



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes en el Hospital General Universitario de Alicante

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2020

Autor: Juan Francisco Luchoro Cerdá

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Juan Carlos Rodríguez Díaz, Maripaz Ventero Martín

Tabla de contenido

1	ANTECEDENTES	3
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el entorno hospitalario	3
1.2	Mecanismos de resistencia.....	5
1.2.1	Mecanismos de resistencia intrínsecos.....	5
1.2.2	Adquisición de resistencias debido a mutaciones genéticas espontáneas.....	6
1.2.3	Adquisición horizontal de material genético	6
1.3	Tratamiento empírico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR/XDR	8
1.3.1	Nuevos tratamientos: imipenem/relebactam.....	9
1.4	Estructura poblacional de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.4.1	Clones de alto-riesgo	10
1.4.2	Relación de los clones de alto riesgo y la transferencia horizontal de genes.....	10
1.5	Métodos en el estudio de las poblaciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo general.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3	MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1	Aislados bacterianos.	13
3.2	Extracción del ADN.....	13
3.3	Amplificación por PCR de la región variable de los loci ms172 y ms217.	13
3.4	Identificación del genotipo.....	15
3.5	Análisis estadístico	15
3.6	Antibiogramas e identificación de carbapenemasas	16
4	RESULTADOS	16
5	DISCUSIÓN	24
6	CONCLUSIONES.....	29
7	BIBLIOGRAFÍA.....	29

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista humano que se asocia a una amplia variedad de infecciones nosocomiales. Debido a su característico genoma, es capaz de desarrollar resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles para su erradicación, provocando la aparición de cepas catalogadas como multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) o incluso pan-resistentes (PDR), entre las cuales es común encontrar los clones exitosos conocidos como de “alto riesgo”, ST235, ST175, ST111. En este estudio, se realiza un estudio molecular mediante el método DLST (de sus siglas en inglés *Double Locus Sequence Typing*) de las cepas MDR, XDR y PDR aisladas en el Hospital General Universitario de Alicante y una identificación de las posibles carbapenemasas existentes para evaluar la resistencia a los carbapenems, los fármacos de última línea contra cepas MDR/XDR. Se detectó una alta prevalencia de los clones de riesgo mencionados anteriormente, suponiendo un 51% del total de muestras (n =45) con una distribución similar entre los clones de alto riesgo. La evaluación *in vitro* del imipenem/relebactam, un agente nuevo carbapenémico asociado a un inhibidor de beta-lactamasas, también ha sido llevada a cabo, observándose una tasa de resistencia del 42% del total de las muestras, entre las cuales se demuestra que las muestras que poseen carbapenemasas (VIM y OXA-48) son resistentes debido a que el relebactam es incapaz de inhibir este tipo de beta-lactamasas. Además, se observa que las muestras correspondientes a los genotipos ST235 y ST111 producen carbapenemasas y son por ende resistentes al imipenem/relebactam. El DLST prueba ser un método eficaz y plausible en las labores de vigilancia y detección de brotes de clones multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

1 ANTECEDENTES

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* en el entorno hospitalario

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram-negativo que habita en gran cantidad de nichos biológicos acuáticos y terrestres debido a su versatilidad metabólica. Su relevancia viene dada por ser un patógeno oportunista humano asociado a una amplia gama de infecciones agudas y crónicas, incluyendo

fibrosis quística, neumonía asociada a ventiladores mecánicos, infecciones del tracto urinario (ITU), otitis externas, infecciones de quemaduras y heridas, de hueso y articulaciones, bacteriemia e infecciones sistémicas¹. Es una de las causas más frecuentes de infección en pacientes hospitalizados, afectando especialmente a pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI)².

Dentro del ámbito hospitalario, destaca por ser uno de los principales responsables etiológicos de bacteriemias (presencia de bacterias en sangre), infecciones respiratorias y urinarias. *Pseudomonas aeruginosa* fue el responsable del 10,23% de infecciones en el entorno hospitalario en el 2019. Además, el 19,42% de las infecciones respiratorias, el 11,71% de las infecciones urinarias, el 8,64% de las infecciones quirúrgicas y el 6,15% de las bacteriemias se debían a este patógeno. Todos estos valores lo sitúan como el tercer microorganismo más prevalente en los hospitales de nuestro país, por detrás de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*³.

Pseudomonas aeruginosa pertenece al grupo de patógenos denominado como “ESKAPE” (en el que se incluyen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y varias especies de *Enterobacter*). Estos patógenos son característicos por su capacidad de evadir la actividad de grandes grupos de fármacos antibióticos. De hecho, *Pseudomonas aeruginosa* forma parte del grupo de patógenos de la OMS para los cuales la búsqueda de nuevos antibióticos es un tema urgente¹.

Ocho categorías de agentes antimicrobianos se utilizan frecuentemente para determinar el perfil de resistencia de *P. aeruginosa*: aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina); carbapenems (imipenem, meropenem); cefalosporinas asociadas inhibidores de beta-lactamasas (ceftazidima-avibactam, ceftolozano-tazobactam, cefepima), fluorquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), penicilinas asociadas a inhibidores de beta-lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam), monobactams (aztreonam), ácidos fosfónicos (fosfomicina) y polimixinas (colistina y polimixina B). De acuerdo con *Magiorakos et al.*⁴, las cepas de *P. aeruginosa* se definen

como multirresistentes (MDR) si no son susceptibles a ≥ 1 agente en ≥ 3 categorías de antimicrobianos; extensivamente multirresistentes (XDR) si no son susceptibles a ≥ 1 agente en todas menos ≤ 2 categorías; y panresistentes (PDR) si no son susceptibles a todos los antibióticos listados.

La ascendente prevalencia de infecciones crónicas y nosocomiales producidas por cepas MDR o XDR de *P. aeruginosa* compromete severamente la selección de tratamientos apropiados, relacionándose así con una mayor morbilidad y mortalidad⁵.

Esta amenaza creciente resulta de la capacidad de este patógeno de desarrollar mecanismos de resistencia contra prácticamente toda clase de antibióticos disponibles, debido a su característico genoma. Este está compuesto por una parte conservada llamada *core genome*, englobando genes que se identifican en todos los clones. De este genoma *core* destaca la gran cantidad de genes dedicados a la producción de sistemas de transporte y enzimas encargados de la captación de nutrientes, y también genes que codifican proteínas de la membrana exterior con funciones de adhesión, motilidad y expulsión de antibióticos y factores de virulencia. Además del genoma *core*, *Pseudomonas aeruginosa* contiene un genoma accesorio compuesto por elementos extracromosómicos como plásmidos y bloques de ADN insertados en el cromosoma en varios *loci*, que es el responsable de la alta variedad genética entre cepas y que suelen codificar proteínas de adaptación al entorno. Se cree que el genoma accesorio se adquiere a través de transferencia horizontal de genes (frecuentemente mediada por fagos), y con ello una amplia variedad de nuevos genes que les confieren elementos extra a la hora de desarrollar resistencias¹.

1.2 Mecanismos de resistencia

1.2.1 Mecanismos de resistencia intrínsecos

Pseudomonas aeruginosa de por sí tiene baja susceptibilidad a antibióticos debido a mecanismos de resistencia conservados como la producción inducible de cefalosporinas tipo AmpC y la producción de bombas de flujo tanto constitutivas (MexAB-OprM) como inducibles (MexXY). La producción inducida

de AmpC afecta mayormente a aminopenicilinas y cefalosporinas. Por otro lado, la expresión constitutiva de bombas de expulsión activa MexAB-OprM es la mayor encargada del bajo nivel de susceptibilidad intrínseco a la mayoría de beta-lactámicos (excepto imipenem, pero no meropenem) y fluorquinolonas. La producción inducible de MexXY, sin embargo, es el principal responsable de la baja sensibilidad a aminoglucósidos⁶.

1.2.2 Adquisición de resistencias debido a mutaciones genéticas espontáneas

La mutación en los genes que regulan la producción de AmpC (*ampD*, *dacB*, *ampR* conocidos como *peptidoglycan-recycling genes*) lleva a una sobreexpresión constitutiva de AmpC, que confiere resistencia superior a grupos como las penicilinas (piperacilina), las cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima, cefepima) y los monobactams (aztreonam)⁶.

