



Diciembre 2021

VIGILANCIA MOLECULAR DE
Klebsiella pneumoniae, *Enterobacter
cloacae* complex y *Escherichia coli*
PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS
EN ESPAÑA
INFORME ANUAL RedLabRA 2021



PRAN

RedlabRA

Red de Laboratorios para la Vigilancia
de Microorganismos Resistentes



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto de Salud Carlos III



MINISTERIO
DE SANIDAD



agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios

Centro Nacional de Microbiología (CNM)
Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Ciencia e Innovación

Monforte de Lemos, 5 – Pabellón 12

28029 MADRID (ESPAÑA)

Tel.: 91 822 24 97

Fax: 91 387 78 16

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<https://cpage.mpr.gob.es/>

Para obtener este informe de forma gratuita en Internet:

<https://publicaciones.isciii.es/>

Publicación incluida en el programa editorial del Ministerio de Ciencia e Innovación.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>.

Edita: Instituto de Salud Carlos III

Ministerio de Ciencia e Innovación

Diseño y maquetación: Editorial MIC

N.I.P.O. pdf: xxxxxxxxx

N.I.P.O. e-pub: xxxxxxxxx

I.S.B.N.: No (Free online version)

Editores:

XXXXXXX

XXXXXXX

Cita sugerida:

Lorem Ipsum is simply dummy text of the printing and typesetting industry. Lorem Ipsum has been the industry's standard dummy text ever since the 1500s.

Índice

Antecedentes y objetivos	5
Protocolo de trabajo de RedLabRA	7
Ajustes del protocolo de trabajo para optimización de la vigilancia	9
Secuenciación y análisis	11
Resultados	12
Casos totales registrados en 2021	12
Cepas secuenciadas	14
Análisis por secuenciación de genomas completos de cepas representativas a nivel nacional.....	14
Acciones inmediatas de mejora	24
Conclusiones	25
Bibliografía	26

Antecedentes y objetivos

La resistencia a antimicrobianos (RA) es un problema de salud dinámico y rápidamente evolutivo que limita de manera importante las alternativas terapéuticas de las enfermedades infecciosas. Los microorganismos patógenos portadores de mecanismos de resistencia generan un gran impacto sobre la salud individual de los pacientes y sobre la salud pública.

La implementación de medidas para su control es imprescindible, pero, para que ésta sea eficaz y rentable, debe ser guiada por el conocimiento previo del problema, un conocimiento lo más actualizado, real y completo posible. Para ello, es necesario estructurar sistemas de vigilancia de la RA holísticos, integradores y de alta calidad que permitan el análisis precoz de datos conjuntos (microbiológicos, clínicos y epidemiológicos) procedentes de diferentes fuentes que guíen la toma de decisiones para el control de la RA.

En el seno del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) y en el marco de la vigilancia de las IRAS y las resistencias en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), se reconoció la necesidad de implementar una red nacional de laboratorios para la vigilancia de microorganismos resistentes, con capacidad para abordar la caracterización molecular de los patógenos responsables de los principales problemas de resistencia a antimicrobianos.

Un grupo de trabajo multidisciplinar del PRAN, formado por más de 50 profesionales, elaboró el documento “Red de laboratorios para la vigilancia de los microorganismos resistentes” (1) que se aprobó por la Comisión de Salud Pública y el Consejo Interterritorial en noviembre de 2018. Las recomendaciones plasmadas en este documento abogan por la integración de la secuenciación genómica en la vigilancia de los patógenos multirresistentes, alineándose con el Marco Estratégico que ha desarrollado el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sobre este tema (2).

El documento (1) recoge como objetivos específicos de la Red:

- Obtener un diagnóstico microbiológico completo y de calidad en todos los casos de infección y/o colonización por microorganismos resistentes objeto de vigilancia.
- Asegurar que la información microbiológica se incluye en la notificación de casos de acuerdo a los protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- Estandarizar los procedimientos de detección y caracterización de los mecanismos de resistencia.
- Establecer los mecanismos de intercambio de información entre los laboratorios de la red según las prioridades que se establezcan.

La implantación de esta Red, potenciadora de la conexión entre los laboratorios, permitirá un conocimiento detallado y precoz, a nivel molecular, de los clones y de los mecanismos causantes de este fenómeno, de sus tendencias evolutivas y de su dinámica de dispersión regional e interregional, clave para poder abordar las iniciativas dirigidas a su control con probabilidades de éxito.

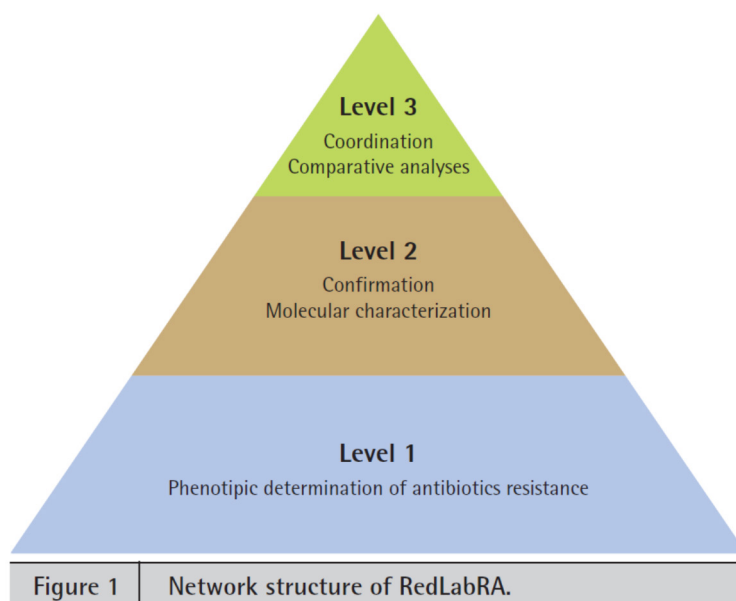
El documento establece también la estructura de la Red, con la organización de los laboratorios de microbiología en diferentes niveles (1,3) (Figura 1).

El 12 de diciembre de 2019 se constituyó el Comité Coordinador de la Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes (RedLabRA) que a continuación comenzó a trabajar en la creación de la estructura, el establecimiento de prioridades y la elaboración de protocolos.

Posteriormente, en enero de 2020 se acordó también de forma conjunta desde el PRAN y la RENAVE la propuesta de *Vigilancia Nacional de la Resistencia a los Antimicrobianos*, que fue aprobada por el Consejo Interterritorial del SNS en 2021, y donde la RedLabRA y su Comité Coordinador tiene un papel fundamental para garantizar la calidad y oportunidad de esta vigilancia.

Sin embargo, la pandemia por COVID-19 tuvo un gran impacto sobre la puesta en marcha de RedLabRA que quedó interrumpida hasta enero de 2021, cuando el Comité Coordinador estableció como prioridad inaplazable dar comienzo al funcionamiento de la Red con un consenso de mínimos, con el objetivo de ir dando forma y fortalecer la estructura y los flujos de trabajo. En este sentido, se acordó comenzar con la vigilancia de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex y *Escherichia coli* productores de carbapenemasas (Kpn-PC, Eclo-PC y Eco-PC, respectivamente).

Figura 1. Estructura de RedLabRA (extraída de Cañada-García JE, et al. 2021).



Protocolo de trabajo de RedLabRA

El diseño de RedLabRA establece la organización de los laboratorios de microbiología clínica en tres niveles:

– **Los laboratorios de Nivel 1 (LN1)** son todos los laboratorios de microbiología clínica, que tienen que disponer, al menos, de la capacidad de detectar fenotípicamente el problema de resistencia sometido a vigilancia. En 2021, los LN1 establecieron la sospecha de producción de carbapenemasas según los siguientes criterios:

- Detección de cepas que presenten una CMI > 0,12 mg/L de meropenem (o halo de inhibición <25 mm; o de 25-27 mm si además son resistentes a temocilina y/o piperacilina/tazobactam) (criterios EUCAST, disponibles en http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).
- En caso de no disponer de meropenem, como alternativa, detección de cepas que presenten una CMI > 0,12 mg/L de ertapenem (o halo de inhibición < 25 mm). Método de detección de alta sensibilidad, pero baja especificidad. La especificidad aumenta si además es resistente a temocilina y/o piperacilina- tazobactam.
- En esas cepas, confirmación fenotípica de la producción de carbapenemasas por al menos, uno de los siguientes métodos: pruebas bioquímicas colorimétricas, combinación de discos con inhibidores, inmunocromatografía o método de la inactivación por carbapenem (CIM-test) (recomendaciones EUCAST).

