measures must be extended to the whole HUCA to preserve the efficacy of this last-resort antimicrobial.

11) The concordance between the Sepsis Flow Chip (SFC) assay and the reference method to identify Gram-negative bacilli from positive blood cultures was high (94.4%) in monomicrobial bacteremia. When SFC was combined with identification by MALDI-TOF after four hours incubation, a 100% of concordance was achieved. However, only 50% of all bacteria present in polymicrobial blood cultures were correctly identified.

12) SFC has the more complete panel of relevant resistance genes, and it provides results in 4 hours after blood cultures positivity. Using this assay, 98.8%, 98.9% and 99% concordance was obtained with respect to the reference method for *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>VIM</sub>, respectively. However, *bla*<sub>SHV</sub> detection should be optimized in order to discriminate ESBL- and non-ESBL-SHV isolates. Moreover, clinical microbiology laboratories should adapt the implementation of the SFC assay to routine workflow, considering that this technique is optimized when performed in batch.

13) The algorithm developed for screening and confirmation of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE), shows a high capacity to discriminate between CPE and non-CPE isolates with decreased susceptibility to carbapenems. Its implementation in health care settings with a high prevalence of OXA-48 producers, would avoid unnecessary additional testing for confirmation of CPE, saving time and resources.

## CONCLUSIONES

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Abraham, E. P. and Chain, E.** (1940) ‘An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin’, *Nature*, 146(837).
- Acosta, J., Merino, M., Viedma, E., Poza, M., Sanz, F., Otero, J. R., et al.** (2011) ‘Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain’, *Emerg Infect Dis*, 17(6), pp. 1064–7. doi: 10.3201/eid1706.091866.
- Alevizakos, M., Gaitanidis, A., Nasioudis, D., Tori, K., Flokas, M. E. and Mylonakis, E.** (2017) ‘Colonization with vancomycin-resistant *enterococci* and risk for bloodstream infection among patients with malignancy: A systematic review and meta-analysis’, *Open Forum Infect Dis*, 4(1), pp. 1–10. doi: 10.1093/ofid/ofw246.
- Alonso, A., Sánchez, P. and Martínez, J.** (2001) ‘Environmental selection of antibiotic resistance genes’, *Environ Microbiol*, 3(1), pp. 1–9. doi: 10.3233/978-1-61499-872-3-236.
- Aminov, R. I.** (2010) ‘A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future’, *Front Microbiol*, 1(134), pp. 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- Antonelli, A., Andrea, M. M. D., Brenciani, A., Galeotti, C. L., Morroni, G., Pollini, S., et al.** (2018) ‘Characterization of *poxxA*, a novel phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin’, *J Antimicrob Chemother*, 73(7), pp. 1763–9. doi: 10.1093/jac/dky088.
- Apisarnthanarak, A., Pinitchai, U., Thongphubeth, K., Yuekyen, C., Warren, D. K., Fraser, V. J., et al.** (2008) ‘A multifaceted intervention to reduce pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in 3 intensive care units in a Thai tertiary care center: A 3-year study’, *Clin Infect Dis*, 47(6), pp. 760–7. doi: 10.1086/591134.
- Argudín, M. A., Youzaga, S., Dodémont, M., Heinrichs, A., Roisin, S., Deplano, A., et al.** (2019) ‘Detection of *optrA*-positive *enterococci* clinical isolates in Belgium’, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38(5), pp. 985–7. doi.org/10.1007/s10096-019-03504-3
- Arias, C. A. and Murray, B. E.** (2012) ‘The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance’, *Nat Rev Microbiol*, 10(4), pp. 266–78. doi: 10.1038/nrmicro2761.
- Ayobami, O., Willrich, N., Reuss, A., Eckmanns, T. and Markwart, R.** (2020) ‘The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: An epidemiological analysis of bloodstream

- infections’, *Emerg Microbes Infect*, 9(1), pp. 1180–1193. doi: 10.1080/22221751.2020.1769500.
- Baeza, L. L., Pfennigwerth, N., Greissl, C., Göttig, S., Saleh, A., Stelzer, Y., et al.** (2019) ‘Comparison of five methods for detection of carbapenemases in *Enterobacterales* with proposal of a new algorithm’, *Clin Microbiol Infect*, 25(10), pp. 1286.e9-1286. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.003.
- Banerjee, R. and Humphries, R.** (2017) ‘Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*’, *Virulence*, 8(4), pp. 427–39. doi: 10.1080/21505594.2016.1185577.
- Baos, E., Candel, F. J., Merino, P., Pena, I. and Picazo, J. J.** (2013) ‘Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*’, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 76(3), pp. 325–9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.002.
- Baquero, F.** (2004) ‘From pieces to patterns: Evolutionary engineering in bacterial pathogens’, *Nat Rev Microbiol*, 2(6), pp. 510–8. doi.org/10.1038/nrmicro909.
- Barros, M., Branquinho, R., Grosso, F., Peixe, L. and Novais, C.** (2014) ‘Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, Portugal, 2012’, *Emerg Infect Dis*, 20(5), pp. 903–5. doi.org/10.3201/eid2005.130783
- van de Beek, D., Drake, J. M. and Tunkel, A. R.** (2010) ‘Nosocomial bacterial meningitis’, *N Engl J Med*, 362(2), pp. 146–54. doi 10.1056/NEJMra0804573
- Bender, J. K., Cattoir, V., Hegstad, K., Sadowy, E., Coque, T. M., Westh, H., et al.** (2018) ‘Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in *enterococci* in Europe: Towards a common nomenclature’, *Drug Resist Updat*, 40, pp. 25–39. doi: 10.1016/j.drup.2018.10.002.
- Bender, J. K., Fleige, C., Klare, I. and Werner, G.** (2019) ‘Development of a multiplex-PCR to simultaneously detect acquired linezolid resistance genes *cfr*, *optrA* and *poxxA* in *enterococci* of clinical origin’, *J Microbiol Methods*, 160, pp. 101–3. doi: 10.1016/j.mimet.2019.03.025.
- Bialvaei, A. Z., Rahbar, M., Yousefi, M., Asgharzadeh, M. and Kafil, H. S.** (2017) ‘Linezolid: A promising option in the treatment of Gram-positives’, *J Antimicrob Chemother*, 72(2), pp. 354–64. doi: 10.1093/jac/dkw450.
- Binda, E., Marinelli, F. and Marcone, G. L.** (2014) ‘Old and new glycopeptide antibiotics: Action and resistance’, *Antibiotics (Basel)*, 3(4), pp. 572–94. doi:



10.3390/antibiotics3040572.