También es frecuente la inactivación mutacional de las porinas OprD, que sinérgicamente con la sobreexpresión de AmpC, confieren el mayor mecanismo de resistencia al imipenem y menor susceptibilidad al meropenem, ambos carbapenémicos; y conjuntamente una resistencia global a todos los beta-lactámicos, ya que, sin estas porinas, la entrada de estos fármacos a la bacteria se dificulta en gran proporción. Además, la sobreexpresión de bombas de expulsión activa como MexAB-OprM y MexXY también suele ocurrir con frecuencia, sumándose al efecto resistente conferido por los dos mecanismos anteriores y otorgando un espectro de resistencia muy alto a beta-lactámicos, fluorquinolonas y aminoglucósidos⁷.

La modificación mutacional de las dianas de fármacos como la ADN-girasa o las topoisomerasas tipo IV también contribuyen en la adquisición de resistencias a fármacos como las fluorquinolonas; o fracciones modificadas del lípido A del lipopolisacárido que dificultan la acción de las polimixinas, debido a su mecanismo de acción⁷.

1.2.3 Adquisición horizontal de material genético

La adquisición de mecanismos de resistencia en forma de transferencia horizontal es una de las áreas de mayor preocupación en el estudio de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que una amplia variedad de beta-

lactamasas, encargadas de impedir la acción de beta-lactámicos, se hereda de esta forma.

Las beta-lactamasas más frecuentes en lo que refiere a *Pseudomonas aeruginosa* se pueden dividir en 4 clases según Potron *et al.*⁸, de acuerdo con la clasificación de Ambler de todas las beta-lactamasas existentes.

Dentro de las beta-lactamasas de clase A, encontramos las beta-lactamasas clase A de espectro extendido (BLEE). Las de clase B son comunmente conocidas como metalo-beta-lactamasas (MBLs), capaces de hidrolizar carbapenems y todos los beta-lactámicos (excepto monobactams); las de clase C son las cefalosporinasas AmpC, de las cuales se ha hablado ya y que se expresan constitutivamente y de forma inducible en *Pseudomonas aeruginosa*. Por último, están las de clase D, conocidas como oxacilinasas (OXA), que pueden expresarse intrínsecamente o adquirirse horizontalmente y su espectro depende en gran parte del tipo de oxicilinasas.

En *Pseudomonas aeruginosa* encontramos beta-lactamasas horizontalmente adquiridas de clase D (OXA-48) y de clase A (PER, VEB, GES...), pero las que destacan sobre todo son las carbapenemasas de clase B, entre las que se encuentran las VIM, IMP, NDM, SPM, GIM, DIM y FIM.

Las de clase A (BLEE) muestran un espectro de hidrólisis que suele incluir a los beta-lactámicos usados contra *Pseudomonas aeruginosa* según las guías (piperacilina, ceftazidima, cefepima o aztreonam, pero no carbapenems), no obstante, suelen ser sensibles a los inhibidores de beta-lactamasas como tazobactam o avibactam, confiriendo susceptibilidad a estos fármacos cuando son administrados junto a los inhibidores de beta-lactamasas. Sin embargo, las de clase B (MBL) sí son capaces de, además, hidrolizar carbapenems, pero el mayor problema radica en que son resistentes a cualquier tipo de inhibidor de beta-lactamasas comercializado actualmente (ácido clavulánico, tazobactam, avibactam y sulbactam, entre otros). Las clases C (ampC) y D (OXA) también suelen ser resistentes a estos inhibidores, pero son incapaces de hidrolizar los carbapenems⁷, a excepción de las OXA-48-like, cuya incidencia en *Pseudomonas aeruginosa* está en aumento y son capaces de hidrolizar

carbapenemes y tienen un perfil de resistencia a beta-lactamasas similar a las MBL.

Como se ha mencionado anteriormente, el genoma accesorio contiene los genes capaces de codificar elementos de adaptación al entorno. La mayoría de las carbapenemasas se asocian a integrones de clase I. Los integrones son elementos genéticos que desde el extremo 5' al 3' están formados por un fragmento que codifica una integrasa (*intl*) y a continuación una secuencia *attI* a la que se unen los genes de resistencia. Dentro de *intl*, en su extremo 3', hay una secuencia promotora *Pant* a partir de la cual se transcriben los genes de resistencia integrados, ya que estos genes carecen de promotor. La integrasa reconoce en ciertos genes de resistencia (denominados genes casete) una secuencia específica que une, por recombinación, a la secuencia *attI* del integrón. El fragmento formado por *intl-attI* está altamente conservado en todos los integrones y se denomina 5'-CS.

Los integrones se han clasificado según la secuencia de su integrasa. Los detectados con más frecuencia pertenecen a la clase 1.

Entre los diferentes genes captados pueden estar los que codifican las metalo-beta-lactamasas, pero pueden incluirse otros como genes que codifiquen otro tipo de beta-lactamasas o enzimas que modifican aminoglucósidos, heredándose así varios mecanismos de resistencia a la vez entre distintas cepas.

Los integrones no son móviles por sí mismos, pero pueden colocarse en transposones que a su vez se encuentran en plásmidos conjugativos, por lo que su movilidad horizontal se vuelve posible¹.

1.3 Tratamiento empírico de *Pseudomonas aeruginosa* MDR/XDR

Normalmente, cuando no existen antecedentes de colonización o infección por una cepa MDR o XDR o la tasa de resistencia a beta-lactámicos no es elevada ($\leq 20\%$), el tratamiento consiste en cualquiera de los beta-lactámicos potencialmente activos (ceftazidima, cefepima, meropenem o piperacilina/tazobactam) asociados a colistina o amikacina por vía intravenosa.

En el caso contrario en el que es necesario tener en cuenta cepas MDR o XDR, el tratamiento suele iniciarse con la asociación de ceftolozano/tazobactam o ceftazidima/avibactam asociados a colistina, amikacina o meropenem. Ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam son dos combinaciones de cefalosporinas con un inhibidor de beta-lactamasas lanzados recientemente al mercado. Ambos consiguen un buen efecto ante cepas MDR debido a que los inhibidores de beta-lactamasas asociados son capaces de inhibir beta-lactamasas de clase A (BLEE) y clase C (AmpC), pero incapaces de inhibir las metalo-beta-lactamasas. Una vez se detecta el espectro de resistencia del patógeno, pueden retirarse tanto la amikacina como la colistina si resultan ser sensibles a los beta-lactámicos utilizados.

En el caso de cepas productoras de metalo-beta-lactamasas, de las cuales se hablará a continuación, se suele asociar ceftazidima/avibactam y aztreonam, y colistina o un aminoglucósido^{7,9}.

1.3.1 Nuevos tratamientos: imipenem/relebactam

Un nuevo candidato, aprobado por la EMA (*European Medicines Agency*) en Febrero de 2020 es la combinación de imipenem/relebactam/cilastatina, aprobada con el nombre de Recarbrio®, indicado para infecciones del tracto urinario e intraabdominales por bacterias gram-negativas susceptibles donde el tratamiento es limitado debido a perfiles multirresistentes¹⁰.

El imipenem es un fármaco tipo carbapenem capaz de inhibir la síntesis de la pared celular, y la cilastatina es un inhibidor de la dihidropeptidasa renal con la función de reducir el metabolismo del imipenem. El relebactam es un inhibidor de beta-lactamasas tipo A (BLEE) y tipo C (AmpC), por lo que se espera que revierta la resistencia al imipenem en cepas productoras de este tipo de beta-lactamasas. También confiere actividad a cepas no susceptibles al imipenem debido a una pérdida de porinas OprD o a la sobreproducción de bombas de eflujo o AmpC. No obstante, el relebactam no es capaz de inhibir metalo-beta-lactamasas (beta-lactamasas tipo B) o OXA-48-*like* carbapenemasas (beta-lactamasas clase D)¹¹.

1.4 Estructura poblacional de *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.1 Clones de alto-riesgo

A lo largo de los años se ha mapeado la población de *Pseudomonas aeruginosa*, revelando que se trata de una especie con una gran diversidad clonal, con la mayoría de aislados siendo genotipos únicos. No obstante, esto ocurre con las cepas sensibles a antibióticos. Cuando se estudian las cepas MDR, se aprecia una distribución clonal mucho más estrecha y todavía más cuando se trata de las XDR.

La mayoría de las cepas XDR y en menor medida las MDR pertenecen a tres clones mayoritarios internacionalmente distribuidos e identificados. Los clones ST111, ST175 y ST235 son los considerados clones de alto riesgo. En orden ascendente, el más distribuido es el ST235 (mundialmente), seguidos de el ST111 (todos los continentes excepto Oceanía) y el ST175 (Japón y algunos países europeos, en su mayoría España, Francia e Italia)⁶.