El protocolo (1) establece que los LN1 deben coordinarse con los Laboratorios de Nivel 2 (LN2) designados específicamente por las comunidades autónomas (CC. AA.) para su participación en RedLabRA (Tabla 1). Los LN1 envían las cepas productoras de carbapenemasas para su confirmación molecular a los LN2 de su C. A.

– **Los LN2** designados por las CC. AA. caracterizan las cepas a nivel molecular estableciendo, al menos, el tipo de carbapenemasa por secuenciación completa del gen y el secuenciotipo (ST) mediante MLST. Esta información se transmite tanto al LN1 como los Departamentos de Salud Pública de sus correspondientes CC. AA.

Los LN2 envían una cepa, o secuencia de genoma completo, representativa de cada hospital por especie, secuenciotipo, y tipo de carbapenemasa al Centro Nacional de Microbiología (CNM) que actúa como Laboratorio de Nivel 3 (LN3).

– **El LN3** realiza la caracterización conjunta mediante secuenciación genómica completa de todas las cepas representativas a nivel nacional. Además, se encarga de la coordinación y asesoría de la Red, así como de suplir la actividad del LN2 en aquellos casos en los que no está disponible. Los procedimientos de la RedLabRA (envío de aislados, tipificación mediante MLST y detección de la producción de carbapenemasas mediante métodos fenotípicos o mediante amplificación de genes de carbapenemasas) se pueden descargar en la página web del ISCIII (<https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/DiagnosticoMicrobiol%c3%b3gicoyProgramasVigilancia/Paginas/Documentacion-RedLabRA.aspx>).

Tabla 1. Laboratorios de Nivel 2 designados por las CC. AA. para su participación en RedLabRA.

CC. AA.	Laboratorios de Nivel 2
Andalucía	Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla).
Aragón	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza); Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza).
Principado de Asturias	Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo).
Islas Baleares	Hospital Universitario Son Espases (Mallorca).
Islas Canarias	Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (Tenerife).
Cantabria	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander).
Castilla y León	Complejo Asistencial Universitario de Burgos (Burgos); Hospital Universitario Río Hortega (Valladolid).
Castilla-La Mancha	No designado.
Cataluña	No designado.
Comunidad Valenciana	Hospital General Universitario de Elche (Alicante); Hospital General Universitario de Alicante (Alicante); Hospital General Universitario de Castellón (Castellón de La Plana); Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia); Hospital General Universitario de Valencia (Valencia); Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia); Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia).
Extremadura	No designado.
Galicia	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (A Coruña); Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (A Coruña); Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (Pontevedra).
Comunidad de Madrid	Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid); Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid); Hospital Universitario La Paz (Madrid); Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid); Hospital Universitario de La Princesa (Madrid); Hospital Universitario Clínico San Carlos (Madrid); Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid); Laboratorio Regional de Salud Pública de Madrid.
Región de Murcia	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).
Comunidad Foral de Navarra	Complejo Hospitalario de Navarra (Pamplona).
País Vasco	Hospital Universitario Donostia (Guipuzcoa); Hospital Universitario de Basurto (Vizcaya); Hospital Universitario de Araba (Álava).
La Rioja	Departamento de Diagnóstico Biomédico (Logroño).

Ajustes del protocolo de trabajo para optimización de la vigilancia

El funcionamiento de la estructura de RedLabRA en 2021 estuvo condicionado por una serie de factores que llevaron a diferentes grados de implementación por CC. AA. Algunos de estos factores fueron: la falta de capacidades (técnicas y/o de recursos) para implementar la secuenciación en algunos LN2, la dificultad de crear subredes autónomas de LN1 coordinadas por los LN2, la ausencia de designación de LN2 por parte de algunas CC. AA., la dificultad de coordinación entre los LN2 en algunas CC. AA. con varios laboratorios designados como tales, y el hecho de que algunos de los LN2 designados no se sintieron concernidos. Algunos de los problemas detectados por CC. AA. se recogen en la [Tabla 2](#).

Con el objetivo de paliar, al menos parcialmente, algunos de estos problemas detectados en la vigilancia de RedLabRA en 2021 se incluyeron algunas acciones correctivas como fueron:

- Incluir cepas enviadas al Programa de Vigilancia del CNM que no estuvieran recogidas por la estructura de RedLabRA y que cumplieran criterios establecidos por el protocolo.
- Proceder a la caracterización molecular en el CNM de cepas seleccionadas por los LN2 en base a criterios solo fenotípicos.
- Actuación del CNM como LN2 en aquellas CC. AA. sin designación de LN2.

Estas acciones llevaron a la realización de la secuenciación genómica en el LN3 de un mayor número de cepas de las que hubiera correspondido, y que fueron posteriormente filtradas para el análisis final en el que se incluyó solo un representante por hospital, especie, ST y tipo de carbapenemasa, como el protocolo establece.

Tabla 2. Condicionantes que dificultan la implementación de RedLabRA por comunidad autónoma.

CC.AA.	Funcionamiento estructura RedLabRA
Andalucía	Según protocolo establecido.
Aragón	Solo uno de los dos LN2 actúa como laboratorio centinela. Faltan capacidades de secuenciación*.
Principado de Asturias	Faltan capacidades de secuenciación en LN2. LN2 actúa como laboratorio centinela.
Islas Baleares	Según protocolo establecido.
Islas Canarias	Según protocolo establecido.
Cantabria	Según protocolo establecido.
Castilla y León	Faltan capacidades de secuenciación en LN2.
Castilla-La Mancha	LN2 no designado.
Cataluña	LN2 no designado.
Comunidad Valenciana	Varios LN2 designados, situaciones desiguales en cada uno de ellos. Falta de coordinación entre LN2 y con LN1.
Extremadura	LN2 no designado.
Galicia	Solo uno de los 3 LN2 participa, y sólo como laboratorio centinela.
Comunidad de Madrid	Varios LN2 designados, situaciones desiguales en cada uno de ellos. Falta de coordinación entre LN2 y con LN1.
Región de Murcia	Faltan capacidades de secuenciación en LN2. LN2 actúa como laboratorio centinela.
Comunidad Foral de Navarra	Según protocolo establecido.
País Vasco	Faltan capacidades de secuenciación en LN2. Dos LN2 actúan como laboratorios centinelas.
La Rioja	Contacto entre LN2 y coordinación de la Red no establecido.

*La ausencia de capacidades de secuenciación a lo largo de la Tabla hace referencia a capacidades técnicas y/o de recursos.

Secuenciación y análisis

El CNM realizó la secuenciación genómica completa mediante la plataforma Illumina. Se realizó el análisis bioinformático conjunto de las secuencias enviadas por los LN2 y de las secuencias obtenidas en el CNM como LN3.

Se analizó la calidad de las lecturas crudas con FASTQC y se trimaron con Trimmomatic (4). Los ensamblados se generaron utilizando Unicycler 0.4.8 (5) y se analizó su calidad mediante QUAST (<http://quast.bioinf.spbau.ru/>). Se confirmó la especie bacteriana mediante el análisis de similitud frente a genomas de referencia con Mash v2.3 (6) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/prokaryotes/>).

Se aplicaron los esquemas de MLST del Instituto Pasteur (Kpn, Eclo y Eco) y Universidad de Warwick (Eco) para determinar los secuenciotipos (STs) mediante el programa Ariba versión 2.6.2 (7).

Se utilizó el programa Ridom SeqSphere+3.5.0 para la generación de árboles de expansión mínima basados en cgMLST, en el que se indicaron las distancias genéticas pareadas generadas con MegaX v10.0.5 (8). Para Kpn-PC y Eco-PC se utilizaron esquemas de cgMLST de 2.358 y 2.513 genes, respectivamente, disponibles en Ridom SeqSphere (<https://www.cgmlst.org/ncs>). Para Eclo-PC en general, *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter rogenkampii* se utilizaron esquemas de 631, 2.123 y 2.466 genes, respectivamente, que fueron diseñados en el CNM (9).