- Blaschke, A. J., Heyrend, C., Byington, C. L., Fisher, M., Barker, E., Garrone, N. F., et al.** (2012) ‘Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex PCR using the FilmArray system’, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(4), pp. 349–55. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.013.Rapid.
- Bouiller, K., Ilic, D., Wicky, P. H., Cholley, P., Chirouze, C. and Bertrand, X.** (2020) ‘Spread of clonal linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit associated with linezolid exposure’, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 39(7), pp. 1271–7. doi: 10.1007/s10096-020-03842-7.
- Brandl, K., Plitas, G., Mihu, C. N., Ubeda, C., Jia, T., Fleisher, M., et al.** (2008) ‘Vancomycin-resistant *enterococci* exploit antibiotic-induced innate immune deficits’, *Nature*, 455(7214), pp. 804–7. doi: 10.1038/nature07250.
- Brigante, G., Migliavacca, R., Bramati, S., Motta, E., Nucleo, E., Manenti, M., et al.** (2012) ‘Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase *armA*’, *J Med Microbiol*, 61(5), pp. 653–61. doi: 10.1099/jmm.0.040980-0.
- Burdette, S. D. and Trotman, R.** (2015) ‘Tedizolid: The first once-daily oxazolidinone class antibiotic’, *Clin Infect Dis*, 61(8), pp. 1315–21. doi: 10.1093/cid/civ501.
- Cai, J., Schwarz, S., Chi, D., Wang, Z., Zhang, R. and Wang, Y.** (2019) ‘Faecal carriage of *optrA*-positive *enterococci* in asymptomatic healthy humans in Hangzhou, China’, *Clin Microbiol Infect*, 25(5), pp. 630.e1-630.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.07.025.
- Cai, J., Wang, Y., Schwarz, S., Lv, H., Li, Y., Liao, K., et al.** (2015) ‘Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010-2014’, *Clin Microbiol Infect*, 21(12), pp. 1095.e1–4. doi: 10.1016/j.cmi.2015.08.007.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., Mirelis, B. and Navarro, F.** (2011) Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en microbiología clínica. *SEIMC*.
- Càmara, J., Camoez, M., Tubau, F., Pujol, M., Ayats, J., Ardanuy, C., et al.** (2019) ‘Detection of the novel *optrA* gene among linezolid-resistant *enterococci* in Barcelona, Spain’, *Microb Drug Resist*, 25(1), pp. 87–93. doi: 10.1089/mdr.2018.0028.
- Cattoir, V. and Leclercq, R.** (2013) ‘Twenty-five years of shared life with vancomycin-

- resistant *enterococci*: Is it time to divorce', *J Antimicrob Chemother*, 68(4), pp. 731–42. doi: 10.1093/jac/dks469.
- Cavaco, L. M., Hansen, F., Mushtaq, S., Hill, R. L. R., Woodford, N., Le Hello, S., et al.** (2019) 'Evaluation of temocillin for phenotypic carbapenemase screening of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates in relation to the presence of genes encoding ESBLs and carbapenemase production', *J Antimicrob Chemother*, 74(3), pp. 639–44. doi: 10.1093/jac/dky493.
- Cercenado, E.** (2000) 'Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: Rediscovery of an old problem?', *Clin Microbiol Infect*, 6(10), pp. 517–8. doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00130.x.
- Chuang, Y. C., Lin, H. Y., Chen, P. Y., Lin, C. Y., Wang, J. T. and Chang, S. C.** (2016) 'Daptomycin versus linezolid for the treatment of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: implications of daptomycin dose', *Clin Microbiol Infect*, 22(10), pp. 890.e1-890.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.018.
- CLSI** (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. *CLSI supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cong, Y., Yang, S. and Rao, X.** (2020) 'Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features', *J Adv Res*, 21, pp. 169–76. doi: 10.1016/j.jare.2019.10.005.
- Coque, T. M., Willems, R. J. L., Fortín, J., Top, J., Diz, S., Loza, E., et al.** (2005) 'Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: Setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?', *Antimicrob Agents Chemother*, 49(7), pp. 2693–700. doi: 10.1128/AAC.49.7.2693-2700.2005.
- Cui, L., Wang, Y., Lv, Y., Wang, S., Song, Y., Li, Y., et al.** (2016) 'Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* spp. isolates in China from 2004-2014', *Antimicrob Agents Chemother*, 60(12), pp. 7490–3. doi: 10.1128/AAC.01256-16.
- D'Arezzo, S., Principe, L., Capone, A., Petrosillo, N., Petrucca, A. and Visca, P.** (2011) 'Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy', *J Antimicrob Chemother*, 66(1), pp. 54–61. doi: 10.1093/jac/dkq407.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., et al.** (2011) 'Antibiotic resistance is ancient', *Nature*, 477(7365), pp. 457–61. doi:

10.1038/nature10388.

- Dahdouh, E., Gómez-Gil, R., Pacho, S., Mingorance, J., Daoud, Z. and Suárez, M.** (2017) ‘Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital’, *PLoS ONE*, 12(4), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0176824.
- Deshpande, L. M., Castanheira, M., Flamm, R. K. and Mendes, R. E.** (2018) ‘Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program’, *J Antimicrob Chemother*, 73(9), pp. 2314–22. doi: 10.1093/jac/dky188.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A. and Seifert, H.** (2007) ‘An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*’, *Nat Rev Microbiol*, 5(12), pp. 939–51. doi: 10.1038/nrmicro1789.
- Djahmi, N., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Dekhil, M., Sotto, A. and Lavigne, J. P.** (2014) ‘Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries’, *Biomed Res Int*, 2014. doi: 10.1155/2014/305784.
- Doi, Y. and Arakawa, Y.** (2007) ‘16S Ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides’, *Clin Infect Dis*, 45(1), pp. 88–94. doi: 10.1086/518605.
- Dortet, L., Agathine, A., Naas, T., Cuzon, G., Poirel, L. and Nordmann, P.** (2015) ‘Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*’, *J Antimicrob Chemother*, 70(11), pp. 3014–22. doi: 10.1093/jac/dkv213.
- Dortet, L., Bernabeu, S., Gonzalez, C. and Naas, T.** (2017) ‘Comparison of two phenotypic algorithms to detect carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*’, *Antimicrob Agents Chemother*, 61(8), pp. 1–5. doi: 10.1128/AAC.00796-17.
- Dortet, L., Cuzon, G., Plésiat, P. and Naas, T.** (2016) ‘Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*’, *J Antimicrob Chemother*, 71(1), pp. 135–40. doi: 10.1093/jac/dkv308.
- Dortet, L., Glaser, P., Kassis-chikhani, N., Girlich, D., Ichai, P., Boudon, M., et al.** (2018) ‘Long-lasting successful dissemination of resistance to oxazolidinones in