1.4.2 Relación de los clones de alto riesgo y la transferencia horizontal de genes

La relación entre los clones de alto riesgo y la transferencia horizontal de genes es enorme, sobre todo en lo que respecta a los genes que codifican MBL (carbapenemasas) y beta-lactamasas BLEE. De hecho, la mayoría de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que producen este tipo de beta-lactamasas pertenecen al genotipo de ST235, seguido del ST111.

Como se ha mencionado anteriormente, el clon ST235 es el más distribuido mundialmente y también el más frecuente entre cepas MDR/XDR. Podemos encontrar una gran variedad de beta-lactamasas adquiridas de clases A, B y D, pero las que más destacan son las carbapenemasas de clase B, sobre todo los subtipos VIM y IMP, siendo la VIM-2 la más frecuente entre los aislados ST235. Al igual que en los ST235, en los clones ST111 también encontramos beta-lactamasas adquiridas, pero de una variedad menor.

No obstante, en los clones ST175 la resistencia no se debe a beta-lactamasas adquiridas horizontalmente, sino que el responsable del perfil multirresistente suele ser de tipo mutacional: inactivación de porinas OprD, hiperproducción de

AmpC y sobreproducción de bombas de expulsión activa. Sin embargo, la producción de VIM se ha detectado en algún caso⁶.

En un estudio sobre los perfiles de susceptibilidad de aislados XDR de *Pseudomonas aeruginosa* en España¹², observaron que de una colección de 150 aislados XDR de 9 hospitales españoles, un 75% de las muestras correspondían a clones de alto riesgo, siendo el más prevalente en España el ST175, y con una presencia de carbapenemasas tipo VIM del 17% entre los 150 aislados.

1.5 Métodos en el estudio de las poblaciones de *Pseudomonas aeruginosa*

El estudio de la epidemiología poblacional a nivel hospitalario de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* se realiza mediante dos enfoques distintos¹³.

Por un lado, el método más conservador se basa en el estudio de las bandas resultantes mediante la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, de sus siglas en inglés). No obstante, este método requiere mucho tiempo y entrenamiento del personal, a la vez que plantea una gran dificultad para la comparativa intra e interlaboratorios por la naturaleza de su técnica.

Por otro lado, se dispone de los métodos de secuenciación génica. Estos métodos son más sencillos, objetivos y disponen de una mayor reproducibilidad. El más popular y estandarizado para el estudio de *Pseudomonas aeruginosa* es el *Multilocus sequence typing* (MLST). Este método, desarrollado por Curran *et al.*¹⁴ en 2004 se basa en la secuenciación de 7 *loci* distribuidos uniformemente en el genoma *core* de *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo los genes *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*. Según la combinación de alelos resultante de la secuenciación de estos genes, se obtiene un clon distinto ST (*sequence type*). De tal forma podemos identificar los clones de alto riesgo referidos anteriormente, ST235, ST175 y ST111, además de los más de 3000 clones distintos que se encuentran en la base de datos de MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa>). Los STs suelen estar representados solo por un aislado, pero para ciertos clones como los 3 de alto riesgo, y hasta 15 más están representados por más de 10 aislados distintos recuperados de distintos países, corroborando así que se trata de clones exitosos.

No obstante, a pesar de que el MLST es el método estándar utilizado actualmente, Basset *et al.*¹⁵ desarrollaron en 2013 el método de *Double locus sequence typing* (DLST), cuya base técnica es la misma que la de MLST, pero utiliza 2 genes del genoma *core* con elevado polimorfismo, los *loci ms172* y *ms217*. El desarrollo de esta técnica buscaba el establecimiento de un método capaz de detectar rápidamente un aumento en la incidencia de un clon específico de *Pseudomonas aeruginosa*, indicando un brote potencial.

Cholley *et al.*¹³ fueron capaces de comparar MLST, PFGE y DLST con el objetivo de fundamentar las capacidades del DLST. Mediante este estudio se muestra el potencial de vigilancia del DLST a nivel intrahospitalario, además de la correlación de los perfiles ST más exitosos (como los ST235, ST111 y ST175) con sus respectivos perfiles en DLST. Sin embargo, el DLST muestra poca variabilidad genética entre ST, por lo que no sirve para la resolución de clusters del mismo clon.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Conocer la epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital General Universitario de Alicante, en especial las cepas resistentes al fármaco carbapenémico imipenem, a través del uso del DLST para categorizar las cepas presentes en las distintas muestras recogidas.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer la relación de los clones multirresistentes que se encuentren con los clones mundialmente esparcidos de alto riesgo.
- Evaluar la actividad *in vitro* de la combinación antibiótica imipenem/relebactam frente a cepas resistentes a imipenem.
- Estudiar la presencia de beta-lactamasas tipo B y su relación con la resistencia antibiótica en cepas multirresistentes y en especial respecto al imipenem/relebactam.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Aislados bacterianos.

En el estudio se incluyó una selección de n=45 aislados bacterianos procedentes de muestras de sangre, esputo, orina y exudado intraabdominal, recogidos en el Hospital General de Alicante a lo largo de un año. Cada aislado pertenece a un paciente distinto. Todos los aislados son de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes al fármaco imipenem. Los aislados se mantienen en el biobanco del hospital a -80°C en un medio de congelación Müller-Hinton con glicerol al 15%.

Para trabajar con ellos, se descongelan y se siembra 1 µL del medio en agar Columbia y se deja crecer en estufa a 35°C durante 24 h. Al día siguiente de la siembra se comprueba el crecimiento y posibles contaminaciones.

3.2 Extracción del ADN.

A partir del cultivo en placa se realizó una suspensión de 1 µL de colonias en 300 µL de una suspensión de resina quelante Chelex 100 al 10% p/v. Esta suspensión se sometió a choque térmico, realizando 3 ciclos de 10 minutos a 96°C y 10 minutos a -80°C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y el resto se descartó.

Una vez extraído el ADN se valoró su calidad y concentración mediante espectrometría por microgota (Nanodrop). Se acepta como una buena extracción una concentración de ADN mayor a 200 ng/µL hasta 1200 ng/µL y un índice A260/A280 entre 1,8 y 2,2.

3.3 Amplificación por PCR de la región variable de los loci ms172 y ms217.

Utilizamos una PCR tradicional para amplificar las regiones altamente variables de los loci ms172 y ms217. Las regiones variables se encuentran flaqueadas por regiones muy conservadas a las que se unirán los cebadores de amplificación.

La amplificación por PCR de cada loci (cada uno por separado) se lleva a cabo en un volumen de 25 µL, siendo 0,625 µL (0,5 µM) de cada primer *forward* y *reverse*, 12,5 µL de AmpliTAQ 360 Gold MasterMix (Applied Biosystems), correspondiente a 1 U de Taq ADN-polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,2 mM de cada dNTP.

Las condiciones de los ciclos de la PCR son: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C, 35 ciclos que consisten en 30 s a 94°C, 30 s a 60°C (para *ms172*) y 64°C (para *ms217*), 45 s a 72°C; por último, una extensión final de 10 min a 72°C (Figura 1).

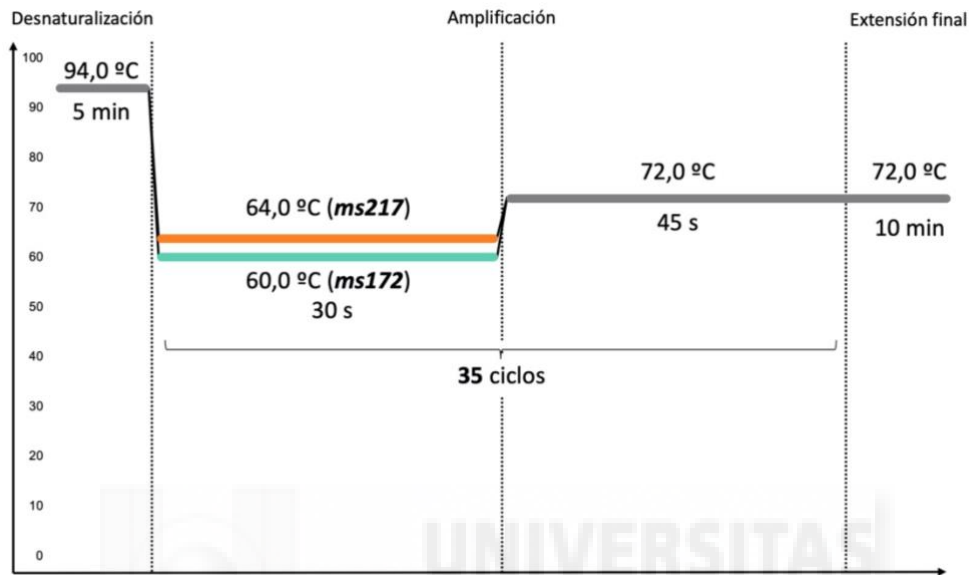


Figura 1. Diagrama de la realización de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) realizada.