El análisis del resistoma se realizó utilizando Ariba versión 2.6.2 (7) frente a la base de datos ResFinder (versión 24-05-2022) (10), estableciendo porcentajes de identidad del 100% para carbapenemasas y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los K-locus y genes de virulencia para *K. pneumoniae* se determinaron mediante Kleborate (11).

Los resultados globales de las cepas representativas, tabulados por especie, secuenciotipo, tipo de carbapenemasa, β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), comunidad autónoma, hospital de aislamiento y tipo de muestra, están disponibles en los enlaces al programa interactivo de libre uso Microreact (<https://microreact.org/>) incluidos en el texto. Esta aplicación permite la representación geográfica de los casos detectados en la vigilancia de RedLabRA 2021.

Resultados

Casos totales registrados en 2021

Durante 2021 se recogió información básica de los casos de infecciones o colonizaciones producidas por Kpn-PC, Eclo-PC y Eco-PC. Según protocolo, esta información se genera por los LN1 y LN2, y se tabula por los LN2 quienes la envían al CNM que actúa como LN3 para su análisis conjunto. Excepcionalmente, y hasta la puesta a punto de la estructura en todas las CC. AA., se incluyeron también aquellos casos cuyas cepas se enviaron al Programa de Vigilancia de Resistencia a Antibióticos del CNM para su caracterización, y que no estaban recogidos en el flujo de información establecido por RedLabRA. Sólo se consideró el primer aislado por especie, tipo de carbapenemasa y paciente.

En total se comunicaron 2304 casos de infección/colonización por los patógenos vigilados: 1.844 (80%) Kpn-PC, 333 (14,5%) Eclo-PC y 127 (5,5%) Eco-PC. El 70,7% de los casos (1.630) fueron comunicados por LN2 (casos propios o recogidos de los LN1 de su CA), el resto fueron casos comunicados directamente al CNM.

Entre los 2.281 casos en los que se comunicó la muestra de aislamiento, 858 (37,2%) fueron de orina y 290 (12,7%) fueron de líquidos estériles (265 de sangre); 640 (28,1%) se aislaron de exudados rectales o heces. Los aislados procedentes de líquidos estériles fueron 235 (81%) Kpn-PC, 43 (14,8%) Eclo-PC y 12 (4,1%) Eco-PC.

Los tipos de carbapenemasas detectados en Kpn-PC fueron 1.299 (70,4%) OXA-48-like, 198 (10,7%) KPC, 192 (10,4%) NDM, 136 (7,4%) VIM y una (0,05%) IMP; además 18 (1%) aislados produjeron doble carbapenemasa, 7 (0,4%) OXA-48 like+NDM, 5 (0,3%) KPC+VIM, 4 (0,2%) OXA-48-like+VIM, una (0,05%) NDM+VIM, y una (0,05%) OXA-48-like+KPC.

Los tipos de carbapenemasas detectados en Eclo-PC fueron 140 (42%) OXA-48-like, 137 (41,1%) VIM, 8 (2,4%) KPC, 8 (2,4%) IMP, 8 (2,4%) GES y 7 (2,1%) NDM; además 15 aislados produjeron doble carbapenemasa, 9 (2,7%) OXA-48 like+VIM, 4 (1,2%) VIM+NDM, una (0,3%) OXA-48-like+GES, y una (0,3%) OXA-48-like+IMP.

Los tipos de carbapenemasas detectados en Eco-PC fueron 91 (71,7%) OXA-48-like, 25 (19,7%) VIM, 6 (4,7%) NDM y 5 (3,9%) KPC.

Los aislados procedentes de líquidos estériles produjeron principalmente las carbapenemasas OXA-48-like (191; 65,9%), VIM (39; 13,4%), NDM (38; 13,1%) y KPC (17, 5,9%).

Durante 2021 se registraron casos de todas las CC. AA. excepto de La Rioja. Las CC. AA. de Castilla y León, Madrid, Islas Canarias y Andalucía fueron las que presentaron un mayor número de casos registrados con 531, 505, 301 y 267 respectivamente.

La distribución de los casos registrados según C. A., especie y tipo de carbapenemasa se refleja en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Distribución de los casos de infección o colonización de *Klebsiella pneumoniae* (Kpn-PC), *Enterobacter cloacae* complex (Eclo-PC) y *Escherichia coli* (Eco-PC) productores de carbapenemasas registrados por RedLabRA en 2021, según comunidad autónoma, especie y tipo de carbapenemasa.

CC. AA.	Kpn-PC	Eclo-PC	Eco-PC
Andalucía (267)	157 (98 OXA-48-like; 28 KPC; 28 VIM; 2 NDM; 1 OXA-48-like+VIM)	87 (56 OXA-48-like; 17 VIM; 6 IMP; 6 OXA-48-like+VIM; 1 KPC; 1 NDM)	23 (18 OXA-48-like; 3 VIM; 1 NDM; 1 KPC)
Aragón (8)	5 (4 OXA-48-like; 1 VIM)	3 (2 VIM; 1 OXA-48-like)	0
Principado de Asturias (13)	12 (11 OXA-48-like; 1 NDM)	1 (OXA-48-like)	0
Islas Baleares (70)	26 (23 VIM; 2 OXA-48-like; 1 NDM)	39 (VIM)	5 (4 VIM; 1 OXA-48-like)
Islas Canarias (301)	286 (163 OXA-48-like; 112 NDM; 4 OXA-48-like+NDM; 3 OXA-48-like+VIM; 2 VIM; 1 VIM+NDM; 1 KPC)	14 (8 OXA-48-like; 3 VIM+NDM; 2 OXA-48-like+VIM; 1 OXA-48-like+GES)	1 (OXA-48-like)
Cantabria (144)	124 (123 OXA-48-like; 1 KPC)	11 (8 GES; 1 OXA-48-like; 1 OXA-48-like+IMP; 1 IMP)	9 (OXA-48-like)
Castilla y León (531)	489 (427 OXA-48-like; 51 KPC; 10 VIM; 1 NDM)	19 (12 VIM; 7 OXA-48-like)	23 (13 OXA-48-like; 10 VIM)
Castilla-La Mancha (80)	73 (40 KPC; 25 OXA-48-like; 6 VIM; 1 KPC+VIM; 1 OXA-48-like+NDM)	6 (3 VIM; 2 OXA-48-like; 1 NDM)	1 (KPC)
Cataluña (133)	76 (64 OXA-48-like; 6 NDM; 4 VIM; 2 KPC)	45 (37 VIM; 6 OXA-48-like; 1 NDM; 1 OXA-48-like+VIM)	12 (6 OXA-48-like; 3 NDM; 2 VIM; 1 KPC)
Comunidad Valenciana (24)	19 (15 OXA-48-like; 3 NDM; 1 KPC)	4 (3 VIM; 1 NDM)	1 (OXA-48-like)
Extremadura (64)	58 (36 OXA-48-like; 12 VIM; 8 KPC; 1 OXA-48-like+KPC; 1 IMP)	2 (1 KPC; 1 VIM)	4 (OXA-48-like)
Galicia (94)	85 (49 NDM; 33 OXA-48-like; 3 VIM)	9 (5 VIM; 3 KPC; 1 OXA-48-like)	0
Comunidad de Madrid (505)	391 (280 OXA-48-like; 52 KPC; 46 VIM; 7 NDM; 4 KPC+VIM; 1 OXA-48-like+VIM; 1 OXA-48-like+NDM)	73 (51 OXA-48-like; 18 VIM; 2 KPC; 1 IMP; 1 NDM)	41 (33 OXA-48-like; 6 VIM; 2 KPC)
Región de Murcia (28)	22 (12 KPC; 5 OXA-48-like; 4 NDM; 1 VIM)	3 (1 NDM; 1 VIM+NDM; 1 OXA-48-like)	3 (3 OXA-48-like)
Comunidad Foral de Navarra (3)	3 (2 KPC; 1 OXA-48-like)	0	0
País Vasco (39)	18 (12 OXA-48-like; 6 NDM)	17 (11 NDM; 5 OXA-48-like; 1 KPC)	4 (2 OXA-48-like; 2 NDM)
La Rioja	NR	NR	NR

NR: No registrados.