- MDR *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates in a tertiary care hospital in France', *J Antimicrob Chemother*, 73(1), pp. 41–51. doi: 10.1093/jac/dkx370.
- Doskey, C., Chowdhry, T., Hecker, M., Hoyen, C., Hanrahan, J., Hujer, A., et al.** (2000) 'Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant *enterococci* in the stool of colonized patients', *N Engl J Med*, 343(26), pp. 1925–32. doi:10.1056/NEJM200012283432604.
- Duncan, R., Grigorenko, E., Fisher, C., Hockman, D. and Duncan, R.** (2019) 'Expert review of molecular diagnostics advances in multiplex nucleic acid diagnostics for blood-borne pathogens: promises and pitfalls - an update', *Expert Rev Mol Diagn*, 19(1), pp. 15–25. doi: 10.1080/14737159.2019.1559055.
- ECDC** (2019) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
- ECDC** (2020) 'European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2019. Stockholm: ECDC; 2020.'
- Egan, S., Corcoran, S., McDermott, H., Fitzpatrick, M., Hoyne, A., McCormack, O., et al.** (2020a) 'A hospital outbreak of linezolid-resistant and vancomycin-resistant ST80 *Enterococcus faecium* harbouring an *optrA*-encoding conjugative plasmid investigated by whole-genome sequencing', *J Hosp Infect*, 105(4), pp. 726–35. doi: 10.1016/j.jhin.2020.05.013.
- Egan, S., Shore, A., Connell, B., Brennan, G. and Coleman, D.** (2020b) 'Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds', *J Antimicrob Chemother*, 75(7), pp. 1704–11. doi: 10.1093/jac/dkaa075.
- Eichenberger, E. M. and Thaden, J. T.** (2019) 'Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria', *Antibiotics (Basel)*, 8(2). doi: 10.3390/antibiotics8020037.
- Elghaieb, H., Freitas, A. R., Abbassi, M. S., Novais, C., Zouari, M., Hassen, A., et al.** (2019) 'Dispersal of linezolid-resistant *enterococci* carrying *poxtA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia', *J Antimicrob Chemother*, 74(10), pp. 2865–9. doi: 10.1093/jac/dkz263.
- Elghaieb, H., Tedim, A. P., Abbassi, M. S., Novais, C., Hassen, A. and Freitas, A. R.** (2020) 'From farm to fork: identical clones and Tn6674 -like elements in linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* from food-producing animals and retail meat', *J*

- Antimicrob Chemother*, 75(1), pp. 30–5. doi: 10.1093/jac/dkz419.
- EPINE** (2019) ESTUDIO EPINE-EPPS nº 30 : 2019 *Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene*.
- Escudero, D., Cofiño, L., Forcelledo, L., Quindós, B., Calleja, C. and Martín, L.** (2017) ‘Control of an *Acinetobacter baumannii* multidrug resistance endemic in the ICU . Recalling the obvious’, *Med Intensiva*, 41(8), pp. 497–9. doi: 10.1016/j.medin.2016.11.005.
- Espinal, P., Macià, M. D., Roca, I., Gato, E., Ruíz, E., Fernández-cuenca, F., et al.** (2013) ‘First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to Tn2006 in Spain’, *Antimicrob Agents Chemother*, 57(1), pp. 589–91. doi: 10.1128/AAC.01157-12.
- EUCAST** (2019) ‘The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>’.
- Fernández-Cuenca, F., Tomás-Carmona, M., Caballero-Moyano, F., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Vila, J., et al.** (2013) ‘Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010)’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(1), pp. 4–9. doi: 10.1016/j.eimc.2012.06.010.
- Fernández, J., Fleites, A., Rodicio, M. R. and Vazquez, F.** (2016a) ‘Evaluation of OXA-48 K-Se T: an immunochromatographic assay for rapid detection of OXA-48–producing *Enterobacteriaceae*’, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 85, pp. 12–5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.015.
- Fernández, J., Montero, I., Fleites, A. and Rodicio, M. R.** (2014) ‘Cluster of *Escherichia coli* isolates producing a plasmid-mediated OXA-48  $\beta$ -lactamase in a Spanish hospital in 2012’, *J Clin Microbiol*, 52(9), pp. 3414–7. doi: 10.1128/JCM.01271-14
- Fernández, J., Montero, I., Martínez, Ó., Fleites, A., Poirel, L., Nordmann, P., et al.** (2015) ‘Dissemination of multiresistant *Enterobacter cloacae* isolates producing OXA-48 and CTX-M-15 in a Spanish hospital’, *Int J Antimicrob Agents*, 46(4), pp. 469–474. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.003.
- Fernández, J., Poirel, L., Rodicio, M. R. and Nordmann, P.** (2016b) ‘Concomitant and multiclonal dissemination of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Spanish hospital’, *J Antimicrob Chemother*, 71, pp. 1734–6. doi:

10.1093/jac/dkv505.

- Fernández, J., Rodríguez-Lucas, C., Fernández-Suárez, J., Vazquez, F. and Rodicio, M. R.** (2016c) 'Identification of *Enterobacteriaceae* and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton', *J Microbiol Methods*, 129, pp. 133–5. doi:10.1016/j.mimet.2016.08.014 0167-7012.
- Fernández, L. and Hancock, R. E. W.** (2012) 'Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance', *Clin Microbiol Rev*, 25(4), pp. 661–81. doi: 10.1128/CMR.00043-12.
- Fiori, B., D'Inzeo, T., Giaquinto, A., Menchinelli, G., Liotti, F. M., de Maio, F., et al.** (2016) 'Optimized use of the MALDI BioTyper system and the FilmArray BCID panel for direct identification of microbial pathogens from positive blood cultures', *J Clin Microbiol*, 54(3), pp. 576–84. doi:10.1128/JCM.02590-15.
- Fleming, A.** (1929) 'On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*', *Br J Exp Pathol*, 10(3), pp. 226–36.
- Freitas, A. R., Elghaieb, H., León-Sampedro, R., Abbassi, M. S., Novais, C., Coque, T. M., et al.** (2017) 'Detection of *oprA* in the African continent (Tunisia) within a mosaic *Enterococcus faecalis* plasmid from urban wastewaters', *J Antimicrob Chemother*, 72(12), pp. 3245–51. doi: 10.1093/jac/dkx321.
- Freitas, A. R., Tedim, A. P., Francia, M. V., Jensen, L. B., Novais, C., Peixe, L., et al.** (2016) 'Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012)', *J Antimicrob Chemother*, 71(12), pp. 3351–66. doi: 10.1093/JAC/DKW312.
- Frickmann, H., Masanta, W. O. and Zautner, A. E.** (2014) 'Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management', *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/375681.
- Galiana, A., Coy, J., Gimeno, A., Guzman, N. M., Rosales, F., Merino, E., et al.** (2017) 'Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections', *PLoS One*, 12(5), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0177627
- García-Ortega, L., Arch, O., Pérez-Canosa, C., Lupión, C., González, C., Rodríguez-Baño, J., et al.** (2011) 'Control measures for *Acinetobacter baumannii*: a survey of Spanish hospitals', *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(1), pp. 36–8. doi: 10.1016/j.eimc.2010.04.012.