Se realizaron geles de electroforesis estándar donde se evaluaba la especificidad y los resultados de la técnica de PCR (i. e. una banda visible de 400 pb para el gen *ms172* y otra de 350 pb para el *ms217* por PCR) (Figura 2).

Finalmente, las muestras se purifican con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

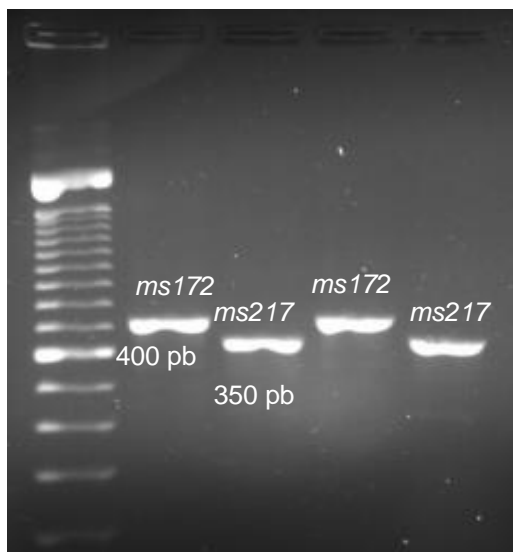


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa. La columna 1 presenta el marcador de peso molecular 100 pb; Las columnas 2 y 3 representan los alelos *ms172* y *ms217* de una de las muestras; Y las columnas 4 y 5 representan los alelos *ms172* y *ms217* de otra muestra distinta.

Las muestras fueron secuenciadas mediante secuenciación tipo SANGER por parte de la empresa externa SECUGEN.

Las secuencias fueron analizadas usando el software 4Peaks, versión (por A. Griekspoor and Tom Groothuis, nucleobytes.com) y MegaX versión 10.1.5 (por K. Tamura, G. Stetcher y S. Kumar).

El proceso se repetía una segunda vez si no se obtenía ninguna secuencia o la calidad de la secuencia era muy baja para un correcto análisis.

3.4 Identificación del genotipo

Las secuencias se introducen en la base de datos de la página web www.dlst.org para la asignación de alelos. A cada *locus* se le da un número distinto según su alelo, por lo que a cada muestra se le daban dos números, uno para cada *locus* (*ms172* y *ms217*). En este trabajo se identificó cada muestra con un número para el alelo del *ms172* seguido por un guion y otro número para el alelo del *ms217* (i. e. 8-37).

Análisis estadístico

Se utilizó el software de análisis estadístico SPSS Statistics (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

3.5 Antibiogramas e identificación de carbapenemasas

El antibiograma y la identificación de carbapenemasas son pruebas que se llevan a cabo de forma rutinaria en el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Alicante, por lo que los datos son obtenidos de las bases de datos realizadas por el servicio.

Por un lado, la detección de carbapenemasas se realiza mediante un kit de test rápido (NG-Test® CARBA 5). Este kit es capaz de detectar beta-lactamasas de los tipos KPC, OXA-48, VIM, IMP y NDM. Por otro lado, el antibiograma de las muestras se realiza mediante un sistema automatizado de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillo. El kit utilizado es el Neg MIC 44 (B1016-175) de Beckman Coulter Inc.

4 RESULTADOS

Del total de las muestras (n=45) que cumplían el criterio de inclusión de ser cepas MDR, XDR y PDR resistentes a imipenem, se obtuvieron los siguientes perfiles de multirresistencia: MDR (n=18, 40%), XDR (n=26, 57,8%), (PNR n=1, 2,2%).

Las familias de antibióticos utilizadas para elaborar la clasificación MDR/XDR/PDR fueron: aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima y cefepima), fluorquinolonas antipseudomónicas (ciprofloxacino y levofloxacino), penicilinas anti-pseudomónicas + inhibidor de beta-lactamasa (piperacilina/tazobactam), monobactams (aztreonam) y polimixinas (colistina)⁴. Cierta sesgo existe a la hora de realizar la clasificación, debido a que la prueba de susceptibilidad a fosfomicina no fue efectuada.

De los antibióticos citados que fueron utilizados, se analizaron las tasas de susceptibilidad, basadas en las recomendaciones del EUCAST¹⁶ donde se observó que la mayor susceptibilidad entre todas las muestras fue a la colistina

(n=42, 93%), mientras que la mayor resistencia se observó las fluorquinolonas, sobre todo al levofloxacino (n = 5, 11% sensibles) (**Figura 3**).

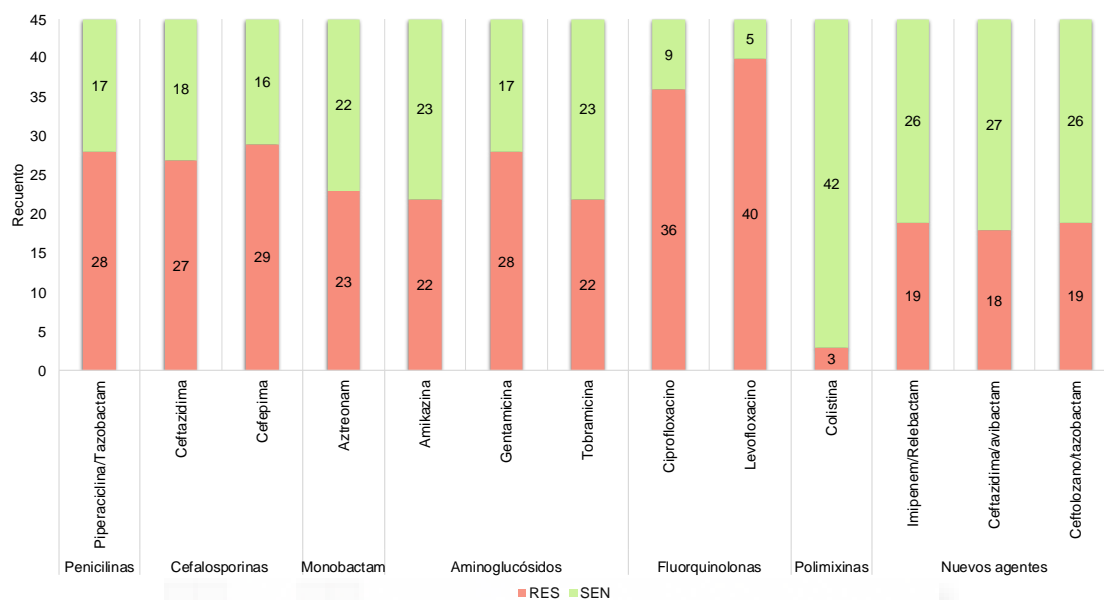


Figura 3. Recuento de la tasa de sensibilidad a los antibióticos comúnmente utilizados para tratar a *Pseudomonas aeruginosa*. Total de muestras n = 45. SEN: sensible, RES: resistente.

También fue testada la sensibilidad de las muestras a los tratamientos más novedosos en el tratamiento de cepas MDR/XDR: ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam. La tasa de susceptibilidad a la ceftazidima/avibactam fue del 60% y para el ceftolozano/tazobactam de 58%. De estos datos también se pudo extraer que 26 muestras (58%) seguían siendo resistentes al imipenem, a pesar de haber sido administradas junto a relebactam.

Adentrándonos en las características moleculares de cada muestra, del estudio mediante el método DLST se obtuvieron los genotipos para cada una de las muestras, denominados según el alelo resultante para ambos locus *ms172* y *m217*.

Las secuencias alélicas de nucleótidos de los dos loci (*ms172* y *ms217*) fueron concatenadas para cada muestra y usadas para crear un árbol filogenético con motivo de observar la formación de clústeres y la similitud entre los distintos perfiles (Figura 4).