Cepas secuenciadas

El protocolo de RedLabRA establece incluir en el análisis por secuenciación genómica completa solo una cepa representativa de cada hospital, ST y tipo de carbapenemasa.

Las peculiaridades mencionadas con anterioridad condicionaron que en 2021 se dispusieran de 674 secuencias completas procedentes de diferentes orígenes:

- Secuencias representativas seleccionadas según protocolo enviadas al CNM por LN2: **119 secuencias.**
- Cepas seleccionadas por criterios fenotípicos/epidemiológicos por los LN2 para su secuenciación en el CNM: **259 cepas.**
- Cepas seleccionadas por criterios fenotípicos/epidemiológicos recibidas en el Programa de Vigilancia del CNM y no recogidas por la estructura de RedLabRA, y/o procedentes de hospitales de CC. AA. sin LN2 designado: **296 cepas.**

La selección basada en criterios fenotípicos/epidemiológicos presenta el riesgo de perder algún ST. Para minimizarlo, se aplicaron criterios de selección amplios con los que se aumentó la posibilidad de incluir más de una cepa de cada ST por hospital y tipo de carbapenemasa. Este hecho se corrigió posteriormente excluyendo los duplicados, por lo que se pudo realizar un análisis riguroso de la diseminación de clones a nivel nacional (ver el siguiente apartado *Análisis por secuenciación de genomas completos de cepas representativas a nivel nacional*).

Las 674 secuencias disponibles correspondieron a 480 Kpn-PC, 129 Eclo-PC y 65 Eco-PC. Los resultados obtenidos del análisis filogenético se utilizaron para la selección de un solo representante por ST, hospital y tipo de carbapenemasa, quedando para el análisis definitivo 394 aislados únicos: 238 Kpn, 94 Eclo y 62 Eco.

Análisis por secuenciación de genomas completos de cepas representativas a nivel nacional

Este apartado refleja los resultados obtenidos en uno de los principales objetivos establecidos por RedLabRA, que es el análisis por secuenciación de genomas completos de la diseminación interhospitalaria e interregional de los clones de Kpn-PC, Eclo-PC y Eco-PC circulantes en España. La información más relevante de estos 394 aislados a nivel de ST, tipo de carbapenemasas y lugar de aislamiento se refleja en los enlaces al Microreact (<https://microreact.org/project/jg2Wqp5S4rLPawqALVh4RP-redlabra2021c-caakpnrepresentantes>, <https://microreact.org/project/7Ni2cQNgGySrRW8VkJFjLiq-redlabra2021ccaaeclorepresentantes>, <https://microreact.org/project/snCdVRyh8Sn7wddPD-8QMRt-redlabra2021ccaaecorepresentantes>). Las cepas representativas incluidas en esta selección procedían de 16 CC. AA. y 77 hospitales.

Distribución según secuenciotipos

Las 238 cepas de Kpn-PC pertenecieron a un total de 84 STs; nueve de los cuales (ST307, ST11, ST512, ST15, ST147, ST392, ST39, ST17 y ST405) se detectaron en al menos 5 hospitales y 3 CC. AA. ST307 fue el más ampliamente distribuido, detectándose en 27 hospitales y 12 CC. AA. diferentes (en todas las que aportaron datos excepto Cantabria, Cataluña, La Comunidad Foral de Navarra e Islas Baleares) (<https://microreact.org/project/jg2Wqp5S4rLPawqALVh4RP-redlabra2021ccaakpnrepresentantes>, Figura 2).

Las 94 cepas de Eclo-PC incluyeron cuatro especies (78 *E. hormaechei*, 13 *E. roggenkampii*, dos *Enterobacter asburiae* y un *Enterobacter cloacae subsp cloacae*) y pertenecieron a 36 STs. Los secuenciotipos ST78, ST114, ST90 y ST93 de *Enterobacter hormaechei* y ST1074 de *Enterobacter roggenkampii* se detectaron en al menos 5 hospitales y 5 CC. AA. ST78 y ST114 fueron los que mostraron una mayor dispersión geográfica, detectándose en 15 hospitales y 8 CC. AA., y en 8 hospitales y 6 CC. AA., respectivamente (<https://microreact.org/project/7Ni2cQNgGySrRW8VkFjLiq-redlabra2021ccaeclorepresentantes>, Figura 2).

Las 62 cepas de Eco-PC pertenecieron a 49 STs de los cuales sólo ST131, ST69, ST538, ST1193, ST127, ST617 y ST93 se detectaron en más de un hospital; además todos ellos menos el ST93 se detectaron en más de una C. A. ST131 y ST69 fueron los más ampliamente distribuidos, estando presentes en cuatro hospitales y tres CC. AA., y en tres hospitales y tres CC. AA. diferentes, respectivamente (<https://microreact.org/project/sncdVRyh8Sn7wddPD8QMrt-redlabra2021ccaecorepresentantes>, Figura 3).

Figura 2. Estructura poblacional de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (Kpn-PC): árbol de expansión mínima. Se muestran las distancias genéticas basadas en cgMLST de 2.358 genes. El color del sombreado de los círculos indica el gen de la carbapenemasa que porta y el número marcado en el interior de los círculos indica el secuenciotipo por MLST. El sombreado gris representa agrupaciones aplicando un punto de corte de 10 alelos.