- García Martínez de Artola, D., Castro, B., Ramos, M. J., Díaz Cuevas, Z., Lakhwani, S. and Lecuona, M.** (2017) ‘Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus* on a haematology ward: management and control’, *J Infect Prev*, 18(3), pp. 149–53. doi: 10.1177/1757177416687832.
- Garnacho-Montero, J., Dimopoulos, G., Poulakou, G., Akova, M., Cisneros, J., Waele, J., et al.** (2015) ‘Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU’, *Intensive Care Med*, 41(12), pp. 2057–75. doi: 10.1007/s00134-015-4079-4.
- Gavaldà, L., Soriano, A. M., Cámara, J., Gasull, R., Arch, O., Shaw, E., et al.** (2016) ‘Control of endemic extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with a cohorting policy and cleaning procedures based on the 1 room, 1 wipe approach’, *Am J Infect Control*, 44(5), pp. 520–4. doi: 10.1016/j.ajic.2015.11.036.
- Girlich, D., Bernabeu, S., Fortineau, N., Dortet, L. and Naas, T.** (2018) ‘Evaluation of the CRE and ESBL ELITe MGB® kits for the accurate detection of carbapenemase- or CTX-M–producing bacteria’, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 92(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.001.
- Glupeczynski, Y., Evrard, S., Ote, I., Mertens, P., Huang, T. D., Leclipteux, T., et al.** (2016) ‘Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria’, *J Antimicrob Chemother*, 71(5), pp. 1217–22. doi: 10.1093/jac/dkv472.
- Gonzales, R. D., Schreckenberger, P. C., Graham, M. B., Kelkar, S., DenBesten, K. and Quinn, J. P.** (2001) ‘Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid’, *Lancet*, 357(9263), p. 1179. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04376-2.
- Gould, K.** (2016) ‘Antibiotics: From prehistory to the present day’, *J Antimicrob Chemother*, 71(3), pp. 572–5. doi: 10.1093/jac/dkv484.
- Grosso, F., Quinteira, S. and Peixe, L.** (2011) ‘Understanding the dynamics of imipenem- resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal’, *Clin Microbiol Infect*, 17(8), pp. 1275–9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03469.x.
- Guerrero-Lozano, I., Fernández-Cuenca, F., Galán-Sánchez, F., Egea, P., Rodríguez-Iglesias, M. and Pascual, Á.** (2015) ‘Description of the OXA-23  $\beta$ -lactamase gene located within Tn2007 in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Spain’, *Microb Drug Resist*, 21(2), pp. 215–7. doi: 10.1089/mdr.2014.0155.

- Hæggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J. and Brisse, S.** (2004) ‘Diversity and Evolution of the class a chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*’, *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7), pp. 2400–8. doi: 10.1128/AAC.48.7.2400–2408.2004
- He, T., Shen, Y., Schwarz, S., Cai, J., Lv, Y., Li, J., et al.** (2016) ‘Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin’, *J Antimicrob Chemother*, 71(6), pp. 1466–73. doi: 10.1093/jac/dkw016.
- Herrera, S., Sorlí, L., Pérez-Sáez, M. J., Ruiz-Garbajosa, P., Barrios, C., Plasencia, V., et al.** (2017) ‘Characterization and rapid control of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) outbreak in a renal transplant unit in Spain: The environment matters’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 35(1), pp. 5–11. doi: 10.1016/j.eimc.2016.04.002.
- Higgins, P. G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P. and Seifert, H.** (2009) ‘OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*’, *Antimicrob Agents Chemother*, 53(12), pp. 5035–8. doi: 10.1128/AAC.00856-09.
- Horan, T. C., Andrus, M. and Dudeck, M. A.** (2008) ‘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*, 36(5), pp. 309–32. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002
- Howden, B. P., Davies, J. K., Johnson, P. D. R., Stinear, T. P. and Grayson, M. L.** (2010) ‘Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications’, *Clin Microbiol Rev*, 23(1), pp. 99–139. doi: 10.1128/CMR.00042-09.
- Huang, J., Wang, M., Gao, Y., Chen, L. and Wang, L.** (2019) ‘Emergence of plasmid-mediated oxazolidinone resistance gene *poxTA* from CC17 *Enterococcus faecium* of pig origin’, *J Antimicrob Chemother*, 74(9), pp. 2524–30. doi: 10.1093/jac/dkz250.
- Huang, T., Poirel, L., Bogaerts, P., Berhin, C., Nordmann, P. and Glupczynski, Y.** (2014) ‘Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48



- producers', *J Antimicrob Chemother*, 69(2), pp. 445–50. doi: 10.1093/jac/dkt367.
- Humphreys, H.** (2014) 'Controlling the spread of vancomycin-resistant *enterococci*. Is active screening worthwhile?', *J Hosp Infect*, 88(4), pp. 191–8. doi: 10.1016/j.jhin.2014.09.002.
- Isler, B., Doi, Y., Bonomo, R. and Paterson, D. L.** (2018) 'New Treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Infections', *Antimicrob Agents Chemother*, 63(1), pp. e01110-18. doi: 10.1128/AAC.01110-18.
- Kirst, H. A., Thompson, D. G. and Nicas, T. I.** (1998) 'Historical yearly usage of vancomycin', *Antimicrob Agents Chemother*, 42(5), pp. 1303–4. doi: 10.1128/aac.42.5.1303.
- Lazaris, A., Coleman, D. C., Kearns, A. M., Pichon, B., Kinnevey, P. M., Earls, M. R., et al.** (2018) 'Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE', *J Antimicrob Chemother*, 72(12), pp. 3252–7. doi: 10.1093/jac/dkx292.
- Leavis, H. L., Bonten, M. J. and Willems, R. J.** (2006) 'Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance', *Curr Opin Microbiol*, 9(5), pp. 454–60. doi: 10.1016/j.mib.2006.07.001.
- Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J. and Courvalin, P.** (1988) 'Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*', *N Engl J Med*, 319(3), pp. 157–61.
- Ledeboer, N., Lopansri, B., Dhiman, N., Cavagnolo, R., Carroll, K., Granato, P., et al.** (2015) 'Identification of Gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the Verigene Gram-negative blood culture multiplex microarray-based molecular assay', *J Clin Microbiol*, 53(8), pp. 2460–2472. doi:10.1128/JCM.00581-15
- Lee, J. Y. H., Monk, I. R., Gonçalves da Silva, A., Seemann, T., Chua, K. Y. L., Kearns, A., et al.** (2018) 'Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*', *Nat Microbiol*, 3(10), pp. 1175–85. doi: 10.1038/s41564-018-0230-7.
- Lemos, E. V., de la Hoz, F. P., Einarson, T. R., Mcghan, W. F., Quevedo, E., Castañeda, C., et al.** (2014) 'Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: Systematic review and meta-analysis', *Clin Microbiol Infect*, 20(5), pp. 416–23. doi: 10.1111/1469-0691.12363.