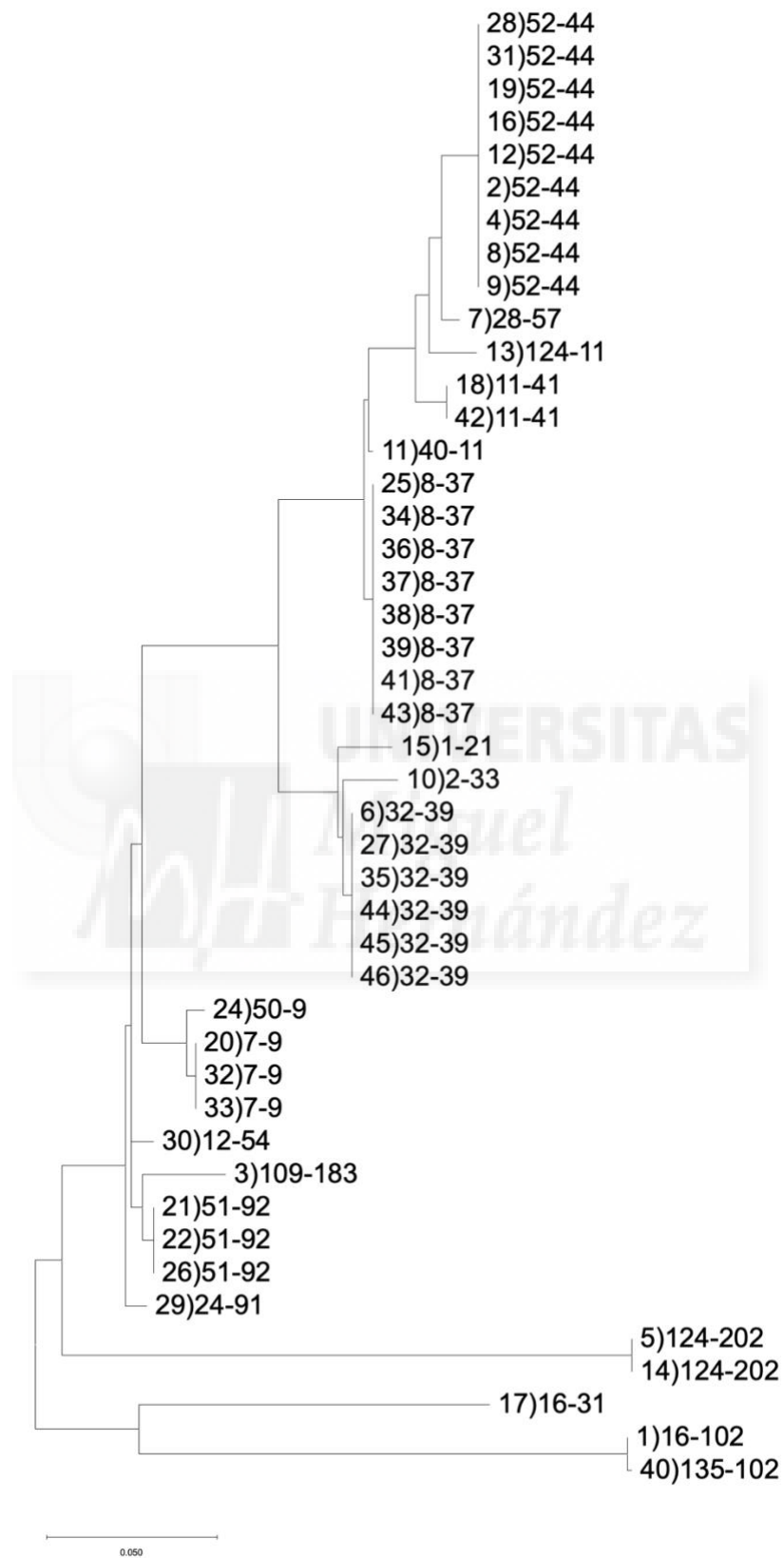


Figura 4. Árbol filogenético de todas las muestras obtenidas construidos a partir del algoritmo *Neighbour-joining tree*.

De las 45 muestras se observó la formación de 7 clústeres de 2 o más muestras (73% de las muestras); y 12 muestras independientes. Si se pone en común la clasificación del perfil de multirresistencia y la formación de clústeres, se observó que entre las muestras XDR la formación de clústeres es más común que entre la población MDR (p -valor = 0.028), lo que implica una menor variabilidad de la población al aumentar las resistencias. Se puede observar gráficamente en la Figura 5.

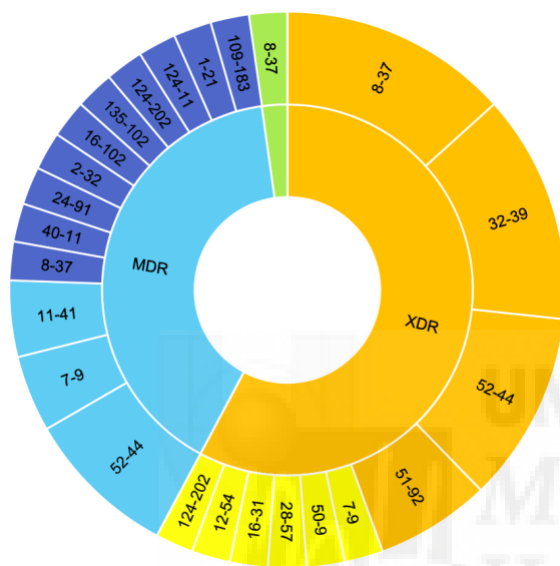


Figura 5. Diagrama de proyección solar en el que se representan los genotipos en relación con su clasificación MDR/XDR/PDR.

De las 45 muestras totales, 13 fueron portadoras de carbapenemasas (28,9% de las muestras). En todas las muestras carbapenemasa-positivas, la carbapenemasa detectada fue la VIM, a excepción de una muestra, que presentaba VIM y la beta-lactamsa de clase D con habilidad de hidrolizar carbapenems OXA-48.

La tasa de resistencia a todos los antibióticos estudiados se realizó dependiendo de si las muestras son carbapenemasa-positiva o carbapenemasa-negativas.

Figura 6.

Para las muestras carbapenemasa-negativo, la tasa de resistencia más alta siguió siendo a las fluorquinolonas, seguidas del aztreonam. La resistencia al resto de beta-lactámicos resultó similar (alrededor del 50%), mientras que, para los nuevos agentes, la tasa de resistencia fue del 25% para el

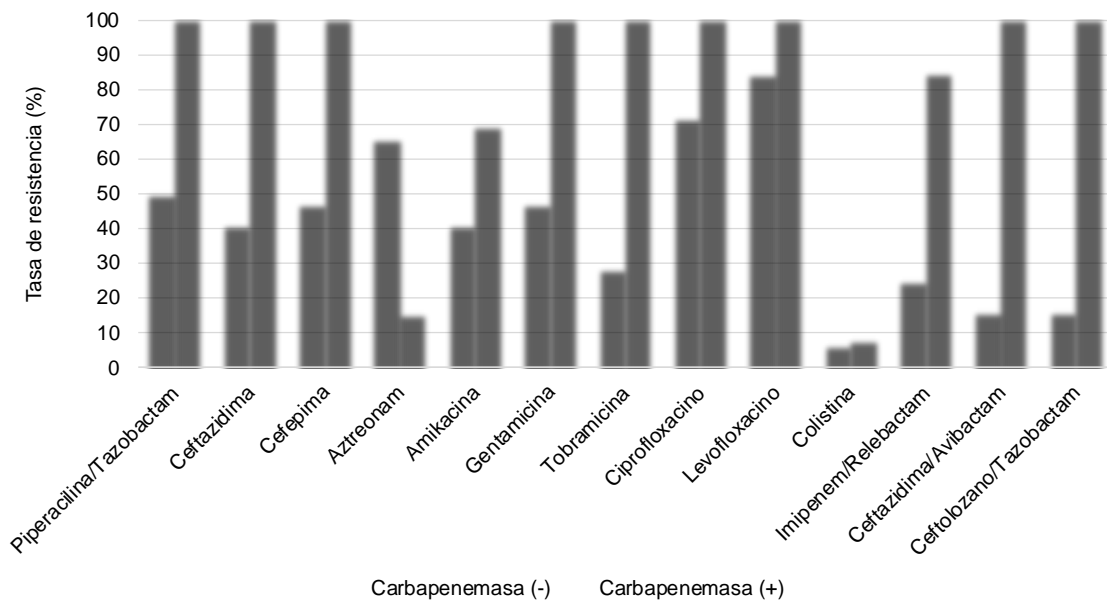


Figura 6. Tasas de susceptibilidad a los antibióticos más utilizados contra *Pseudomonas aeruginosa* expresada en porcentaje. Carbapenemasa (-): ninguna carbapenemasa fue detectada. Carbapenemasa (+): Carbapenemasas tipo VIM y OXA-48.

imipenem/relebactam y del 16% para ceftazidima/avibactam y para ceftolozano/tazobactam. La colistina siguió siendo el agente con mayor tasa de sensibilidad.