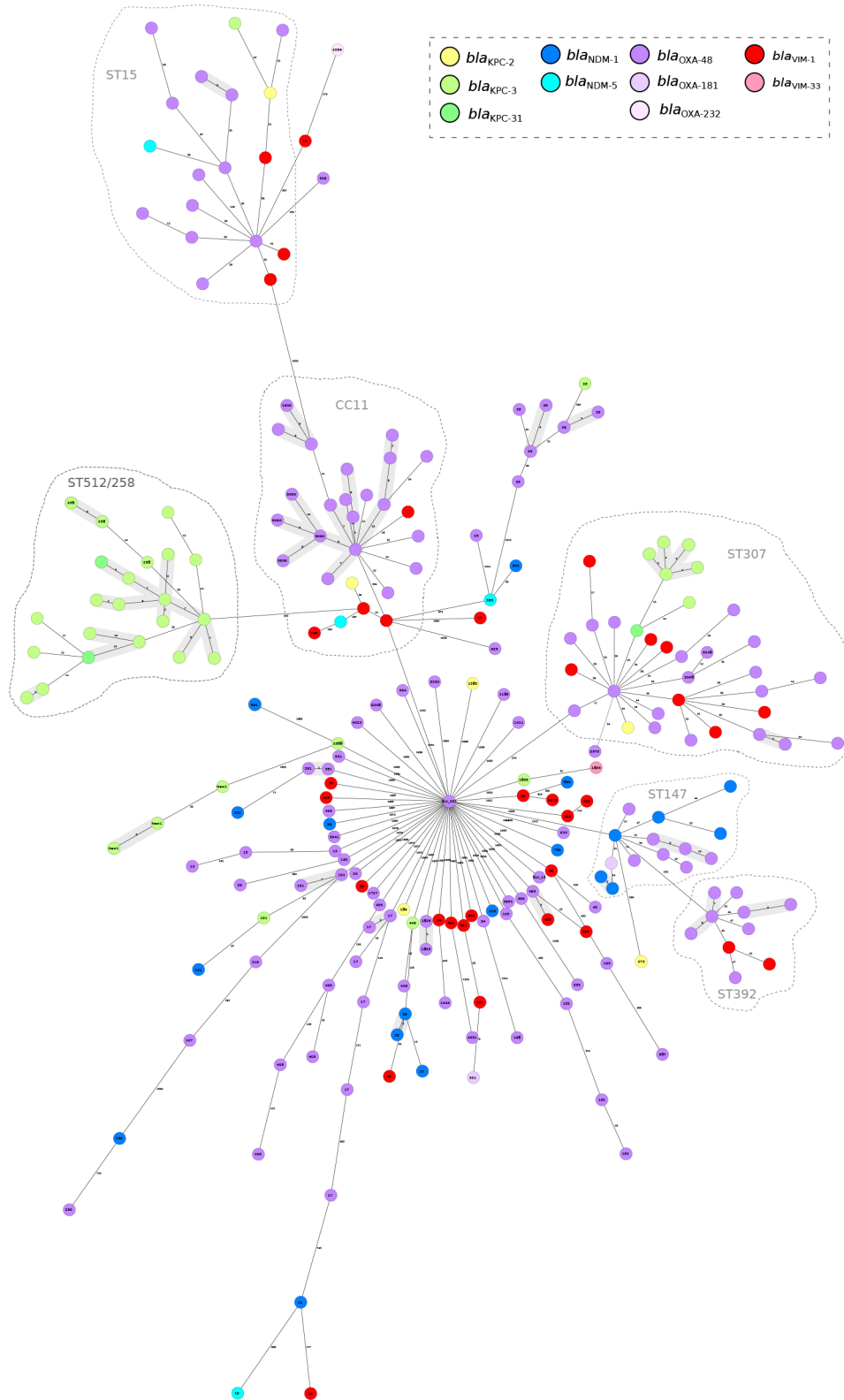


Figura 3. Estructura poblacional de *Enterobacter cloacae* complex productor de carbapenemasas (Eclo-PC): árbol de expansión mínima. Se muestran las distancias genéticas basadas en un cgMLST de 631 obtenido a partir de 36 genomas de referencia (NCBI RefSeq). El color del sombreado de los círculos indica el gen de la carbapenemasa que porta y el número marcado en el interior de los círculos indica el secuenciotipo por MLST.

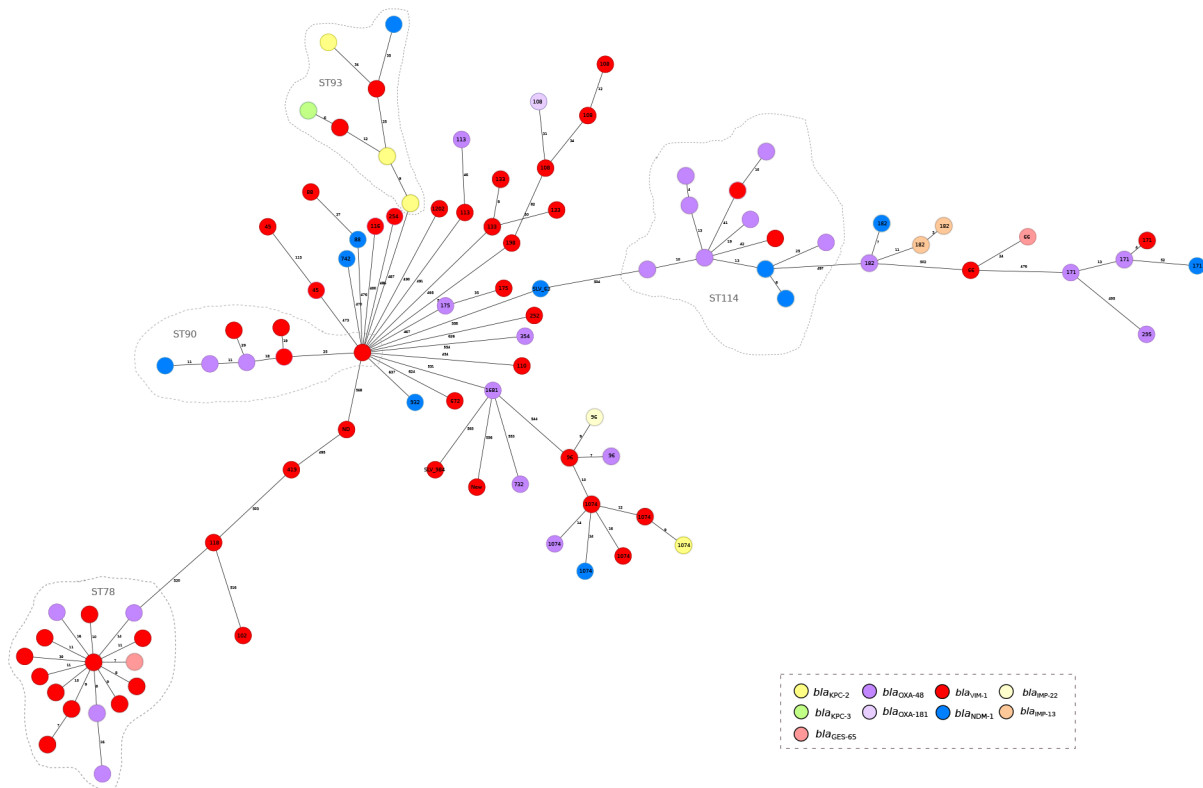
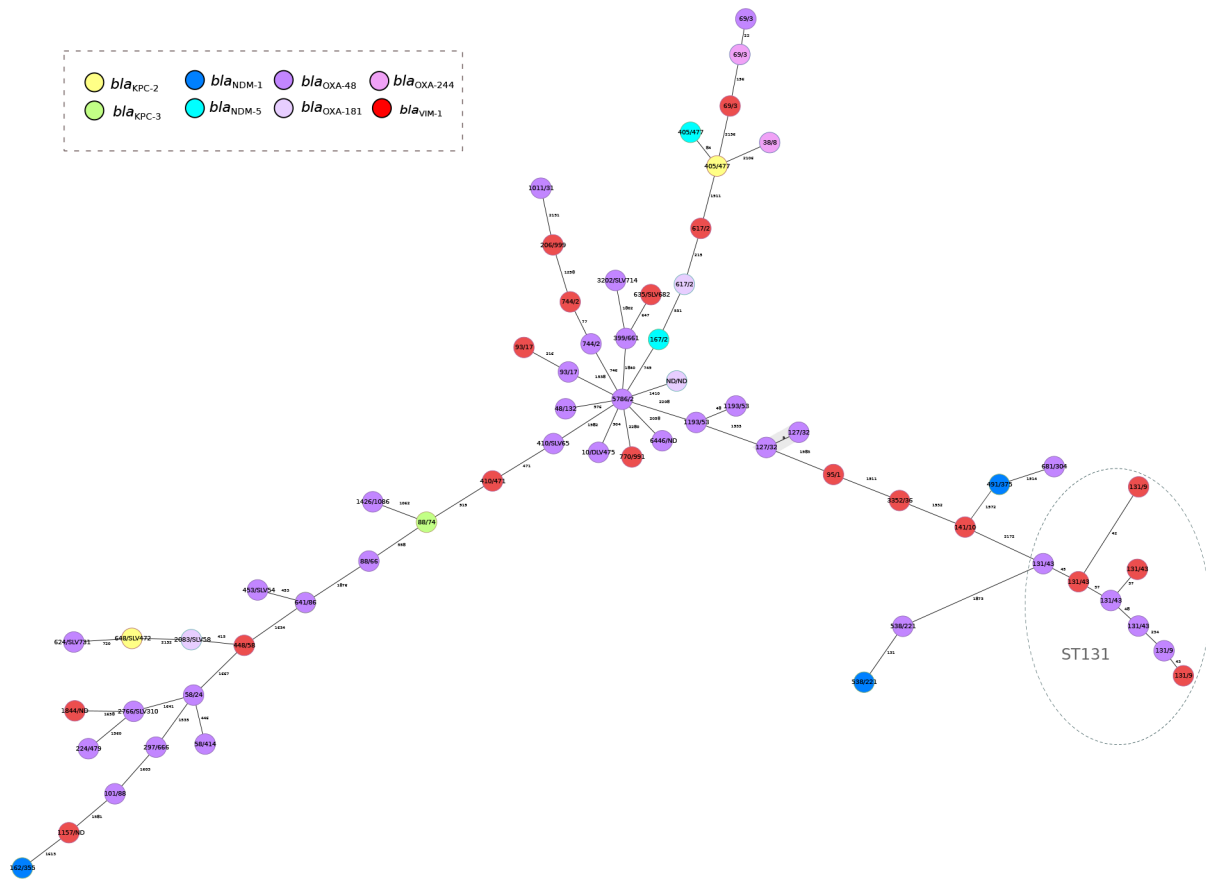


Figura 4. Estructura poblacional de Escherichia coli productor de carbapenemasas (Eco- PC): árbol de expansión mínima. Se muestran las distancias genéticas basadas en cgMLST de 2.513. El color del sombreado de los círculos indica el gen de la carbapenemasa que porta y el número marcado en el interior de los círculos indica el secuenciotipo por MLST. El sombreado gris representa agrupaciones aplicando un punto de corte de 10 alelos.