- Levine, D.** (2006) 'Vancomycin: A History', *Clin Infect Dis*, 42(Suppl 1), pp. S5-12. doi: 10.1086/491709.
- Liakopoulos, A., Miriagou, V., Katsifas, E. A., Karagouni, A. D., Daikos, G. L., Tzouvelekis, L. S., et al.** (2012) 'Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011', *Euro Surveill*, 17(11), p. 20117. doi: 10.2807/ese.17.11.20117-en.
- Liu, Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., et al.** (2016) 'Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study', *Lancet Infect Dis*, 16(2), pp. 161–8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Livermore, D. M.** (2003) 'Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum', *J Antimicrob Chemother*, 51, pp. 9–16. doi: 10.1093/jac/dkg249.
- Locke, J. B., Finn, J., Hilgers, M., Morales, G., Rahawi, S., Kedar, G. C., et al.** (2010) 'Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the *cfm* methyltransferase gene or ribosomal mutations', *Antimicrob Agents Chemother*, 54(12), pp. 5337–43. doi: 10.1128/AAC.00663-10.
- Logan, L. K. and Weinstein, R. A.** (2017) 'The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace', *J Infect Dis*, 215(Suppl 1), pp. S28–S36. doi: 10.1093/infdis/jiw282.
- Long, K. S. and Vester, B.** (2012) 'Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome', *Antimicrob Agents Chemother*, 56(2), pp. 603–12. doi: 10.1128/AAC.05702-11.
- López-Lozano, J. M., Lawes, T., Nebot, C., Beyaert, A., Bertrand, X., Hocquet, D., et al.** (2019) 'A nonlinear time-series analysis approach to identify thresholds in associations between population antibiotic use and rates of resistance', *Nat Microbiol*, 4(7), pp. 1160–72. doi: 10.1038/s41564-019-0410-0.
- Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K. J., Tysall, L., Woodford, N. and Livermore, D.** (2002) 'Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* Isolates from a hospital in northern Spain', *J Clin Microbiol*, 40(12), pp. 4741–3. doi: 10.1128/JCM.40.12.4741.
- Lowe, M., Ehlers, M. M., Ismail, F., Peirano, G., Becker, P. J., Pitout, J. D. D., et al.** (2018) '*Acinetobacter baumannii*: Epidemiological and beta-lactamase data from

- two tertiary academic hospitals in Tshwane , South Africa’, *Front. Microbiol*, 9(1280), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01280
- Ma, F., Shen, C., Zheng, X., Liu, Y., Chen, H., Zhong, L., et al.** (2019) ‘Identification of a novel plasmid carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* strain in China’, *Antimicrob Agents Chemother*, 63(6), pp. e00133-19. doi: 10.1128/AAC.00133-19.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al.** (2012) ‘Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance’, *Clin Microbiol Infect*, 18(3), pp. 268–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Louro, D., Portugal, A. R. S. P. in and Caniça, M.** (2012) ‘Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118’, *Int J Antimicrob Agents*, 40(5), pp. 398–403. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.013.
- March-Rosselló, G. A.** (2017) ‘Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 35(3), pp. 182–8. doi: 10.1016/j.eimce.2017.02.007.
- Martínez-Lamas, L., Constenla-Caramés, L., Otero-Fernández, S. and Álvarez-Fernández, M.** (2014) ‘Nuevo clon de *Acinetobacter baumannii* ST187 responsable de un brote en una unidad de cuidados intensivos’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32(4), pp. 242–5. doi: 10.1016/j.eimc.2013.10.014.
- Martínez, L. and Baquero, F.** (2002) ‘Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance’, *Clin Microbiol Rev*, 15(4), pp. 647–79. doi: 10.1128/CMR.15.4.647.
- Martínez, M., García, M., Sánchez, EG and Sánchez, EJ** (2010) ‘Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(Supl 2), pp. 53–64.
- Meka, Venkata G. and Gold, H. S.** (2004a) ‘Antimicrobial resistance to linezolid’, *Clin Infect Dis*, 39(7), pp. 1010–5. doi: 10.1086/423841.
- Meka, Venkata G, Gold, H. S., Cooke, A., Venkataraman, L., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., et al.** (2004b) ‘Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*’, *J Antimicrob Chemother*, 54(4), pp. 818–20. doi: 10.1093/jac/dkh423.

- Mendes, R. E., Castanheira, M., Farrell, D. J., Flamm, R. K., Sader, H. S. and Jones, R. N.** (2016) ‘Longitudinal (2001-14) analysis of enterococci and VRE causing invasive infections in European and US hospitals, including a contemporary (2010-13) analysis of oritavancin in vitro potency’, *J Antimicrob Chemother*, 71(12), pp. 3453–8. doi: 10.1093/jac/dkw319.
- Mendes, R. E., Deshpande, L., Streit, J. M., Sader, H. S., Castanheira, M., Hogan, P. A., et al.** (2018) ‘ZAAPS programme results for 2016 : an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries’, *J Antimicrob Chemother*, 73(7), pp. 1880–7. doi: 10.1093/jac/dky099.
- Merino, M., Poza, M., Roca, I., Barba, M. J., Sousa, M. D., Vila, J., et al.** (2014) ‘Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain’, *Microb Drug Resist*, 20(4), pp. 259–63. doi: 10.1089/mdr.2013.0127.
- Mezzatesta, M. L., D’Andrea, M. M., Migliavacca, R., Giani, T., Gona, F., Nucleo, E., et al.** (2012) ‘Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy’, *Clin Microbiol Infect*, 18(2), pp. 160–6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03527.x.
- Minandri, F., D’Arezzo, S., Antunes, L. C. S., Pourcel, C., Principe, L., Petrosillo, N., et al.** (2012) ‘Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II’, *J Clin Microbiol*, 50(3), pp. 590–7. doi: 10.1128/JCM.05555-11.
- Moellering, R. C.** (1998) ‘The specter of glycopeptide resistance: Current trends and future considerations’, *Am J Med*, 104(5A), pp. 3S-6S. doi: 10.1016/S0002-9343(98)00148-X.
- Montesinos, I., Campos, S., Ramos, M. J., Ruiz-Garbajosa, P., Riverol, D., Batista, N., et al.** (2010) ‘Study of the first outbreak of *vanA Enterococcus faecium* in the Canary Islands’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(7), pp. 430–4. doi: 10.1016/j.eimc.2009.11.008.
- Morales, G., Picazo, J. J., Baos, E., Candel, F. J., Arribi, A., Peláez, B., et al.** (2010) ‘Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* Gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*’, *Clin Infect Dis*, 50(6), pp. 821–5. doi: 10.1086/650574.
- Morroni, G., Brenciani, A., Simoni, S., Vignaroli, C., Mingoia, M. and Giovanetti,**

- E. (2017) ‘Commentary: Nationwide Surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014’, *Front. Microbiol*, 8(1631), pp. 1–5. doi: 10.1128/AAC.01256-16.
- Morrone, G., Brenciani, A., Vincenzi, C., Barocci, S., Tili, E., Manso, E., et al.** (2016) ‘A clone of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* bearing the G2576T mutation is endemic in an Italian hospital’, *J Hosp Infect*, 94(2), pp. 203–6. doi: 10.1016/j.jhin.2016.07.012.
- Mosqueda, N., Espinal, P., Cosgaya, C., Viota, S., Plasencia, V., Álvarez-Lerma, F., et al.** (2013) ‘Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: Nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain’, *Antimicrob Agents Chemother*, 57(10), pp. 5155–7. doi: 10.1128/AAC.01486-13.
- Moure, Z., Lara, N., Marin, M., Sola-Campoy, P., Bautista, V., Gómez-Bertomeu, F., et al.** (2020) ‘Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxTA* genes’, *Int J Antimicrob Agents*. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105977.
- Mulanovich, V. E., Huband, M. D., Mccurdy, S. P., Lemmon, M. M., Lescoe, M., Jiang, Y., et al.** (2010) ‘Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization’, *J Antimicrob Chemother*, 65(9), pp. 2001–4. doi: 10.1093/jac/dkq238.
- Nebreda, T., Oteo, J., Aldea, C., García-Estébanez, C., Gastelu-Iturri, J., Bautista, V., et al.** (2007) ‘Hospital dissemination of a clonal complex 17 *vanB2*-containing *Enterococcus faecium*’, *J Antimicrob Chemother*, 59(4), pp. 806–7. doi: 10.1093/jac/dkm022.
- Nordmann, P., Dortet, L. and Poirel, L.** (2012a) ‘Rapid detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*’, *J Clin Microbiol*, 50(9), pp. 3016–22. doi: 10.1128/JCM.00859-12.
- Nordmann, P., Poirel, L. and Dortet, L.** (2012b) ‘Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*’, *Emerg Infect Dis*, 18(9), pp. 1503–7. doi: 10.1111/1469-0691.12318.
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., et al.** (2012c) ‘Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*’, *Clin Microbiol Infect*, 18(5), pp. 432–8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x.

- Normark, B. and Normark, S.** (2002) 'Evolution and spread of antibiotic resistance', *J Intern Med*, 252(2), pp. 91–106. doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x.
- Nüesch-Inderbilen, M., Hächler, H. and Kayser, F.** (1996) 'Detection of genes coding for extended-spectrum SHV Beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E Test', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15(5), pp. 398–402.
- O'Connor, C., Powell, J., Finnegan, C., O'Gorman, A., Barrett, S., Hopkins, K. L., et al.** (2015) 'Incidence, management and outcomes of the first *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a tertiary referral centre in the Republic of Ireland', *J Hosp Infect*, 90(4), pp. 316–21. doi: 10.1016/j.jhin.2014.12.013.
- Opota, O., Croxatto, A., Prod, G. and Greub, G.** (2015a) 'Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art', *Clin Microbiol Infect*, 21(4), pp. 313–22. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.003.
- Opota, O., Jatón, K. and Greub, G.** (2015b) 'Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood', *Clin Microbiol Infect*, 21(4), pp. 323–31. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.005.
- Oteo, J., Ortega, A., Bartolomé, R., Bou, G., Conejo, C., Fernández-Martínez, M., et al.** (2015) 'Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain Reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem', *Antimicrob Agents Chemother*, 59(6), pp. 3406–3412. doi: 10.1128/AAC.00086-15.
- Otten, H.** (1986) 'Domagk and the development of the sulphonamides', *J Antimicrob Chemother*, 17(6), pp. 689–96. doi: 10.1017/S0922156500001230.
- Oviaño, M. and Bou, G.** (2019) 'Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond', *Clin Microbiol Rev*, 32(1), pp. e00037-18. doi: 10.1128/CMR.00037-18.
- Palmieri, M., D'Andrea, M. M., Pelegrin, A. C., Perrot, N., Mirande, C., Blanc, B., et al.** (2020) 'Abundance of colistin-resistant, OXA-23- and *armA*-producing *Acinetobacter baumannii* belonging to international clone 2 in Greece', *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2020.00668.
- Papagiannitsis, C. C., Tsilipounidaki, K., Malli, E. and Petinaki, E.** (2019) 'Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel

- oxazolidinone resistance gene *poxTA*', *J Antimicrob Chemother*, 74(8), pp. 2461–2. doi: 10.1093/jac/dkz155.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. and Bonomo, R. A.** (2011) 'Carbapenems: Past, present, and future', *Antimicrob Agents Chemother*, 55(11), pp. 4943–60. doi: 10.1128/AAC.00296-11.
- Pfaller, M. A., Mendes, R. E., Streit, J. M., Hogan, P. A. and Flamm, R. K.** (2017) 'Five-year summary of in vitro activity and resistance mechanisms of linezolid against clinically important gram-positive cocci in the United States from the LEADER surveillance program (2011 to 2015)', *Antimicrob Agents Chemother*, 61(7), pp. 1–9. doi: 10.1128/AAC.00609-17.
- Pintado, V., Pazos, R., Jiménez-Mejías, M. E., Rodríguez-Guardado, A., Díaz-Pollán, B., Cabellos, C., et al.** (2018) '*Staphylococcus aureus* meningitis in adults: A comparative cohort study of infections caused by meticillin-resistant and meticillin-susceptible strains', *Journal of Hospital Infection*. doi: 10.1016/j.jhin.2018.11.008.
- Pintado, V., Pazos, R., Jiménez-Mejías, M. E., Rodríguez-Guardado, A., Díaz-Pollán, B., Cabellos, C., et al.** (2020) 'Linezolid for therapy of *Staphylococcus aureus* meningitis: a cohort study of 26 patients', *Infect Dis (Lond)*, 52(11), pp. 808–15. doi: 10.1080/23744235.2020.1789212.
- Podolsky, S. H.** (2018) 'The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018)', *Palgrave Communications*, 4(1), p. 124. doi: 10.1057/s41599-018-0181-x.
- Poirel, L., Fernández, J. and Nordmann, P.** (2016) 'Comparison of three biochemical tests for rapid detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*', *J Clin Microbiol*, 54(2), pp. 423–7. doi: 10.1128/JCM.01840-15.
- Poirel, L., Naas, T. and Nordmann, P.** (2010) 'Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases', *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), pp. 24–38. doi: 10.1128/AAC.01512-08.
- Poirel, L. and Nordmann, P.** (2006) 'Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology', *Clin Microbiol Infect*, 12(9), pp. 826–36. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x.
- Queenan, A. M. and Bush, K.** (2007) 'Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases', *Clin Microbiol Rev*, 20(3), pp. 440–58. doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- Reitzel, R. A., Rosenblatt, J., Gerges, B. Z., Jarjour, A., Fernández-Cruz, A. and**

- Raad, I. I.** (2020) ‘The potential for developing new antimicrobial resistance from the use of medical devices containing chlorhexidine, minocycline, rifampicin and their combinations: a systematic review’, *JAC Antimicrob Resist*, 2(1), pp. 1–16. doi: 10.1093/jacamr/dlaa002.
- Renvoise, A., Decre, D., Amarsy-Guerle, R., Huang, T. D., Jost, C., Podglajen, I., et al.** (2013) ‘Evaluation of the  $\beta$ lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of *Enterobacteriaceae*’, *J Clin Microbiol*, 51(12), pp. 4012–17. doi: 10.1128/JCM.01936-13.
- Robledo, I. E., Aquino, E. E., Santé, M. I., Santana, J. L., Otero, D. M., León, C. F., et al.** (2010) ‘Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico’, *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), pp. 1354–7. doi: 10.1128/AAC.00899-09.
- Rodríguez-Baño, J., García, L., Ramírez, E., Lupión, C., Muniain, M. A., Velasco, C., et al.** (2010) ‘Long-term control of endemic hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): The Impact of targeted active surveillance for MRSA in patients and healthcare workers’, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31(8), pp. 786–95. doi: 10.1086/654003.
- Rodríguez-Baño, J., García, L., Ramírez, E., Martínez-Martínez, L., Muniain, M., Fernández-Cuenca, F., et al.** (2009) ‘Long-term control of hospital-wide endemic multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive “bundle” approach’, *Am J Infect Control*, 37(9), pp. 715–22. doi: 10.1016/j.ajic.2009.01.008.
- Rodríguez-Baño, J., Paño-Pardo, J. R., Alvarez-Rocha, L., Asensio, Á., Calbo, E., Cercenado, E., et al.** (2012) ‘Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish Hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH Consensus Document’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30(1), pp. 22.e1-22.e23. doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.018.
- Rodríguez-Díaz, J., Guna-Serrano, R., Larrosa-Escartín, N. and Marín-Arriaza, M.** (2017) ‘Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares’, *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 62.
- Ruiz-Garbajosa, P., De Regt, M., Bonten, M., Baquero, F., Coque, T. M., Cantón, R., et al.** (2012) ‘High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17’, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(4), pp. 519–22. doi: 10.1007/s10096-



011-1342-7.

- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A. T., Hanke, D., Eichhorn, I., Azcona-Gutiérrez, J. M., Pérez-Moreno, M. O., et al.** (2020) ‘Mechanisms of linezolid resistance among *enterococci* of clinical origin in Spain—detection of *optrA*- and *cfr(D)*-carrying *E. faecalis*’, *Microorganisms*, 8(8), pp. 1–17. doi: 10.3390/microorganisms8081155.
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A. T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Eichhorn, I., et al.** (2019) ‘Detection of *poxtA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm’, *J Glob Antimicrob Resist*. doi: 10.1016/j.jgar.2019.12.012.
- Ruiz, M., Marti, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A. and Vila, J.** (2007) ‘High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain’, *Clin Microbiol Infect*, 13(12), pp. 1192–8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01825.x.
- Russo, A., Campanile, F., Falcone, M., Tascini, C., Bassetti, M., Goldoni, P., et al.** (2015) ‘Linezolid-resistant staphylococcal bacteraemia: A multicentre case–case–control study in Italy’, *Int J Antimicrob Agents*, 45(3), pp. 255–261. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.008.
- Sabaté, M. and Prats, G.** (2002) ‘Estructura y función de los integrones’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 20(7), pp. 341–5. doi: 10.1016/s0213-005x(02)72813-9.
- Sakoulas, G., Rose, W., Nonejuie, P., Olson, J., Pogliano, J., Humphries, R., et al.** (2014) ‘Ceftaroline restores daptomycin activity against daptomycin-nonsusceptible vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*’, *Antimicrob Agents Chemother*, 58(3), pp. 1494–1500. doi: 10.1128/AAC.02274-13.
- Salimnia, H., Fairfax, M. R., Lephart, P. R., Schreckenberger, P., Desjarlais, S. M., Johnson, J. K., et al.** (2016) ‘Evaluation of the FilmArray Blood culture identification panel: results of a multicenter controlled trial’, *J Clin Microbiol*, 54(3), pp. 687–98. doi: 10.1128/JCM.01679-15.
- Santimaleworagun, W., Changpradub, D., Thunyaharn, S. and Hemapanairoa, J.** (2019) ‘Optimizing the dosing regimens of daptomycin based on the susceptible dose-dependent breakpoint against vancomycin-resistant *enterococci* infection’, *Antibiotics (Basel)*, 8(4), p. 245. doi: 10.3390/antibiotics8040245.
- Sassi, M., Guérin, F., Zouari, A., Beyrouthy, R., Auzou, M., Fines-Guyon, M., et al.** (2019) ‘Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in *enterococci* from France, 2006–16’, *J Antimicrob Chemother*, 74(6), pp. 1469–72. doi: 10.1093/jac/dkz097.

- Saule, M., Samuelsen, O., Dumpis, U., Sundsfjord, A., Karlson, A., Balode, A., et al.** (2013) 'Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel Abar4-like resistance Island in Latvia', *Antimicrob Agents Chemother*, 57(2), pp. 1069–72. doi: 10.1128/AAC.01783-12.
- Schleicher, X., Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Körber-Irrgang, B., Kresken, M. and Seifert, H.** (2013) 'Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009)', *Clin Microbiol Infect*, 19(8), pp. 737–42. doi: 10.1111/1469-0691.12026.
- Schwarz, S., Werckenthin, C. and Kehrenberg, C.** (2000) 'Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*', *Antimicrob Agents Chemother*, 44(9), pp. 2530–3. doi: 10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000.
- Seral, C., Sáenz, Y., Algarate, S., Duran, E., Luque, P., Torres, C., et al.** (2011) 'Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients.', *Int J Med Microbiol*, 301(4), pp. 354–8. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.11.001.
- Shang, Y., Li, D., Shan, X., Schwarz, S., Zhang, S., Chen, Y., et al.** (2019) 'Analysis of two pheromone-responsive conjugative multiresistance plasmids carrying the novel mobile *optrA* locus from *Enterococcus faecalis*', *Infect Drug Resist*, 12, pp. 2355–62. doi: 10.2147/IDR.S206295.
- Sharkey, L. K. R., Edwards, T. A. and O'Neill, A. J.** (2016) 'ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection', *mBio*, 7(2), pp. 1–10. doi: 10.1128/mBio.01975-15.
- Shen, J., Wang, Y. and Schwarz, S.** (2013) 'Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria', *J Antimicrob Chemother*, 68(8), pp. 1697–706. doi: 10.1093/jac/dkt092.
- Da Silva, G., Quinteira, S., Bertolo, E., Sousa, J., Gallego, L., Duarte, A., et al.** (2004) 'Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula', *J Antimicrob Chemother*, 54, pp. 255–8. doi: 10.1093/jac/dkh269.
- Srinivasan, A., Dick, J. D. and Perl, T. M.** (2002) 'Sample size determination in health sciences: A practical Manual', *Clin Microbiol Rev*, 15(3), pp. 430–8. doi:

10.1128/CMR.15.3.430-438.2002.

- Stojković, V., Ulate, M. F., Hidalgo-villeda, F., Aguilar, E., Monge-Cascante, C., Pizarro-Guajardo, M., et al.** (2019) ‘*cfr(B)*, *cfr(C)*, and a New *cfr*-Like gene, *cfr(E)*, in *Clostridium difficile* strains recovered across Latin America’, *Antimicrob Agents Chemother*, 64(1). doi: 10.1128/AAC.01074-19.
- Suárez, C. and Gudiol, F.** (2009) ‘Antibióticos betalactámicos’, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(2), pp. 116–29. doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001.
- Tacconelli, E., Cataldo, M. A., Dancer, S. J., De Angelis, G., Falcone, M., Frank, U., et al.** (2014) *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*. doi: 10.1111/1469-0691.12427.
- Tedim, A. P., Ruíz-Garbajosa, P., Rodríguez, M. C., Rodríguez-Baños, M., Lanza, V. F., Derdoy, L., et al.** (2017) ‘Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995-2015) in Spain’, *J Antimicrob Chemother*, 72(1), pp. 48–55. doi: 10.1093/jac/dkw366.
- Thatrimontrichai, A., Pannaraj, P. S., Janjindamai, W., Dissaneevate, S., Maneenil, G. and Apisarnthanarak, A.** (2020) ‘Intervention to reduce carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit’, *Infect Control Hosp Epidemiol*, pp. 1–6. doi: 10.1017/ice.2020.35.
- Tomaschek, F., Higgins, P. G., Stefanik, D., Wisplinghoff, H. and Seifert, H.** (2016) ‘Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates’, *PLoS One*, 11(4), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0153014.
- Torres, C.** (2012) ‘La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming’, *Discurso leído en el acto de su recepción académica el día 31 de Octubre de 2012. Servicio Publicaciones de la Universidad de La Rioja*, pp. 1–48.
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R. and Coque, T. M.** (2018) ‘Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin’, *Microbiol Spectr*, 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0032-2018.
- Tuite, N., Reddington, K., Barry, T., Zumla, A. and Enne, V.** (2014) ‘Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift?’, *J Antimicrob Chemother*, 69(7), pp. 1729–33.
- Tunkel, A. R., Hasbun, R., Bhimraj, A., Byers, K., Kaplan, S. L., Scheld, W. M., et**

- al.* (2017) '2017 Infectious diseases society of America' s clinical practice guidelines for healthcare-associated ventriculitis and meningitis', *Clin Infect Dis*, 64(6), pp. e34–e65. doi: 10.1093/cid/ciw861.
- Uttley, A. H., George, R. C., Naidoo, J., Woodford, N., Johnson, A. P., Collins, C. H., et al.** (1989) 'High-level vancomycin-resistant *enterococci* causing hospital infections', *Epidemiol Infect*, 103(1), pp. 173–81. doi: 10.1017/S0950268800030478.
- Valdezate, S., Labayru, C., Navarro, A., Mantecón, M. A., Ortega, M., Coque, T. M., et al.** (2009) 'Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital', *J Antimicrob Chemother*, 63(1), pp. 17–20. doi: 10.1093/jac/dkn449.
- Valdezate, S., Miranda, C., Navarro, A., Freitas, A. R., Cabrera, J. J., Carrasco, G., et al.** (2012) 'Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like:Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital', *J Antimicrob Chemother*, 67(4), pp. 832–6. doi: 10.1093/jac/dkr545.
- Vena, A., Falcone, M., Comandini, E., Meledandri, M., Novelli, A., Campanile, F., et al.** (2013) 'Daptomycin plus trimethoprim/sulfamethoxazole combination therapy in post-neurosurgical meningitis caused by linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*', *Diagn Microbiol Infect Dis*, 76(1), pp. 99–102. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.021.
- Villalón, P., Sáez-Nieto, J. A., Carrasco, G., Medina-Pascual, M. J., Garrido, N. and Valdezate, S.** (2019) 'Dynamics of a sporadic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex population', *Front. Microbiol*, 10(593), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2019.00593.
- Villalón, P., Valdezate, S., Cabezas, T., Garrido, N., Vindel, A., Medina-pascual, M. J., et al.** (2015) 'Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital', *BMC Microbiol*, 15(47), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12866-015-0383-y.
- Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Vindel, A. and Saez-Nieto, J. A.** (2013) 'Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- $\beta$ -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain', *J Antimicrob Chemother*, 68(3), pp. 550–3. doi: 10.1093/jac/dks448.
- Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Rubio, V., Vindel, A. and Saez-**

- Nieto, J. A.** (2011) ‘Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain’, *J Clin Microbiol*, 49(3), pp. 875–82. doi: 10.1128/JCM.01026-10.
- Villar, M., Cano, M., Gato, E., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J., Alegría, C., et al.** (2014) ‘Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: A reappraisal’, *Medicine (Baltimore)*, 93(5), pp. 202–10. doi: 10.1097/MD.0000000000000036.
- Walsh, T. R.** (2018) ‘A one-health approach to antimicrobial resistance’, *Nat Microbiol*, 3, pp. 854–5. doi: 10.1038/s41564-018-0208-5.
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., et al.** (2015) ‘A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin’, *J Antimicrob Chemother*, 70(8), pp. 2182–90. doi: 10.1093/jac/dkv116.
- Weiner-Lastinger, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., et al.** (2019) ‘Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017’, *Infect Control Hosp Epidemiol*, pp. 1–18. doi: 10.1017/ice.2019.297.
- Weßels, C., Strommenger, B., Klare, I., Bender, J., Messler, S., Mattner, F., et al.** (2018) ‘Emergence and control of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an ICU of a German hospital’, *J Antimicrob Chemother*, 73(5), pp. 1185–93. doi: 10.1093/jac/dky010.
- WHO** (2017) ‘Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics’, pp. 1–7. doi: 10.4103/jms.jms\_25\_17.
- WHO** (2019) ‘Executive summary. The Selection and use of essential medicines 2019. Report of the 22nd WHO expert committee on the selection and use of essential medicines, 1-5 April 2019. Geneva: World Health Organization; 2019’, pp. 1–15.
- Widerström, M., Monsen, T., Karlsson, C., Edebro, H., Johansson, A. and Wiström, J.** (2009) ‘Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe’, *Scand J Infect Dis*, 41(9), pp. 642–649. doi: 10.1080/00365540903146987.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S., Seifert, H., Wenzel, R. and Edmond, M.** (2004) ‘Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179

## BIBLIOGRAFÍA

cases from a prospective nationwide surveillance study’, *Clin Infect Dis*, 39(3), pp. 309–17. doi: 10.1097/01.idc.0000144912.27311.19.

**Wright, G. D.** (2010) ‘The antibiotic resistome’, *Expert Opin Drug Discov*, 5(8), pp. 779–88. doi: 10.1517/17460441.2010.497535.

**Wu, Y., Fan, R., Wang, Yinchao, Lei, L., Feßler, A. T., Wang, Z., et al.** (2019) ‘Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items’, *Sci Rep*, 9(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-019-51918-y.

**Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M. and Tsakris, A.** (2013) ‘Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages’, *Int J Antimicrob Agents*, 41(1), pp. 11–19. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008.