Por otro lado, para las muestras carbapenemasa-positiva, se observó una tasa de resistencia del 100% para todos los derivados beta-lactámicos, a excepción del imipenem/relebactam y del aztreonam. La tasa de susceptibilidad al aztreonam fue significativamente mayor cuando existen carbapenemasas (p-valor = 0,010), probablemente debido a que el aztreonam no puede ser hidrolizado por estas, aunque esto no implica que la presencia de carbapenemasas suponga un perfil resistente al aztreonam.

Además, respecto a la gentamicina y la tobramicina, se observó una tasa de resistencia total cuando las muestras presentan carbapenemasas (p-valor <0,001), cuya relación venga de la transmisión contigua de enzimas que modifican aminoglucósidos junto a carbapenemasas tipo VIM en integrones de clase I.

En lo que respecta al imipenem/relebactam, del total de muestras resistentes a imipenem/relebactam, un 82% (n = 11) demostraron la presencia de la carbapenemasa VIM. Por el contrario, de entre las muestras sensibles, en un 82% no se detectó ninguna carbapenemasa. Esto implica que la no presencia de carbapenemasas confiere sensibilidad al imipenem/relebactam (p-valor = 0,001). Una de las muestras resultó poseer ambas carbapenemasas VIM y OXA-48 (**Figura 7**).

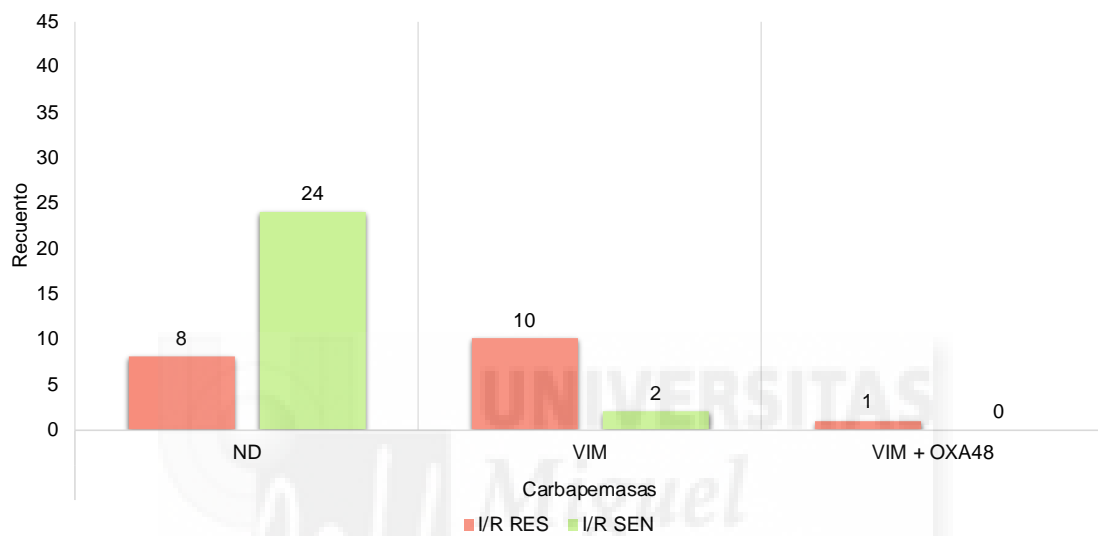


Figura 7. Recuento de carbapenemasas según la resistencia al imipenem/relebactam en el total de muestras (n = 45). I/R: Imipenem/relebactam, RES: resistente, SEN: sensible.

Las muestras que no presentaban carbapenemasas se analizaron con más detalle para comprobar si el efecto del relebactam a la hora de revertir la resistencia al imipenem era estadísticamente significativo. Para ello, se midieron las CMI (concentración mínima inhibitoria) de todas las muestras cuando se administraba imipenem, y por otro lado las CMI cuando se administraba imipenem/relebactam. El resultado fue que la CMI media de las muestras disminuía cuando se les administraba a las muestras imipenem/relebactam, en comparación a cuando solo se administraba imipenem (p-valor <0,0001), por lo tanto, se aumentaba la sensibilidad a este carbapenémico al administrarse en combinación con el relebactam. Esto produce una evidencia clara del efecto inhibitor del relebactam siempre que no existan metalo-beta-lactamasas, observándose que en 25 muestras la resistencia al imipenem se revierte.

En relación a los genotipos encontrados según el DLST, a pesar de no haber realizado el genotipado de las muestras mediante el método MLST, los genotipos 8-37, 32-39 y 52-44 se corresponden, respectivamente, con los genotipos ST235, ST111 y ST175 según el estudio de Cholley *et al.*¹³ en el que se comparan los métodos DLST y MLST (13).

Los 3 clones juntos conformaban el 51% de todas las muestras. Además, correspondían al 65% del total de las muestras XDR y ciertas muestras 52-44 conforman el 28% de las MDR.

Respecto a su espectro de resistencia, ambos 8-37 y 32-39 obtuvieron un perfil similar. Ambos tuvieron tasas de casi el 100% de resistencia a penicilinas, cefalosporinas (incluyendo ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam), aminoglucósidos (excepto a la amikacina, a la que los 32-39 suelen ser sensibles con una tasa de resistencia del 17%), fluorquinolonas y ambos resultaron totalmente sensibles a la colistina. No obstante, dentro del genotipo 52-44, las tasas de resistencia, sobre todo en lo que respecta a derivados de beta-lactámicos (piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam) se redujeron notablemente (**Figura 8**). Esta sensibilidad se apreciaba en tan solo 4 muestras (44% de total), que además son las clasificadas como MDR y no XDR dentro del grupo de las 52-44.

A propósito de la presencia de carbapenemasas, se observó que los genotipos 8-37 y 32-39 acumulan más del 90% de las carbapenemasas detectadas, mientras que dentro del genotipo 52-44, en el 87,5% de las muestras no se detectó ninguna carbapenemasa (p -valor = 0,014). Como se puede observar en la **Figura 9**, del genotipo 8-37 ($n = 8$), 7 muestras eran resistentes a imipenem/relebactam y 1 era susceptible; del genotipo 32-39 ($n = 6$), 4 muestras eran resistentes y 2 eran sensibles a imipenem/relebactam. Del genotipo 52-44 ($n = 9$), 8 muestras eran sensibles, y 1 muestra era resistente. Según estos datos, se observa que los genotipos 8-37 y 32-39 están significativamente relacionados con resistencia a imipenem/relebactam, y el genotipo 52-44 está relacionado susceptible a este fármaco (p -valor = 0,008), reiterando a su vez que la

presencia de carbapenemasas en cepas resistentes a imipenem confiere resistencia al imipenem/relebactam.

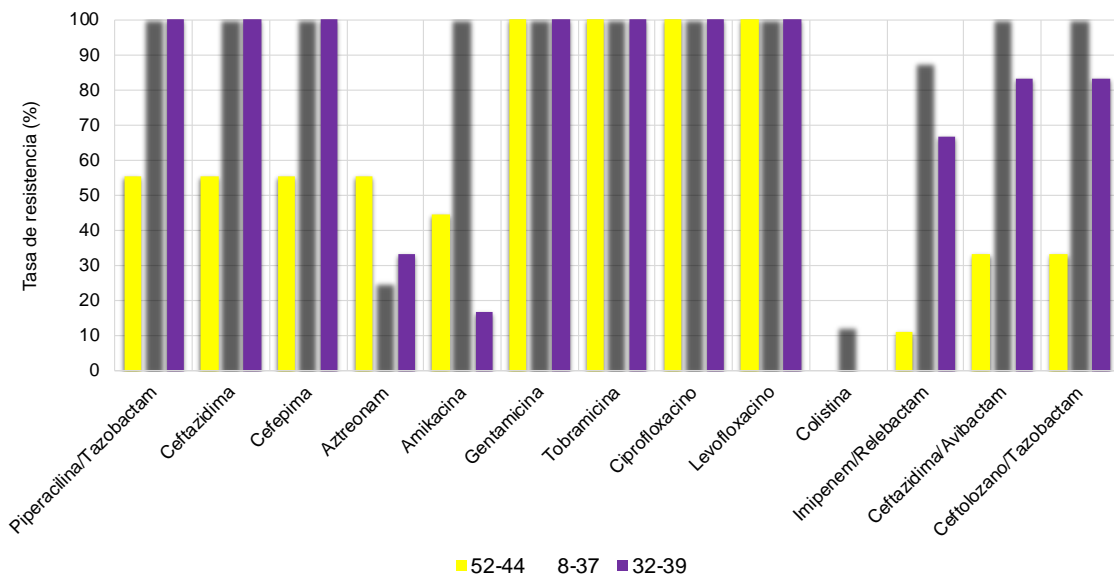


Figura 8. Tasas de resistencia expresadas en porcentaje a los antibióticos más utilizados contra *Pseudomonas aeruginosa* según el genotipo obtenido mediante el método DLST.