Distribución según tipo de carbapenemasa

Se detectaron cepas de Kpn-PC productoras de OXA-48, KPC-3, VIM-1 y NDM-1 en 51/16, 29/10, 22/9 y 14/8 hospitales/CC. AA., respectivamente. Cuatro cepas de 4 STs diferentes y procedentes de 4 CC. AA. producían variantes de OXA-48; tres OXA-181 y una OXA-232. Otras cuatro, también de diferentes STs y diferentes CC. AA. produjeron NDM-5, dos de ellas coproducían una OXA-48-like. Por último, tres cepas procedentes de tres CC. AA. diferentes producían variantes de KPC-31, dos pertenecían al ST512 y una al ST307 (<https://microreact.org/project/jg2Wqp5S4rLPawqALVh4RP-redlabra2021ccaakp-nrepresentantes>, Figura 2).

Las carbapenemasas con mayor diseminación entre los Eclo-PC fueron VIM-1, OXA-48 y NDM-1 presentes en 21/9, 16/10 y 6/6 hospitales/CC. AA., respectivamente. Cabe destacar la producción de carbapenemasas del tipo IMP en tres cepas de dos STs procedentes de dos CC. AA., dos de ellas productoras de IMP-13 del ST182 procedentes de dos hospitales de Cantabria. Dos cepas de diferentes STs y diferentes hospitales de Cantabria produjeron GES-6 (<https://microreact.org/project/7Ni2cQNgGySrRW8VkJLiq-redlabra2021c-ccaeclorepresentantes>, Figura 3).

Las carbapenemasas con mayor diseminación entre las cepas de Eco-PC fueron OXA-48 y VIM-1 presentes en 19/9 y 13/5 hospitales/CC. AA., respectivamente. Se detectó la presencia de OXA-181 en tres cepas de diferentes STs y diferentes CC. AA., y la de NDM-5 en dos cepas de diferentes STs y diferentes hospitales de Cataluña (<https://microreact.org/project/snCdVRyh8Sn7wddPD8QMRt-redlabra2021ccaecore-presentantes>, Figura 4).

Distribución de las principales combinaciones secuenciotipo/tipo de carbapenemasa.

Según este análisis de cepas representativas se detectaron 10 combinaciones de ST/tipo de carbapenemasa presentes en al menos 5 hospitales diferentes. Dos correspondían a las cepas de Eclo-PC con las combinaciones ST78/VIM-1, detectada en 11 hospitales de 6 CC. AA., y la ST14/OXA-48, presente en 7 hospitales de 5 CC. AA. (Tabla 4). Las ocho restantes fueron Kpn-PC con las combinaciones ST307/OXA-48 (17 hospitales y 8 CC. AA.), ST512/KPC-3 (17 hospitales y 6 CC. AA.), ST11/OXA-48 (15 y 6), ST15/OXA-48 (12 y 7), ST147/OXA-48 (7 y 4); ST307/VIM-1 (7 y 6), ST307/KPC-3 (6 y 2) y ST147/NDM-1 (5 y 5) (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución geográfica de las combinaciones de ST/tipo de carbapenemasa presentes en al menos 5 hospitales.

Combinación ST/tipo de carbapenemasa	Especie	Nº hospitales/ Nº CC.AA.	CC.AA.
ST307/OXA-48	Kpn	17/8	Castilla-La Mancha, Comunidad de Madrid, Canarias, Comunidad Valenciana, Andalucía, Aragón, Asturias y País Vasco.
ST512/KPC-3	Kpn	17/6	Castilla-La Mancha, Andalucía, Comunidad de Madrid, Castilla y León, Comunidad Foral de Navarra y Cantabria.
ST11/OXA-48	Kpn	15/6	Comunidad de Madrid, Cantabria, Castilla y León, Castilla-La Mancha, País Vasco y Comunidad Valenciana.
ST15/OXA-48	Kpn	12/7	Comunidad de Madrid, Canarias, Castilla y León, Andalucía, Comunidad Valenciana, Extremadura y Castilla-La Mancha.
ST78/VIM-1	Eclo	11/6	Comunidad de Madrid, Islas Baleares, Comunidad Valenciana, Castilla y León, Andalucía y Cataluña.
ST392/OXA-48	Kpn	7/3	Comunidad de Madrid, Canarias y Cataluña.
ST147/OXA-48	Kpn	7/4	Castilla y León, Galicia, Asturias y Comunidad de Madrid.
ST307/VIM-1	Kpn	7/6	Andalucía, Castilla y León, Castilla-La Mancha, Comunidad de Madrid, Extremadura y Galicia.
ST114/OXA-48	Eclo	7/5	Comunidad de Madrid, Andalucía, País Vasco, Canarias y Castilla-La Mancha.
ST307/KPC-3	Kpn	6/2	Comunidad de Madrid y Extremadura.
ST147/NDM-1	Kpn	5/5	Galicia, Canarias, País Vasco, Cataluña, Comunidad de Madrid.

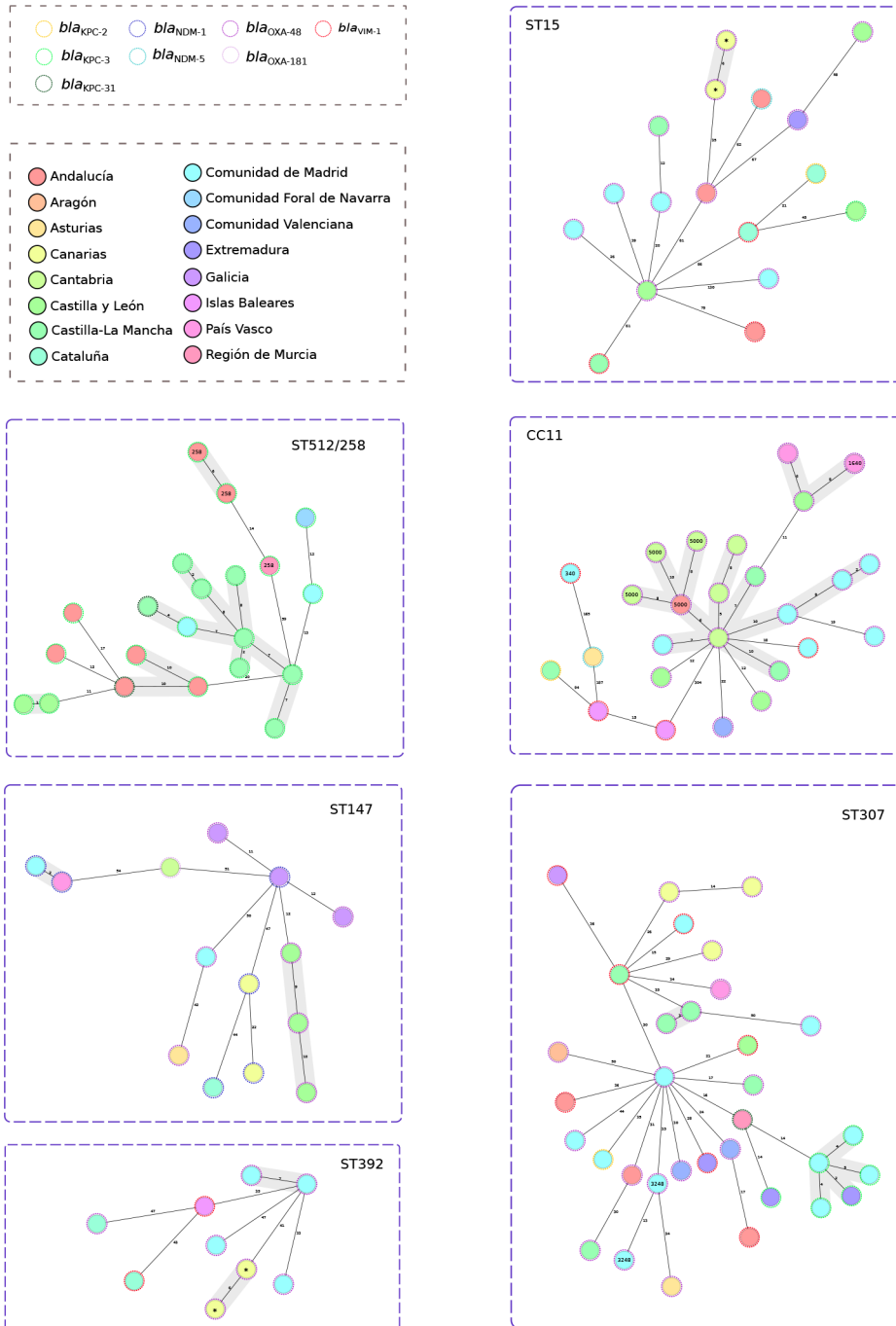
Análisis de agrupaciones interhospitalarias por cgMLST