Figura 9. Recuento de las muestras resistentes a imipenem/relebactam en relación a la presencia de carbapenemasas y al genotipo obtenido en el método DLST. RES: resistente, SEN: sensible, I/R: imipenem/relebactam.

5 DISCUSIÓN

Los carbapenems son los antibióticos beta-lactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las beta-lactamasas. Por sus cualidades son imprescindibles en el tratamiento empírico, en monoterapia, de numerosas infecciones nosocomiales graves y en la terapéutica dirigida de las producidas por bacterias gram-negativas multirresistentes¹⁷.

La alta tasa de muestras extremadamente multirresistentes probablemente corresponda a que toda nuestra colección de muestras está basada en la resistencia a imipenem (carbapenem). Ya que el imipenem es uno de los antibióticos actuales a los que menor tasa de resistencia se tiene¹⁸, el número de muestras con resistencias conjuntas a otros fármacos es muy grande. De hecho, las infecciones atribuibles a cepas carbapenem-resistentes de bacilos gram-negativos como es *Pseudomonas aeruginosa* se están incrementando de forma global y ya han sido descritas como una amenaza inminente a la salud pública y para las cuales la OMS clasifica como infecciones en las que nuevos antibióticos se necesitan con urgencia⁵ debido a la alta tasa de multirresistencia que conllevan.

Una de las consecuencias principales de la multirresistencia es la dificultad a la hora de seleccionar el tratamiento empírico correcto. Los pacientes con infecciones por cepas MDR o XDR son más susceptibles a recibir un tratamiento inicial inadecuado^{19,20} debido a que, como se puede comprobar en las tasas de resistencia resultantes en nuestro estudio, los antibióticos efectivos contra este tipo de cepas son escasos y de segunda o tercera línea en el ámbito de uso normal.

Una de las posibles soluciones a esta crisis es la puesta en marcha de medidas y movilización de recursos en el control de infecciones y la administración de los antibióticos. Los estudios de epidemiología molecular se han convertido en esenciales para la vigilancia activa de las infecciones y la detección de brotes, sobre todo debido a la compleja ecología de *Pseudomonas aeruginosa*²¹.

El mayor objetivo de la investigación de la epidemiología a nivel local es la identificación de la transmisión de los aislados. Los marcadores usados para

este propósito deben ser estables a lo largo del periodo de la investigación. El DLST ha demostrado ser capaz de producir resultados estables después de meses, para así poder comparar los aislados obtenidos a lo largo de la investigación. Por lo tanto, puede implementarse para estudiar la epidemiología de los aislados con un coste bajo, tanto económico como de trabajo. En este estudio, se implementó con el fin de revelar la diversidad de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes durante un periodo de un año, y ha demostrado ser una herramienta molecular eficaz y confiable a la hora de distinguir y discriminar clústeres de aislados pertenecientes al mismo hospital. Además, es de fácil uso, debido a que no requiere de algoritmos especiales y tediosos de identificación de las secuencias.

Habitualmente los estudios de epidemiología molecular realizados en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* tanto de muestras hospitalarias como de muestras ambientales, presentan una gran diversidad clonal. Sin embargo, varios análisis muestran que esta gran diversidad clonal se obtiene al analizar cepas sensibles a antibióticos, pero no en cepas multirresistentes⁶. Es por ello por lo que *Pseudomonas aeruginosa* es conocida por tener una estructura poblacional panmictica-epidémica, en la que nuevas cepas aparecen constantemente debido a una alta tasa de recombinación, pero en cambio ciertas cepas tienden a ser exitosas y expandirse debido a características únicas que les proporcionan una alta resistencia al medio²². De hecho, un estudio realizado en 2008-2009 en varios centros españoles reveló que la inmensa mayoría de aislados presentaban un genotipo único, pero que la diversidad era mucho menor entre cepas MDR, y especialmente entre las XDR. De hecho, el 90% de las muestras XDR pertenecían a los mismos clones, los considerados de alto riesgo ST235, ST111 y ST175⁵. No obstante, del total de nuestras muestras XDR, estos tres clones suponían el 65%, algo que se corresponde más con el estudio realizado en nueve centros españoles en 2016, en el que los clones de alto riesgo conformaban el 68% de los aislados XDR¹².

La problemática respecto a estos clones de alto riesgo no reside solo en su extensión, sino sobre todo en su tratamiento. Como se ha demostrado, estos clones, en especial los 32-39 (ST111) y 8-37 (ST235) son resistentes a casi todo

el arsenal terapéutico, en especial debido a la presencia de metalo-beta-lactamasas tipo VIM y en menor medida a beta-lactamasas tipo D como la OXA-48, que les proporcionan protección frente a prácticamente todos los beta-lactámicos y para los cuales actualmente no hay ningún tratamiento dirigido porque no existen beta-lactámicos capaces de evadir la hidrólisis de estas beta-lactamasas y ningún inhibidor de beta-lactamasas actualmente comercializado es capaz de frenar su acción¹¹.

Además, como bien se ha demostrado a lo largo de los años²³, los integrones de clase I en los que se suelen encontrar las MBL suelen llevar también genes que codifican enzimas modificantes de aminoglucósidos de tipo acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas, que sobre todo son capaces de inutilizar a la gentamicina y a la tobramicina, y para las que la amikacina es peor sustrato. A pesar de no haber llevado a cabo un estudio molecular de los integrones en nuestras muestras, sí que se ha observado que la presencia de carbapenemasas tipo VIM está relacionada con la resistencia a gentamicina y a tobramicina, pero no a amikacina.

Las polimixinas como la colistina son la única opción terapéutica en algunos de estos casos, como se ha comprobado en nuestro hospital con una tasa de susceptibilidad del 93% entre las muestras XDR. Sin embargo, la dosificación de colistina es un tema controvertido debido a que este antibiótico es un agente relativamente viejo y no se han realizado los estudios farmacocinéticos o de toxicidad convenientes para su comercialización. Gracias a estudios poblacionales actuales, se han establecido la toxicidad y relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas que permiten un uso más seguro, aunque su utilización sigue siendo reducido debido a un margen terapéutico estrecho que cuando se supera causa nefrotoxicidad y neurotoxicidad relacionada directamente con la dosis⁵.

En lo que respecta al genotipo 52-44 (ST175) se ha probado que no suele producir carbapenemasas, por lo que su espectro de resistencia, a pesar de ser uno de los clones de alto riesgo, no se define por este tipo de beta-lactamasas. En un estudio realizado por Cabot G *et al.*²⁴ se descifró que la clave de la

resistencia en el genotipo ST175 es debida a mutaciones, específicamente en el promotor del gen que codifica para AmpC; en genes que codifican porinas tipo OprD, genes que codifican bombas de eflujo tipo MexZ y en 3 regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR).

A pesar de que en la literatura se sitúa al genotipo ST175 como XDR¹², en nuestro estudio un 44% de las muestras 52-44 (ST175) resultaron pertenecer a la clase MDR, debido a que todas presentaban susceptibilidad a los beta-lactámicos utilizados habitualmente en *Pseudomonas aeruginosa*. Estas muestras deberían estudiarse en más detalle.

Debido a la diferencia que existe entre los mecanismos de resistencia entre los clones ST235 y ST111 y los clones ST175, se puede contrastar que el imipenem/relebactam no surta efecto contra los dos primeros, debido a que a pesar de ser un fármaco recién comercializado, el relebactam tiene un espectro de inhibición similar al avibactam²⁵. No obstante, sí que resultó ser efectivo frente a las cepas ST175, debido a su ausencia de carbapenemasas, además de conseguir revertir la resistencia al imipenem en otras 18 muestras no clasificadas como de alto riesgo.

Respecto a las muestras que siguen siendo resistentes al imipenem/relebactam, pero ninguna carbapenemasa es detectada, probablemente su perfil de resistencia consista una mutación inactivante de las porinas OprD que facilitan al imipenem la entrada a la bacteria. Ante este caso, el relebactam no servirá de nada debido a que solo se encarga de inhibir beta-lactamasas.

El ceftozolozano/tazobactam y la ceftazidima/avibactam son tratamientos más novedosos que se reservan para cepas con tasas de resistencia a los beta-lactámicos altas o en caso de cepas MDR/XDR⁷. Entre nuestras muestras se ha observado una resistencia más baja que al resto de antibióticos usados. El uso de ceftolozano está contraindicado en cepas productoras de metalo-beta-lactamasas, aunque no la ceftazidima/avibactam. A pesar de esta recomendación, entre nuestras muestras productoras de carbapenemasas, se presentaba una tasa de resistencia total a la ceftazidima/avibactam. No obstante,

esta se suele asociar a aztreonam y colistina y aminoglucósidos, por lo que no se descarta un efecto sinérgico *in vivo*²⁶.

El siguiente paso en este estudio y en futuros sería la asociación de cada genotipo específico con cada paciente y sus características clínicas e historial de estancia en el hospital: en qué unidades hospitalarias fue tratado, contacto con otros pacientes, y qué antibióticos se han utilizado previamente. Una inspección rutinaria de las áreas cuya presencia de *Pseudomonas aeruginosa* es muy probable (UCIs, servicio de neumología, unidad de enfermedades infecciosas) debería asociarse en este método de vigilancia, ya que este patógeno crece de forma universal en ambientes húmedos como son las pilas, los baños, los grifos e incluso en instrumental médico como equipos de diálisis, sondas, catéteres o sistemas de ventilación mecánica debido a su capacidad de formar biofilms²⁷, además de poder formar parte de la flora endógena del paciente.

Por ende, ante la detección de un brote potencial cuyos genotipos sean iguales, se deben tener en cuenta los lugares donde el reservorio del patógeno podría estar, sobre todo en el caso de los clones de alto riesgo y determinar si la infección ha surgido del propio paciente por la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en su propia flora, por una transmisión paciente-paciente o por una transmisión cruzada en un medio contaminado. El establecimiento de esta causalidad solo es posible mediante métodos de genotipado molecular²⁸.

Por último, cabe destacar que a pesar de que el DLST es un método fácil y barato a la hora de establecer una población nosocomial de *Pseudomonas aeruginosa*, el desarrollo actual del *Whole Genome Sequencing* (WGS) o secuenciación del genoma completo ha terminado con las dificultades en el área de la epidemiología molecular²⁹. Aunque esta técnica es mucho más cara y necesita de una pericia bioinformática muy superior, permite el análisis en profundidad de cada muestra²⁷. Las muestras de nuestro estudio que necesitan de un mayor análisis serán sometidas a esta técnica y se podrá conocer en amplitud sus características. No obstante, para una tarea de vigilancia estándar, el método de DLST sigue siendo más que suficiente.

6 CONCLUSIONES

- La resistencia a carbapenems y con ello la aparición de cepas MDR y XDR está en alza y actualmente ya supone un problema de salud debido a la limitación en el tratamiento de estas cepas. Entre estas cepas es recurrente la aparición de los denominados clones de alto riesgo ST235, ST175 y ST111, los cuales ya se encuentran de forma endémica en el Hospital General Universitario de Alicante.
- El método DLST permite una identificación rápida y sencilla de muestras de *Pseudomonas aeruginosa* y permite la identificación de clusters pertenecientes al mismo genotipo, entre ellos los clones de alto riesgo ST235, ST111 y ST175 que se corresponden con los genotipos 32-39, 8-37 y 52-44, respectivamente.
- Entre las muestras resistentes a carbapenems se ha detectado la presencia de beta-lactamasas tipo B o también llamadas metalo-beta-lactamasas o carbapenemasas, específicamente en los genotipos 32-39 y 8-37.
- El imipenem-relebactam es capaz de revertir la resistencia al imipenem, siempre y cuando la cepa no sea productora de metalo-beta-lactamasas.
- Las infecciones por cepas productoras del metalo-beta-lactamasas suponen un problema debido a que su rango de resistencia cubre casi el total del arsenal terapéutico actual contra *Pseudomonas aeruginosa*.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019 May;44:100640. doi: 10.1016/j.drug.2019.07.002. Epub 2019 Jul 19. Review. PubMed PMID: 31492517.
2. Oliver A. Epidemiología y mecanismos de resistencia a carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*: papel de los clones de alto riesgo en la multirresistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017.

3. Estudio EPINE-EPPS nº30:2019. Prevalencia de infecciones (relacionadas con la asistencia sanitaria y comunitarias) y uso de antimicrobianos en hospitales de agudos).
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268-81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
5. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, *et al.* 2019. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* 32:e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>.
6. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015 Jul-Aug;21-22:41-59. doi: 10.1016/j.drup.2015.08.002. Epub 2015 Aug 10. Review. PubMed PMID: 26304792.
7. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context.* 2018 May 29;7:212527. doi: 10.7573/dic.212527. eCollection 2018.
8. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jun;45(6):568-85. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001. Epub 2015 Mar 24. Review. PubMed PMID:25857949.
9. Mensa J, Barberán J, Soriano A, *et al.* Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter.* 2018 Feb;31(1):78-100. Epub 2018 Feb 23. Review. PubMed PMID: 29480677
10. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/recarbrio-epar-medicine-overview_en.pdf
11. Lob SH, Karlowsky JA, Young K, Motyl MR, Hawser S, Kothari ND, Sahn DF. *In vitro* activity of imipenem-relebactam against resistant phenotypes

- of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from intraabdominal and urinary tract infection samples - SMART Surveillance Europe 2015-2017. *J Med Microbiol.* 2020 Feb;69(2):207-217. doi: 10.1099/jmm.0.001142. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31976856.
12. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, et al. Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain [published correction appears in *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Dec 21;62(1):]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):e01589-17. Published 2017 Oct 24. doi:10.1128/AAC.01589-17
 13. Cholley P, Stojanov M, Hocquet D, Thouverez M, Bertrand X, Blanc DS. Comparison of double-locus sequence typing (DLST) and multilocus sequence typing (MLST) for the investigation of *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Aug;82(4):274-7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.027.
 14. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5644-5649. doi:10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004
 15. Basset P, Blanc DS. Fast and simple epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* using the double-locus sequence typing (DLST) method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Jun;33(6):927-32. doi: 10.1007/s10096-013-2028-0.
 16. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
 17. Fresnadillo Martínez M, García García M, García Sánchez E, García Sánchez J. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(Supl 2):53-64. DOI: 10.1016/S0213-005X(10)70031-8
 18. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.

19. Paterson DL, Rice LB. 2003. Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: are minimization of selection of resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive?. *Clin Infect Dis* 36:1006–1012. <https://doi.org/10.1086/374243>
20. Guillaumet CV, Vazquez R, Noe J, Micek ST, Kollef MH. 2016. A cohort study of bacteremic pneumonia. *Medicine (Baltimore, MD)* 95:e4708. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004708>
21. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol.* (2004) 4:193–7. doi: 10.1016/j.meegid.2004.01.010
22. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE.* (2009) 4:e7740. doi: 10.1371/journal.pone.0007740
23. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla(VIM-2) carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(2):546–52. DOI: dx.doi.org/10.1128/AAC.45.2.546-552.2001
24. Cabot G, López-Causapé C, Ocampo-Sosa AA, Sommer LM, Domínguez MÁ, Zamorano L, et al. 2016. Deciphering the resistome of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 60:7415–7423. <https://doi.org/10.1128/AAC.01720-16>.
25. Horner C, Mushtaq S, Livermore DM; BSAC Resistance Surveillance Standing Committee. Potentiation of imipenem by relebactam for *Pseudomonas aeruginosa* from bacteraemia and respiratory infections. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7):1940-1944. doi:10.1093/jac/dkz133
26. Davido B, Fellous L, Lawrence C, Maxime V, Rottman M, Dinh A. Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam, an Interesting Strategy To Overcome β -Lactam Resistance Conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2017;61(9):e01008-17. Published 2017 Aug 24.
doi:10.1128/AAC.01008-17
27. Magalhães B, Valot B, Abdelbary MMH, Prod'hom G, Greub G, Senn L and Blanc DS (2020) Combining Standard Molecular Typing and Whole Genome Sequencing to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology in Intensive Care Units. *Front. Public Health* 8:3. doi: 10.3389/fpubh.2020.00003
28. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol.* 2004;4(3):193-197. doi:10.1016/j.meegid.2004.01.010
29. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* (2014) 52:1501–10. doi: 10.1128/JCM.03617-13