El análisis de los resultados de cgMLST aplicando un punto de corte de 10 alelos máximo para considerar agrupaciones en Kpn-PC, Eco-PC y Eclo-PC (aplicando en este caso los esquemas de cgMLST específicos de las especies mayoritarias *E. hormaechei* y *E. rogenkampii*), mostró agrupaciones de cepas aisladas en diferentes hospitales (posible diseminación interhospitalaria).

En el caso de Kpn-PC, se detectaron agrupaciones de cepas aisladas de diferentes hospitales de una misma C. A. en el ST307/OXA-48 (Castilla La Mancha), ST15/OXA-48 (Islas Canarias), ST512/KPC-3/KPC-31 (Andalucía), ST258/KPC-3 (Andalucía), ST147/OXA-48 (Castilla y León) y ST392/OXA-48 (Comunidad de Madrid e Islas Canarias). Aplicando el mismo criterio, se observaron agrupaciones de cepas aisladas en hospitales de diferentes CC. AA. en el ST307/KPC-3 (Comunidad de Madrid-Extremadura),

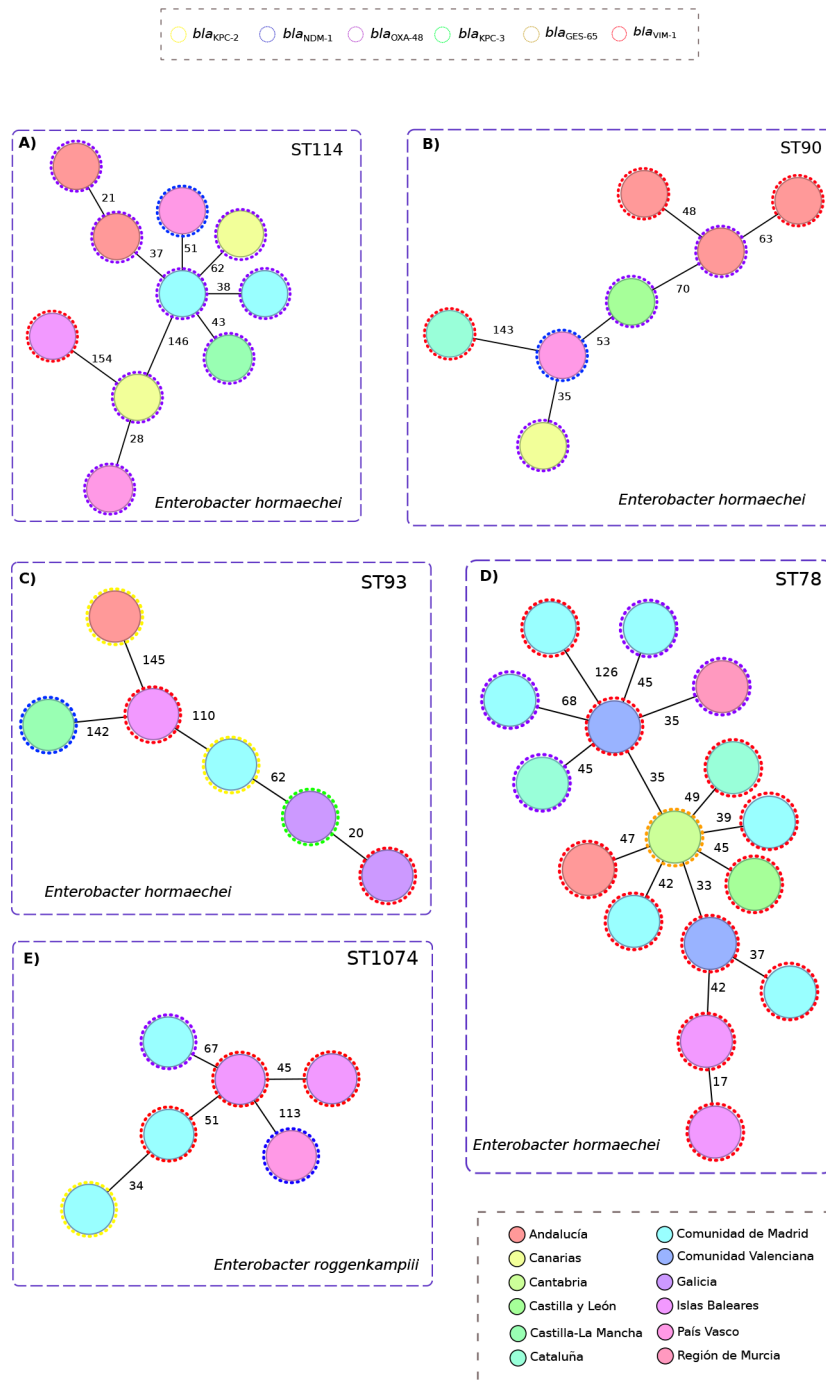
ST11/OXA-48 (Castilla y León-País Vasco; Cantabria-Comunidad de Madrid-Castilla la Mancha), ST512/KPC-3 (Castilla La Mancha-Comunidad de Madrid), ST147/NDM-1 (Comunidad de Madrid-País Vasco) y ST5000/OXA-48 (Andalucía-Cantabria) (Figura 4).

Figura 5. Estructura poblacional de los STs mayoritarios de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (Kpn-PC): árbol de expansión mínima. Se muestran las distancias genéticas basadas en cgMLST de 2.358. El color del sombreado de los círculos indica la comunidad autónoma en la que se ha tomado la muestra, el color de la línea punteada que rodea los círculos indica el gen de la carbapenemasa que porta y el número marcado en el interior de los círculos indica el MLST. El sombreado gris representa agrupaciones aplicando un punto de corte de menor o igual a 10 alelos.



En *E. hormaechei* y *E. roggenkampii* no se detectó ninguna agrupación entre cepas de diferentes hospitales (Figura 6).

Figura 6. Estructura poblacional de los ST mayoritarios de *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter roggenkampii* productores de carbapenemasas: árbol de expansión mínima. Se muestran las distancias genéticas basadas en cgMLST de 2.123 y 2.466 genes respectivamente. El color del sombreado de los círculos indica la comunidad autónoma en la que se ha tomado la muestra y el color de la línea punteada que rodea los círculos indica el gen de la carbapenemasa que porta.



En Eco-PC, solo se detectó una agrupación interhospitalaria afectando a dos cepas del ST127/OXA-48 y aisladas en hospitales de Cataluña e Islas Baleares (Figura 4).

Producción de β -lactamasas de espectro extendido

La BLEE asociada con más frecuencia a la diseminación de carbapenemasas en las tres especies fue la CTX-M-15. Esta asociación fue mayor en Kpn productora de OXA-48, combinación que se detectó en todas las CC. AA. excepto en la Comunidad Foral de Navarra. La segunda BLEE más detectada fue la CTX-M-9, que se asoció principalmente a Eclo productor de VIM-1 de Islas Baleares y Cataluña (12 cepas de nueve STs). Se detectó la presencia de Eclo productor de SHV-12 en 6 CC. AA. (<https://microreact.org/project/jg2Wqp5S4rLPawqALVh4RP-redlabra2021ccaakpnrepresentantes>, <https://microreact.org/project/7Ni2cQNgGySrRW8VkJLiq-redlabra2021ccaaeclorepresentantes>, <https://microreact.org/project/sncdVRyh8Sn7wddPD8QMRt-redlabra2021ccaaecorepresentantes>).

Tipos capsulares y virulencia en *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemas.

Cinco aislados de *K. pneumoniae* presentaban genes de virulencia que codifican para yersiniabactina (*ybt*) y aerobactina (*iuc*), pero no para colibactina (*clb*) (score de virulencia 4 sobre 5 según los criterios utilizados por Kleborate). Se detectó *ybt9* asociado a ICEKp3 en dos de ellas, *ybt16* asociado a ICEKp12 en otras dos e *ybt14* asociado a ICEKp5 en una, cuatro presentaban *iuc1* y una *iuc3*. Estas cinco cepas procedían de Cataluña (2), Región de Murcia (2) y Comunidad Valenciana, y pertenecían a los STs ST395 (2), ST86, ST23 y ST2096, y a los K-loci KL2 (n=3), KL57 y KL64. Producían las carbapenemasas VIM-1, OXA-48, OXA-232, NDM-5 y NDM-1. En tres de ellas (ST23/OXA-48, ST2096/OXA-232 y ST395/NDM-1) se detectó el gen *rmpA2* asociado a un fenotipo hipervirulento e hiper mucoso.

El resto de las cepas de *K. pneumoniae* no tuvieron factores de virulencia reseñables, presentando un score de 0/1 sobre 5, según criterios Kleborate.

Acciones inmediatas de mejora

El presente informe aporta información relevante sobre la situación en España de Kpn- PC, Eclo-PC y Eco-PC en 2021. La casuística recogida, aunque incompleta, es lo suficientemente amplia y representativa para poder establecer el mapa nacional de diseminación de estos patógenos.

Sin embargo, la estructura de RedLabRA, planteada como una red de subredes autonómicas en las que todos los LN1 están implicados, con la coordinación autonómica de los LN2 y una supra-coordinación a nivel nacional por el LN3 (CNM), no ha funcionado como tal en todas las CC. AA. (Tabla 2), lo que genera inevitables sesgos en el grado de representatividad entre CC. AA.

a. La principal acción de mejora pasa ineludiblemente por potenciar el funcionamiento de la estructura en las sub-redes autonómicas. Algunos puntos detectados que podrían mejorar este aspecto son:

- Información y contacto con los LN1.
- Revisión de la designación de LN2, designándolos en aquellas CC. AA. que no los tienen, excluyendo aquellos que no se sientan concernidos en la iniciativa, y buscando el compromiso de los que sí lo estén.
- Mejorar las capacidades de secuenciación, a nivel técnico y de recursos.

b. Otra mejora necesaria hace referencia al flujo de cepas, secuencias e información. Uno de los objetivos de RedLabRA es disponer de información relevante de una forma ágil para la toma de decisiones; es evidente que el funcionamiento actual no permite cubrir este objetivo de forma global. Para optimizar el proceso hay que establecer actividades de mejora en el envío de cepas/secuencias de los LN2 al LN3, en el retorno de información individual del LN3 a los LN2 por secuencia recibida (por el sistema GIPI el retorno individual por cepa está bien resuelto), y en el retorno de los análisis conjuntos del LN3 a los LN2 y a los otros participantes en el sistema de vigilancia (muy condicionado por el ritmo de envío cepas/secuencias).

En este apartado, la comunicación de los casos confirmados desde las CC. AA. a RENAVE es también una importante mejora que necesita acción en el sistema de vigilancia.

c. Uno de las cuestiones que están en continuo debate en RedLabRA es el escalado en los patógenos multirresistentes a vigilar. Se trata de una acción de mejora necesaria de implementar, pero muy condicionada al correcto funcionamiento de las sub-redes autonómicas. En este aspecto, una mejora viable a corto plazo sería implementar sistemas de vigilancia por cortes temporales de patógenos concretos. En esta línea se está desarrollando la red oficial europea para la vigilancia de genes de resistencia EURGen-Net (<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-work/disease-and-laboratory-networks/EURGen-net>); una importante acción de mejora sería promover la alineación de EURGen-Net con RedLabRA.

Conclusiones

- RedLabRA registró en 2021 2.304 casos de infección/colonización por Kpn-PC, Eclo-PC o Eco-PC. Se registraron casos en todas las CC. AA. excepto La Rioja, y 99 hospitales registraron al menos un caso.
- La familia de carbapenemasas más prevalente en las tres especies estudiadas fue OXA-48-like. Sin embargo, mientras que en Kpn-PC y Eco-PC su prevalencia estuvo en torno al 70%, en Eclo-PC fue del 42% y prácticamente igual a la de la familia VIM.
- La distribución por especie y familia de carbapenemasas detectada en aislados de líquidos estériles no varió significativamente respecto a la observada en el total de las cepas.
- Se detectaron un total de 394 combinaciones únicas de especie/hospital/secuenciotipo/tipo de carbapenemasa: 238 Kpn, 94 Eclo y 62 Eco.
- El análisis por secuenciación genómica completa de las 238 Kpn-PC detectó la presencia de cepas productoras de cada una de las principales carbapenemasas en al menos 14 hospitales y ocho CC. AA.
- Las combinaciones ST/tipo de carbapenemasa más ampliamente distribuidas a nivel geográfico fueron las correspondientes a las Kpn-PC ST307/OXA-48, ST512/KPC-3, ST11/OXA-48 y ST15/OXA-48, detectadas cada una en al menos 12 hospitales de seis CC. AA.
- El análisis filogenético por cgMLST (≤ 10 alelos) detectó seis agrupaciones de cepas de Kpn-PC aisladas en hospitales de diferentes CC. AA.: ST307/KPC-3 (Comunidad de Madrid-Extremadura), ST11/OXA-48 (Castilla y León-País Vasco; Cantabria-Comunidad de Madrid-Castilla la Mancha), ST512/KPC-3 (Castilla La Mancha-Comunidad de Madrid), ST147/NDM-1 (Comunidad de Madrid-País Vasco) y ST5000/OXA-48 (Andalucía- Cantabria).
- Estos resultados no solo muestran la diseminación interregional de los principales tipos de carbapenemasas y de los STs mayoritarios de Kpn-CP, sino que además sugieren la diseminación de clones específicos con una limitada variabilidad genética.
- RedLabRA se muestra como una herramienta útil en la vigilancia de patógenos multirresistentes. Sin embargo, son necesarias importantes acciones de mejora para optimizar su rendimiento, sobre todo en los aspectos referentes a la unificación de la representatividad y funcionamiento por CC. AA., flujos de cepas/secuencias e información, y agilidad de respuesta.

Bibliografía

1. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes. https://resistenciaantibioticos.es/sites/default/files/2022-04/red_laboratorios_vigilancia.pdf. Madrid, AEMPS, 2018
2. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations – 2019–2021. Stockholm: ECDC; 2019.
3. Cañada-García JE, Pérez-Vázquez M, Oteo-Iglesias J. RedLabRA; a Spanish Network of Microbiology Laboratories for the Surveillance of Antibiotic Resistant Microorganisms. *Rev Esp Quimioter.* 2021 Sep;34 Suppl 1(Suppl1):12-14.
4. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014 Aug 1;30(15):2114-20.
5. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017 Jun 8;13(6):e1005595.
6. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, Phillippy AM. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* 2016 Jun 20;17(1):132.
7. Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, Harris SR. ARI-BA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb Genom.* 2017 Sep 4;3(10):e000131.
8. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547-1549.
9. Cañada-García JE, Grippo N, de Arellano ER, Bautista V, Lara N, Navarro AM, Cabezas T, Martínez-Ramírez NM, García-Cobos S, Calvo J, Cercenado E, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Oteo-Iglesias J; Spanish IMP Study Group. Phenotypic and molecular characterization of IMP- producing Enterobacterales in Spain: Predominance of IMP-8 in *Klebsiella pneumoniae* and IMP- 22 in *Enterobacter roggenkampii*. *Front Microbiol.* 2022 Sep 28;13:1000787.
10. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Nov;67(11):2640-4.
11. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat. Commun.* 2021, 12, doi:10.1038/s41467-021-24448-3.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto de Salud Carlos III



MINISTERIO
DE SANIDAD



agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios