



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud Programa de Doctorado en Medicina
Clínica y Salud Pública

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO MOLECULAR Y EPIDEMIOLÓGICO DE ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS RESISTENTES A COLISTINA

Doctorando: Claudia Soria Segarra

Dirección: José Gutiérrez Fernández

Granada 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Claudia Soria Segarra
ISBN: 978-84-1195-563-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/97439>

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por ser mi soporte e inspiración en todo momento.

A mi tutor Dr. José Gutiérrez Fernández por guiarme con paciencia en este camino y ofrecerme su valiosa ayuda y conocimiento, trazando el camino para conseguir el éxito en la meta propuesta.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	6
3. ABREVIATURAS Y SIGLAS	11
4. INTRODUCCIÓN	14
4.2. ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS.....	15
4.2.1. DEFINICIÓN	15
4.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS EPC.....	18
4.3. COLISTINA.....	21
4.3.1. GENERALIDADES	21
4.3.2. MECANISMOS DE ACCIÓN	22
4.3.3. USO EN MEDICINA VETERINARIA	24
4.3.4. COLISTINA. MECANISMOS DE RESISTENCIA	25
4.3.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A COLISTINA	29
4.3.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LA COLISTINA	29
5. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVOS	37
7. METODOLOGÍA	39
<i>SECCIÓN 1. PREVALENCIA, CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, MOLECULARES DE EPC-RC Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS.</i>	39
7.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	40
7.2. VARIABLES CLÍNICAS ANALIZADAS	40
7.4. DETERMINACIÓN GENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS.....	41
7.5. DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A COLISTINA Y PRESENCIA DE GEN <i>MCR-1</i>	41
7.6. ANÁLISIS DE CLONALIDAD Y MLST	42
7.7. ANÁLISIS DE SINERGIA ENTRE COLISTINA Y FOSFOMICINA POR EL MÉTODO DE TABLERO DE AJEDREZ	42
7.8. COMITÉ DE ÉTICA	42
7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
<i>SECCIÓN 2. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A COLISTINA EN EPC</i>	43
7.10. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A COLISTINA POR EL MÉTODO DILUCIÓN EN AGAR CON CONCENTRACIÓN ÚNICA (3 MG/L).....	43

8. RESULTADOS	46
8.1. EVIDENCIAS DE CALIDAD	46
8.2. ARTÍCULOS	48
9. DISCUSIÓN	112
10. CONCLUSIONES.....	120
11. BIBLIOGRAFÍA.....	122

1. RESUMEN

Introducción

La alta prevalencia de Enterobacteriales productores de carbapenemasas (EPC) constituye una preocupación a nivel mundial por las altas tasas de mortalidad asociadas y las escasas opciones terapéuticas disponibles, lo cual ha llevado al uso de antibióticos considerados de último recurso como colistina y tigeciclina, sobre todo en regiones, como Ecuador, donde el acceso a los nuevos antimicrobianos es limitado.

Colistina fue introducida para su uso clínico en el año 1949, pero debido a sus efectos secundarios, su uso se restringió para casos excepcionales. Sin embargo, su uso se está incrementado para el tratamiento de las EPC, por lo que la aparición de resistencia a este antimicrobiano, lo convierte en un problema con impacto clínico en la Salud Pública, por lo cual es necesario desarrollar esfuerzos para estudiar a fondo esta problemática para elaborar estrategias que permitan la prevención y el control de estos microorganismos multirresistentes.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo describir las características microbiológicas, moleculares y los factores de riesgo asociados a Enterobacteriales productores de carbapenemasas y resistentes a colistina (EPC-RC), evaluando un método de laboratorio útil para su detección.

Metodología

Los artículos que componen esta tesis doctoral se pueden dividir en dos secciones: la primera que estudia la prevalencia, características microbiológicas y moleculares de EPC-RC, además de los factores de riesgo asociados; y la segunda parte que evalúa un método de laboratorio para la detección de la resistencia a colistina en EPC. La metodología utilizada se va a dividir de acuerdo con las secciones anteriormente mencionadas.

Sección 1. Prevalencia, características microbiológicas y moleculares de EPC-RC, y factores de riesgo asociados

Los artículos incluidos en esta sección se realizaron con aislados de EPC obtenidos durante tres periodos de tiempo (2016, 2020 y 2022) a partir de muestras clínicas y frotis rectales en hospitales de Ecuador. El estudio se inició con la selección de todos los Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos (según puntos de corte del CLSI del año de su aislamiento), posteriormente se confirmó la resistencia a carbapenémicos con el método de difusión por disco con meropenem y

la producción de carbapenemasas por el método de inactivación de carbapenémicos. Todos los aislados de EPC fueron estudiados por el método de microdilución en caldo para determinar la resistencia a colistina, siguiendo la metodología del CLSI. Se realizó el ensayo de sinergia para la combinación colistina/fosfomicina por el método de tablero de ajedrez en aislados de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa.

Los datos de los pacientes con infecciones por EPC se obtuvieron de los registros médicos electrónicos y las infecciones fueron definidas según el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Atlanta (CDC, por sus siglas en inglés). Para el análisis de los factores de riesgo, los casos incluyeron los pacientes infectados o colonizados con EPC-RC y el grupo control consistió en aquellos pacientes en los que no se aisló EPC-RC.

La caracterización molecular de los aislados EPC-RC incluyó la detección de los genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM* y *blaIMP* por una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) múltiple. En los aislados del año 2020, se determinaron las variantes de la carbapenemasa más frecuente (KPC) por el método de secuenciación de Sanger y se identificó la secuencia tipo por la técnica de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, se realizaron estudios de clonalidad con ERIC-PCR y determinación de resistencia plasmídica por presencia del gen *mcr-1* en todos los aislados de EPC-RC.

Sección 2. Evaluación de un método de laboratorio para la detección de la resistencia a colistina en EPC.

En este estudio se realizó la comparación del método de referencia (microdilución en caldo) para la determinación de susceptibilidad a colistina con el método de dilución en agar con una única concentración de colistina (3 mg/L), evaluando la concordancia categórica y errores menores en aislados de EPC-RC.

Resultados

Los resultados de este trabajo realizado en aislados de EPC-RC, obtenidos en diferentes ciudades de Ecuador, mostraron una prevalencia alta de resistencia a colistina (RC) (20,77%), la cual se incrementó en el período de estudio desde un 3,73% en el 2016 hasta un 23,73% en el 2022.

Las muestras respiratorias fueron predominantes (27,40 % n=57/208), seguidas por las bacteriemias (25,48% n=53/208). *K. pneumoniae* fue el microorganismo aislado con mayor

frecuencia (89,19%, n=322/361) aunque la resistencia a colistina también se presentó en *K. aerogenes* y *E. cloacae*. El análisis por microorganismo permitió identificar a *K. aerogenes* como el portador de mayor resistencia a colistina (52,94%; n=9).

Los aislados EPC-RC mostraron altos niveles de co-resistencia a gentamicina y ciprofloxacino, mientras que la sensibilidad a tigeciclina, ceftazidima-avibactam (CIM₉₀ < 0,12 mg/L) y meropenem-vaborbactam (CIM₉₀ < 0,84 mg/L) fue alta (>90%). No se encontró sinergia con la combinación colistina y fosfomicina en aislados de *K. pneumoniae bla_{KPC}*.

El gen *bla_{KPC}* fue el único involucrado en los aislados EPC-RC y no se detectó resistencia a colistina en los aislados productores de otras carbapenemasas como NDM y OXA-48.

Los resultados del estudio de factores de riesgo demostraron una tasa de mortalidad de 42,2% en infecciones por EPC-RC y no se encontró ninguna diferencia en la mortalidad con los pacientes infectados por EPC-colistina sensibles. Las infecciones del tracto urinario fueron las infecciones más frecuentemente encontradas. La presencia de fallo renal, hemodiálisis en los 3 meses previos a la hospitalización, la presencia de catéteres para hemodiálisis y el uso de inhibidores de β-lactamasas son factores de riesgo independientes para EPC-RC.

El análisis de clonalidad con ERIC-PCR demostró que el 34,47% de los aislados obtenidos en el año 2020 en las unidades hospitalarias de la ciudad de Guayaquil, tenían 100% de similitud y se evidenció la presencia predominante (95,23%) de *K. pneumoniae bla_{KPC-3} ST 512*. El gen *mcr-1* de origen plasmídico no fue identificado en ninguno de los aislados EPC-RC estudiados.

Los resultados del estudio con el agar colistina-3 mg/L mostraron que este método de laboratorio tiene una excelente concordancia categórica (97,02%) con el método de referencia para identificar los EPC-RC.

Conclusiones

Existe una alta prevalencia de resistencia a colistina en EPC en las principales ciudades de Ecuador, la cual ha aumentado en el transcurso de los años. La resistencia a colistina no está mediada por el gen de origen plasmídico *mcr-1*, lo cual sugiere la presencia de otros mecanismos involucrados que requieren futuras investigaciones. Adicionalmente, los aislados de EPC-RC detectados se consideran extremadamente resistentes por sus co-resistencias, por lo cual se debe garantizar el acceso a los nuevos antimicrobianos disponibles debido a las altas tasas de mortalidad

asociadas a las infecciones por EPC-RC. No se encontró sinergia en la combinación colistina-fosfomicina.

La prevalencia de infección por EPC-RC es del 28,07%, siendo *K. pneumoniae* ST 512-KPC-3 la responsable de la diseminación clonal de estos microorganismos multirresistentes, lo cual evidencia la falta de adherencia al Plan Nacional de Resistencia Antimicrobiana en Ecuador.

Los factores de riesgo independientes asociados a la presencia de EPC-RC son la nutrición parenteral, hemodiálisis reciente, el uso de inhibidores de β -lactamasas y el fallo renal.

El agar Colistina 3 mg/L puede ser considerado como una buena alternativa para llevar a cabo , en los laboratorios de microbiología clínica con recursos limitados, la detección de EPC-RC en el ámbito clínico y con fines epidemiológicos.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten comprender la problemática de los EPC-RC en Ecuador y aportan datos que pueden ser útiles en regiones similares con bajos recursos, los cuales sirven para elaborar estrategias que permitan la prevención y control de estos microorganismos.

2. ABSTRACT

Introduction

The high prevalence of Carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) is a worldwide concern due to the high associated mortality rates and the few therapeutic options available, which has led to the use of antibiotics considered as last resorts such as colistin and tigecycline, especially in regions, such as Ecuador, where access to new antimicrobials is limited.

Colistin was introduced for its use in 1949, but due to its side effects, its use was restricted to exceptional cases. However, its use is increasing for the treatment of CPE, so the emergence of resistance to this antimicrobial, turns it into a problem with clinical and Public Health impact, requiring developing efforts to thoroughly study this problematic to be able to develop strategies that allow the prevention and control of the multidrug-resistant pathogens.

Methodology

The articles that are part of this doctoral thesis can be divided into two sections: The first one, that studies the incidence, microbiological and molecular characteristics of CPE-RC and in addition the risk factors associated with CPE-CR. The second part is made up of the article that evaluates a laboratory method for the detection of colistin resistance in CPE. The methodology used will be divided according to the sections.

Section 1. Prevalence, microbiological and molecular characteristics of CPE-RC and associated risk factors.

The articles included in this section were carried out with CPE isolates obtained during three time periods (2016, 2020 and 2022) from clinical samples and rectal swabs in Ecuadorian hospitals. The study began with the selection of all Enterobacterales resistant to carbapenems (according to CLSI breakpoints of the year of their isolation), subsequently resistance to carbapenems was confirmed with the disk diffusion method with meropenem and carbapenemase-production was checked with carbapenem inactivation method. All CPE isolates were tested by the broth microdilution method to determine resistance to colistin following the CLSI methodology. Synergy measurements by checkboard analysis was made in colistin-fosfomicin combination in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase -producing.

Patient's data was obtained from electronic medical records. For the analysis of risk factors, cases included patients infected or colonized with CPE-CR and the control group consisted

of those patients with CPE-colistin susceptible.

The molecular characterization of CPE-CR included the detection of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes by multiplex PCR. In the 2020 isolates, the most frequent carbapenemase variants (KPC) were determined by Sanger sequencing method and the sequencetype was studied with Multilocus Sequence Typing. Additionally, clonality studies were carried out with ERIC-PCR. The *mcr-1* gene was studied in all EPC-CR isolates.

Section 2. Evaluation of a laboratory method for the detection of colistin resistance in CPE.

In this study, a comparison of the reference method (broth microdilution) for determining susceptibility to colistin was carried out with the agar dilution method using a single concentration of colistin (3 mg/L) evaluating categorical agreement and minor errors in CPE-CR isolates.

Results

The results of this work carried out on CPE-CR isolates obtained in different cities in Ecuador, showed a high prevalence of CR (20.77%), which increased in the study period from 3.73% in 2016 to 23.73% in 2022. Respiratory samples were predominant (27.40%; n= 57/208), followed by bacteremia (25.48%; n: 53/208). *K. pneumoniae* was the most prevalent isolated microorganism (89.19%; n:322/361) although CR also occurred in *K. aerogenes* and *E. cloacae*. The analysis by microorganisms allowed the identification of *K. aerogenes* as the carrier of the greatest resistance to colistin (52.94%; n=9).

CPE-RC isolates showed high levels of co-resistance to gentamicin and ciprofloxacin, while susceptibility to tigecycline, ceftazidime-avibactam and meropenem-vaborbactam was high (90%). No positive synergy was found with the combination colistin and fosfomycin in *K. pneumoniae bla*_{KPC} isolates.

The *bla*_{KPC} gene was the only one involved in the CPE-CR isolates and no resistance to colistin was detected in the isolates producing other carbapenemases such as NDM and OXA-48.

The results of the risk factor study demonstrated a mortality rate of 42.2% in CPE-CR infections and no difference in mortality was found with patients infected with CPE-colistin susceptible. Urinary tract infection was the most frequently infection found, and multivariate

analysis showed that renal failure, hemodialysis in the 3 months prior to hospitalization, the presence of hemodialysis catheters and the use of β -lactamase inhibitors are associated with CPE-CR.

The clonality analysis with ERIC-PCR showed that 34.47% of the isolates obtained in 2020 in the hospital's units of Guayaquil city had 100% similarity and the predominance of *K. pneumoniae* ST-512 KPC-3 was evident (95.232%). The *mcr-1* gene was not identified in any of the CPE-CR isolates studied.

The results of the study with colistin agar (3 mg/L) showed that this laboratory method has excellent categorical agreement (97.02%) with the reference method to identify CPE-CR.

Conclusions

There is a high prevalence of CR in CPE in the main cities of Ecuador, which has increased over the years. The absence of the gene of plasmid origin *mcr-1* in the isolates tested, suggests the presence of other mechanisms involved that require further investigations. It can be added that CPE-CR isolates are considered extremely resistant due to their co-resistance, so access to the new available antimicrobials such as ceftazidime/avibactam or meropenem/vaborbactam should be guaranteed, due to the high associated mortality rates. No synergy was found in the combination colistin-fosfomicin.

The prevalence of CPE-CR infections is 28.07%, being *K. pneumoniae* ST-512-KPC-3 responsible for the clonal dissemination of these multidrug-resistant microorganism, which shows the lack of adherence to the National Antimicrobial Resistance Plan in Ecuador. Additionally, we can mention that the independent risk factors associated with carrying EPC-RC are parenteral nutrition, recent hemodialysis, use of β -lactamase inhibitors and kidney failures.

Colistin agar 3 ug/ml, could be considered as a good alternative for implement in clinical microbiology laboratories with limited resources for CPE-CR detection in clinical and epidemiological settings

The results obtained in his doctoral thesis allow us to understand the problem of CPE-CR in Ecuador and provide data that can be useful in similar regions with low resources, which serve

to develop strategies that allow the prevention and control of these multidrug-resistant microorganisms.

3. ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido

CDC: Centro para Prevención y prevención de Enfermedades de Estados Unidos, por sus siglas en inglés

CIF: concentración inhibitoria fraccional

CLSI: Instituto de Estandarización de Laboratorio Clínico, por sus siglas en inglés

CMI: concentración mínima inhibitoria

ECDC: Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades, por sus siglas en inglés

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

EPC: Enterobacterales productores de carbapenemasas

EPC-RC: Enterobacterales productores de carbapenemasas resistentes a colistina

ERC: Enterobacterales resistentes a carbapenémicos

EUCAST: Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (por sus siglas en inglés)

EuSCAPE: Estudio Europeo de Enterobacterales productores de carbapenemasas, por sus siglas en inglés

KPC: *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa

LA: lípido A

LPS: lipopolisacárido

MBL: metalo- β -lactamasa

mCIM: método modificado de inactivación de carbapenémicos

ME: membrana externa

MDR: microorganismo multirresistente

MI: membrana interna

MLST: Tipificación multilocus de secuencias, por sus siglas en inglés

NDM: Nueva Deli metalo- β -lactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PBP: Proteínas ligadoras de proteínas, por sus siglas en inglés

ST: Secuencia tipo

XDR: Extremadamente resistente, por sus siglas en inglés

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Generalidades de los Enterobacterales

El orden Enterobacterales corresponde a un grupo de bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, que habitan en diferentes nichos ecológicos como el agua, tierra y vegetación y forman parte de la microbiota intestinal de seres humanos y animales (1).

En el transcurso de los años, su taxonomía ha sufrido cambios importantes. Sin embargo, se considera que las Enterobacterias se caracterizan por poseer tradicionalmente los siguientes marcadores: tinción de gram negativa, ausencia de flagelos, antígeno común enterobacteriano positivo, son oxidasa negativos, catalasa positivos, tienen la prueba de nitrato reductasa positiva, utilizan la glucosa, el manitol y la xilosa y genéticamente su contenido de guanina + citosina es del 38 al 60% (2).

El orden Enterobacterales engloba a 60 géneros bacterianos, los cuales han sido agrupados basándose en sus relaciones filogenéticas. Es así como su división taxonómica actual incluye a siete familias que se describen a continuación: *Budviciaceae*, *Morganellaceae*, *Hafniaceae*, *Yersiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Erwiniaceae* y *Enterobacteriaceae* (3). Las familias de mayor importancia para la medicina humana son *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae* y *Yersiniaceae*, las cuales están asociadas con una gran variedad de síndromes clínicos como enteritis transmitida por alimentos, enfermedades zoonóticas e incluso brotes de peste bubónica (1).

La familia *Enterobacteriaceae* agrupa a los géneros *Atlantibacter*, *Buttiauxella*, *Cedeea*, *Franconbacter*, *Kluybera*, *Kosakonia*, *Lecleria*, *Lelliottia*, *Mongrovibacter*, *Pluralibacter*, *Raoultella*, *Shinwella*, *Siccibacter*, *Trabulsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella* y *Yokenella*, de los cuales los géneros *Salmonella* y *Shigella* son reconocidos patógenos primarios, causantes de infecciones gastrointestinales, mientras que el género *Escherichia* spp., con su especie tipo *Escherichia coli*, y los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* tienen una gran importancia en la medicina, ya que causan una variedad de infecciones en el ser humano (1, 4). Se estima que el 70% de los aislados bacterianos de los laboratorios de microbiología, corresponden a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos géneros integrantes pueden causar una gran variedad de infecciones, tanto de origen comunitario, como intrahospitalarias (1).

4.2. Enterobacteriales productores de carbapenemasas

4.2.1. Definición

Los carbapenémicos, son un grupo de antimicrobianos que pertenecen a la familia de los β -lactámicos. Imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem pertenecen a este grupo y han sido considerados debido a su amplio espectro como fármacos de última elección para el tratamiento de bacilos gram-negativos multirresistentes (5).

Su mecanismo de acción radica en su alta afinidad por las enzimas conocidas como PBPs (penicillin binding proteins, por sus siglas en inglés), las cuales participan en el ensamblaje de los peptidoglucanos. Se unen particularmente a los residuos de serina que forman parte de las PBPs y una vez en el sitio de acción inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, impidiendo un ensamblaje adecuado, debilitando la pared celular y causando la lisis bacteriana, por lo cual son considerados antimicrobianos con efecto bactericida (5–7).

Los Enterobacteriales son considerados sensibles a los carbapenémicos, sin embargo, en las dos últimas décadas se ha observado un incremento en la resistencia a estos antimicrobianos en este grupo bacteriano, lo cual constituye un grave problema de Salud Pública, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a los Enterobacteriales resistentes a los carbapenémicos (ERC) dentro de la lista de patógenos con prioridad crítica para investigación (8).

La resistencia a los carbapenémicos está causada principalmente por dos mecanismos. El primer mecanismo involucra la presencia de enzimas β -lactamasas de espectro extendido, también conocidas como BLEEs o enzimas β -lactamasas de tipo cefalosporinas conocidas como AmpCs, las cuales asociadas a mutaciones estructurales le confieren impermeabilidad y generan resistencia a los carbapenémicos. El tipo de resistencia generada por este mecanismo es generalmente considerada de bajo nivel. El segundo mecanismo de resistencia a los carbapenémicos involucra la modificación enzimática del antimicrobiano a través de la producción de enzimas que tienen esta capacidad, estas enzimas se conocen con el nombre de carbapenemasas y constituyen actualmente el principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos (9).

De acuerdo con la clasificación de Ambler basada en la secuencia de los aminoácidos, las carbapenemasas están incluidas en tres de los cuatro grupos de esta clasificación: Carbapenemasas clase A, B y D, cuyas características se detallan a continuación (10, 11):

Carbapenemasas clase A

Las enzimas pertenecientes a este grupo comparten un grupo serina en su sitio activo el cual le confiere las propiedades a esta enzima. Tienen localización cromosómica o plasmídica y son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas, incluyendo los nuevos avibactam, relebactam y vaborbactam (10).

Dentro de este grupo se encuentran la carbapenemasa SME (enzima de *Serratia marcescens*), de origen cromosómico, IMI (β -lactamasa que hidroliza el imipenem), GES (β -lactamasa de espectro extendido de Guyana) y la menos comunes, la enzima SFC (*Serratia fonticola* carbapenemasa), BKC (Brazilian *Klebsiella* carbapenemasa), BIC (Bicetre carbapenemase) y FRI (Imipenemasa francesa) (10).

En el grupo de las serin-carbapenemasas también se encuentra la KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que es reconocida como la carbapenemasa con mayor relevancia clínica (12). La diseminación mundial de esta carbapenemasa ha sido asociada a la diseminación exitosa de un clon epidémico perteneciente a la secuencia tipo (ST) 258 y a las cepas relacionadas al complejo clonal (CC) 258. Este clon ha sido descrito como de virulencia moderada, pero tiene co-resistencia a otros antimicrobianos como los aminoglucósidos, quinolonas, trimetoprima y sulfonamidas (13).

El transposón Tn4401 constituye el contexto genético más frecuente del gen *bla*_{KPC}, el cual se encuentra delimitado por dos secuencias de inserción ISKpn6 e ISNKpn7, junto con genes que codifican transposasas y resolvasas, principalmente en Europa y Estados Unidos, mientras que el Tn 1721 ha sido reportado en China (14,15).

Carbapenemasas clase B

Las metalo- β -lactamasas (MBLs), pertenecen a la clase B de la clasificación de Ambler. Su mecanismo de acción depende la interacción de los β -lactámicos con iones zinc en el sitio activo de la enzima, lo cual resulta en su característica inhibición por EDTA, un quelante del zinc y otros cationes divalentes. Tienen un amplio espectro de acción que incluye cefalosporinas y penicilinas, sin embargo, excluye a los monobactámicos (p.ej. aztreonam). Este grupo de carbapenemasas no son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas (10).

Las enzimas de clase B, pueden ser subdivididas en tres subclases, B1, B2 y B3, basadas

en la secuencia de aminoácidos en el sitio activo, los ligandos de zinc, la arquitectura del asa y el sustrato específico. Las subclases B1 y B3 necesitan dos iones de zinc en el sitio activo, los cuales deben estar coordinados para la actividad enzimática y tienen un amplio espectro de acción, que incluye a los carbapenémicos, mientras que la subclase B2 tiene actividad exclusiva contra los carbapenémicos (16).

Las primeras MBLs estudiadas se detectaron en bacterias oportunistas como *Bacillus cereus*, *Aeromonas* y *Stenotrophomonas maltophilia* y tienen localización cromosómica. Su prevalencia es baja y está relacionada directamente con la prevalencia de la especie productora (10).

La primera MBL de origen plasmídico descrita fue IMP-1, obtenida de un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* en Japón en 1991 y posteriormente se describieron en otras especies como *S. marcescens* (10).

En contraste con lo mencionado anteriormente, en los últimos años se ha observado un incremento y diseminación de familias de MBLs adquiridas o transferibles, las cuales incluyen a VIM (Verona integron encode metallo- β -lactamasa), IMP (active on imipenem), GIM (German imipenemase) y SIM (Seoul imipenemase), localizadas en integrones y que han sido incorporadas en plásmidos o transposones, haciendo la transferencia entre bacterias muy factible (10,16).

Carbapenemasas clase D

Las enzimas de la clase D, son serino β -lactamasas, con capacidad hidrolítica para la oxacilina, por lo cual también se conocen con el nombre de oxacilinasas. Estas enzimas tienen la habilidad de mutar rápidamente y expandir su espectro de actividad, por lo cual es la familia más diversa de β -lactamasas descritas según la clasificación de Ambler (17). Las oxacilinasas más prevalentes de este grupo con capacidad de hidrolizar los carbapenémicos, son las enzimas OXA-48 y OXA 181 (18).

OXA-48 tiene una estructura dimérica con dos subunidades, similar a las enzimas OXA-10, OXA-13 y OXA-46, posee capacidad hidrolítica contra cloxacilina, oxacilina y carbapenémicos, y no es inhibible por EDTA, característicamente no tiene actividad hidrolítica contra las cefalosporinas (17). Su transmisión ha sido asociada a plásmidos como IncL, IncA/C, IncF, ColKP3, ColE2, IncX3, IncN1 e IncT y en contraste con otras oxacilinasas, los genes tipo *bla*_{OXA-48} no se han

asociado a integrones de clase 1 (17,19).

OXA-48 fue detectada por primera vez en Turquía en el 2001 (19) y actualmente, esta enzima predomina en países como Turquía, Oriente Medio, África del norte y en ciertos países de Europa. Incluso Turquía, ha sido considerado como un importante reservorio productor de enzimas tipo OXA-48 (p.ej. la OXA-181 y la OXA-232), es así como también se ha observado un incremento en casos de coproducción de OXA-48/NDM en diferentes huéspedes y en varios STs, como el ST 14 y el ST 307 (17, 20). La enzima OXA-232 asociada al ST 2096 en *K. pneumoniae*, se ha asociado con alta mortalidad y altas resistencias antibióticas y es el clon predominante en bacteriemias en Turquía (20).

La detección en el laboratorio de microbiología de las enzimas OXA-48 constituyen un reto, ya que típicamente presentan bajo nivel de resistencia, por lo cual requieren de un alto grado de sospecha, además que no existen pruebas de laboratorio simples basados en la sinergia y debido a la baja expresión de esta oxacilinasas en las pruebas bioquímicas, tienen un alto número de resultados falsos negativos, haciendo que estas enzimas pasen desapercibidas e impactando en la epidemiología y directamente en el tratamiento de los pacientes (17).

4.2.2. Epidemiología de los EPC

En los últimos años el incremento de infecciones causadas ERC sobre todo aquellas mediadas por producción de carbapenemasas, ha causado preocupación a nivel mundial por su alta morbilidad y mortalidad asociadas y es así que la OMS ha incluido a estos microorganismos dentro de la lista de patógenos resistentes cuya investigación debe ser priorizada (21), de igual manera el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), ha considerado a los ERC como una amenaza urgente a la Salud Pública (22).

La distribución de los EPC es muy variable y su prevalencia depende de la región estudiada. De acuerdo con el estudio multicéntrico EuSCAPE (European survey of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*) que incluyó a 36 países del continente europeo y que vigiló la resistencia mediada por carbapenemasas en *K. pneumoniae* y *E. coli* en el año 2013-2014, estimó la tasa de infecciones por estos microorganismos en 1,3 por 10.000 admisiones, siendo Grecia, Italia, Montenegro, España y Serbia los países con las mayores incidencias declaradas (23).

De acuerdo a datos proporcionados por la Red Europea de vigilancia de genes asociados

a resistencia antimicrobiana (European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network, EURGen-Net), que forma parte del proyecto de Vigilancia Europea de Enterobacterias productoras de carbapenemasas (“European Survey of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae”, EuSCAPE) establecido en el 2017 por el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), determinó la situación de EPC como preocupante, ya que 11 de los 37 países vigilados, mostraron un incremento alarmante en la prevalencia de estos microorganismos multirresistentes (MDR) durante el período 2015 al 2018 (24). Si bien la situación no es homogénea para todos los países, Grecia, Italia, Malta y Turquía han sido catalogados epidemiológicamente como zonas endémicas de CPE (24). *K. pneumoniae* productora de KPC es la enzima más prevalente en el continente europeo, siendo Italia, Israel, Grecia y Portugal los países con las mayores prevalencias, mientras que en Turquía la enzima OXA-48 predomina ampliamente (17).

El incremento de la resistencia a carbapenémicos en América del Norte y particularmente en Estados Unidos, está relacionado directamente con la emergencia y diseminación de genes tipo KPC, enzima que fue descrita por primera vez en el 2001 en un aislamiento en un paciente en Carolina del Norte (25) y que se diseminó rápidamente en los hospitales de la Costa Este de los Estados Unidos. En el 2000, se desarrolló la variante KPC-3 en Estados Unidos y con ello la incidencia se incrementó sustancialmente y es actualmente la variante más prevalente en este país, la cual está asociada genéticamente con un clon hipervirulento, el cual también es prevalente en Israel (26).

En el Oriente Medio, una epidemia significativa de EPC tipo KPC se desarrolló, principalmente en Israel, país en el cual una estrategia de intervención nacional se implementó desde el 2007 después de numerosos brotes, con lo cual se redujo de 55,5 casos / 100.000 hospitalizaciones a 4,8, los casos de infecciones intrahospitalarias causadas por EPC (26). Sin embargo, actualmente, este país es considerado una zona hiperendémica para estos MDRs (27).

Las MBLs predominan en Asia, especialmente en países como India, Pakistán y Bangladesh donde la enzima NDM-1 está ampliamente distribuida. Las NDMs, incluso han sido detectadas en las aguas residuales y agua potable en Mumbai, India, lo cual explica un poco la magnitud del problema. En un reciente estudio realizado en Mumbai, también se demostró que el 19,81% de las NDMs, tenían otras carbapenemasas asociadas como OXA-48 o VIM-1, agravando la situación (28).

En América Latina prevalece la carbapenemasa KPC con sus diferentes variantes (12). Esta serín-carbapenemasa ha sido descrita casi en todos los países de la región. La primera carbapenemasa reportada en América del Sur, data del año 2005 en Colombia, en dos aislados de *K. pneumoniae* (29). Posteriormente en el 2008, se describe en este mismo país la aparición de KPC-3 en un paciente proveniente de Israel. Este aislado detectado era genotípicamente indistinguible de los que causaron múltiples brotes en este país europeo (12, 30).

Brasil, también describió a partir de estudios retrospectivos, aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC, desde el 2005 en las ciudades de Sao Paulo y Florianópolis (30) y diversos estudios moleculares han demostrado la diseminación predominante del complejo clonal CC 11/258 (ST 11, ST 258, ST 437 y ST 340), recolectados a partir de diversas muestras clínicas (12).

En el último tiempo, Argentina ha descrito un cambio epidemiológico importante en el contexto clínico. En este país predominaba la variante KPC-2, pero actualmente se reporta la presencia de linajes más virulentos de cepas *K. pneumoniae* hiper mucoviscosa ST25 y ST11, junto con la emergencia de clones de alto riesgo como el ST307, portador del gen *bla*_{KPC-3} (31).

Epidemiología EPC en Ecuador

En el año 2010 se detectó la primera carbapenemasa en Ecuador en un aislado de *K. pneumoniae* productor de KPC-2 y a partir de ese momento y durante el período 2010-2013 se describió la prevalencia exclusiva de esta variante en las ciudades más importantes del país (Quito, Cuenca y Guayaquil) (32). En el 2013, se describe un brote nosocomial de larga duración (2012-2013) el cual reveló la presencia predominante de *K. pneumoniae bla*_{KPC-5}, con predominio del ST 25 y en menor proporción el ST 258 (33). La presencia del ST25 descrito en esos años en Ecuador, difería con la epidemiología del resto de países latinoamericanos en los que el ST 258 era descrito como predominante (34). Durante los primeros años subsecuentes a la aparición de la primera carbapenemasa, los estudios apuntaban a una diseminación policlonal y horizontal de estas enzimas principalmente ligado a la presencia de *K. pneumoniae bla*_{KPC} (33,35).

A partir del 2016, la resistencia a carbapenémicos mediada por carbapenemasas en Enterobacterales aumenta sustancialmente en el país llegando a alcanzar valores del 37,3%, siendo *K. pneumoniae bla*_{KPC} ST 258 la responsable de estas cifras y ya se habla de una diseminación clonal de esta cepa, prevaleciendo sobre las otras secuencias tipos previamente reportados (36).

Actualmente, según datos del Centro Nacional de Referencia en Resistencia Antimicrobiana la incidencia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos se estima en un 30%, siendo la KPC la enzima más prevalente, la cual ha sido detectada en diferentes Enterobacterias como *E. coli*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *K. oxytoca*. En menor prevalencia se encuentran las enzimas NDM y OXA-48, mientras que enzimas como VIM e IMP también han sido informadas en aislados de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* respectivamente, pero en casos excepcionales (37–40).

La primera NDM reportada en Ecuador, fue en la ciudad de Guayaquil en un aislamiento de *Providencia rettgeri* (41), mientras que la enzima OXA-48 se describió en el país en el 2016 en un aislamiento de *K. pneumoniae* ST 307 obtenida de un paciente procedente de Ucrania (42). En diciembre de 2017 se describe un caso de infección por *Raoultella ornithinolytica* OXA-48 el cual originó un brote en la ciudad de Quito y Santo Domingo de los Tsáchilas durante el 2017-2018 (43, 44).

Durante la pandemia de COVID-19, Ecuador fue uno de los países que declaró un incremento sustancial de *K. pneumoniae* no sensible a meropenem (39%) y se realizan los primeros informes de aislados clínicos con coproducción de carbapenemasas como KPC+NDM y KPC +OXA-48 (45, 46).

4.3. Colistina

4.3.1. Generalidades

Colistina, también denominada Polimixina E, es un polipéptido catiónico de origen no-ribosomal producido por *Paenibacillus polymyxa* (antiguamente *Bacillus polymyxa*), el cual fue descubierto en Japón en 1949 (47). Es un antimicrobiano que pertenece a la familia de las polimixinas, la cual incluye a polimixina A, B, C, D y E, de las cuales únicamente polimixina B y E (colistina) tienen utilidad clínica. Los dos compuestos químicos disponibles de este antimicrobiano incluyen el metasulfonato de colistina, que es una prodroga que se utiliza para administración parenteral y el sulfato de colistina de administración oral, tópica e inhalatoria (48).

Las polimixinas comparten una estructura similar, son polipéptidos catiónicos que consisten en un heptapéptido cíclico ligado a un tripéptido lineal, cuyo extremo N-terminal es acilado con una cadena lateral de ácidos grasos. Fue primeramente utilizada en medicina humana y veterinaria, pero entre los años 70 y 80, su uso médico fue vetado por su nefro y ototoxicidad ,

sólo persistiendo el uso veterinario (47).

En los últimos años, su uso fue acogido como uno de los últimos antimicrobianos disponibles para tratar infecciones por bacilos gram-negativos multirresistentes, como Enterobacteriales productores de carbapenemasas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (49). Es así como la OMS lo clasifica dentro de la categoría de “fármacos con alta importancia en la medicina humana” (50). Es considerado por la Agencia Europea de Medicina (The European Medicines Agency. EMA) como un antibiótico de importancia crítica para la medicina humana (Categoría B. Uso restringido), lo cual implica que su administración en medicina veterinaria debe estar limitada para reducir el daño a la Salud Pública. Esta categoría incluye drogas como las quinolonas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Los antibióticos dentro de la categoría B, deben ser reservados para el tratamiento cuando antimicrobianos de la categoría C o D no son efectivos y no existe otra alternativa, además que su uso debe estar basado en los resultados de las pruebas de sensibilidad antibiótica (51).

4.3.2. Mecanismos de acción

Colistina se une primariamente a la membrana externa (ME) de las bacterias gram-negativas, específicamente a los lipopolisacáridos (LPS). Los LPS tienen tres regiones, la más interna denominada lípido A (LA), la región central de oligosacáridos y la región más externa que corresponde a la cadena de antígeno O. El lípido A tiene un papel fundamental en la estabilización de toda la membrana externa permitiendo su enlace a las cadenas de ácidos grasos y contribuyendo a la rigidez de la ME, adicionalmente es un compuesto fundamental para el intercambio celular y la permeabilidad bacteriana. Adicionalmente, cationes divalentes como el calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) facilitan las conexiones adyacentes entre las moléculas de LPS contribuyendo también a la estabilidad de la ME (52).

La actividad antimicrobiana de la colistina surge de los intercambios electrostáticos entre los residuos catiónicos Dab (ácido L-diaminobutírico) de colistina, los cuales son compuestos anfipáticos que desplazan competitivamente a los cationes divalentes de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) y permiten que la colistina se una a través de su cadena de ácido graso terminal (hidrofóbica) por enlaces electrostáticos a los grupos fosfato del LA, cargados negativamente (53, 54) La colistina tiene acción antimicrobiana a través de cinco mecanismos, que se describen a continuación:

Mecanismos de lisis de la membrana celular

Este constituye el mecanismo más clásico de acción de la colistina, el cual ocurre por la interacción entre los grupos fosfatos cargados negativamente del LA y los residuos Dab de la colistina cargados positivamente. A través de esta interacción, los cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} son desplazados y se desestabiliza el LPS, posteriormente la colistina agranda la ME e introduce su segmento D-Leu6-I-Leu7 o su cadena de ácido graso terminal hidrofóbica, lo cual aumenta la permeabilidad de la membrana, facilitando la auto captación de colistina a través de las zonas desestabilizadas de la ME. En última instancia, la membrana interna bacteriana (MI) compuesta por una bicapa de fosfolípidos se daña por el adelgazamiento de la membrana, lo que genera el debilitamiento y pérdida de la integridad de la MI ocasionando la lisis celular(55).

Mecanismo de contacto vesícula-vesícula

Un mecanismo alternativo que contribuye a la actividad antimicrobiana de colistina involucra el contacto vesícula-vesícula. En este proceso, se facilita el contacto entre la capa externa de la membrana citoplasmática y la capa interna de la ME, a través de vesículas de fosfolípidos aniónicos. Esta interacción promueve el intercambio de fosfolípidos entre vesículas lo que lleva a una pérdida de especificidad de la composición de fosfolípidos y se produce una alteración del equilibrio osmótico de la célula desencadenando la lisis celular (56).

Mecanismo de los radicales hidroxilos

Este mecanismo involucra la activación de la muerte celular por la vía de los radicales hidroxilos. En el interior de la célula bacteriana, colistina produce especies de oxígeno reactivos como superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) e hidroxilo (HO) lo cual causa estrés oxidativo, produciendo daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, y lípidos. Una vez en el interior de la célula, colistina promueve la producción de O_2^- , el cual se transforma en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa. La presencia de H_2O_2 promueve la producción de hierro férrico (Fe^{3+}) por oxidación del hierro ferroso y dispara la reacción de Fenton, causando la producción de HO. Este daño oxidativo ocasionado por las especies de oxígeno reactivo daña los compuestos celulares y conduce a la muerte celular (56).

Mecanismo de inhibición de la vía respiratoria

Este es un mecanismo secundario recientemente descubierto, el cual consiste en disparar las enzimas respiratorias localizadas en el interior de la MI de las bacterias gram-negativas, específicamente la enzima respiratoria oxidorreductasa NADH tipo II, la cual es un objetivo para la

colistina. Esta enzima está localizada en el sistema de transporte de electrones en el interior de la MI pero no bombea activamente protones al interior de la MI, a diferencia de las NADH tipo I. Colistina inhibe esta enzima estimulando la cadena respiratoria y acelerando así su consumo. Esta inhibición altera el sistema de transporte de electrones bacterianos, perjudicando la función respiratoria y comprometiendo la viabilidad bacteriana (57).

Mecanismo antitoxina

Colistina interactúa con el lípido A del LPS, con lo cual interactúa eficazmente con la endotoxina neutralizando la molécula de LPS e inhibiendo indirectamente su actividad. Las endotoxinas pueden desencadenar respuestas inflamatorias tras la infección liberando citoquinas como la interleucina-8 o el factor de necrosis tumoral alfa, lo cual puede conducir a shock séptico (58).

4.3.3. Uso en medicina veterinaria

Actualmente, colistina es un antimicrobiano ampliamente utilizado en medicina veterinaria, principalmente en cerdos para el tratamiento de infecciones intestinales causadas por Enterobacterales. La administración de antibióticos en animales de granja soporta su crecimiento y su producción, permitiendo una exitosa ganancia de peso y densidad animal y probablemente tenga un impacto económico en el control de infecciones causadas por *E. coli* y la toxina Vero (48).

Colistina se administra por vía oral en el agua la comida en la industria porcina, cuando es utilizada con fines profilácticos. Este antimicrobiano se absorbe pobremente en el tracto gastrointestinal, con lo cual se ejerce una presión selectiva en la microbiota intestinal de los animales, seleccionando microorganismos resistentes (48). Esta práctica involucra que todos los animales, tanto enfermos como sanos estén expuestos a la droga, por lo que el uso de colistina con fines profilácticos conlleva un alto riesgo para la emergencia de resistencia, por lo cual su uso debería ser limitado exclusivamente al manejo clínico en veterinaria (51).

La transmisión de aislados resistentes a colistina con producción de MCR-1, plantea interrogantes sobre el uso de colistina en medicina veterinaria y su impacto en la salud humana (59). Adicionalmente, Italia, ha descrito la detección de cepas de *E. coli* resistentes a colistina en conejos salvajes que no habían sido tratados previamente con colistina (60), consecuentemente la fauna salvaje también juega un rol en la transmisión de la resistencia a colistina, convirtiéndose en un potencial reservorio en el ambiente y contribuyendo a la transmisión a otros animales y/o al

humano a través del agua o comida contaminada o con el contacto humano directo (59, 61).

Bacterias resistentes a colistina han sido detectadas en la naturaleza, agua, aves migratorias y vegetales (54). Por lo tanto, la ecotoxicidad de este antimicrobiano y su impacto en el ambiente también deben ser tomados en consideración. La colistina en altos niveles en el agua de desecho de las granjas porcinas está relacionada con la toxicidad observada en las bacterias responsables de oxidar el amonio. La biotransformación de sustancias xenobióticas junto con la transformación química en nitritos del agua de desecho en las plantas de tratamiento es asegurado por las bacterias responsables de la oxidación del amonio (62). Por lo tanto, el daño eco tóxico causado por la toxicidad generada por la eliminación de la colistina en las aguas residuales revela toxicidad del ambiente. Otro efecto de la ecotoxicidad es el daño observado en el epitelio intestinal de la lombriz de tierra *Eisenia fetida*, causado también por la eliminación de colistina en aguas residuales (63). Debemos recordar que los antibióticos no son metabolizados al 100% y sobre todo con antibióticos como colistina, la cual tiene pobre absorción oral y gran parte de la forma activa es eliminada en heces y orina.

4.3.4. **Colistina. Mecanismos de resistencia**

La resistencia a colistina puede ser explicada por una variedad de mecanismos, que básicamente se dividen de acuerdo con su origen: los de tipo cromosómico y los de tipo plasmídico.

Resistencia cromosómica

La actividad antimicrobiana de la colistina radica en la capacidad de modificar el LPS a través de una sustitución catiónica. Las células pueden mitigar la interacción de la colistina con el LPS alterando el lípido A. Esta modificación involucra la inclusión de restos catiónicos como la fosfoetanolamina (PEtN) y la 4-aminio-4desoxy-L-arabinosa (L-Ara4N) (64). La adición de estos restos catiónicos al LPS es conseguida usando los sistemas regulatorios complementarios (TCSs). Alteraciones en este sistema, probablemente a nivel genético, conllevan a una activación constitutiva o desrepresión del sistema, produciendo un número incrementado de estos restos catiónicos en el LPS, lo cual produce una disminución de la carga negativa neta de la ME y de esta forma inhiben la acción de la colistina (53).

Los dos componentes de este sistema regulatorio son: PmrA-PmrB (PmrAB) y PhoP-PhoQ (PhoPQ). El sistema PmrAB está codificado por el operón *pmrCAB* y es activado por PhoPQ, sirve como regulador clave que apoya la modificación de lípidos en bacterias gram- negativas . En

condiciones de crecimiento bajo de Mg^{2+} o exposición a concentraciones subletales de péptidos antimicrobianos catiónicos como la polimixina, se activa el sistema PhoPQ. La quinasa sensora PhoQ fosforila la respuesta del regulador PhoP que posteriormente utiliza la proteína PmrD activada por PhoP para activar *pmrAB* (65).

PmrD es una pequeña proteína que conecta los dos sistemas TCSs: PmrAB y PhoPQ. PmrD se une a la forma fosforilada de PmrA con la consecuente activación de PhoP. La forma fosforilada activa de PmrA la protege de la desfosforilación resultante de su unión con el blanco *pmrHFI-JKLM*, el cual es un operón promotor de genes responsables de la modificación de los LPS (65). En *Salmonella spp* se ha demostrado que la multiplicación de los genes *pmrD* correlaciona positivamente con resistencia a colistina, sin embargo, no se ha descrito este mecanismo en *E. coli*, además que PmrD no está presente en todos los Enterobacteriales (66).

En respuesta a concentraciones intracitoplasmáticas de Fe^{2+} y pH ácido, la enzima sensora quinasa PmrB facilita la fosforilación del regulador de respuesta PmrA, lo cual da como resultado la transcripción de genes activados por PmrA como *arnBC* TEFF y *pmrE*, lo cual facilita la modificación de LPS adicionando L-Ara4N y reprimiendo los genes de represión *PmrA*. Estas modificaciones orquestadas por los sistemas PmrAB y PhoPQ ocasionan que la carga negativa de los LPS decrezca, con lo cual previenen las interacciones electrostáticas de la polimixina (53).

En total, existen dos puntos calientes para mutaciones en el gen *PmrA* lo cual afecta los aminoácidos G53 y R81 dentro del dominio del receptor del fosfato (REC) que ha sido identificado en Enterobacteriales. Mutaciones en la posición G53 han sido confirmados experimentalmente como mediadores en la resistencia a colistina (67). *E. coli* y *Salmonella spp* exhiben la mayoría de las mutaciones que permiten la resistencia a la colistina en los genes *PmrAB*, predominantemente en la histidina-quinasa PmrB. En contraste pocas alteraciones genéticas han sido descritas en este punto en *Klebsiella spp* (68).

Se ha demostrado que la quinasa PhoQ responde a bajas concentraciones ambientales de Mg^{2+} , cambios en el pH y a la presencia de péptidos antimicrobianos, los cuales resultan en la activación y fosforilación del sistema regulador PhoP, el cual controla la expresión de los genes involucrados en el sistema de transporte de Mg^{2+} y la modificación de los LPS (54).

Sistema regulador MgrB

MgrB es un péptido regulador transmembrana de 47 aminoácidos, que es producido durante la activación del sistema PhoPQ. Este péptido previene la fosforilación de PhoP, probablemente por la supresión de la PhoQ quinasa o promoviendo la fosfatasa. La fosforilación de PhoP, se ha encontrado que aumenta la transcripción del gen *mgrB*. Alteraciones en el dominio periplásmico de PhoQ, MgrB actúan como un sistema inhibidor de retroalimentación negativa del sistema PhoPQ en diferentes bacterias (52).

Dentro de las alteraciones genéticas en el *mgrB*, se han descrito, mutaciones sin sentido, missense, deleciones de nucleótidos individuales o deleciones enteras del locus *mgrB* así como inserciones de aminoácidos o elementos de inserción. Casi cualquier posición de este gen puede ser alterado, lo cual lleva a una inactivación funcional del péptido, llevando a una desregulación del sistema PhoPQ, lo cual activa el sistema Pmr responsable de la modificación de los LPS (69).

Sistema CrrAB

CrrA y CrrB pertenecen a un sistema TCS, el cual ha sido investigado en el contexto de la resistencia a colistina en *K. pneumoniae*. El rol fisiológico de TCS es todavía desconocido. El operón *crrAB* es variablemente expresado en *K. pneumoniae* y ha sido también encontrado en *Enterobacter* spp., pero no se lo ha encontrado en el cromosoma de *E. coli*. Se ha descrito que mutaciones en *CrrB* incrementan la expresión de *CrrC*, que regula positivamente el PmrAB TCS, lo cual resulta en una elevada transcripción del gen *pmrC* y del operón *prHFIJKLM*, que afecta directamente el CrrAB TCS (53).

Mecanismos de resistencia propios de K. pneumoniae

Específicamente en *K. pneumoniae*, dos mecanismos de resistencia han sido descritos, los cuales no están basados en mutaciones genéticas. La sobreproducción del polisacárido capsular aniónico impide que las polimixinas alcancen su objetivo en la ME, causando resistencia. Adicionalmente la sobreexpresión de los sistemas de eflujo como AcrAB y KPNEF, han sido también sugeridos como mecanismos efectivos para expulsar el antibiótico desde su interior (53,54).

Resistencia plasmídica

Antes del 2015, la resistencia a colistina era principalmente de origen cromosómico, y no fue hasta el año 2015 cuando se informó por primera vez en China la presencia del gen *mcr-1* en

aislados de *E. coli* obtenidos de animales de consumo y su carne. Estos genes tienen localización plasmídica, con lo cual se favorece la resistencia a colistina por transferencia horizontal (70). Estos genes codifican para una enzima que pertenece a la familia de las etanolaminas transferasas, que provoca cambios en el LA a través de la adición del metabolito de fosfoetanolamina, suprimiendo de esta forma la unión del LA con la colistina. Según estudios realizados, la presencia del gen *mcr* puede incrementar en 4-8 veces las concentraciones inhibitorias mínimas en *E. coli* (71).

Después de la descripción de este mecanismo de resistencia en China, el gen *mcr-1* ha sido descrito en varias partes del mundo y en varias especies de Enterobacterias, adicionalmente se han descrito múltiples variantes del gen *mcr-1* y ha sido notable el incremento de descripciones de este gen en aislados de *E. coli* a partir de animales domésticos, principalmente cerdos y pollos, los cuales han sido catalogados como reservorios de este mecanismo de resistencia (72).

Luego de la aparición del gen *mcr-1*, se describe en Bélgica el gen *mcr-2* en *E. coli* y *Salmonella* spp, a partir de cerdos, y pollos (73). *Mcr-3* aparece en humanos y animales en *E. coli*, *Proteus* spp. y *Aeromonas* spp. en países de Europa, Asia y Sudamérica. Hasta el momento se han descrito 10 variantes de este gen, las cuales están distribuidas heterogéneamente alrededor del (74,75). Comparaciones en las secuencias de las variantes descritas, reflejan variabilidad entre ellas. Específicamente, el gen *mcr-1* comparte una identidad en la secuencia aminoacídica con *mcr-2* del 81%, con *mcr-3* del 34%, *mcr-4* del 33%, *mcr-5* del 31%, *mcr-6* del 82%, *mcr-7* del 29% y *mcr-8* del 31% (76). Estos genes y sus variantes se encuentran en un 91% en aislados de *E. coli*, seguido por *Salmonella enterica* con un 7% y *K. pneumoniae* con un 2% de frecuencia, aunque también han sido descritos en *Cronobacter sakazakii*, *Shigella sonnei*, *Moraxella* spp., *Proteus mirabilis* y otras especies de *Enterobacter* spp., lo cual se estima en un 0,2%, aproximadamente (77).

El riesgo del gen *mcr*, está relacionado directamente por la posibilidad de la transmisión horizontal y esto está ligado fundamentalmente a su diseminación a través de fuentes alimentarias y animales, debido a la utilización de este antimicrobiano en medicina veterinaria (53,74)

Entre los plásmidos asociados a la diseminación de los genes *mcr* se incluyen IncX4, IncHI1, IncHI2, IncP, IncP, IncIY, IncN, IncQ e IncY, entre los que IncI2 e IncX4 son los más prevalentes, incluso estos dos últimos plásmidos han sido considerados epidémicos. La movilidad

del gen *mcr* está acompañada por una secuencia de inserción (IS), cuya distribución es variable dentro de la familia de genes *mcr* (53).

4.3.5. **Epidemiología de la resistencia a colistina**

La resistencia global a colistina entre aislados clínicos de Enterobacterales entre 2012-2013 era de un 1,6% con una distribución regional de 1,6% en Europa, 1,3% en América del Norte, 1,5% en América del Sur, África y Oriente Medio del 14% y Asia del 1,3%, siendo *Enterobacter* spp. el género en el cual se observaba mayor resistencia, seguido por *K. pneumoniae* y *E. coli* (78).

En los años posteriores, de acuerdo con la base de datos ATLAS, la incidencia global en el período 2014-2019 se incrementó de un 2,6 a un 3,6%, siendo las regiones de Latinoamérica (2,7-4,3%) y Asia (3,3-6,7%) las que presentaron los mayores incrementos (68).

En el 2019, la resistencia a colistina en Enterobacterales en muestras clínicas en Asia, se estimaba en un 25,4%. Entre los mecanismos de resistencia cromosómicos que se describen se menciona a la disrupción del gen *mgrB*, así como mutaciones puntuales en MgrB, PhoQ y PmrB (68).

En América del Norte, la prevalencia total de resistencia a colistina entre aislados clínicos en Enterobacterales en el 2019, fue del 10,4% para *Enterobacter* spp., 0,8% para *Klebsiella* spp. y 0,3% para *E. coli*, mientras que, en América del Sur, según datos proporcionados por la base de datos ATLAS, se estimaba la resistencia a colistina en aislados clínicos de *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *E. coli* de un 12,8%, 3,5% y 0,3% respectivamente (68). Se estima que la prevalencia global del gen *mcr-1* es de 4.6% (79).

4.3.6. **Métodos diagnósticos para detección de resistencia a la colistina**

La resistencia a la colistina se está incrementando a nivel mundial, situación agravada por la presencia de los genes *mcr* de localización plasmídica por lo cual se requieren métodos de laboratorio adecuados que permitan detectar de una manera confiable y rápida los aislados resistentes. A continuación, se detallarán los métodos disponibles actualmente para determinar la resistencia a colistina.

Métodos fenotípicos

Métodos de vigilancia utilizando medios selectivos

Este sistema está basado en el cultivo, por lo tanto, una de sus principales desventajas radica en su tiempo de ejecución que puede requerir entre 18 a 48 h, además de la capacidad limitada para identificar el mecanismo de resistencia involucrado. Sin embargo, permite detectar todos los aislados resistentes a este antimicrobiano, incluyendo aquellos que posean mecanismos emergentes. Entre los medios de cultivo comúnmente utilizados se encuentran, SuperPolymixin™ (Elitech-Microbio, France), CHROMagar COL-Aspe (Francia) y el LBJMR medio (Lucie-Bardet-Jean_Marc-Rolain). La composición de estos medios incluye anfotericina que inhibe el desarrollo de hongos, vancomicina o daptomicina para inhibir el crecimiento de las bacterias gram-positivas y adicionalmente concentraciones bajas de colistina que permita detectar los aislados resistentes (52, 80).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es una técnica basada en cultivo, para lo cual se requiere un cultivo puro bacteriano. La técnica de microdilución en caldo es el método de referencia para obtener la CMI a colistina de acuerdo con el Instituto de Estandarización en Laboratorios Clínicos de Estados Unidos (CLSI, por sus siglas en inglés) y por el Comité Europeo en Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés). A partir del 2016, estas dos organizaciones reglamentaron que las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para colistina debían realizarse exclusivamente por esta metodología. Entre las recomendaciones que se indicaron, se incluía el uso de caldo Mueller-Hinton ajustado en cationes, el uso de metasulfonato de colistina, que las cubetas para el ensayo debían ser de poliestireno fondo plano y que ningún aditivo, en particular, el polisorbato-80 debía ser añadido en ninguna parte de la prueba. Esta técnica requiere de tiempo y experticia para su ejecución, pero existen alternativas comerciales disponibles como el sistema Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (81–83).

Espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción-ionización láser (MALDI-TOF)

Esta metodología ha ganado importancia actualmente, esta herramienta basada en la proteómica permite detectar modificaciones en el espectro proteico del lípido A. Un pico específico de 17962 m/z es observado en el espectrómetro. En los últimos años Dortet y cols., en el 2018, Desarrollaron el MALDIxin Test, que permite detectar el fenotipo de colistina-resistente en *E. coli* en 15 minutos e incluso diferenciar entre su origen cromosómico o plasmídico (84).

Prueba de Polimixina de Nordmann, Poirel (RPNP) para Enterobacterales

Esta prueba desarrollada por Nordmann y cols., permite la detección de la resistencia a

colistina de una manera rápida en aislados de Enterobacterales, su ejecución demora < 2 horas, y recae en un mecanismo basado en pH, y la detección se basa en el cambio de color (85).

Prueba de colistina spot

Esta metodología basada en cultivo consiste en inocular una suspensión bacteriana ajustada al 0,5 Mac Farland en un agar Mueller-Hinton que contiene colistina (16 mg/L). La interpretación de una prueba positiva se realiza con la presencia de crecimiento. Las desventajas de este método radican en la utilización de cultivos puros para su ejecución y requieren de 16-18 horas para obtener el resultado (86).

Métodos genotípicos

Entre los métodos disponibles actualmente se encuentra la secuenciación de genoma completo, el cual permite la identificación de mecanismos desconocidos y desconocidos en un tiempo máximo de 2 horas, dependiente del instrumento utilizado (83).

La reacción en cadena de la polimerasa es otro método utilizado que permite la detección de genes, entre las variantes descritas se encuentran PCR en tiempo real y PCR múltiple que permite detectar varias variantes de genes *mcr* (87). Una de las desventajas de este método, radica en que solo permite detectar los mecanismos de resistencia ya estudiados, sin embargo, son métodos muy sensibles, que pueden detectar incluso 10^1 o 10^8 copias de ADN (88).

Se ha descrito también la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés), en la cual se consigue amplificación del ADN con una temperatura estática. Esta técnica permite detectar con muy buena sensibilidad y en corto tiempo los genes *mcr*. Zou y cols., describieron una técnica para detectar el gen *mcr-1* en Enterobacterales, obteniendo resultados cromogénicos visuales, incluso demostraron que esta técnica era 10 veces más sensible que la PCR convencional (89). Zhong y cols., desarrollaron una técnica LAMP doble que permitía detectar los genes *mcr-2* y 5 y una LAMP triple que detectaba los genes *mcr-1*, 3 y 4 (90). Las ventajas de esta técnica radican en su corto tiempo de ejecución y que no requieren de instrumentos especializados, potenciando su utilidad como pruebas de cribado a la cabecera del paciente.

Entre las otras metodologías disponibles se encuentra el Microarray, el cual cuenta con

el sistema comercial disponible CT103XL (Check MDR) que permite detectar *mcr-1* y *mcr-2*, así como genes *bla*, entre las que se incluyen las principales carbapenemasas como GES, GIM, IMP, KPC, NDM, OXA-23, OXA-48, OXA-58, VIM y SPM (91). Las desventajas de esta técnica radican en su alto costo y el equipamiento necesario y la experticia requerida, además que solo permite detectar los genes incorporados en la plataforma. Sin embargo, posee alta flexibilidad para incorporar mecanismos de resistencia emergentes.

5. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

En el año 2017 la OMS incluyó a las EPC dentro de los 10 principales microorganismos cuya investigación debe ser urgentemente priorizada debido a su alta morbi-mortalidad (92), la cual puede alcanzar hasta el 50% según diversos estudios (93,94).

Las escasas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las infecciones por EPC y la poca accesibilidad en Ecuador a los nuevos antimicrobianos como ceftazidima- avibactam, obliga a mantener el uso de viejos antimicrobianos como la colistina, para lo cual se requieren de métodos de laboratorios que permitan determinar la susceptibilidad a este antimicrobiano de una manera confiable.

La resistencia a colistina mediada por impermeabilidad fue descrita por primera vez en el año 2010, sin embargo, en el 2015, se describió la aparición de resistencia a colistina de origen plasmídico en un aislado de *Escherichia coli* en China (70). Desde entonces este tipo de resistencia cobró importancia por la facilidad de transmisión. Actualmente diversos estudios han descrito una incidencia creciente de este fenotipo de resistencia a nivel mundial (75, 95).

Los estudios en Sudamérica sobre EPC-RC son escasos. El conocer los mecanismos moleculares que generan la resistencia a la colistina, así como los factores asociados permitirá determinar la magnitud del problema de EPC-RC en un país de recursos limitados, como Ecuador, lo cual permitirá generar estrategias que permitan el control de la diseminación de estos microorganismos multirresistentes .

Además de la resistencia creciente a colistina, existen problemas concernientes a las metodologías utilizadas para la determinación de la susceptibilidad a este antimicrobiano. En el año 2019, el EUCAST y el CLSI estandarizaron la metodología válida para realizar esta prueba e identificaron exclusivamente a la microdilución en caldo como el método de referencia. Las alternativas comerciales son escasas, por lo que la evaluación de un método fácil y confiable, de bajo coste para laboratorios de recursos limitados constituye una necesidad (83).

Hipótesis

Es posible que exista una alta prevalencia de Enterobacterales productores de carbapenemasa resistentes a la colistina, probablemente asociados a la diseminación de un clon exitoso de *K. pneumoniae bla KPC*

6. OBJETIVOS

General

El objetivo general de esta tesis es describir las características microbiológicas, moleculares y los factores de riesgo asociados a Enterobacterales productores de carbapenemasas resistentes a la colistina (EPC-RC), evaluando un método de laboratorio útil para su detección.

Específicos

Los objetivos específicos son:

1. Determinar la prevalencia y características microbiológicas de la resistencia a colistina en Enterobacterales productores de carbapenemasas en tres ciudades grandes de Ecuador y observar su variación desde el 2016 al 2022.
2. Describir la situación clínica-epidemiológica y los factores de riesgo relacionados con infección / colonización por EPC-RC en una ciudad grande de Ecuador.
3. Describir la epidemiología molecular de los aislados de EPC-RC.
4. Evaluar la concordancia categórica entre la microdilución en caldo y la técnica de dilución en agar.

7. METODOLOGÍA

Los cinco artículos que componen esta tesis doctoral se dividen en dos secciones: la primera que estudia la prevalencia, características microbiológicas y moleculares de EPC-RC además de los factores de riesgo asociados y que comprende la inclusión de cuatro artículos y la segunda parte que evalúa un método de laboratorio para la detección de la resistencia a colistina en EPC, que incluye un solo artículo. La metodología utilizada se va a detallar de acuerdo con las secciones anteriormente mencionadas.

De manera general, podemos mencionar que esta tesis doctoral incluyó el análisis de aislados de EPC-RC procedentes de diferentes unidades hospitalarias de Ecuador, los cuales fueron obtenidos en tres momentos diferentes de tiempo. El periodo 1 ocurrió desde febrero a abril de 2016 en muestras de hisopado rectal obtenidas de las unidades de terapia intensiva en siete hospitales de Guayaquil, el segundo período abarcó desde diciembre de 2019 a mayo 2020, e incluyó 5 hospitales de la ciudad de Guayaquil y el tercer período de enero a mayo de 2022, que incluyó pacientes hospitalizados en instituciones de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca, lo cual corresponde a las tres ciudades más importantes del país.

Sección 1. Prevalencia, características microbiológicas, moleculares de EPC-RC y factores de riesgo asociados.

Selección de aislados microbiológicos

Artículo 1. Se llevó a cabo un estudio multicéntrico en siete hospitales de segundo y tercer nivel de Ecuador, durante enero a mayo del 2022. Se incluyeron todos los aislados de Enterobacterales, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* no sensibles a carbapenémicos, aislados en cada unidad operativa durante el periodo de estudio obtenidos a partir de muestras clínicas con fines diagnósticos, las cuales fueron procesadas de acuerdo con los procedimientos de cada institución. Se utilizaron los puntos de corte descritos en el documento M100-S31 del CLSI para definir la resistencia a carbapenémicos. Se incluyeron todos los aislados que tuvieran resistencia a cualquier carbapenem estudiado (imipenem, meropenem o ertapenem). Se incluyó solo un aislado por paciente, prefiriendo los que provenían de sitios estériles o con el mayor perfil de resistencia

Artículo 2: Se realizó un estudio multicéntrico en seis hospitales de Guayaquil, se

incluyeron todos los aislados de Enterobacteriales no sensibles a carbapenémicos identificados por los laboratorios de cada institución, durante el período comprendido entre diciembre del 2019 y mayo del 2020.

Artículo 3: Este estudio de tipo retrospectivo, comprendió el estudio de 361 aislados de EPC-RC obtenidos durante los tres períodos de tiempo que duró la tesis doctoral, los mismos que se obtuvieron de diferentes ciudades de Ecuador.

Artículo 4: Este estudio se ejecutó con 10 aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de KPC, resistentes a colistina, obtenidos durante el segundo período de tiempo de estudio (2019-2020).

7.1. Selección de pacientes

Los datos de los pacientes incluidos en el artículo 2, correspondientes al análisis de los factores de riesgo se obtuvieron de los registros médicos electrónicos. Las definiciones de infección utilizadas fueron establecidas de acuerdo con el CDC.

Los casos fueron definidos como todo paciente infectado o colonizado con EPC-RC. Los portadores asintomáticos fueron considerados como colonizados. El grupo control consistió en aquellos pacientes en los que no se aisló EPC-RC.

7.2. Variables clínicas analizadas

Se estudiaron las siguientes variables sociodemográficas en el artículo 2, presencia de comorbilidades, entre las que se incluyeron: fallo renal, enfermedad cardiovascular, neoplasia, diabetes mellitus, enfermedad neurológica, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad del tejido conectivo y para/hemi/cuadriplejía, el índice de severidad de Charlson, inmunosupresión definida como positividad para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), neutropenia (contaje absoluto de neutrófilos <500 células/ μ l, tratamiento con esteroides (por lo menos 16 mg de prednisona/día por lo menos 5 días consecutivos), recibir quimioterapia o radioterapia, factor de necrosis tumoral positivo en los 3 meses precedentes, historia de trasplante de médula ósea.

Se incluyó la presencia de dispositivos médicos invasivos (catéter venoso central, drenajes externos, sonda vesical, fijadores externos, tubos de traqueostomía o gastrostomía) y exposición a antimicrobianos en los 90 días previos al aislamiento de EPC-RC.

7.3. Determinación de producción de carbapenemasa

Los Enterobacterales resistentes a carbapenémicos fueron cultivados en CHROMagar Super Carba (CHROMagar, Francia) mientras que los bacilos gram-negativos no fermentadores fueron cultivados en agar Mac Conkey para comprobar su pureza y viabilidad. Se incubaron a 37 °C por 16-18 horas.

Se confirmó la identificación por el sistema Vitek 2 Compact (BioMérieux, Francia) y por pruebas bioquímicas convencionales. La resistencia a los carbapenémicos fue confirmada por el método de difusión por disco al meropenem, siguiendo las indicaciones del CLSI.

Se realizó el método de inactivación de carbapenémicos (mCIM) para Enterobacterales y *P. aeruginosa*, siguiendo las recomendaciones del CLSI (81), mientras que para *A. baumannii* complex, se utilizó el método descrito por Zhang S y cols. (96).

7.4. Determinación genotípica de carbapenemasas

Los genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM* y *blaIMP* fueron estudiados en todos los bacilos gram-negativos productores de carbapenemasas confirmados por el método mCIM, con una PCR múltiple siguiendo metodología previamente descrita (97). Adicionalmente los genes *blaOXA-23-like*, *blaOXA-58* y *blaOXA-24/40-like* fueron estudiados *A. baumannii* complex (98). La extracción del ácido desoxirribonucleico se realizó por el método de columnas de sílica (Invitrogen/Thermo Fisher, Estados Unidos).

Se estudió la variable del gen (*blaKPC*) que fue el más prevalente, por secuenciación de Sanger, para lo cual el extracto de ADN fue remitido para su estudio a MacroGen Inc (Korea) utilizando los cebadores UNIKPCF y UNIKPCR (99).

7.5. Determinación de resistencia a colistina y presencia de gen *mcr-1*

La resistencia a colistina fue determinada por el método de microdilución en caldo, siguiendo la metodología descrita en el documento M07-A8 del CLSI (100). Se utilizó sulfato de colistina en grado analítico (Sigma-Aldrich Código 2700000) y caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido). El rango de concentraciones utilizadas fue de 0,5 a 4 mg/L y el punto de corte para definir resistencia fue de ≥ 4 mg/L. *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* BAA ATCC 1705 y *E. coli* AR Bank # 0349 fueron las cepas utilizadas para el

control de calidad.

La presencia del gen *mcr-1* fue estudiada por una PCR previamente descrita (87).

7.6. Análisis de clonalidad y MLST

El análisis de clonalidad se llevó a cabo con ERIC-PCR utilizando los primers de Versalovic (101). Se realizó el dendograma con el método de UPGMA (tolerancia 2%) utilizando el Gel J software. Se definió clonalidad en aquellos aislados que tuvieran > 70% de similitud.

Los grupos clonales diferentes de *K. pneumoniae blaKPC* positivo fueron analizados por MLST, utilizando el protocolo descrito por el Instituto Pasteur (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/primers-used/>) y la secuencia tipo se asignó utilizando la base de datos Klebsiella Pasteur MLST database (https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_isolates).

7.7. Análisis de sinergia entre colistina y fosfomicina por el método de tablero de ajedrez

La detección de resistencia fosfomicina se realizó siguiendo los lineamientos del EUCAST y sus puntos de corte. Se utilizó el disco de fosfomicina 200 µg (BioAnalysis, India) y agar Mueller Hinton (Difco, Inglaterra). Los ensayos de sinergia se realizaron con la técnica del tablero de ajedrez, en un volumen final de 200 µl. El rango de concentraciones utilizadas para fosfomicina fue de 4 a 128 mg/L y el de colistina de 4 mg/L se utilizaron placas de microtitulación de poliuretano no tratadas con fondo redondo. A los pocillos de fosfomicina se les adiciona 25 mg/L de glucosa-6-fosfato (Sigma Chemical Co., Estados Unidos).

Los resultados se expresaron en términos de concentración inhibitoria fraccional (CIF) para cada antibiótico. La CIF se calculó para colistina utilizando la siguiente fórmula $CMI_{col-fos} / CMI_{colistina}$ y para fosfomicina $CMI_{fos-col} / CMI_{fosfomicina}$. El índice de concentración inhibitoria fraccional para la combinación col/fos (ICIF) se calculó sumando $CIF_{colistina} + CIF_{fosfomicina}$. Se consideró combinación sinérgica si el índice CIF era de $\leq 0,5$ un IFIC = 1 la combinación es aditiva, valores de ICIF de 1 a 4 se consideraron indiferentes y ICIF > 4 como antagónico.

7.8. Comité de ética

Los estudios que componen esta tesis doctoral fueron realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el "Comité de Ética de Investigación en

Seres Humanos de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador (PUCE) “ [EO-26-2021] para los aislados obtenidos en el año 2022. El comité de Ética del “Hospital Clínica Kennedy de Guayaquil (HCK)” [CEISH-19-0016] aprobó los estudios para los aislados obtenidos durante el 2020 y para los aislados obtenidos en el 2016, los estudios fueron aprobados por el “Comité de Bioética del Hospital Luis Vernaza de Guayaquil” [HLV-DOF-CE-008].

7.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico comprendió el uso de estadística descriptiva e inferencial. Para las variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas (n) y relativas (%).

En el estudio de concordancia se utilizó el análisis de concordancia categórica y errores menores. La concordancia categórica se definió si los aislados estaban clasificados en la misma categoría por el método probado y el método de referencia (microdilución en caldo) y se expresó en porcentaje. El error menor fue definido cuando la microdilución en caldo identificó a un aislamiento como resistente y el método nuevo lo identificó como intermedio. Para las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central y variabilidad.

Adicionalmente, para el estudio de factores de riesgo se realizó un análisis bivariado previo a determinar las variables a ser consideradas para un análisis multivariado. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para las variables cuantitativas y para las variables cualitativas se utilizó chi-cuadrado de Pearson y la prueba de Fisher. Se realizó una regresión logística para un análisis multivariado para predecir resistencia a colistina. Se estableció el valor $< 0,05$ para determinar significancia estadística para comparación de proporciones, medias y variables predictivas.

Sección 2. Evaluación de un método de laboratorio para la detección de resistencia a colistina en EPC

7.10. Determinación de la resistencia a colistina por el método dilución en agar con concentración única (3 mg/L)

Una concentración única de 3 mg/L de sulfato de colistina (Sigma-Aldrich, Reino Unido) fue añadida al agar Mueller-Hinton (Becton Dickinson, Reino Unido). El agar fue conservado a 4°C hasta su utilización y fue utilizado dentro de las 48 horas posteriores. El inóculo bacteriano fue ajustado a 0,5 McFarland, utilizando el equipo DensiChek (BioMérieux, Francia) y se realizó una dilución

1/10, inoculando 10 µl de la dilución preparada. Se procesaron únicamente 10 aislados por caja de Petri y se incubó a 35°C por 16-18 horas. El crecimiento de 1 o más colonias se consideró como positivo con un valor de CMI > 3 mg/L. Las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* Bank #0349, fueron utilizadas para el control de calidad.

8. RESULTADOS

8.1. Evidencias de calidad

Artículo 1: Epidemiología molecular de bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en Ecuador. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Ecuador

Autores: Claudia Soria-Segarra, Carmen Soria-Segarra, Marcos Molina-Matute, Ivanna Agreda-Orellana, Tamara Núñez-Quezada, Kerly Cevallos-Apolo, Marcela Miranda-Ayala, Grace Salazar-Tamayo, Margarita Galarza-Herrera, Victor Vega-Hall, José E. Villacis y José Gutiérrez-Fernández.

URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-024-09248-6>

Revista: BMC Infectious Diseases. 47/132. Enfermedades infecciosas. 2T

FI: 3.4

Avala la tesis

Artículo 2: Cribado de resistencia a colistina mediada por *mcr-1* en Enterobacterales productores de carbapenemasas en Ecuador en tres períodos de tiempo desde el 2016 al 2022. Surveillance of colistin resistance mediated by *mcr-1* in Carbapenemase-producing Enterobacterales in Ecuador through three periods from 2016 to 2022.

Soria-Segarra Claudia, Soria-Segarra Carmen, Gutiérrez-Fernández José

Revista: Revista Argentina de Microbiología. En proceso editorial.135/161. Microbiología. 3T

FI: 1.8

Artículo 3: Sinergia entre colistina y fosfomicina para *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas

Soria-Segarra Claudia, Soria-Segarra Carmen, Gutiérrez-Fernández José.

Revista: Revista Española de Quimioterapia. En proceso editorial. 130/161 Microbiología. 3T

FI: 1.9

Artículo 4: Factores de riesgo asociados a Enterobacterales productores de carbapenemasa con resistencia a la colistina: estudio multicéntrico de un país de bajo. Risk factors associated with colistin resistance in carbapenemase-producing *Enterobacterales*: a multicenter study from a low-income country.

Autores: Soria-Segarra Claudia, Soria-Segarra Carmen, Diaz Andrés, Miranda-Ayala Marcela, Cevallos-Apolo Kerly, Bombón Moreno Bryan, Chuzan J. John y Gutierrez-Fernández José.

URL: <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00609-8>

Revista: Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 37/161. Microbiología. 1T

FI: 5.3

Avala la tesis

Artículo 5: Cribado de resistencia a colistina utilizando dilución en agar con una única concentración de colistina (3 µg/ml) en Enterobacterales productores de carbapenemasas. Colistin resistance screening by 3 µg/ml colistin agar in Carbapenemase-producing *Enterobacterales*.

Soria-Segarra Claudia, Soria-Segarra Carmen, Diaz Andrés, Miranda-Ayala Marcela, Cevallos-Apolo Kerly, Bombón Moreno Bryan, Chuzan J. John y Gutiérrez-Fernández José.

URL: <https://doi.org/10.1002/jcla.24639>

Revista: Journal of Clinical Laboratory Analysis. 14/30. Medical Laboratory Technology. 2T

FI:2.6

Avala la tesis

8.2. Artículos

Artículo 1.

Soria-Segarra et al. *BMC Infectious Diseases* (2024) 24:378
<https://doi.org/10.1186/s12879-024-09248-6>

BMC Infectious Diseases

RESEARCH

Open Access



Molecular epidemiology of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Ecuador

Claudia Soria-Segarra^{1,2,3*}, Carmen Soria-Segarra^{1,4}, Marcos Molina-Matute⁵, Ivanna Agreda-Orellana⁵, Tamara Núñez-Quezada⁶, Kerly Cevallos-Apolo⁷, Marcela Miranda-Ayala⁸, Grace Salazar-Tamayo⁹, Margarita Galarza-Herrera¹⁰, Victor Vega-Hall¹¹, José E. Villacis¹² and José Gutiérrez-Fernández^{13,3}

Abstract

Introduction Carbapenem-resistant gram-negative bacilli are a worldwide concern because of high morbidity and mortality rates. Additionally, the increasing prevalence of these bacteria is dangerous. To investigate the extent of antimicrobial resistance and prioritize the utility of novel drugs, we evaluated the molecular characteristics and antimicrobial susceptibility profiles of carbapenem-resistant Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Ecuador in 2022.

Methods Ninety-five clinical isolates of carbapenem non-susceptible gram-negative bacilli were collected from six hospitals in Ecuador. Carbapenem resistance was confirmed with meropenem disk diffusion assays following Clinical Laboratory Standard Institute guidelines. Carbapenemase production was tested using a modified carbapenemase inactivation method. Antimicrobial susceptibility was tested with a disk diffusion assay, the Vitek 2 System, and gradient diffusion strips. Broth microdilution assays were used to assess colistin susceptibility. All the isolates were screened for the *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes. In addition, *A. baumannii* isolates were screened for the *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-24/40} genes.

Results Carbapenemase production was observed in 96.84% of the isolates. The *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48} genes were detected in Enterobacterales, with *bla*_{KPC} being predominant. The *bla*_{VIM} gene was detected in *P. aeruginosa*, and *bla*_{OXA-24/40} predominated in *A. baumannii*. Most of the isolates showed co-resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, and trimethoprim/sulfamethoxazole. Both ceftazidime/avibactam and meropenem/vaborbactam were active against carbapenem-resistant gram-negative bacilli that produce serin-carbapenemases.

Conclusion The epidemiology of carbapenem resistance in Ecuador is dominated by carbapenemase-producing *K. pneumoniae* harbouring *bla*_{KPC}. Extensively drug resistant (XDR) *P. aeruginosa* and *A. baumannii* were identified, and their identification revealed the urgent need to implement strategies to reduce the dissemination of these strains.

Keywords Carbapenem resistance, Carbapenemase genes, Ecuador, Gram-negative bacilli

*Correspondence:

Claudia Soria-Segarra
Claudia.soria.s@gmail.com

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



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

The increasing number of multidrug-resistant organisms (MDROs) constitutes a major threat to health worldwide. MDROs are linked to increasing costs and mortality rates [1] and are an important challenge to clinicians due to the complicated choice of treatment option [2].

The World Health Organization included carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and Enterobacterales as “priority antibiotic-resistant pathogens”, for which the research and development of new antimicrobial agents is critical [3]. The dissemination of these pathogens is mainly due to high-risk clones and is generally associated with health care-associated infections with high mortality rates [4, 5].

The mechanisms of carbapenem resistance are diverse but are dominated by the expression of carbapenemases. The prevalence of carbapenemases varies according to region [2]. In Ecuador, despite the high prevalence of carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) (37%) and other gram-negative rod-shaped bacteria [6, 7], there is little information about the mechanisms involved and the antimicrobial susceptibility profiles, including that to recently approved antibiotics such as ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, or ceftolozane/tazobactam, which constitute the first line of treatment against carbapenem-resistant gram-negative rod-shaped bacteria [8, 9].

Thus, essential information is required to optimize the administration of antibiotics as a lack of knowledge could lead to the misuse of antibiotics and the rapid development of antimicrobial resistance.

Therefore, to clarify the extent of antimicrobial resistance and prioritize the utility of newly available drugs, our goal was to determine the molecular characteristics and antimicrobial susceptibility profiles of clinical CRE, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* complex isolates from Ecuador.

Methodology

A multicentre study was carried out in six hospitals in Ecuador between January 2022 and May 2022. Clinical isolates of CRE, *P. aeruginosa* and the *A. baumannii* complex were collected according to protocols established by each institution. Carbapenem resistance was defined when the isolate was non-susceptible to any of the carbapenems tested according to Clinical Standards Institute (CLSI) breakpoints [10]. Only one clinical isolate from each patient was studied, and there was a preference for samples from sterile sites or those with the greatest resistance phenotype.

CRE isolates were cultured on CHROMagar Super Carba (CHROMagar, France). *P. aeruginosa* and *A. baumannii* complex isolates were cultured on MacConkey

agar (16–18 h; 35 °C) (Becton–Dickinson, England) to check their viability and purity. Isolates were identified with the Vitek 2 System (BioMérieux, France) and conventional biochemical tests.

Carbapenem resistance was confirmed with meropenem disk diffusion assays using CLSI methodology. Carbapenemase production was studied with the modified carbapenem inactivation method (mCIM) for Enterobacterales and *P. aeruginosa* according to CLSI guidelines [10]. *A. baumannii* complex isolates were studied with the optimized carbapenem inactivation method described by Zhang S. et al. [11].

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility tests for ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tigecycline, ceftazidime, cefepime, meropenem imipenem, ampicillin/sulbactam and piperacillin/tazobactam were performed using disk diffusion assays and the Vitek 2 System (AST-N402 or AST-N401 Card) (BioMérieux, France). Minimal inhibitory concentrations (MICs) for ceftazidime/avibactam and meropenem/vaborbactam were determined using gradient diffusion strips (Liofilchem, Italy). MIC values and disk diffusion results were interpreted using CLSI breakpoints [10]. For tigecycline, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) breakpoints were used (susceptible ≥ 19 mm or ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$) for Enterobacterales [12]. For meropenem/vaborbactam, European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) testing breakpoints were used for *P. aeruginosa* (susceptible ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$) [13].

Susceptibility to ceftazidime/avibactam and meropenem/vaborbactam was not tested in NDM-positive isolates.

The MIC of colistin was obtained using a broth microdilution (CBM) method, as described in CLSI document M07-A8 [14]. Analytical grade colistin sulfate (Sigma–Aldrich Code C2700000, batch 3.0) and Mueller Hinton broth with cation adjustment (Thermo Fischer Scientific, United Kingdom) were used. The concentration range was 0.5–4 $\mu\text{g/mL}$, and CLSI breakpoints were used to define colistin resistance (MIC values ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) [10]. The MIC₅₀ and MIC₉₀ were determined for each antimicrobial.

Escherichia coli ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* BAA ATCC 1705 and *E. coli* AR Bank #0349 were used for quality control.

Detection of carbapenemase and mcr-1 genes

The carbapenemase-encoding genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} were studied using multiplex polymerase chain reaction (PCR) in all isolates [15]. Additionally, the *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58} and

*bla*_{OXA-24/40-like} genes were studied in *A. baumannii* complex isolates with a previously described multiplex PCR method [16].

The molecular detection of the colistin-resistance gene *mcr-1* was performed via PCR [17].

Clonality study

Clonal relatedness was studied in *bla*_{KPC}-positive *K. pneumoniae*, *bla*_{VIM}-positive *P. aeruginosa* and *bla*_{OXA-24/40}-positive *A. baumannii* complex using ERIC-PCR following a previously described method [18].

Dendrograms were constructed using GelJ software based on Dice's similarity coefficient and the unweighted pair group method (UPGM) (tolerance 2%). The cut-off level for ERIC-PCR electrophoretic pattern delineation was 80% similarity.

Results

One hundred and twenty-nine isolates were obtained for analysis. Thirty-four were rejected for inconsistencies in shipments or duplications (26.35%). Thus, a total of ninety-five isolates were included in the study (73.64%).

Enterobacteriales predominated among the sample and accounted for 60 isolates studied (63.15%), with *K. pneumoniae* being the most frequently isolated species ($n=45$; 47.36%). *K. aerogenes*, *E. cloacae* and *E. coli* were also present in 16.66% ($n=10$), 5% ($n=3$) and 3.33% ($n=2$) of samples, respectively. The *A. baumannii* complex was present in 25.26% ($n=24$) of the samples, and *P. aeruginosa* was present in 11.57% ($n=11$) of the samples.

Carbapenemase production was confirmed in 92 isolates (96.84%). Three *P. aeruginosa* isolates tested negative for mCIM.

*Bla*_{KPC} was the most frequent carbapenemase-encoding gene found in Enterobacteriales ($n=52$; 86.66%). *Bla*_{NDM} ($n=7$; 11.66%) and *bla*_{OXA-48} ($n=1$; 1.66%) were also detected. Neither *bla*_{IMP} nor *bla*_{VIM} was detected in Enterobacteriales. Both ceftazidime/avibactam (MIC₅₀ and MIC₉₀ < 0.12/4 µg/ml) and meropenem/vaborbactam (MIC₅₀ 0.064/8 µg/ml; MIC₉₀ 0.84/8 µg/ml) were active against all tested isolates harbouring *bla*_{KPC}. The susceptibility rates to CPE were 95% and 76.67% for tigecycline and colistin, respectively.

Detailed information about the susceptibility patterns of the CPE strains, *K. pneumoniae* strains and *K. aerogenes* *bla*_{KPC} strains is provided in Table 1.

Tigecycline and colistin were the only drugs that *K. aerogenes* *bla*_{NDM} isolates were susceptible to ($n=1$). *E. cloacae* *bla*_{KPC} isolates ($n=2$) were resistant to most of the antimicrobials tested, except for amikacin tigecycline, colistin, ceftazidime/avibactam and meropenem/vaborbactam, as observed for *E. coli* *bla*_{KPC} ($n=1$).

E. cloacae *bla*_{NDM} ($n=1$) was only susceptible to colistin and amikacin.

The susceptibility profile of *E. coli* *bla*_{OXA-48} was the most conserved. This isolate was resistant to only ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and ceftazidime. Tigecycline, colistin, ceftazidime/avibactam, trimethoprim/sulfamethoxazole and colistin were active against *E. coli* *bla*_{KPC}. These strains were resistant to ciprofloxacin, aminoglycosides and all beta-lactam antimicrobial agents tested.

In *P. aeruginosa*, only *bla*_{VIM} was detected ($n=8$; 72.72%). Three isolates lacked any of the examined carbapenemase genes and tested negative for mCIM. All antimicrobials tested showed high resistance in *bla*_{VIM}-positive *P. aeruginosa*. Ceftolozane/tazobactam was active against carbapenemase-negative *P. aeruginosa*.

In *A. baumannii* complex isolates, 66.66% ($n=16$) of the patients were *bla*_{OXA-24/40} positive, and 33.33% ($n=8$) of the patients were *bla*_{OXA23} positive. *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} were not detected in any of the isolates. *A. baumannii* complex isolates were only susceptible to colistin (95%), regardless of which gene was present in the isolates.

Tables 2 and 3 provide comprehensive details regarding carbapenem-resistant non-fermentative gram-negative pathogens. The MIC values of the antimicrobials evaluated are detailed in Supplementary Table 1.

None of the colistin-resistant isolates carried the *mcr-1* gene.

*Bla*_{VIM}-positive *P. aeruginosa* and *bla*_{KPC}-positive *K. pneumoniae* ($n=35$) isolates exhibited significant genetic heterogeneity (Supplementary Figs. 1 and 2).

In the *bla*_{OXA-24/40}-positive *A. baumannii* complex, six electrophoretic patterns were found, and 50% of the isolates belonged to only one pattern, indicating the clonal dissemination of this microorganism (Supplementary Fig. 3).

Four electrophoretic patterns were found in *bla*_{KPC}-positive *K. aerogenes* (8 isolates studied) (Supplementary Fig. 4).

Discussion

Our research describes the molecular characteristics of carbapenem-resistant gram-negative rod-shaped bacteria in Ecuador. Carbapenemase production was prevalent in the isolates studied (96.64%), and carbapenemase production has been described by several authors as the main mechanism involved in carbapenem resistance [6, 19–21].

Carbapenemase-encoding genes such as *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48} were detected in Enterobacteriales, and *bla*_{KPC} was the predominant gene. Our results are similar to those described in other Western countries, such

Table 1 Antimicrobial susceptibility against carbapenemase-producing Enterobacterales

Antimicrobials	CPE (n = 60)			<i>K. pneumoniae</i> bla _{KPC} (n = 40)			<i>K. pneumoniae</i> bla _{NDM} (n = 5)			<i>Klebsiella aerogenes</i> bla _{KPC} (n = 9)				
	Susceptible		No	Susceptible		No	Susceptible		No	Susceptible		No		
	No	%		No	%		No	%		No	%			
AK	27	45.00	21	47.73	4	≥ 64	0	0.00	0	≥ 64	2	22.22	≥ 64	≥ 64
GN	11	18.33	8	18.18	≥ 64	≥ 64	0	0.00	0	≥ 64	2	22.22	≥ 64	≥ 64
CIP	8	13.33	5	11.36	≥ 4	≥ 4	1	20.00	1	≥ 4	2	22.22	≥ 4	≥ 4
SXT	4	6.67	4	9.09	4/76	4/76	0	0.00	0	4/76	0	0.00	4/76	4/76
TIG	57	95.00	38	86.36	≤ 0.5	≤ 0.5	5	100.00	2	2	9	100.00	≤ 0.5	≤ 0.5
COL	46	76.67	34	85.00	1	≥ 8	5	100.00	1	1	1	11.11	≥ 8	≥ 8
CAZ/AVI	53 ^a	100.00	40	100.00	≤ 0.12/4	≤ 0.12/4	NT	NT	NT	NT	9	100.00	DD	DD
MER/VAB	25 ^b	100.00	23 ^c	100.00	0.064/8	0.94/8	NT	NT	NT	NT	1 ^d	100.00	-	-
CAZ	0	0.00	0	0.00	≥ 64	≥ 64	0	0	0	≥ 64	0	0.00	≥ 64	≥ 64
FEP	1	0.00	0	0.00	≥ 32	≥ 32	0	0	0	≥ 32	0	0.00	≥ 32	≥ 32
IMP	1	3.33	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0	0	≥ 16	0	0.00	≥ 16	≥ 16
MER	1	3.33	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0	0	≥ 16	0	0.00	≥ 16	≥ 16
PTZ	0	0.00	0	0	≥ 128/4	≥ 128/4	0	0	0	≥ 128/4	0	0.00	≥ 128/4	≥ 128/4

NT not tested, DD disk diffusion, AK Amikacin, GN Gentamicin, CIP Ciprofloxacin, SXT Trimethoprim/sulfamethoxazole, TIG Tigecycline, COL Colistin, CAZ/AVI Ceftazidime/Avibactam, MER/VAB Meropenem/vaborbactam, CAZ Ceftazidime, FEP Cefepime, IMP Imipenem, MER Meropenem, PTZ Piperacillin/tazobactam

^a 53 isolates tested

^b 25 isolates tested

^c 23 isolates tested

^d 1 isolate tested

Table 2 Susceptibility antimicrobial against *P. aeruginosa*

Antimicrobials	<i>P. aeruginosa</i> bla _{VIM} n = 8				<i>P. aeruginosa</i> mCIM negative n = 3				<i>P. aeruginosa</i> n = 11	
	Susceptible		MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	Susceptible		MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	Susceptible	
	No	%			No	%			No	%
AK	4	50	4	32	2	66.67	16	16	6	54.54
GN	2	25	≥ 32	≥ 32	1	33.33	4	8	3	27.27
CIP	1	12.5	≥ 4	≥ 4	1	33.33	0.5	≥ 4	1	9.09
COL	4	50	2	≥ 8	3	100.00	1	1	7	63.63
CAZ/AVI	NT	NT	NT	NT	3 ^a	100.00	DD	DD	3 ^a	100
MER/VAR	NT	NT	NT	NT	3 ^a	100.00	0.5	1	3 ^a	100
CAZ	0	0	≥ 64	≥ 64	2	66.67	4	≥ 64	2	18.18
FEP	0	0	≥ 32	≥ 32	1	33.33	8	≥ 32	1	9.09
IMP	0	0	≥ 16	≥ 16	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0
MER	0	0	≥ 16	≥ 16	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0
CEF/TAZ	0	0	> 256	> 256	3	100.00	1.5	4	3	27.27
PTZ	0	0	≥ 128/4	≥ 128/4	0	0.00	≥ 128/4	≥ 128/4	0	0

NT not tested, DD Disk diffusion, AK Amikacin, GN Gentamicin, CIP Ciprofloxacin, COL Colistin, CAZ/AVI Ceftazidime/avibactam, MER/VAB Meropenem/vaborbactam, CAZ Ceftazidime, FEP Cefepime, IMP Imipenem, MER Meropenem, CEF/TAZ, PTZ Piperacillin/tazobactam

^a EUCAST Breakpoints

Table 3 Susceptibility antimicrobial against *A. baumannii* complex

Antimicrobials	<i>A. baumannii</i> complex bla _{OXA23} n = 8				<i>A. baumannii</i> complex bla _{OXA24/40} n = 16				<i>A. baumannii</i> complex n = 24	
	Susceptible		MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	Susceptible		MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	Susceptible	
	No	%			No	%			No	%
AK	0	0.00	≥ 64	≥ 64	0	0.00	≥ 64	≥ 64	0	0
GN	0	0.00	≥ 64	≥ 64	0	0.00	≥ 64	≥ 64	0	0
CIP	0	0.00	≥ 4	≥ 4	0	0.00	≥ 4	≥ 4	0	0
SXT	0	0.00	4/76	4/76	0	0.00	4/76	4/76	0	0
COL	6 ^a	100.00	1	1	13 ^b	92.86	1	1	19±	95
CAZ	2	25.00	≥ 64	≥ 64	2	12.50	≥ 64	≥ 64	4	18.18
FEP	0	0.00	≥ 32	≥ 32	0	0.00	16	≥ 32	0	0
IMP	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0
MERO	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0.00	≥ 16	≥ 16	0	0
PTZ	0	0.00	≥ 128/4	≥ 128/4	0	0.00	≥ 128/4	≥ 128/4	0	0
SAM	0	0.00	≥ 32/16	≥ 32/16	2	12.50	≥ 32/16	≥ 32/16	2	8.33

AK Amikacin, GN Gentamicin, CIP Ciprofloxacin, SXT Trimethoprim/sulfamethoxazole, COL Colistin, CAZ Ceftazidime, FEP Cefepime, IMP Imipenem, MER Meropenem, PTZ Piperacillin/tazobactam, SAM Ampicillin/sulbactam

^a 6 isolates tested

^b 14 isolates tested ± 20 isolates tested

as the United States, Argentina, Colombia, and Brazil, which described bla_{KPC} as the prevalent gene linked to *K. pneumoniae* [7, 21, 22]. Our results also agree with previous data published in 2022 by the National Reference Laboratory, which described *K. pneumoniae* harbouring bla_{KPC} as the main cause of carbapenem resistance in Enterobacterales in Ecuador [23].

In our study, we did not find bla_{NDM} (11.47%) or bla_{OXA-48} (1.64%) genes very frequently in Enterobacterales; these percentages are comparable to those reported in a national surveillance report [23]. However, given the small number of isolates, we advise using caution when considering this information. Bla_{NDM} was detected in *K. pneumoniae*, *K. aerogenes* and *E. cloacae*. Interestingly,

we did not find any *P. rettgeri* isolates harbouring this gene because this species has been shown to play a central role in the dissemination of *bla*_{NDM} in Latin America, but infections by *P. rettgeri* are not very common [24]. Similar to other studies, we found *bla*_{OXA-48} only in *E. coli*, which is the main species associated with this gene [25, 26].

The pattern observed in Ecuador is different from that described in other countries, such as India, where *NDM* is prevalent, or Turkey, where *OXA-48* dominates among CRE [26, 27].

During the COVID-19 pandemic, an increase in carbapenemase-producing Enterobacterales was observed; moreover, the emergence of isolates harbouring more than one carbapenemase gene was reported [28]. In 2021, Ecuador reported *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} + *bla*_{OXA-48} associations [28, 29]. Nevertheless, we did not find any combinations of carbapenemase genes in any of the isolates studied.

Co-resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones was observed in *K. pneumoniae* *bla*_{KPC}-positive isolates. This association has also been described by several authors and is linked to horizontal dissemination [30, 31]. Genetic diversity was revealed in our isolates, suggesting horizontal dissemination. Interestingly, our results differ from those of previous research in which clonal circulation of *K. pneumoniae* *bla*_{KPC}-positive isolates was documented [18]. The differences found could be attributed to the fact that our study was not limited to one city or hospital area, such as intensive care units, where most other research is focused.

According to our results, tigecycline could be considered a therapeutic alternative for Enterobacterales isolates, independent of carbapenemase genes or the species involved, but its use will require a previous antimicrobial susceptibility report, as other authors have also suggested [32].

Enterobacterales harbouring *bla*_{KPC} showed reduced susceptibility to colistin, but surprisingly, all isolates harbouring *bla*_{NDM} remained susceptible to colistin, contrary to the findings of other authors, who described an increase in colistin resistance in CRE isolates harbouring *bla*_{NDM} [33]. Based on our findings, colistin may be considered a significant therapeutic option for the treatment of CRE, but a prior susceptibility report may be needed. The *mcr-1* gene was not detected in any of our isolates, in contrast with the results of other Latin American studies [34–36], suggesting that resistance could be mediated by chromosomal mutations or other *mcr* variants that were not studied and have been described in the region, including *mcr-3* or *mcr-5* [37–39]. Further studies are needed to understand the resistance mechanisms involved in colistin resistance.

New antimicrobial agents, such as ceftazidime/avibactam and meropenem/vaborbactam, demonstrated complete susceptibility in all the *bla*_{KPC}-positive isolates. Despite the susceptibility patterns reported by several authors, the emergence of KPC isolates with ceftazidime/avibactam resistance has been reported, which has been frequently associated with mutations leading to substitutions in the Ω -loop of the KPC-3 variant [40, 41]. Fortunately, our research did not show any resistance to this new antimicrobial in KPC isolates, perhaps due to the recent introduction of this antimicrobial (June 2022) in Ecuador, although some cases of CAZ/AVI resistance have been reported prior to drug introduction in other countries through a salt bridge between glutamic 197 and arginine 164 in the wild-type KPC enzyme; however, this result was not found in this study [42].

Carbapenemase production by the *bla*_{VIM} gene was detected in 63.63% of *P. aeruginosa* isolates, and this gene encodes a metallo- β -lactamase. Our findings are consistent with several other authors who determined that this gene was prevalent [43]. *P. aeruginosa* exhibited high rates of co-resistance to aminoglycosides, ciprofloxacin, colistin and ceftolozane/tazobactam, rendering these antimicrobials ineffective for empirical treatment. Our findings differ from those of other authors who recommended ceftolozane/tazobactam as an effective treatment for multidrug-resistant *P. aeruginosa* [44]. In contrast to our findings, Ajila et al. reported good susceptibility to ceftolozane/tazobactam in *P. aeruginosa* isolates recovered in 2019 in Ecuador [45]. We attributed these conflicting findings to the molecular mechanisms involved in the studied isolates, but these hypotheses were not described by the authors.

In America, carbapenem resistance in *A. baumannii* complex isolates is principally mediated by oxacillinases, particularly *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} [46, 47]. In 2016, Nuñez-Quezada et al. reported an outbreak of a carbapenem-resistant *A. baumannii* complex with *bla*_{OXA-72}, a member of the *bla*_{OXA-24/40} subgroup, in Guayaquil, Ecuador [48]. Our research revealed that *bla*_{OXA-24/40} (66.66%) was predominant in *A. baumannii* complex isolates, similar to the results of a previous report in our country; furthermore, the same PCR pattern was observed in 50% of the isolates, which indicates the clonal spread of this microorganism, as has been previously reported [48].

Nevertheless, our results differ from those published in a national surveillance report, which showed a predominance of *OXA-23* in *A. baumannii* complex isolates collected from 2019 to 2021. However, an increase in *OXA-24/40* was observed in 2021, with similar values to those of *OXA-23* (*bla*_{OXA-23} *n* = 129; *bla*_{OXA-24/40} *n* = 116). In addition, we did not detect *bla*_{OXA-58} in our isolates, although it has been reported previously in Ecuador [23].

Our results also differ from the regional epidemiology [49], where the *bla*_{OXA-24/40} gene has been described only sporadically and is mainly reported in countries such as Taiwan, China and South Korea in Asia [50, 51].

Co-resistance to other groups of drugs is highly common in *A. baumannii* complex isolates, and this co-resistance reduces the number of therapeutic options. The extensive drug resistance (XDR) phenotype was independent of the oxacillinase gene. The isolates only showed 100% susceptibility to colistin, and colistin could be considered a last resort option for these XDR isolates.

This study has several limitations. First, our results could not be generalized to primary care hospitals or other cities as the hospitals were not randomly selected; instead, they included hospitals from public and private services from the second and third levels of attention in Ecuador's most populous cities. Second, clinical isolates of carbapenem-resistant gram-negative bacilli were selected by each microbiology laboratory according to their protocols and clinical requests for culture by physicians; therefore, some isolates were not included. Third, the sensitivity and specificity of the mCIM method are greater than 90%, although there could be false-negative results due to uncommon carbapenemase types that were not tested in our study [52]. Finally, *bla*_{OXA143}, which is an oxacillinase previously described in *A. baumannii* in Ecuador, has not been examined.

In conclusion, the epidemiology of carbapenem resistance in the three most important cities of Ecuador (Quito, Guayaquil, and Cuenca) was dominated by carbapenemase-producing *K. pneumoniae* harbouring *bla*_{KPC}. Additionally, XDR *P. aeruginosa* and *A. baumannii* complex isolates were also present, showing an urgent need to implement strategies to reduce their dissemination.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09248-6>.

Supplementary Material 1.
Supplementary Material 2.
Supplementary Material 3.
Supplementary Material 4.
Supplementary Material 5.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

SSCL, SSC, GFJ contributed to study conception, design, and analysis. SSCL wrote the draft version of the manuscript. MMM, AOI, NQT, CAK, MAM, STM, GHM, VHV, VJE, contributed to collection and data analysis. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors reviewed, revised, and approved the final manuscript.

Funding

This research was supported by Pfizer grant No 68213903.

Availability of data and materials

The datasets used during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was carried out according to the Declaration of Helsinki and was approved by the "Comite de Etica de Investigación en Seres humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) [EO-26–2021]. Informed consent was waived due to the retrospective design of the study by the Ethical Committee of "Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) [EO-26–20210.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Sosecali, Medical Services, Guayaquil, EC 090308, Ecuador. ²Faculty of Medical Sciences, Guayaquil University, Guayaquil, Ecuador. ³Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada & Ibs, Granada, Spain. ⁴Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. ⁵Hospital del Río, Cuenca, Ecuador. ⁶Hospital del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social Dr. Teodoro Maldonado Carbo, Guayaquil, Ecuador. ⁷Hospital de Infectología Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña, Guayaquil, Ecuador. ⁸Omni Hospital, Guayaquil, Ecuador. ⁹Hospital Vozandez, Quito, Ecuador. ¹⁰Hospital Eugenio Espejo, Quito, Ecuador. ¹¹Interhospital, Guayaquil, Ecuador. ¹²Centro de Investigación Para La Salud en América Latina (CISeAL), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito 1701-2184, Ecuador. ¹³Department of Microbiology, Hospital Virgen de Las Nieves, Institute for Biosanitary Research-Ibs, Granada, Spain.

Received: 23 May 2023 Accepted: 23 March 2024

Published online: 06 April 2024

References

- Knols BG, Smallegange RC, Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(9):535–6.
- Pournaras S, Zarrilli R, Higgins PG, Tsioutsis C. Editorial: carbapenemase-producing organisms as leading cause of hospital infections. *Front Med*. 2021;8:10–2.
- World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. [cited 2023 Aug 21].
- Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(5):895–904.
- Ko KS. Antibiotic-resistant clones in Gram-negative pathogens: presence of global clones in Korea. *J Microbiol*. 2019;57(3):195–202.
- Sánchez-López J, Cantón R. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: epidemiology and resistance phenotypes. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter*. 2019;32:27–31.
- García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021;19(2):197–213.

8. Tamma PD, Hsu AJ. Defining the role of novel β -lactam agents that target carbapenem-resistant gram-negative organisms. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2019;8(3):251–60.
9. Doi Y. Treatment options for Carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S565–75.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 31th informational supplement. CLSI document M100-S31. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS; 2021.
11. Zhang S, Mi P, Wang J, Li P, Luo K, Liu S, et al. The optimized carbapenem inactivation method for objective and accurate detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2023;14:1–13.
12. Food and Drug Administration C for DE and FDA. FDA. Tigecycline – Injection products. 2023. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/tigecycline-injection-products>. [cited 2024 Jan 30].
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024–01–01. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf. [cited 2024 Jan 30].
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard — Ninth Edition. Vol. 32, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Ninth Edition. 2012. p. 18.
15. Poirer L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119–23.
16. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(4):351–3.
17. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018;23(6):1–11.
18. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-González A, Gutiérrez-Fernández J. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units in Ecuador: results from a multicenter study. *J Infect Public Health*. 2020;13(1):80–8.
19. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol*. 2017;17:1–12.
20. Haji SH, Aka STH, Ali FA. Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *PLoS One*. 2021;16:e0259005.
21. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(3):277–97.
22. Hansen GT. Continuous evolution: perspective on the epidemiology of Carbapenemase resistance among enterobacteriales and other gram-negative bacteria. *Infect Dis Ther*. 2021;10(1):75–92.
23. Ecuador IN de l y SP del. Vigilancia de BLEE y Carbapenemasas en Ecuador período 2018–2021. Available from: <http://www.investigacion.salud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2022/11/2do-Boletin-CRN-Resistencia-Antimicrobiana.pdf>. [cited 2023 Sep 20].
24. Marquez-Ortiz RA, Haggerty L, Olarte N, Duarte C, Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, et al. Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in latin American clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome Biol Evol*. 2017;9(6):1725–41.
25. Findlay J, Perreten V, Poirer L, Nordmann P. Molecular analysis of OXA-48-producing *Escherichia coli* in Switzerland from 2019 to 2020. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2022;41(11):1355–60.
26. Neidhöfer C, Buechler C, Neidhöfer G, Bierbaum G, Hannel I, Hoerauf A, et al. Global distribution patterns of Carbapenemase-encoding bacteria in a new light: clues on a role for ethnicity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:1–9.
27. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of Carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017;8(4):460–9.
28. Organización Panamericana de la Salud. Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacteriales en Latinoamérica y el Caribe. 2021. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas>. [cited 2023 Sep 20].
29. Organización Panamericana de la Salud. Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacteriales en Latinoamérica y el Caribe. *Emerg E Incremento Nuevas Comb Carbapenemasas En Enterobacteriales En Latinoam El Caribe*. 2021;(Vim):2–8.
30. Oliveira R, Castro J, Silva S, Oliveira H, Saavedra MJ, Azevedo NF, et al. Exploring the antibiotic resistance profile of clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Portugal. *Antibiotics*. 2022;11(11):1613.
31. González Rocha G, Vera Leiva A, Barría Loaiza C, Carrasco Anabalón S, Lima C, Aguayo Reyes A, et al. Infectología al Día KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias KPC. *Infectol Al Día*. 2017;34(5):476–84.
32. Malek A, McGlynn K, Taffner S, Fine L, Tesini B, Wang J, et al. Next-generation-sequencing-based hospital outbreak investigation yields insight into *Klebsiella aerogenes* population structure and determinants of Carbapenem resistance and pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(6):302577–18.
33. El-Mahallawy HA, El Swify M, Abdul Hak A, Zafer MM. Increasing trends of colistin resistance in patients at high-risk of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Ann Med*. 2022;54(1):1–9.
34. Zarate M, Barrantes D, Cuicapuza D, Velasquez J, Fernández N, Salvatierra G, et al. Frequency of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2021;38:308–12.
35. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colln-Castro CA, Sánchez-Pérez A, et al. Carbapenemase-encoding genes and colistin resistance in gram-negative bacteria during the COVID-19 pandemic in Mexico: results from the Invifair network. *Microb Drug Resist*. 2023;29(6):239–48.
36. Ortega-Paredes D, Barba P, Zurita J. Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiol Infect*. 2016;144(14):2967–70.
37. Calero-CÁ W. Evolution and dissemination of mobile colistin resistance genes: limitations and challenges in Latin American countries. *Lancet*. 2023;4:e571.
38. Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Travel Med Infect Dis*. 2019;31:101459.
39. Daza-Cardona EA, Buenhombre J, Fontenelle RO dos S, Barbosa FCB. mcr-mediated colistin resistance in South America, a One Health approach: a review. *Rev Res Med Microbiol*. 2022;33(1):e119.
40. Findlay J, Poirer L, Juhas M, Nordmann P. KPC-mediated resistance to ceftazidime-avibactam and collateral effects in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(9):e0089021.
41. Cui X, Shan B, Zhang X, Qu F, Jia W, Huang B, et al. Reduced Ceftazidime-Avibactam Susceptibility in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* from patients without ceftazidime-avibactam use history – a multicenter study in China. *Front Microbiol*. 2020;11:1–9.
42. Wozniak A, Paillavil B, Legarraga P, Zumarán C, Prado S, García P. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of KPC in clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(2):131–3.
43. Schäfer E, Malecki M, Tellez-Castillo CJ, Pfennigwerth N, Marlinghaus L, Higgins PG, et al. Molecular surveillance of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* at three medical centres in Cologne, Germany. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1–7.
44. Gallagher JC, Satlin MJ, Elabor A, Saraiya N, McCreary EK, Molnar E, et al. Ceftolozane-tazobactam for the treatment of multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* infections: a multicenter study. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(11):ofy280.
45. Ajila Acuña A, Satán Salazar C, Villavicencio F, Villacís JE. Determinación de la actividad de ceftolozane/tazobactam en cepas de. *Rev Científica INSPILIP*. 2022;6(1):9–18.
46. Liu C, Chen K, Wu Y, Huang L, Fang Y, Lu J, et al. Epidemiological and genetic characteristics of clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains collected countrywide from hospital intensive care units (ICUs) in China. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11(1):1730–41.
47. McKay SL, Vlachos N, Daniels JB, Albrecht VS, Stevens VA, Rasheed JK, et al. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter*

- baumannii in the United States, 2013–2017. *Microb Drug Resist.* 2022;28(6):645–53.
48. Nuñez Quezada T, Rodríguez CH, Castro Cañarte G, Nastro M, Balderrama Yrhui N, Dabos L, Acosta Mosquera Y, Plaza Moreira N, Famiglietti A. Outbreak of blaOXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Chemother.* 2017;29(5):321–4. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1158936>.
 49. Rodríguez CH, Balderrama Yrhui N, Nastro M, Nuñez Quezada T, Castro Cañarte G, Magne Ventura R, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Med Microbiol.* 2016;65(10):1088–91.
 50. Chen Y, Yang Y, Liu L, Qiu G, Han X, Tian S, et al. High prevalence and clonal dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital: a cross sectional study. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):491.
 51. Thirapanmethee K, Srisiri-a-nun T, Houngsaitong J, Montakantikul P, Khuntayaporn P, Chornawang MT. Prevalence of OXA-Type β -lactamase genes among Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Thailand. *BMC Infect Dis.* 2020;9(12):864.
 52. Gutiérrez S, Correa A, Hernández-Gómez C, De La Cadena E, Pallares C, Villegas MV. Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed.* 2019;37(10):648–51.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Artículo 2

Surveillance of colistin resistance mediated by *mcr-1* in Carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Ecuador through three periods from 2016 to 2022.

Vigilancia epidemiológica de resistencia a colistina mediada por *mcr-1* en *Enterobacterlaes* productores de carbapenemasas, durante 3 periodos desde el 2016 al 2022

Authors: *Claudia Soria-Segarra^{1,2,3}, Carmen Soria-Segarra^{1,4}, Jose Gutierrez-Fernandez^{3,5}

1. Sosecali. Medical Services. Guayaquil, Ecuador. EC 090308
2. Guayaquil University. Faculty of Medical Sciences. Guayaquil, Ecuador.
3. Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health. University of Granada & IBS. Granada. Spain.
4. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
5. Department of Microbiology, Hospital Virgen de las Nieves, Institute for Biosanitary Research-IBS. Granada, Spain.

Corresponding author: *Soria-Segarra Claudia

E-mail: Claudia.soria.s@gmail.com

Phone: +59396432878

Postal Address: EC 090308

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

50

51 **RESUMEN**

52 Este estudio tiene como objetivo, comprender la epidemiología de la resistencia
53 a colistina en la región, a través de la identificación del gen *mcr-1* en
54 Enterobacterales productores de carbapenemasas (EPC) en el Ecuador. Se
55 recolectaron 361 aislamientos de EPC, durante tres momentos de tiempo,
56 durante el período 2016-2022. Se realizaron las pruebas de susceptibilidad
57 antimicrobiana y se determinó la concentración inhibitoria mínima a colistina.
58 Se identificaron los genes de las carbapenemasas más frecuentes y se
59 determinó la presencia del gen *mcr-1*.

60 *K. pneumoniae* fue el microorganismo aislado más prevalentemente observado
61 (89.20%). La tasa de resistencia a colistina fue del 20,77%, observándose un
62 incremento en la resistencia a colistina del 3,76% al 23,74% . No se identificó
63 el gen *mcr-1* en ninguno de los aislamientos estudiados. Se observó una
64 amplia resistencia a los otros antimicrobianos testados en >50% de los aislados
65 de *K. pneumoniae* resistentes a colistina.

66 En conclusión, nuestros resultados resaltan la necesidad de implementar un
67 programa de administración de antimicrobianos a nivel nacional como prioridad
68 urgente para evitar la diseminación de este patógeno.

69

70

71 **KEYWORDS**

72 Colistin resistance, Ecuador, Carbapenemase, Enterobacterales, *mcr-1*

73	
1	
2	74
3	
4	
5	75
6	
7	76
8	
9	
10	77
11	
12	78
13	
14	
15	79
16	
17	80
18	
19	81 List of abbreviations
20	
21	
22	82 MDR: Multidrug resistance
23	
24	83 CPE: Carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i>
25	
26	
27	84 CR: Colistin resistance
28	
29	85 CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute
30	
31	
32	86 CBM: Colistin broth microdilution
33	
34	87 ATCC: American Type Culture Collection
35	
36	
37	88 MIC: Minimal Inhibitory Concentration
38	
39	89 FDA: U.S Food and Drug Administration
40	
41	
42	90 PCR: Polymerase chain reaction
43	
44	91 TIG: Tigecycline
45	
46	92 AK: Amikacin
47	
48	
49	93 GN: Gentamicin
50	
51	
52	94 CIP: Ciprofloxacin
53	
54	95 SXT: Trimethoprim/sulfamethoxazole
55	
56	96 CAZ/AVI: Ceftazidime/avibactam
57	
58	97 M/V: meropenem/vaborbactam
59	
60	
61	
62	
63	
64	
65	

98 XDR: extensively drug-resistant
1
2
3
4
5 100 **1. Introduction**
6
7 101 Multidrug resistance (MDR) in gram-negative bacilli has dramatically
8
9 102 increased in the last decades, especially in the *Enterobacterales*, becoming
10
11 103 a serious public health problem [1]. A predictive statistical model indicated
12
13 104 that antibiotic resistance was responsible for 4.95 million deaths globally,
14
15 105 with the highest burdens in low-resource settings [2].
16
17
18
19 106
20
21 107 Although novel antibiotics have been developed in the last five years, their
22
23 108 limited availability and high costs limit their use in countries with low
24
25 109 economic resources. This situation have forced the employment of less
26
27 110 effective therapeutic schemes, which include colistin and/or tigecycline, even
28
29 111 though they have demonstrated poor survival rates [3,4].
30
31
32
33 112
34
35 113 Colistin is a drug whose use rebounded along with the emergence of
36
37 114 resistance to carbapenems in gram-negative bacilli in the 1990s. Its
38
39 115 resistance is primarily due to mutations in the gene(s) that code for lipid A
40
41 116 [5]. Liu et al, reported the emergence of plasmid resistance mediated by the
42
43 117 *mcr-1* gene in an *Escherichia coli* strain in 2015 [6]. Currently, ten variants of
44
45 118 this gene have been described, being *mcr-1* variant the most prevalent. This
46
47 119 type of resistance has a wide distribution in *Enterobacterales* and has been
48
49 120 reported from various sources, including cattle and the environment [7].
50
51
52
53
54
55
56 121
57
58
59
60
61
62
63
64

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

122 In Ecuador, the data about colistin-resistance in carbapenemase-producing
123 *Enterobacterales* (CPE) is scarce. The first colistin-resistant (CR)
124 *Escherichia coli* harboring *mcr-1* was detected in 2016 [8], another report
125 has been done in animals from rural farms [9]. Thus, this is the first study in
126 our country that gathered information about the presence of colistin-resistant
127 isolates of CPE mediated by *mcr-1* gene in three different periods from
128 various hospitals around the country, between 2016 to 2022 in humans.

129

130 2. Materials and Methods

131 2.1. Study design

132 A retrospective cross-sectional study was carried out with samples or
133 strains collected in three different moments during a seven-year period.
134 The first period was between February and April 2016 in seven private
135 and public intensive care units in Guayaquil, Ecuador. The second period
136 was between December 2019 and May 2020 in five private and public
137 hospitals in the same city, and the third period was between January
138 2021 to April 2022 in five private and public hospitals in Quito, Guayaquil,
139 and Cuenca. Quito is the capital of Ecuador, and all these cities are the
140 most populated and economically important metropolises in Ecuador,
141 accounting for 5 095.691 inhabitants
142 (<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/>).

143 In the first period, rectal swabs were collected weekly by trained
144 personnel in all the intensive care patients after a signed informed
145 consent was obtained. For the second and third period, all the samples
146 with carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) collected by

1 147 microbiology laboratories of each hospital were sent to our referencial
2 148 laboratory in a Stuart medium for further processing in our reference
3
4 149 laboratory. CRE was defined as any isolate which had a non-susceptible
5
6
7 150 category for any of the carbapenems tested, using Clinical Laboratory
8
9 151 Standard Institute (CLSI) breakpoints [10] .
10

11 152

12 153 **2.2. Isolates**

13
14 154 Three hundred and sixty-one isolates of carbapenem-resistance
15
16
17 155 *Enterobacterales* collected during the study were included. One isolate per
18
19 156 patient was studied and *Enterobacterales* with intrinsic colistin resistance
20
21
22 157 were excluded.
23
24
25

26 158

27
28
29 159 All isolates were conserved in 20% skim milk (Oxoid, United Kingdom) until
30
31 160 processing. Their viability and purity were checked in MacConkey agar (16-
32
33 161 18h; 35°C) (Becton-Dickinson, England). Identification was confirmed with
34
35 162 Vitek® 2 Compact System (GN-Card) (BioMérieux, France) and
36
37 163 conventional tests (motility, oxidase, and gram stain).
38
39
40

41 164

42
43 165 Carbapenem resistant was screened with CHROMagar Super Carba
44
45 166 (CHROMagar, France) and confirmed disk diffusion to meropenem following
46
47 167 CLSI methodology. Carbapenemase-production was studied with the
48
49 168 modified carbapenem inactivation method (mCIM)[10] .
50
51

52 169

53 170 **2.3. Colistin susceptibility tests**

54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 171 First, surveillance of colistin resistance with agar dilution was performed
2 172 following CLSI M07-A8 and CLSI M100-S31 protocols [10,11]. Colistin
3
4 173 sulfate (Sigma-Aldrich. Code C2700000.Batch 3.0) and Mueller-Hinton Agar
5
6
7 174 (Becton Dickinson, United Kingdom) were used with a concentration of 3
8
9 175 $\mu\text{g/ml}$. Ten microliters of bacterial inoculum (approximately 1.5×10^8 UFC)
10
11
12 176 were added to the agar. The samples were incubated at 35°C for 16 to 18h.
13

14 177
15
16
17 178 All isolates categorized as resistant with agar dilution were confirmed with
18
19 179 colistin broth microdilution (CBM) to obtain the minimal inhibitory
20
21 180 concentration (MIC). Colistin sulphate analytical grade (Sigma-Aldrich Code
22
23 181 C2700000, batch 3.0) and Mueller Hinton broth with cation adjustment
24
25 182 (Thermo Fischer Scientific, United Kingdom) were used. The concentration
26
27 183 range used was $0.5 - 4 \mu\text{g/ml}$. MIC values $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ were considered as
28
29 184 resistant according to CLSI breakpoints document M100-S31. *Escherichia*
30
31 185 *coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 27853 and *E.*
32
33 186 *coli* AR Bank #0349 were used for quality control.
34
35
36
37
38
39
40

41 187

42 188 **2.4. Antimicrobial susceptibility profile**

43 189 Susceptibility tests for ciprofloxacin, amikacin, gentamicin,
44
45 190 trimethoprim/sulfamethoxazole, tigecycline, ceftazidime/avibactam and
46
47 191 meropenem/vaborbactam were performed using disk diffusion according to
48
49 192 CLSI guidelines [10]. Non-susceptible phenotypes for ceftazidime/avibactam
50
51 193 and tigecycline obtained with disk diffusion, were confirmed with agar
52
53 194 diffusion method to obtain MIC values. Liofilchem Etest Strips
54
55 195 (Liofilchem,Italy) were used, and commercial methodology was followed .
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

196 U.S Food and Drug Administration (FDA) breakpoints were used for
197 [tigecycline \(https://www.fda.gov/drugs/development-resources/tigecycline-](https://www.fda.gov/drugs/development-resources/tigecycline-injection-products)
198 [injection-products\)](https://www.fda.gov/drugs/development-resources/tigecycline-injection-products).
199
200 Multidrug-resistant (MDR) was defined as acquired non-susceptibility to at
201 least one agent in three or more antimicrobial categories and extensively
202 drug-resistant (XDR) was defined as non-susceptibility to at least one agent
203 in all but two or fewer antimicrobial categories [12]. A XDR phenotype was
204 defined when a resistant phenotype was present to one of the
205 aminoglycosides tested, ciprofloxacin and trimethoprim/sulphamethoxazole.
206
207 *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 2785 and *K. pneumoniae* ATCC
208 700603 were used for quality control in antimicrobial susceptibility tests.
209
210 **2.5. Carbapenemase and *mcr-1* genes detection**
211 Molecular identification of carbapenemase production was studied with a
212 multiplex polymerase chain reaction (PCR), which included *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*,
213 *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{IMP}* genes [13]. A PCR protocol previously described
214 that detects *mcr-1* gene was used. MCR-1 Clinical Strain Z&Z1409 was
215 used as quality control strain [8, 14].
216
217 **3. Results**
218 **3.1. Isolates**
219 Three hundred and sixty-one isolates were studied. All isolates were
220 phenotypically confirmed as CRE at the reference laboratory, and 100 %
221 were positive for carbapenemase production.

222
1
2
3 223 CRE Isolates were obtained more frequently in 2016 and 2020 years, with
4
5 224 values ranging from 36.84 % (n=133) to 46.81 % (n=169) respectively. Only
6
7 225 59 (16.34%) isolates were received in 2022.
8
9
10 226 Most isolates were collected from rectal swabs (42.38%; n= 153), followed
11
12 227 by respiratory samples (15.79 %; n=57), blood (14.68 %; n=53) and urine
13
14 228 (10.25 %; n=37).
15
16
17 229
18
19 230 *K. pneumoniae* was the prevalent microorganism observed (n=322; 89.20%)
20
21 231 followed by *K. aerogenes* (n=17; 4.71 %), *E. cloacae* (n=11; 3.05 %), *E. coli*
22
23 232 (n=9; 2.49 %) and *K. oxytoca* (n=2; 0.55 %).
24
25
26 233
27
28
29 234 **3.2. Colistin susceptibility test and *mcr-1* detection**
30
31 235 The total rate of colistin resistance in CPE was 20.77 % (n= 75). CR-CPE
32
33 236 increased during the three time periods investigated. A value of 3.76% (n=5)
34
35 237 was observed in 2016, followed by 33.14% (n=56) in 2020 and 23.72%
36
37 238 (n=14) in 2022.
38
39
40 239
41
42
43 240 The microorganism with the highest CR observed was *K. aerogenes* (52.94
44
45 241 % n=9), followed by *K. pneumoniae* 20.19 % (n=65) and *E. cloacae* 9.09 %
46
47 242 (n=1).CR was not found in any of *E. coli* or *K. oxytoca* isolates.
48
49
50 243
51
52
53 244 The highest prevalence of CR-CPE was found in respiratory samples
54
55 245 (50.88%, n=57). Table 1 depicts the CR proportion of CR-CPE found in the
56
57 246 samples according to the microorganisms involved.
58
59
60
61
62
63
64
65

247
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

248 The *mcr-1* gene was not identified in any of the isolates studied.

249
250

251
252 **3.3. Carbapenemase production**

253 The *bla_{KPC}* gene was predominant in the CPE studied (n=353; 97.78 %),
254 *bla_{NDM}* (n=7; 1.93 %) and *bla_{OXA-48}* (n=1; 0.27 %) were also observed. The
255 *bla_{NDM}* gene was detected in *K. pneumoniae* (n=5), *K. aerogenes* (n=1) and
256 *E. cloacae* (n=1) while *bla_{OXA-48}* was present just in *E. coli*. The only
257 carbapenemase type involved in CR isolates was *bla_{KPC}*.

258
259 **3.4. Antimicrobial susceptibility profile of CR-CPE**

260 A high frequency of co-resistance to other antimicrobials was observed.
261 Only ceftazidime/avibactam (51 isolates tested) and
262 meropenem/vaborvactam (31 isolates tested) conserved 100% of
263 susceptibility in all CR-CPE studied. Tigecycline also remains susceptible
264 (90.27%) in CR-CPE. Susceptibility rates of CR-CPE to the antimicrobials
265 tested are detailed in table 2.

266
267 **Table 2. Susceptibility profile of Colistin-resistant carbapenemase-**
268 **producing Enterobacterales**

269
270 An increasing resistance trend in CR-*K. pneumoniae* to amikacin, ciprofloxacin,
271 and trimethoprim/sulfamethoxazole was observed during the three time periods
272 of the study

273
1
2 274 Co-resistance to one of the aminoglycosides, fluoroquinolones and
3
4
5 275 trimethoprim/sulphamethoxazole was observed in 77.58% (n=45/58) of CR-*K.*
6
7 276 *pneumoniae* isolates and 77.77 % (n=7/9) of CR- *K.aerogenes* isolates had an
8
9 277 XDR phenotype.
10
11 278
12
13
14 279 **4. Discussion**
15
16
17 280 The increasing trend in carbapenem-resistant *Enterobacterales* offers a
18
19 281 worldwide health challenge, since therapeutic approaches are no longer
20
21 282 effective, resulting in increased hospital admissions and mortality rates [15]. In
22
23 283 this context, old antibiotics such as colistin remain as a “last resort” treatment
24
25 284 option in low-income countries [1] .
26
27 285
28
29
30 286 Colistin resistance in *Enterobacterales* has been found to be on the rise
31
32 287 worldwide. The global frequency was 1.6% in 2013, rising to 3.6% in 2019.
33
34 288 According to this data, Latin America had the highest prevalence rates (6.7%)
35
36 289 [5]. Our findings demonstrated a similar pattern across the three time periods
37
38 290 investigated, describing an increased rate from 3.73 % to 23.73 % among the
39
40 291 isolates analyzed.
41
42
43 292
44
45
46 293 Our study focused on CPE and discovered a prevalence of colistin resistance of
47
48 294 21.9 %. Similar high CR values have been reported in other countries such as
49
50 295 Greece, Spain, and Italy, principally in carbapenemase-producing *K.*
51
52 296 *pneumoniae*, with values ranging from 40.4% (2019) to 31% and 43 % (2013)
53
54 297 respectively. According to other writers, this tendency is mostly related with
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

298 outbreaks [16]. Despite the lack of data on colistin resistance in CPE in Latin
299 America, Brazil reported a large CR rate (35.5%), owing primarily to KPC-2
300 production and mainly associated with outbreaks [17,18]. To the best of our
301 knowledge, despite the rising incidence of CPE in Ecuador [19], this is the first
302 study focused on CR surveillance in clinical isolates of CPE.
303
304 The increasing CPE prevalence in Ecuador could be attributable to clonal
305 spread during various outbreaks [20]. The majority of the antimicrobial
306 resistance reports in our country are focus on phenotypic characteristics, and
307 there is a paucity of evidence regarding genotypic studies (such as clonality,
308 plasmid characterization, mechanism of resistance and virulence) [21].
309
310 A national plan to tackle antimicrobial resistance was launched in 2019 in
311 Ecuador. This involves the establishment of infection control committees in
312 each hospital unit as well as the execution of an antimicrobial stewardship
313 program [22]. However, until the publication of this report, there is no official
314 report providing antibiotic resistance patterns in our country [23], and data on
315 healthcare-associated infections in each unit cannot be compared due to the
316 different monitoring types. This situation illustrates the scarcity of strategies and
317 research within the hospital units to prevent or control the spread of multidrug-
318 resistant microorganisms, and the important necessity for quantifying the impact
319 of antimicrobial stewardship programs and the infection control strategies in
320 each hospital included in this study.
321

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

322 Antimicrobial use in the clinical and outpatient settings determined antibiotic
323 resistance [24]. In Ecuador, as in other Latin American countries, there is a
324 scarcity of data on antimicrobial consumption in the community and inside the
325 hospitals [25]. However, it is well known that our population obtains antibiotics
326 without medical prescription. This situation demonstrates a lack of regulations
327 that contributes to an excessive antimicrobials consumption [26], particularly
328 during the COVID-19 pandemic years (2020-2023) [27], when an increase in
329 antimicrobial resistance was observed in gram-negatives pathogens worldwide
330 affecting healthcare-associated infections It is worth noting that the World
331 Health Organization (WHO) regards antibiotic consumption in agriculture as a
332 critical component in the fight against antimicrobial resistance [28]. Colistin use
333 in animals was forbidden in Ecuador only in 2019, although there is little
334 information on the adherence to this regulation [29].
335
336 Surprisingly, no *mcr-1* isolates were found in our research. Neither does any of
337 the other MCR variants. *mcr-1* production has previously been reported
338 previously in a clinical *E. coli* isolate collected in Ecuador in 2016 [30], and the
339 few reports available are limited to animal samples and environmental sources
340 [31,32]. One report shows a high prevalence of colistin-resistant *E. coli* and *K.*
341 *pneumoniae* in extended spectrum beta-lactamase (EBSL) (harboring the *mcr-*
342 *1* gene) with just one co-occurrence of carbapenemase genes in rural
343 communities in our country [33]. To the best of our knowledge, in Latin America
344 only *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* variants have been identified. The *mcr-3* gene
345 was identified in Brazil (*E. coli* isolated from pig samples) and *mcr-5* was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

346 reported in Colombia in an *E. coli* isolate, obtained from an human urinary
347 sample [34] .
348
349 The *mcr-1* gene is the most clinically and epidemiologically significant variant,
350 which its phenotypical expression is colistin resistance. Therefore, we could
351 presume that chromosomal mutations are the principal colistin resistance
352 mechanism involved in our isolates rather than plasmid origin, which is
353 supported by the epidemiology documented in the region. Additionally, our
354 collection was predominantly made up of *Klebsiella pneumoniae* (89.19%), and
355 the *mcr-1* enzyme is mainly described in *E. coli* [35]. We believe that further
356 studies are required to confirm other resistance mechanisms that may be
357 involved.
358
359 Additionally, we did not find any difference about CR between carbapenemase
360 type studied, but *K. aerogenes*, was the microorganism with the highest
361 resistance rate, as described for other authors [36]. This phenomenon was
362 observed in one hospital unit, which could be attributable to an outbreak, but
363 unfortunately, we did no carried out clonality studies.
364
365 In our study, most of our isolates showed co-resistance to aminoglycosides and
366 fluoroquinolones. Brazil reports a 16% of ciprofloxacin resistance and 20%
367 gentamycin resistance in multidrug-resistant *K.pneumoniae* which constitutes a
368 frequently described phenotypic in this country [37]. Another study in Tucuman,
369 Argentina, describes a 100% resistance to ciprofloxacin and 22% to gentamycin
370 [38]. It is a very concerning situation since these isolates should be classified as

1 371 extensively drug-resistant (XDR), according to Magiorakos et al. [12],
2 372 definitions, implying that discovering new medications should be given a high
3
4 373 priority in research.
5
6 374 Despite the limitations related to colistin susceptibility testing, the significant CR
7
8 375 rates found in our research imply that susceptibility testing should be necessary
9
10 376 before considering colistin as a therapeutic option [39,40].
11
12 377
13
14 378 A limitation of our study is that the hospitals involved were not the same in each
15
16 379 period analyzed, making difficult to analyze this increase in resistance per unit.
17
18 380 The presence of high resistance patterns to all the drugs used for CPE
19
20 381 treatment and the scarce available options in our country to treat them
21
22 382 (tigecycline, ceftazidime-avibactam or meropenem/vaborbactam could be
23
24 383 considered as the last resort options for treating XDR microorganisms
25
26 384 according to our results) shows the great importance of controlling antimicrobial
27
28 385 resistance within units and at a national level. The Ministry of Health should
29
30 386 closely monitor national politics on antimicrobial resistance, including human
31
32 387 medicine and the food industry and the recruitment of well-qualified infection
33
34 388 control teams that meet high standards levels must be the rule [41].
35
36 389
37
38 390 **5. Conclusion**
39
40 391 In conclusion, colistin resistance has dramatically increased in carbapenemase-
41
42 392 producing *Enterobacterales* in Ecuador. The absence of *mcr-1* production as a
43
44 393 mediator of the resistance mechanism suggests the involvement of additional
45
46 394 factors that need further investigation. Our findings show that a national
47
48 395 antimicrobial stewardship programmed must be adopted immediately.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

396

397

398

399

400

401

402 **DECLARATIONS**

403 **Ethics approval and consent to participate**

404 The study was carried out according to the Declaration of Helsinki and was
405 approved by the "Comité de Etica de Investigación en Seres Humanos de la
406 Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE)" [EO-26-2021] for strains
407 collected during 2022. "Comité de Etica del Hospital Clinica Kennedy" [HCK-
408 CEISH-19-0016] approved the research for isolates obtained during 2020, and
409 for the samples collected during 2016 the Comité de Bioética "Hospital Luis
410 Vernaza (HLV-DOF-CE-008)".

411

412 Informed consent was waived by the Ethical Committees of PUCE and Clínica
413 Kennedy because we collected the strains from biological samples and the
414 clinical information was anonymized. No data could be gathered from the
415 subjects from whom the strains were isolated. We gained approval from each
416 institution's clinical records committee There was no risk to the subjects, and
417 the study was found to be of high public health benefit.

418

1 419 Informed consent was obtained for the patients to participate in the research
2
3 420 carried out during 2016, which was approved by the Comité de Bioética
4
5 421 “Hospital Luis Vernaza”.
6
7 422
8
9
10 423 **Consent for publication**
11
12 424 Not applicable
13
14 425
15
16 426
17
18
19 427 **Availability of data and materials**
20
21 428 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from
22
23 429 the corresponding author on reasonable request.
24
25 430
26
27
28
29 431 **Competing interest**
30
31 432 The authors declare that they have no competing interests.
32
33 433
34
35
36 434 **Funding**
37
38 435 This work was supported by Universidad Católica de Santiago de Guayaquil
39
40 436 [grant number SIU#510-298, 2020] , [grant number SINDE 0875-2015,2015]
41
42 437 and Sosecali C. LTDA [grant number 001-020,2022].
43
44 438
45
46
47
48 439 **Author contributions**
49
50 440 SSCL, SSC, GFJ contributed to study conception, design, and analysis.
51
52 441 SSCL wrote the draft version of the manuscript. All authors commented on
53
54 442 previous versions of the manuscript. All authors reviewed, revised, and
55
56 443 approved the final manuscript.
57
58 444
59 445
60
61
62
63
64
65

1 446
2 447
3 448
4 449
5 450
6 451
7 452
8 453
9 454
10 455
11 456
12 457
13 458
14 459
15 460
16 461
17 462
18 463
19 464
20 465
21 466
22 467
23 468
24 469
25 470
26 471
27 472
28 473
29 474
30 475
31 476
32 477
33 478
34 479
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

- [1] Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* 2019;69:S565–75. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>.
- [2] Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022;399:629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [3] Peyclit L, Baron SA, Rolain JM. Drug repurposing to fight colistin and carbapenem-resistant bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00193>.
- [4] Mo Y, Lorenzo M, Farghaly S, Kaur K, Housman ST. What's new in the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019;93:171–81.
- [5] Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: A review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. vol. 46. 2022. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab049>.
- [6] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161–8. <https://doi.org/10.1016/S1473->

480 3099(15)00424-7.

1 481 [7] Osei Sekyere J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of
2 current diagnostics and detection methods. *Microbiologyopen* 2019;8:1–
3 482 21. <https://doi.org/10.1002/mbo3.682>.
4 483

5 484 [8] Ortega-Paredes D, Barba P, Zurita J. Short report colistin-resistant
6 Escherichia coli clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador.
7 485 *Epidemiol Infect* 2016;144:2967–70.
8 486 <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>.
9 487

10 488 [9] Bastidas-Caldes C, Guerrero-Freire S, Ortuño-Gutiérrez N, Sunyoto T,
11 Gomes-Dias C, Ramírez MS, et al. Colistin resistance in Escherichia coli
12 489 and Klebsiella pneumoniae in humans and backyard animals in Ecuador.
13 490 *Rev Panam Salud Pública* 2023;47:e48.
14 491

15 492 [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
16 Antimicrobial Susceptibility Testing; 31th informational supplement. CLSI
17 493 document M100-S31. Wayne, PA: 2021.
18 494

19 495 [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution
20 Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ;
21 496 Approved Standard — Ninth Edition. vol. 32. 2012.
22 497 <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>.
23 498

24 499 [12] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske
25 CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-
26 500 resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard
27 501 definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
28 502 <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
29 503

30 504 [13] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection
31 505 of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*
32 506 2011;70:119–23. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>.
33 507

34 507 [14] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon
35 P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated
36 508 colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for
37 509 surveillance purposes. *Eurosurveillance* 2018;23:1–11.
38 510 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>.
39 511

40 512 [15] Ait Ouakrim D, Cassini A, Cecchini M, Plauchoras D. The health and
41 513 economic burden of antimicrobial resistance. *Eur J Public Health*

- 514 2020;30:23–44. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckaa165.1201>.
- 1
2 515 [16] Otter JA, Doumith M, Davies F, Mookerjee S, Dyakova E, Gilchrist M, et
3
4 516 al. Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple
5
6 517 mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella*
7
8 518 *pneumoniae* in London. *Sci Rep* 2017;7:1–8.
9 519 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12637-4>.
- 10 520 [17] Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae
11 521 in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol*
12 522 2016;47:31–7. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>.
- 13 523 [18] Rocha VFD, Barbosa MS, Leal HF, Silva GEO, Sales NMMD, Monteiro A
14 524 de SS, et al. Prolonged Outbreak of Carbapenem and Colistin-Resistant
15 525 *Klebsiella pneumoniae* at a Large Tertiary Hospital in Brazil. *Front*
16 526 *Microbiol* 2022;13:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831770>.
- 17 527 [19] Satán C, Satyanarayana S, Shringarpure K, Mendoza-Ticona A, Palanivel
18 528 C, Jaramillo K, et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in bacteria
19 529 isolated from inpatient and outpatient samples, Ecuador, 2018. *Rev*
20 530 *Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal* 2023;47:1–10.
21 531 <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.14>.
- 22 532 [20] Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-gonzález A. Carbapenemase
23 533 producing Enterobacteriaceae in intensive care units. *J Infect Public*
24 534 *Health* 2019:1–9.
- 25 535 [21] Tamayo Trujillo V, A GR, Santiago C, Paz Cruz E, Ruiz Pozo V,
26 536 Zambrano Espinosa K. *CAMBios* 21(2) 2022. *CAMBIOS* 2022;21:1–8.
- 27 537 [22] Ministerio de Salud Pública. Plan Nacional para la Prevención y Control
28 538 de la Resistencia Antimicrobiana 2019-2023. *Dir Nac Vigil Epidemiológica*
29 539 2019:1–38. [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-Nacional-para-la-prevención-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana_2019_compressed.pdf)
30 540 *Nacional-para-la-prevención-y-control-de-la-resistencia-*
31 541 *antimicrobiana_2019_compressed.pdf* (accessed March 20, 2024).
- 32 542 [23] Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. “Leopoldo Izquieta
33 543 Pérez.” *Vigilancia de BLEE y carbapenemasas en Ecuador período 2018-*
34 544 *2021 n.d.* [http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-](http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2022/11/2do-Boletin-CRN-Resistencia-Antimicrobiana.pdf)
35 545 *content/uploads/2022/11/2do-Boletin-CRN-Resistencia-*
36 546 *Antimicrobiana.pdf* (accessed September 20, 2023).
- 37 547 [24] วิรัตน์ ทองรอด. Antimicrobial Resistance (AMR, การดื้อยาของเชื้อโรค). 2564.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

548 [25] Marin GH, Giangreco L, Dorati C, Mordujovich P, Boni S, Mantilla-Ponte
549 H, et al. Antimicrobial Consumption in Latin American Countries: First
550 Steps of a Long Road Ahead. *J Prim Care Community Heal* 2022;13.
551 <https://doi.org/10.1177/21501319221082346>.

552 [26] Ortiz-Prado E, Galarza C, León FC, Ponce J. Acceso a medicamentos y
553 situación del mercado farmacéutico en Ecuador 2014;36:57–62.

554 [27] Langford BJ, Soucy JPR, Leung V, So M, Kwan ATH, Portnoff JS, et al.
555 Antibiotic resistance associated with the COVID-19 pandemic: a
556 systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2023;29:302–
557 9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.12.006>.

558 [28] Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos n.d.

559 [29] Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario. AGROCALIDAD
560 PROHÍBE EL USO DEL ANTIBIÓTICO COLISTINA EN ANIMALES n.d.
561 [https://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad-prohibe-el-uso-del-
562 antibiotico-colistina-en-animales/](https://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-en-animales/) (accessed October 16, 2023).

563 [30] Barba P. SHORT REPORT Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical
564 isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador 2016:1–4.
565 <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>.

566 [31] Ortega-Paredes D, Barba P, Mena-López S, Espinel N, Crespo V, Zurita
567 J. High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the
568 Machángara urban river in Quito, Ecuador. *J Water Health* 2020;18:67–
569 76. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.195>.

570 [32] Ortega-Paredes D, de Janon S, Villavicencio F, Ruales KJ, De La Torre
571 K, Villacís JE, et al. Broiler Farms and Carcasses Are an Important
572 Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Front Vet
573 Sci* 2020;7:1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547843>.

574 [33] Bastidas-Caldes C, Cisneros-Vásquez E, Zambrano A, Mosquera-Maza
575 A, Calero-Cáceres W, Rey J, et al. Co-Harboring of Beta-Lactamases and
576 *mcr-1* Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Healthy
577 Carriers and Backyard Animals in Rural Communities in Ecuador.
578 *Antibiotics* 2023;12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050856>.

579 [34] Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin
580 resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. *Travel
581 Med Infect Dis* 2019;31:101459.

1 582 <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>.

2 583 [35] Hussein NH, AL-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD. Mobilized colistin

3 584 resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol*

4 585 *Rep* 2021;48:2897–907. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06307-y>.

5 586 [36] Mashaly GES, Mashaly MES. Colistin-heteroresistance in

6 587 carbapenemase-producing *Enterobacter* species causing hospital-

7 588 acquired infections among Egyptian patients. *J Glob Antimicrob Resist*

8 589 2021;24:108–13. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.019>.

9 590 [37] Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF da, Alves LC, Brayner FA, Veras DL,

10 591 et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-

11 592 modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*

12 593 and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob*

13 594 *Resist* 2020;21:255–61. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>.

14 595 [38] Vargas JM, Moreno Mochi MP, Nuñez JM, Cáceres M, Mochi S, del

15 596 Campo Moreno R, et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-

16 597 clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*

17 598 2019;5:23–8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>.

18 599 [39] Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Andrade-Soriano M, Quezada TN,

19 600 Gestal MC, Gutierrez-Fernandez J. Colistin resistance screening by

20 601 3 µg/ml colistin agar in Carbapenemase-producing Enterobacterales. *J*

21 602 *Clin Lab Anal* 2022;36. <https://doi.org/10.1002/jcla.24639>.

22 603 [40] Sz E, Toader S, Dobreanu M. Comparison of Six Phenotypic Assays with

23 604 Reference Methods for Assessing Colistin Resistance in Clinical Isolates

24 605 of Carbapenemase-Producing Enterobacterales : Challenges and

25 606 Opportunities 2022.

26 607 [41] Rhouma M, Madec J-Y, Laxminarayan R. Colistin: from the shadows to a

27 608 One Health approach for addressing antimicrobial resistance. *Int J*

28 609 *Antimicrob Agents* 2023;61.

29 610

30 611

31 612

32 613

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

Table 1. Colistin resistance in Carbapenemase-producing Enterobacterales according to clinical samples

Sample type	<i>K. pneumoniae</i>		<i>K. aerogenes</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>E. coli</i>		<i>K. oxytoca</i>		Total
	CR isolates/Total	% CR	CR isolates/Total	% CR	CR isolates/Total	% CR	CR isolates/Total	% CR	n	%	
Unknow origin	4/8	50.00	0/0	0.00	0/1	0.00	0/1	0.00	0/0	0.00	10
Tissue	0/4	0.00	1/1	100.00	0/0	0.00	0/1	0.00	0/0	0.00	6
Abscess	0/0	0.00	1/1	100.00	0/1	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	2
Rectal swab	6/139	4.32	0/4	0.00	0/4	0.00	0/4	0.00	0/2	0.00	153
Urethral discharge	1/2	50.00	0/0	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	2
Blood	14/50	28.00	1/2	50.00	0/1	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	53
Urine	12/35	34.29	0/1	0.00	0/0	0.00	0/1	0.00	0/0	0.00	37
Peritoneal fluid	2/6	33.33	0/0	0.00	0/0	0.00	0/2	0.00	0/0	0.00	8
Surgical wounds	3/12	25.00	1/1	100.00	1/4	25.00	0/0	0.00	0/0	0.00	17
Catheters	2/16	12.50	0/0	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	16
Respiratory samples	21/50	42.00	5/7	71.43	0/0	0.00	0/0	0.00	0/0	0.00	57
Total	65/322	20.19	9/17	52.94	1/11	9.09	0/9	0.00	0/2	0.00	361

Table 2. Susceptibility profile of Colistin-resistant carbapenemase-producing Enterobacterales

ANTIMICROBIALS	<i>K. pneumoniae</i>				<i>K. aerogenes</i>				<i>E. cloacae</i>			
	2016	2020	2022	Total	2016	2020	2022	Total	2016	2020	2022	Total CPE
Tigecycline	5/5 (100%)	46/52 (88.46%)	6/6 (100%)	57/63 (90.48%)	-	0/1 (0%)	8/8 (100%)	8/9 (88.89%)	-	1/1 (100%)	-	65/72 (90.27%)
Amikacine	2/5 (40%)	6/52 (11.53%)	0/6 (0%)	8/63 (12.70%)	-	0/1 (0%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.11%)	-	1/1 (100%)	-	10/73 (1.36%)
Gentamicine	2/4 (50%)	47/52 (90.38%)	4/6 (66.66%)	53/62 (85.48%)	-	0/1 (0%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.11%)	-	1/1 (100%)	-	55/72 (76.38%)
Ciprofloxacin	2/5 (40%)	0/52 (0%)	0/6 (0%)	2/63 (3.17%)	-	0/1 (0%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.11%)	-	0/1 (0%)	-	3/73 (4.10%)
Sulphamethoxazole/timethoprim	Not tested	2/52 (3.84%)	0/6 (0%)	2/58 (3.45%)	-	0/1 (0%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.11%)	-	1/1 (100%)	-	4/685.88%
Ceftazidime/avibactam	Not tested	35/35 (100%)	6/6 (100%)	41/41 (100%)	-	1/1 (100%)	8/8 (100%)	9/9 (100%)	-	1/1 (100%)	-	51/51 (100%)
Meropenem/varbobactam	Not tested	21/21 (100%)	6/6 (100%)	27/27 (100%)	-	1/1 (100%)	8/8 (100%)	9/9 (100%)	-	1/1 (100%)	-	37/37 (100%)

n susceptible/n total isolates tested (susceptibility percentage)

- (not isolates during the period)

CPE Carbapenemase-producing Enterobacterales

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

RESUMEN

Introducción: La resistencia a carbapenemes por producción de carbapenemasa en Enterobacterales constituye un problema de salud pública, debido a sus altas tasas de morbimortalidad, particularmente aquellas provocadas por *Klebsiella pneumoniae*. A pesar de la emergencia de nuevos antimicrobianos, en ciertas regiones su acceso continua siendo limitado, obligando a usar terapias de salvataje con combinaciones de antimicrobianos antiguos pero eficaces. La combinación colistina/fosfomicina no ha sido del todo estudiada, por lo cual nos propusimos estudiar “*in vitro*” la sinergia de colistina y fosfomicina en aislados clinicos de *Klebsiella pneumoniae* tipo KPC resistentes a la colistina, para determinar si en esta combinación podría existir sinergia y ser considerada como una opción terapéutica.**Métodos:** Se estudiaron diez aislados clinicos de *K. pneumoniae productores* de KPC, resistentes a colistina con el método de tablero de ajedrez. Se estudió la susceptibilidad antimicrobiana para varios antibióticos con el método de difusión en disco **Resultados** No se encontró sinergia en la combinación colistina/fosfomicina testada para ninguno de los aislados testados. Los aislados presentaron alto nivel de resistencia a amikacina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol. **Conclusiones:** No se recomienda el uso de la combinación colistina/fosfomicina en aislados clínicos de KPC

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

26 **INTRODUCCION**

27 La resistencia a carbapenemes por producción de carbapenemasas en

28 Enterobacteriales ha escalado a proporciones abismales a nivel mundial y es

29 considerada actualmente un problema de Salud Pública, por lo cual la

30 investigación enfocada en estos microorganismos multidrogoresistentes (MDRs)

31 ha sido priorizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹⁻³.

32 Dentro de este grupo de MDRs, las infecciones por *Klebsiella pneumoniae*

33 productora de carbapenemasa tipo KPC (KPC) ocupan un lugar importante por

34 sus altas tasas de prevalencia y morbimortalidad, que pueden incluso alcanzar

35 valores del 59%, sobretodo en países en desarrollo ⁴⁻⁶.

36 Si bien, en los últimos años se han introducido nuevos antimicrobianos ⁷ para

37 tratar las infecciones ocasionadas por KPC, su accesabilidad continua siendo

38 limitada en ciertas regiones, lo cual obliga a volver la mirada hacia

39 antimicrobianos antiguos como colistina o fosfomicina utilizándolos en terapias

40 de salvataje⁸⁻¹⁰ .

41 La fosfomicina es un antimicrobiano para el cual se han reportado altas tasas

42 de susceptibilidad , su acción bactericida radica en inhibir la síntesis del

43 peptidglucano en su primera fase citoplasmática, mientras que el principal

44 mecanismo de acción de la colistina consiste en alterar la permeabilidad de la

45 membrana externa ya que actúa como un agente tensoactivo uniéndose a los

46 lipopolisacáridos (LPS) y generando un efecto bactericida ¹¹.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

47 El uso de estos dos antimicrobianos se realiza únicamente en esquemas
48 combinados ya que la monoterapia promueve la selección de cepas
49 resistentes intratratamiento ^{9,11,12}

50 La literatura científica existente sobre la sinergia entre colistina y fosfomicina
51 en aislados clínicos productores de carbapenemasas es escasa. Sin embargo,
52 se conoce que la colistina tiene efectos sinérgicos con drogas hidrofílicas
53 como la fosfomicina, además que adicionalmente a su principal efecto
54 bactericida se ha descrito que puede provocar muerte celular al fusionar la
55 membrana externa con la membrana citoplasmática y por producción de
56 radicales hidroxilo libres e inhibición de enzimas respiratorias vitales ¹³ .

57 En base a la información disponible, nos propusimos determinar “*in vitro*” la
58 sinergia de colistina y fosfomicina (col/fos) con el método del tablero de
59 ajedrez, en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* tipo KPC resistentes a
60 la colistina.

61 **Métodos**

62 Se testaron diez aislados de *K. pneumoniae* con las siguientes características:
63 Resistentes a la colistina (no productores del gen *mcr-1*) y a carbapenemes por
64 producción de carbapenemasa tipo KPC. Los aislamientos fueron obtenidos de
65 diversas muestras clínicas.

66

67 **Detección de resistencia a colistina**

68 La concentración mínima inhibitoria a colistina (CMI) se obtuvo por la técnica de
69 microdilución en caldo de acuerdo a las guías del Clinical Laboratory Standards

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

70 Institute documento M7A9 ¹⁴. Se utilizó un rango de concentraciones de colisitna
71 entre 0.5 a 8 µg/ml, definiéndose como resistente todo valor ≥ 4 µg/ml ¹⁵.

72 Lo presencia del gen *mcr-1* se estudió con la técnica de reacción en cadena de
73 la polimerasa (PCR), con metodología previamente descrita ¹⁶.

74

75 **Deteccción de resistencia a carbapenemes**

76 La resistencia a carbapenemes se estudió con difusión por disco, utilizando
77 discos de meropenem (30 µg) (BioAnalysis, India) e imipenem (30 µg)
78 (BioAnalysis, India), siguiendo las recomendaciones del CLSI ¹⁵.

79 La producción de carbapenemasa se confirmó con el método de inactivación de
80 carbapenémicos ¹⁵ y la presencia de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}* y
81 *bla_{IMP}* fue confirmada molecularmente con una PCR múltiple ¹⁷.

82

83 **Deteccción de resistencia a fosfomicina**

84 La detección de resistencia fosfomicina se realizó siguiendo los lineamientos de
85 la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing sus puntos de
86 corte ¹⁸. Se utilizó el disco de fosfomicina 200 µg (BioAnalysis, India) y agar
87 Mueller Hinton (Difco, Inglaterra).

88

89 **Ensayos de sinergia de colistina y fosfomicina**

90 Los ensayos de sinergia se realizaron con la técnica de tablero de ajedrez, en
91 un volumen final de 200 µl. El rango de concentraciones utilizadas para
92 fosfomicina fue de 4 a 128 µg/ml y el de colistina de 4 µg/ml. Se utilizaron placas
93 de microtitulación de poliuretano no tratadas con fondo redondo. A los pocillos
94 de fosfomicina se les adicionó 25 mg/L de glucosa-6-fosfato (Sigma Chemical

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

95 Co., Estados Unidos) El detalle de la combinación de concentraciones se detalla
96 en la Figura Suplementaria No 1.
97
98 Los resultados se expresaron en términos de concentración inhibitoria fraccional
99 (CIF) para cada antibiótico. La CIF se calculó para colistina utilizando la siguiente
100 fórmula $CMI_{col-fos} / CMI_{colistina}$ y para fosfomicina $CMI_{fos-col} / CMI_{fosfomicina}$. El índice de
101 concentración inhibitoria fraccional para la combinación col/fos (ICIF) se calculó
102 sumando $CIF_{colistina} + CIF_{fosfomicina}$. Se consideró combinación sinérgica si el
103 índice CIF era de $\leq 0,5$, un IFIC = 1 la combinación es aditiva, valores de ICIF
104 de 1 a 4 se consideraron indiferentes y ICIF > 4 como antagónico.

105

106 **Susceptibilidad antimicrobiana**

107 Se realizó susceptibilidad antimicrobiana por difusión por disco para los
108 siguientes antimicrobianos: trimetoprim/sulfametoxazol, amikacina, gentamicina,
109 ciprofloxacina siguiendo las recomendaciones del CLSI ¹⁵. La susceptibilidad a
110 tigeciclina, se testó utilizando los punto de corte de la U. S Food and Drug
111 Administration de los Estados Unidos ¹⁹.

112

113 **RESULTADOS**

114

115 De las diez cepas trabajadas, el 60% correspondió a aislados provenientes de
116 muestras de orina. Tres cepas se aislaron del aparato respiratorio y una de un
117 líquido vesicular.

118

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

119 El 90 % de los aislamientos tenía resistencia a fosfomicina, con valores de
120 CMI₅₀ y CMI₉₀ ≥ 128 µg/ml.

121 La CMI₉₀ a la colistina fue ≥ 8 µg/ml, en el rango de resistencia. El detalle de la
122 CMI se detalla en la tabla 1.

123

124 En el 80 % de los aislados la combinación col/fos tuvo características
125 antagónicas (IFIC > 4), incluyendo el aislado susceptible a fosfomicina. El valor
126 de la CFI de cada antimicrobiano y el valor del índice de concentración inhibitoria
127 fraccional se detalla en la tabla. 1.

128

129 **Tabla 1. Detalle de la CMI, CIF e ICIF de *K. pneumoniae* KPC**

Código	CMI		CIF		ICIF	Interpretación
	Fosfomicina	Colistina	Fosfomicina	Colistina	VALOR	
1	≥ 128	8	128	128	17	Antagonismo
2	≥ 128	>= 128	128	128	2	Indiferencia
3	≥ 128	8	128	64	9	Antagonismo
4	≥ 128	8	128	64	9	Antagonismo
5	≥ 128	8	128	64	9	Antagonismo
6	32*	8	128	64	12	Antagonismo
8	≥ 128	8	128	128	17	Antagonismo
9	≥ 128	8	128	128	17	Antagonismo
11	≥ 128	8	128	128	17	Antagonismo
12	≥ 128	8	128	128	17	Indiferencia

CMI: concentración mínima inhibitoria; CIF: concentración inhibitoria fraccional; ICIF: índice concentración inhibitoria fraccional.

130

131

- Sensibles

132

133 Las cepas se caracterizaron por tener un patrón de resistencia a amikacina
134 (90%), trimetoprim/sulfametoxazol (100%) y ciprofloxacina (100%).
135 Ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborvactam y tigeciclina mantuvieron su
136 suceptibilidad en todos los aislados, mientras gentamicina en el 80% de los
137 aislados estudiados.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

138 **DISCUSION**

139

140 Actualmente, tratar las infecciones por KPC constituye un reto. Si bien, se han

141 desarrollado nuevos antimicrobianos, su disponibilidad continua siendo limitada

142 en países en vias de desarrollo, lo cual obliga a utilizar combinaciones

143 antibióticas de manera empírica como terapia de salvataje ¹¹.

144

145 Varios autores han demostrado efectos sinérgicos entre colistina y fosfomicina

146 con ensayos de farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) y curva de muerte en

147 cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 con susceptibilidad a los dos

148 fármacos estudiados, atribuyendo este efecto a que la colistina facilitaba la

149 entrada de fosfomicina al interior de la célula bacteriana aumentando su

150 concentración en el sitio activo ^{20,21}.

151

152 La sinergia positiva de la combinación col/fos también ha sido demostrada en

153 *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo NDM ²², *Acinetobacter*

154 *baumanii* extremadamente resistente (XDR: Extremely drug resistance) ²³ y

155 *Pseudomonas aeruginosa* en las cuales se demostró una mejor respuesta

156 microbiológica y menor mortalidad utilizando esta combinación versus recibiendo

157 monoterapia ²⁴.

158

159 Si bien, nuestro estudio demostró ausencia de sinergia para la combinación

160 col/fos para todas las concentraciones de fosfomicina probadas, podríamos

161 atribuir la diferencia encontrada a que en los estudios anteriormente

162 mencionados, se utilizaron cepas con sensibilidad a los dos fármacos

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

163 estudiados, mientras que nuestra investigación se enfocó en demostrar sinergia
164 en aislados de KPC con resistencia a ambos fármacos.
165
166 *Souli et al*, en el 2011, determinaron un 25% de sinergia en cuatro aislados de
167 KPC colistina resistente/fosfomicina sensible, con la técnica de curva de muerte
168 y sugirió que solo concentraciones altas de colistina (4 mg/L) y de fosfomina
169 (512 mg/L) podrían alcanzar efectos sinérgicos en cepas KPC resistentes a
170 colistina ²⁵. En este estudio no probamos la concentración de fosfomicina
171 anteriormente mencionada, ya que estas concentraciones superan los niveles
172 séricos, adicionalmente el mecanismo de resistencia involucrado en la
173 resistencia a colistina en el estudio previamente mencionado, se desconoce, lo
174 cual podría ser una variable a considerar que podría interferir en la diferencia de
175 los resultados obtenidos en este estudio.
176
177 Nuestros hallazgos concuerdan y refuerzan lo observado por *Wang et al* ²⁰, en
178 el 2018, al realizar estudios de farmacocinética y farmacodinamia (PD/PD) en
179 una única cepa KPC, en la cual que no se observó sinergia en la combinación
180 col/fos en cepas con resistencia a la colistina, incluso observó que este mismo
181 patrón se repetía en aislados con heteroresistencia a la colistina.
182
183 El método de tablero de ajedrez utilizado para el ensayo de sinergia en este
184 estudio se realiza con base en la microdilución en caldo, lo cual podría ser
185 tomado como una liminante, ya que la correlación entre la microdilución en caldo
186 y la dilución en agar (método de referencia) para la determinación de la
187 concentración mínima inhibitoria (CMI) a la fosfomicina en *Enterobacterales* es

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

188 controvertida, aunque existen autores que justifican su uso con ciertas
189 precauciones, las cuales fueron seguidas en este estudio¹².
190
191 De acuerdo con nuestras observaciones concluimos que la ausencia de sinergia
192 “*in vitro*”entre colistina y fosfomicina en las cepas KPC estudiadas, sugieren que
193 esta combinación terapéutica no puede ser considerada para su utilización en
194 infecciones por KPC.
195
196 **DECLARACIONES**
197
198 **Comité de ética y consentimiento a participar**
199 El estudio se llevó a cabo acorde con la Declaración de Helsinki y fue aprobado
200 por el “Comité de Ética del Hospital Clínica Kennedy [HCK-CEISH-19-0016].
201 No se requirió el consentimiento informado para procesar los
202 aislamientos bacterianos. Toda la información fue anonimizada y
203 ninguna información clínica se puede obtener a partir de los
204 aislamientos bacterianos utilizados en este estudio.
205
206 **Consentimiento para publicación**
207 No aplica
208
209 **Disponibilidad de información y materiales**
210 Las bases de datos utilizadas durante el estudio están disponibles bajo petición
211 al autor correspondiente.
212

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

213

214 **Conflicto de intereses**

215 Esta investigación fue financiada por Sosecali C. LTDA, pero los autres

216 declaras que el diseño, concepción, recolección , análisis e interpretación de

217 los resultados fue realizada con la participación exclusive de los investigadores

218 sin influencia de los patrocinadores.

219

220

221 **Financiamiento**

222 La siguiente investigación fue financiada por Sosecali C.LTDA (2020-001)

223

224 **Contribuciones en autoría**

225 SSCL, SSC, GFJ contribuyeron a la conceptualización, diseño y análisis

226 SSCL escribió la version en borrador. Todos los autores comentaron, revisaron

227 y aprobaron la version final del manuscrito..

228

229 **Agradecimiento**

230 No aplica

231

232

233

234

235

236

237

238

10

239 **BIBLIOGRAFIA**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

240

- 241 1. World Health Organization. WHO Publishes List of Bacteria for Which
242 New Antibiotics Are Urgently Needed [Internet]. [cited 2023 Aug 21].
243 Available from: [https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-
244 list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-
244 list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)
- 245 2. Lee YL, Chen HM, Hii IM, Hsueh PR. Carbapenemase-producing
246 Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment.
247 Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2022;59(2):106528. Available from:
248 <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106528>
- 249 3. Lee BY, Bartsch SM, Wong KF, McKinnell JA, Slayton RB, Miller LG, et
250 al. The potential trajectory of carbapenem-resistant enterobacteriaceae,
251 an emerging threat to health-care facilities, and the impact of the centers
252 for disease control and prevention toolkit. Am J Epidemiol.
253 2016;183(5):471–9.
- 254 4. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and
255 the threat of klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) resistance.
256 Infect Drug Resist. 2012;5(1):133–41.
- 257 5. Wise MG, Karlowsky JA, Lemos-Luengas E V., Valdez RR, Sahm DF.
258 Epidemiology and in vitro activity of ceftazidime-avibactam and
259 comparator agents against multidrug-resistant isolates of
260 Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa collected in Latin
261 America as part of the ATLAS surveillance program in 2015–2020.
262 Brazilian J Infect Dis [Internet]. 2023;27(3):102759. Available from:
263 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.102759>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

264 6. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-gonzález A. Carbapenemase
265 producing Enterobacteriaceae in intensive care units. *J Infect Public*
266 *Health*. 2019;1–9.

267 7. Hughes S, Gilchrist M, Heard K, Hamilton R, Sneddon J. Treating
268 infections caused by carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE):
269 A pragmatic approach to antimicrobial stewardship on behalf of the
270 UKCPA Pharmacy Infection Network (PIN). *JAC-Antimicrobial Resist*.
271 2020;2(3):1–11.

272 8. Veeraraghavan B, Bakthavatchalam YD, Sahni RD, Malhotra S, Bansal
273 N, Walia K. Loss of exclusivity of ceftazidime/avibactam in low- and
274 middle-income countries: a test for antibiotic stewardship practice. *Lancet*
275 *Reg Heal - Southeast Asia* [Internet]. 2023;15:100225. Available from:
276 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lansea.2023.100225>

277 9. Lim LM, Pharm D, Ly N, Anderson D, Pharm D, Yang JC, et al.
278 Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity,
279 Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy*. 2010;30(12):1279–
280 91.

281 10. Peyclit L, Baron SA, Rolain JM. Drug repurposing to fight colistin and
282 carbapenem-resistant bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:1–11.

283 11. Scudeller L, Righi E, Chiamenti M, Bragantini D, Menchinelli G, Cattaneo
284 P, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro efficacy of
285 antibiotic combination therapy against carbapenem-resistant Gram-
286 negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2021;57(5):106344.
287 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106344>

288 12. Oficial De La P, Española De Quimioterapia S. Q uimioterapia Q

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

289 uimioterapia Aspectos actuales en fosfomicina SPANISH JOURNAL OF
290 CHEMOTHERAPY. Rev Esp Quim [Internet]. 2019;32(1):1–66. Available
291 from: www.seq.es
292 13. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin update on its
293 mechanism of action and resistance, present and future challenges.
294 Microorganisms. 2020;8(11):1–12.
295 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution
296 Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ;
297 Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32, Methods for Dilution
298 Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;
299 Approved Standar- Ninth Edition. 2012. 18 p.
300 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
301 Antimicrobial Susceptibility Testing; 31th informational supplement. CLSI
302 document M100-S31. Clinical and Laboratory Standars Institute - NCCLS.
303 Wayne, PA; 2021.
304 16. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon
305 P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated
306 colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for
307 surveillance purposes. Eurosurveillance. 2018;23(6):1–11.
308 17. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection
309 of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis.
310 2011;70(1):119–23.
311 18. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint
312 Tables for Interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, valid
313 from 2023-06-29 [Internet]. [cited 2023 Aug 21]. Available from:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

314 https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

315 19. (FDA) U. F and DA. FDA-Identified Interpretative Criteria for Tigecycline.

316 20. Wang J, He JT, Bai Y, Wang R, Cai Y. Synergistic activity of
317 colistin/fosfomycin combination against carbapenemase-producing
318 *Klebsiella pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic
319 model. *Biomed Res Int.* 2018;2018.

320 21. Zhao M, Bulman ZP, Lenhard JR, Satlin MJ, Kreiswirth BN, Walsh TJ, et
321 al. Pharmacodynamics of colistin and fosfomycin: A “treasure trove”
322 combination combats KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J*
323 *Antimicrob Chemother.* 2017;72(7):1985–90.

324 22. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O.
325 Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and
326 NDM-producing *klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments.
327 *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1757–62.

328 23. Saelim W, Changpradub D, Thunyaharn S, Juntanawiwat P, Nulsopapon
329 P, Santimaleeworagun W. Colistin plus sulbactam or fosfomycin against
330 carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii*: Improved efficacy or
331 decreased risk of nephrotoxicity? *Infect Chemother.* 2021;53(1):128–40.

332 24. Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. Prevalence of in vitro synergistic
333 antibiotic interaction between fosfomycin and nonsusceptible
334 antimicrobials in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med*
335 *Microbiol.* 2019;68(6):893–7.

336 25. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z,
337 Kanellakopoulou K, et al. In vitro interactions of antimicrobial
338 combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella*

1	339	pneumoniae and protection of resistance development. Antimicrob Agents
2		
3	340	Chemother. 2011;55(5):2395–7.
4		
5	341	
6		
7	342	
8		
9		
10	343	
11		
12	344	
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		
43		
44		
45		
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
64		
65		

RESEARCH

Open Access



Risk factors associated with colistin resistance in carbapenemase-producing *Enterobacterales*: a multicenter study from a low-income country

Soria-Segarra Claudia^{1,2,3*} , Soria-Segarra Carmen^{1,4} , Díaz Andrés⁵ , Miranda-Ayala Marcela⁶ ,
Cevallos-Apolo Kerly⁷ , Bombón Moreno Bryan¹⁰ , Chuzan J. John⁹  and Gutierrez-Fernández José⁸ 

Abstract

Purpose The aim of this study was to assess the risk factors for colistin-resistant carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CR-CPE), and describe the mortality associated with this organism, in a low-income country.

Methods A descriptive, observational, and prospective multicenter study was carried out in Guayaquil, Ecuador. All patients with carbapenem-resistant *Enterobacterales* admitted between December 2021 and May 2022 were enrolled. Infection definitions were established according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) protocols. The presence of carbapenemase-producing *Enterobacterales* was confirmed with a multiplex PCR for *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{IMP}* genes. MCR-1 production was studied molecularly, and MLST assays were carried out.

Results Out of 114 patients enrolled in the study, 32 (28.07%) had at least one positive sample for CR-CPE. *Klebsiella pneumoniae* ST512-KPC-3 was the most frequent microorganism isolated. Parenteral feeding, β -lactamase inhibitor use, recent hemodialysis, and renal failure were all considered independent risk factors for carrying CR-CPE. A mortality of 41.22% was detected, but we could not find any difference between colistin-resistant and colistin-susceptible CPE. MCR-1 production was not detected in any of the isolates studied.

Conclusion A significant burden for CR-CPE was found in a South American country that was mainly caused by the high-risk clone *K. pneumoniae* ST512-KPC-3 and not mediated by *mcr-1* production. Its acquisition involved parenteral feeding, β -lactamase inhibitor use, recent hemodialysis, and renal failure as independent risk factors, demonstrating the critical need for infection prevention and stewardship programs to avoid dissemination to other countries in the region.

Keywords Colistin, Resistance, Carbapenemase-producing, *Enterobacterales*, Risk factors

*Correspondence:

Soria-Segarra Claudia
claudia.soria.s@gmail.com

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



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

The escalating proportion of healthcare-associated infections (HAI) caused by multidrug-resistant organisms (MDROs) constitutes a major health threat worldwide. Its economic burden is estimated at USD 1.1 billion per year, including more than 400,000 inpatient days and more than 10,000 deaths [1]. One of the leading causes of MDROs (multidrug-resistant organisms) infections are carbapenemase-producing *Enterobacterales*, microorganisms that have shown a rapid increase in prevalence during the last few years in developing countries [2–4].

The limited antimicrobial treatment options and insufficient development of new antibiotics against these microorganisms have forced physicians to use “last resort” drugs such as colistin [5]. As a consequence of this increase use of colistin, there has been a rise in the number of reports of colistin-resistant *Enterobacterales* [4, 6–9]. Colistin resistance is based on two principal mechanisms: the most frequent is a chromosomally encoded mechanism, whereas a less common form is through plasmid-mediated colistin resistance genes, such as *mcr* [10]. Although clinical experience with polymyxins began 40 years ago and therapeutic use for MDROs has dramatically increased in recent years, sparse data exist on the baseline prevalence and risk factors for colistin resistance among *Enterobacterales*; data from developing countries is particularly lacking [4, 8, 11].

In Ecuador, Ortega-Paredes et al. reported the first clinical isolate of colistin-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* in 2016 [12]. Since then, *mcr-1* in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* has been described in Ecuador in animals from rural farms [13]. Therefore, this study aimed to assess the epidemiology and risk factors associated with colistin-resistant carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CR-CPE) and describe the mortality in a low-income country.

Methodology

A descriptive, observational, and prospective multicenter study was carried out in six private and public hospitals in Guayaquil, Ecuador. All patients admitted with carbapenem-resistant *Enterobacterales* between December 2021 and May 2022 were enrolled. Patient information was collected from electronic medical records, and infection definitions were established according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) protocols [14].

The cases were patients infected or colonized with CR-CPE. All asymptomatic carriers were considered as colonized. The control group consisted of patients who tested negative for CR-CPE. The variables studied were: (1) sociodemographic data, (2) comorbidities, (3) Charlson's severity index, (4) immunosuppression, (5) presence

of invasive devices, (6) exposure to antimicrobials in the 90 days prior to CR-CPE screening, and (7) hospitalization unit.

Microbiological characterization

All carbapenem-resistant *Enterobacterales* isolates were identified by the relevant microbiology unit and were collected and processed according to the protocols established by each institution. Carbapenem resistance was defined as an isolate categorized as intermediate or resistant to meropenem, imipenem, or ertapenem, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints.

Strains included for further study were stored at each hospital unit in Stuart Medium at room temperature until processing in a reference laboratory. Only one clinical isolate from each patient was studied, with preference given to those from sterile sites or with the highest resistance phenotype observed.

All isolates received at the reference laboratory were cultured in MacConkey agar (Becton–Dickinson, England) (16–18 h; 35 °C) to check their viability and purity. Bacterial identification was made using the Vitek 2 System (GN-Card) (BioMérieux, France) and conventional biochemical tests.

Carbapenem resistance was screened with CHRO-Magar Super Carba (CHROMagar, France) and confirmed with the disk diffusion test for meropenem and ertapenem according to CLSI guidelines. Further characterization of carbapenemase production was undertaken with the modified inactivation carbapenem method, following the methodology previously described [15, 16].

Antimicrobial susceptibility profile

The minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin was determined using broth microdilution (CBM) as described in the CLSI document M07-A9 [15]. Analytical-grade colistin sulphate (Sigma-Aldrich Code C2700000, batch 3.0) and Mueller Hinton broth with cation adjustment (Thermo-Fischer Scientific, United Kingdom) were used. The concentration range was 0.5–8 µg/mL, and CLSI breakpoints were used to define colistin resistance (MIC values ≥ 4 µg/mL) [16].

Susceptibility tests for aztreonam, ceftriaxone, cefepime, piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, colistin, tigecycline, ceftazidime/avibactam, and meropenem/vaborbactam were performed using disk diffusion. The results were interpreted using the CLSI breakpoints [16]. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) breakpoints were used for tigecycline (<https://www.fda.gov/drugs/development-resources/tigecycline-injection-products>): for Fosfomycin IV, the EUCAST breakpoints

were used (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints). The intermediate category was interpreted as resistant to susceptibility profile analysis.

E. coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *K. pneumoniae* BAA ATCC 1705 were used for quality control of the bacterial identification tests and chromogenic agar and susceptibility tests. *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* AR Bank #0349 were used for the quality control of the CBM.

Molecular carbapenemase identification and mcr-1 detection

A multiplex polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} was used to confirm the carbapenemase type in all CPE cases [17]. The *mcr-1* gene was studied using a previously described multiplex PCR [18].

Clonality study

Clonal relatedness was studied in colistin-resistant *bla*_{KPC}-positive *Klebsiella pneumoniae* using ERIC-PCR, following the methodology previously described [3]. Isolates with 70% similarity in their electrophoretic pattern were not further analyzed.

Multilocus sequence typing (MLST) and determination of the KPC variant

KPC-positive colistin resistant *K. pneumoniae* with different electrophoretic patterns were studied with MLST using the protocol described at <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/primers-used/> and the sequence type assigned with the Klebsiella Pasteur MLST database (https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_isolates). Additionally, for KPC variant identification, the primers UNIKPCF and UNIKPCR were used [18]. Twenty-one strains of *Klebsiella pneumoniae* were sequenced at Macrogen INC., Korea. The quality of the chromatograms of each sequence was analyzed using the bioinformatic tools FinchTV and SnapGene. Alignment of sequences was performed with MEGA 11 software. Variants were also analyzed with the basic local alignment search tool (BLAST) database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINKLOC=blasthome). Sequence type (ST) numbers were determined using the public MLST website at (<http://pubmlst.org/kpneumoniae>).

Statistical analysis

The analyses were carried out with the statistical package IBM SPSS version 28. Descriptive statistics were used, representing the absolute and relative variables of the qualitative variables as well as measures of central tendency and variability for the quantitative variables.

In terms of inferential statistics, a bivariate analysis was performed to determine the variables to be considered in the multivariate analysis. The Mann–Whitney test was used for quantitative variables (verifying non-normality), whereas the chi-square and Fisher Tests were applied to qualitative variables.

Multivariate logistic regression analysis was used to predict colistin resistance. Statistical significance of the comparisons of proportions, means, and predictor variables was established as $p < 0.05$.

Ethical statement

This study was approved by the “Comite de Etica del Hospital Clinica Kennedy” [HCK-CEISH-19-0016]. Informed consent was waived due to the study design.

Results

CR-CPE clinical data

Out of 114 patients enrolled in the study, 32 (28.07%) had at least one positive sample for CR-CPE. Eleven patients (34.38%) were colonized, and 21 (65.62%) were infected with CR-CPE. A urinary tract infection was the most frequent disease, accounting for 38.10% ($n=8$), followed by ventilator-associated pneumoniae (33.33%, $n=7$), catheter-related bloodstream infections (9.52%, $n=2$), surgical site infections (4.76%, $n=1$), and others (4.92%, $n=3$). The median time from admission to CR-CPE detection was 32 days. Table 1 shows the patient clinical characteristics; the diseases included in the immunosuppression variable did not show any statistically significant difference between patients with CR-CPE and colistin-susceptible carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CS-CPE) (human immunodeficiency virus (0 (0.0%) vs. 6 (7.32%); $p=0.19$), neutropenia (1 (3.23%) vs. 5 (6.1%); $p=1.00$), steroid use (0 (0%) vs. 2 (2.44%); $p=1.00$), chemotherapy/radiotherapy (2 (6.45%) vs. 6 (7.32%); $p=1.00$).

We did not find any difference between CR-CPE and CS-CPE according to the type of unit where the microorganisms were isolated. These units included: intensive care unit (14 (43.5%) vs. 42 (51.85%)), medical wards (10 (31.25%) vs. 20 (24.69%)), surgical wards (2 (6.25%) vs. 6 (7.41%)), emergency department (1 (3.13%) vs. 3 (3.7%)), neonatal ward (0 (0%) vs. (1.23%)), neonatal intensive care unit (1 (3.313%) vs. (7.41%)), pediatric intensive care unit (0 (0) vs. 1 (1.3%)), post-critical care (4 (12.5%) vs. 2 (2.47%); $p=0.48$).

Univariate analysis

Renal failure diagnosis and comorbidity, hemodialysis, previous infection with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, total parenteral nutrition, and β -lactamase inhibitor (ampicillin/sulbactam, piperacillin/

Table 1 Clinical characteristics of hospitalized patients

Clinical characteristics	Total n = 114	Colistin-resistance		p-value
		Yes n = 32	No n = 82	
Age [median (IQR)]	56 (29–72)	61 (28–73)	50 (29–71)	0.297
Sex [n (%)]				
Female	40 (35.09)	8 (25)	32 (39.02)	0.159
Male	74 (64.91)	24 (75)	50 (60.98)	
Charlson [median (IQR)]	2 (0–4)	2 (1–6)	2 (0–3)	0.143
APACHE [median (IQR)]	15 (9–21)	16 (13–22)	15 (6–21)	0.201
Diagnostic [n (%)]				
Neurological disease	35 (30.97)	11 (35.48)	24 (29.27)	0.524
Acute respiratory failure	24 (21.05)	6 (18.75)	18 (21.95)	0.706
Chronic heart failure	14 (12.28)	5 (15.63)	9 (10.98)	0.532
Renal failure	17 (14.91)	9 (28.13)	8 (9.76)	0.020 ^a
Diabetes mellitus	13 (11.4)	5 (15.63)	8 (9.76)	0.512
Immunosuppression	13 (11.61)	3 (9.68)	10 (12.35)	1.000
Gastrointestinal disease	11 (9.65)	2 (6.25)	9 (10.98)	0.725
Malignancy	8 (7.02)	3 (9.38)	5 (6.1)	0.684
Polytrauma	7 (6.14)	3 (9.38)	4 (4.88)	0.399
Sepsis	6 (5.26)	1 (3.13)	5 (6.1)	1.000
Comorbidities [n (%)]				
Renal failure	28 (24.78)	12 (38.71)	16 (19.51)	0.035 ^a
Chronic heart failure	51 (45.13)	17 (54.84)	34 (41.46)	0.202
Diabetes mellitus	32 (28.57)	11 (35.48)	21 (25.93)	0.316
Malignancy	17 (15.04)	6 (19.35)	11 (13.41)	0.556
Neurological disease	16 (14.16)	2 (6.45)	14 (17.07)	0.227
Immunosuppression	13 (11.5)	2 (6.45)	11 (13.41)	0.509
Chronic pulmonar disease	4 (3.6)	1 (3.23)	3 (3.75)	1.000
Length of hospital stay [median (IQR)]	39 (20–156)	44 (21–124)	38 (19–158)	0.709
Mortality [n (%)]	47 (41.23)	14 (43.75)	33 (40.24)	0.733

Guayaquil-Ecuador; ^a Statistical significance $p > 0.05$

IQR interquartile range

tazobactam) use were considered risk factors for CR-CPE in the univariate analysis (Tables 1 and 2).

Multivariate analysis

Our multivariate analysis showed that renal failure diagnosis, hemodialysis, isolation of CR-CPE in the preceding 3 months, total parenteral nutrition, and β -lactamase inhibitor use were independent risk factors for CR-CPE (Table 3).

Carbapenemase production characterization and colistin resistance

A total of 114 carbapenem resistant isolates were obtained. All were characterized as carbapenemase producers. *K. pneumoniae* was the most prevalent microorganism isolated (93.50%, $n = 72$), followed by *E. cloacae* ($n = 3$) and *K. aerogenes* ($n = 2$). bla_{KPC} was the most prevalent gene found in CPE; however, one

K. pneumoniae isolate produced NDM. Thirty-two *K. pneumoniae* isolates were categorized as colistin resistant, and all were KPC producers. Detailed information on susceptibility profiles is given in Table 4.

Values of minimal inhibitory concentration to colistin are detailed in Additional file 2: Table S1. Colistin MIC distribution.

Molecular characterization of CR-CPE

Eleven electrophoretic patterns were found in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates (Additional file 1: Fig S1. Dendrogram of ERIC PCR results). These were sequenced and analyzed to determine the KPC variant and the ST. ST512, which carried the KPC-3 variant, was predominant (90.90%, $n = 10$). Only one isolate of ST111 with the KPC-2 variant was detected.

Table 2 Univariate analysis risk factor for colistin-resistance carbapenemase-producing *Enterobacterales*

Variables	Total n= 114 n (%)	Collistin resistance		p-value
		Yes n= 32 n (%)	No n= 82 n (%)	
Invasive procedures				
Mechanical ventilator	74 (64.91)	23 (71.88)	51 (62.2)	0.331
Central venous catheter	76 (67.26)	21 (67.74)	55 (67.07)	0.946
Urinary catheter	90 (79.65)	25 (78.13)	65 (80.25)	0.801
Gastrostomy	16 (14.55)	5 (16.67)	11 (13.75)	0.763
Tracheostomy	46 (40.35)	16 (50)	30 (36.59)	0.19
Nasogastric tube	74 (64.91)	18 (56.25)	56 (68.29)	0.226
Hemodialysis catheter	25 (22.12)	13 (41.94)	12 (14.63)	0.002 ^a
Surgery	44 (38.94)	12 (38.71)	32 (39.02)	0.976
Total parenteral Nutrition	24 (21.43)	2 (6.67)	22 (26.83)	0.021 ^a
Peripheral catheter	87 (77.68)	19 (63.33)	68 (82.93)	0.027 ^a
Antimicrobials				
β-lactam-inhibitors	31 (27.19)	13 (40.63)	18 (21.95)	0.044 ^a
Cephalosporins	32 (28.07)	8 (25)	24 (29.27)	0.649
Aztreonam	2 (1.75)	1 (3.13)	1 (1.22)	0.484
Carbapenem	56 (49.12)	16 (50)	40 (48.78)	0.907
Quinolone	27 (23.68)	7 (21.88)	20 (24.39)	0.777
Vancomycin	44 (38.6)	10 (31.25)	34 (41.46)	0.314
Clindamycin	17 (15.18)	5 (16.13)	12 (14.81)	1.000
Doxycycline	6 (5.26)	1 (3.13)	5 (6.1)	1.000
Tigecycline	11 (9.65)	4 (12.5)	7 (8.54)	0.499
Colistin	15 (13.16)	6 (18.75)	9 (10.98)	0.355
Aminoglycosides	20 (17.54)	5 (15.63)	15 (18.29)	0.736
Trimethoprim/sulfamethoxazole	9 (7.89)	2 (6.25)	7 (8.54)	1.000
Metronidazol	13 (11.4)	3 (9.38)	10 (12.2)	1.000
Macrolides	15 (13.51)	5 (15.63)	10 (12.66)	0.761
Linezolid	10 (9.01)	4 (12.5)	6 (7.59)	0.47
Microorganism isolated previous CR-CPE				
ESBL <i>E. coli</i>	5 (4.39)	0 (0)	5 (6.1)	0.32
ESBL <i>K. pneumoniae</i>	2 (1.75)	0 (0)	2 (2.44)	1.00
Carbapenem-resistant <i>A. baumannii</i>	5 (4.39)	4 (12.5)	1 (1.22)	0.021 ^a
Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	7 (6.14)	3 (9.38)	4 (4.88)	0.399
<i>E. coli</i>	3 (2.63)	1 (3.13)	2 (2.44)	1.00
<i>K. pneumoniae</i>	2 (1.75)	0 (0)	2 (2.44)	1.00
<i>A. baumannii</i>	4 (3.51)	0 (0)	4 (4.88)	0.20
Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i>	1 (0.88)	0 (0)	1 (1.22)	1.00
<i>P. aeruginosa</i>	1 (0.88)	0 (0)	1 (1.22)	1.00
<i>E. cloacae</i>	2 (1.75)	0 (0)	2 (2.44)	1.00
Otros	28 (24.56)	7 (21.88)	21 (25.61)	0.677
Previous exposures within 3 months				
Hospitalization	47 (41.96)	14 (43.5)	33 (41.25)	0.809
Immunosuppression	21 (18.58)	8 (25.0)	13 (16.05)	0.270
Intubation	17 (15.18)	4 (12.5)	13 (16.25)	0.774
Invasive procedures	21 (18.58)	4 (12.5)	17 (20.99)	0.296
Hemodialysis	9 (8.04)	6 (18.75)	3 (3.75)	0.016 ^a

Table 2 (continued)

Chi-squared test or Fisher's exact test

^a Statistical significance $p > 0.05$

CR-CPE Colistin-resistant carbapenemase producing *Enterobacteriales*, ESBL extended-spectrum beta-lactamase

None of the other carbapenemase genes studied were positive, nor was the *mcr-1* gene.

Discussion

Our 6 month surveillance confirmed a high prevalence of CR-CPE in Guayaquil, the most populated city of Ecuador. Reports from Brazil and other South American countries, including one from PAHO (the Pan-American Health Organization), have shown CR-CPE prevalence rates ranging from 4 to 38.5% [4, 8, 11, 19, 20], with *K.*

pneumoniae as the most frequent microorganism isolated [21]. Since resistance to carbapenem in different institutions in Ecuador is elevated, colistin has become the first-line drug to treat infections caused by Gram-negative pathogens, particularly in the ICU [3]. This explains the increase in colistin use and may have contributed to the increasing colistin resistance rates.

High mortality rates occur in patients infected with CR-CPE and range from 9 to 38% [8, 20, 22–25]. However, we did not find statistical differences in mortality for CR-CPE

Table 3 Multivariate and Univariate analyses of risk factors associated with the development of colistin-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriales* strains

Risk factors	Univariate		Multivariate	
	OR (IC95%)	p-value	OR (IC95%)	p-value
Renal failure diagnosis				
Renal failure	3.62 (1.25–10.46)	0.018 ^a	0,1 (0.11–2.48)	0.03 ^a
Previous exposure within 3 months				
Hemodialysis	5.92 (1.38–25.39)	0.017 ^a	3.45 (0.51–23.9)	0.03 ^a
Invasive procedures				
Hemodialysis catheter	4.1 (1.65–10.79)	0.003 ^a	3.20 (0.77–13.37)	0.110
Parenteral nutrition	0.20 (0.043–0.89)	0.034 ^a	0.15 (0.02–0.94)	0.043 ^a
Peripheral catheter	0.36 (0.4–0.91)	0.031 ^a	0.39 (0.13–1.14)	0.084
Antimicrobial use				
Previous exposure to β-lactamase-inhibitor	2.43 (1.01–5.85)	0.047 ^a	2.97 (1.07–8.24)	0.036 ^a

Guayaquil-Ecuador

^a $p < 0.05$

Table 4 Susceptibility profile of colistin-resistant and colistin-susceptible carbapenemase producing-*Enterobacteriales*

Antibiotic	<i>K. pneumoniae</i>			<i>E. aerogenes</i>			<i>E. cloacae</i>		
	Total	Collistin-resistance		Total	Collistin-resistance		Total	Collistin-resistance	
		Yes	No		Yes	No		Yes	No
	n = 84	n = 25	n = 54	n = 3	n = 1	n = 2	n = 3	n = 1	n = 2
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Meropenem	0/84 (0)	0/25 (0)	0/54 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)
Ertapenem	0/84 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)
Aztreonam	0/84 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)
Piperacillin/tazobactam	0/84 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)
Amikacin	29/79 (36.7)	1/25 (4)	28/54 (52)	3/3 (100)	1/1 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	2/2 (100)
Gentamicin	48/79 (60.75)	21/25 (84)	27/54 (50)	2/3 (66.67)	1/1 (100)	1/2 (50)	1/2 (50)	1/1 (100)	1/2 (50)
Ciprofloxacin	8/78 (10.25)	0/25 (0)	8/54 (15)	1/3 (33.3)	0/1 (0)	1/2 (50)	1/2 (50)	0/1 (0)	1/2 (50)
Tigecycline	31/53 (58.49)	25/25 (100)	26/37 (70)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	2/2 (100)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	2/33 (6.06)	1/25 (4)	1/8 (13)	0/1 (0)	0/1 (0)		0/1 (0)	0/1 (0)	
Ceftazidime-avibactam	25/25 (100)	25/25 (100)		0/1 (100)	0/1 (100)		1/1 (100)	1/1 (100)	
Meropenem/vaborbactam	23/25 (92)	23/25 (92)					1/1 (100)	1/1 (100)	
Fosfomicin iv	5/25 (20)	5/25 (20)		0/1 (100)	0/1 (9)		0/1 (0)	0/1 (0)	

vs. CS-CPE ($p=0.73$). However, other published reports from Italy and Brazil did show a statistical difference in mortality rates in patients infected with CR-CPE vs. CS-CPE [22, 23, 25]. We hypothesized that this difference could be due to the presence of bloodstream infections in the Italian groups and the inclusion of neonates by the Brazilian team. Bloodstream infections produce higher mortality rates than urinary tract infections [22, 25–27], which was the most frequent infection identified in our data.

Our multivariate analysis showed renal failure, hemodialysis, parenteral nutrition, and β -lactamase inhibitor use as independent risk factors associated with CR-CPE. Other studies have described different comorbidities associated with CR-CPE, including neurological disease [28], chronic kidney disease [23], and Charlson score >3 [22, 23, 28]. A multi-variate analysis revealed that renal failure was an independent predictor for CR-CPE in critically ill patients (OR 11.37, 95% IC CI 1.0–128.63) [23]. A relevant difference between studies could be that they were undertaken with different populations, healthcare facility levels, sample sizes, and methodologies.

Total parenteral nutrition has not been previously recognized as an independent risk factor for CR-CPE, since most studies do not include this variable [5, 23, 28]. Nutrition support impacts the gastrointestinal microbiota, predisposing a trend towards greater abundance for pathogenic Proteobacteria (including the families of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, and *Klebsiella*), which differs from healthy individuals who have high abundance of Bacteroidetes and Firmicutes [29].

Interestingly, isolation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* was determined in the univariate analysis as a risk factor for CR-CPE. However, we could not find this association in the multivariate analysis, probably due to the small sample size. This suggests that controlling carbapenem use may help to mitigate the emergence of CR-CPE [30].

Prior antibiotic exposure is considered an important risk factor for colistin resistance [20, 21, 28, 31]. In our study, β -lactamase inhibitors were found to be independent predictors of CR-CPE. In our country, these antimicrobials are frequently used in patients with community onset infections, which could predispose multidrug-resistant microorganism isolation [28].

We found no link between colistin-resistant isolates and previous exposure to colistin [21, 22, 27, 28, 32]. However, the findings on this topic are still controversial [31, 33]; one study found a protective effect for the use of colistin–tigecycline combination therapy [34], whereas another showed a protective effect for aminoglycosides in acquired colistin-resistant strains [23]. In our institutions, colistin is used when a CPE infection is suspected

and confirmed. Thus, previous colistin use was not frequent in our data.

The epidemiology of carbapenemase is dynamic [3, 35], and this is the first time that KPC-3 ST512 has been reported in our country. Despite having been previously reported, no OXA carbapenemase types were found in this study. The clinical implications of this are significant, since this knowledge influences the selection of empirical antibiotics. The most prevalent STs in the clonal group CG258 are ST512 and ST258. Notably, the emergence of the bla_{KPC-3} gene has been related to the spread of ST512 in Italy [36], Algeria, Israel [37], and Spain [38], has been linked to the coexistence of several *K. pneumoniae* subpopulations, and is particularly associated with outbreaks.

Plasmid-mediated colistin resistance, especially related to the *mcr-1* gene, is increasing in frequency in Ecuador, Argentina, Brazil, and Colombia [7, 12, 13] and is the most relevant mechanism in colistin resistance; however, it has mainly been described in *E. coli* [13]. Our sample was composed mostly of *K. pneumoniae*, where this resistance mechanism is rarely involved. Our study did not find this mechanism of resistance in any isolations, suggesting another mechanism could be involved. A recent meta-analysis published by Yusof et al. evaluated the prevalence of mutations in colistin-resistance genes worldwide and showed that the mutation most frequently reported was in the *mgrB* gene, followed by the *prnB* and *phoQ* genes, which supported the idea that a genetic mutation on chromosomal genes may be involved in our resistant isolates [10]. In South America and Europe, different countries have found chromosomal mutations to be the most frequent mechanism causing colistin resistance [11, 22–24, 39].

This study has several limitations. First, our sample size was insufficient and the statistical analysis did not have the power to extrapolate the findings to the entire population. Second, we were unable to distinguish the colistin resistance genetic etiology, which was different from the *mcr-1* gene. Finally, the results could not be extrapolated to CR-CPE harboring the *mcr-1* gene because non-CR-CPE strains carrying the gene were found in our study. Despite these limitations, our research provides important data about the risk factors associated with CR-CPE in low-income developing nations and warns of their transferability to neighboring South American countries.

In conclusion, a significant burden for CR-CPE was found in a South American country; this was mainly caused by *K. pneumoniae* ST512-KPC-3 and parenteral feeding, β -lactamase inhibitor use, recent hemodialysis, and renal failure, which were all independent risk factors for carrying CR-CPE. This article demonstrated the

critical need for infection prevention and stewardship programs and emphasizes the importance of researching other colistin-resistant mechanisms in underdeveloped nations, where most hospital laboratories do not regularly screen for colistin susceptibility.

Abbreviations

CR-CPE	Colistin-resistant carbapenemase-producing <i>Enterobacteriales</i>
CDC	Centers for disease control and prevention
HAI	Healthcare-associated Infections
MDROs	Multidrug-resistant organisms
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
MIC	Minimal inhibitory concentration
ATCC	American type culture collection
PCR	Polymerase chain reaction
CR	Colistin resistance
MLST	Multilocus sequence typing
BLST	Basic local alignment search tool
CS-CPE	Colistin-susceptible carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i>
CPE	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriales</i>
ST	Sequence type

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00609-8>.

Additional file 1: Figure S1. Dendrogram of ERIC PCR Results.

Additional file 2: Table S1. Colistin MIC distribution

Acknowledgements

We thank all the health personnel of the microbiology laboratory for their collaboration and SOSECALI C. Ltd. for their institutional support.

Author contributions

SSCL, SSC, and GFJ contributed to study conception, design, and analysis. SSCL wrote the draft version of the manuscript. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors reviewed, revised, and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by Universidad Católica de Santiago de Guayaquil (Grant Number SIU#510-298).

Availability of data and materials

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the "Comite de Etica del Hospital Clinica Kennedy" [HCK-CEISH-19-0016]. Informed consent was waived by the Ethical Committee, to collect the strains from biological samples and anonymized clinical information. No data could be gathered from the subjects from whom the strains were isolated. We gained approval from each institution's clinical records committee. There was no risk to the subjects, and the study was found to be of high public health benefit.

Consent for publication

Not applicable.

Competing Interests

There are no competing interests to declare.

Author details

¹Sosecall. Medical Services, Guayaquil, EC 090308, Ecuador. ²Faculty of Medical Sciences, Guayaquil University, Guayaquil, Ecuador. ³Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada & Ibs, Granada, Spain. ⁴Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. ⁵Hospital Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. ⁶Omni Hospital, Guayaquil, Ecuador. ⁷Hospital de Infectología Dr. José Daniel Rodríguez Mariñueña, Guayaquil, Ecuador. ⁸Present Address: Department of Microbiology, Hospital Virgen de las Nieves, Institute for Biosanitary Research-Ibs, Granada, Spain. ⁹Department of Microbiology, Hospital Alcívar, Guayaquil, Ecuador. ¹⁰Department of Human Biology, University of Toronto, Toronto, Canada.

Received: 31 January 2023 Accepted: 5 July 2023

Published online: 02 August 2023

References

- Nelson RE, Hyun D, Jezek A, Samore MH. Mortality, length of stay, and healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among elderly hospitalized patients in the United States. *Clin Infect Dis*. 2022;74:1070–80.
- Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-González A, Apolo-Matamoros M, Vega-Franco F, Chung-Sang M, et al. Macrolides: a novel risk factor for carbapenemase-producing *Enterobacteriales* in intensive care units. *J Infect Dev Ctries*. 2021;15:584–9.
- Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-González A, Gutiérrez-Fernández J. Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units in Ecuador: results from a multicenter study. *J Infect Public Health*. 2020;13:80–8.
- Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, de Almeida JN, da Duarte AJS. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis*. 2017;21:98–101.
- Mills JP, Rojas LJ, Marshall SH, Rudin SD, Hujer AM, Nayak L, et al. Risk factors for and mechanisms of CO listin R resistance among *E. coli* Enterobacteriales: getting at the CORE of the issue. *Open Forum Infect Dis*. 2021;8:145.
- Elbediwi LJ, Paudyal P, Li X, et al. Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). *Microorganisms*. 2019;7:461.
- Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. 2019;51:93–100.
- Rossi Gonçalves I, Ferreira ML, Araujo BF, Campos PA, Royer S, Batistão DWF, et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2016;94:322–9.
- Longo LGA, De Sousa VS, Kraychete GB, Justo-da-Silva LH, Rocha JA, Superti SV, et al. Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro. *Brazil Int J Antimicrob Agents*. 2019;54:579–86.
- Yusof NY, Norazzman NII, Hakim SNWA, Azlan MM, Anthony AA, Mustafa FH, et al. Prevalence of mutated colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7:414.
- Naomi-Matsuoka A, Vargas M, Ymaña B, Soza G, Pons MJ. Resistencia a colistina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogorresistente del periodo 2015–2018 en un hospital materno perinatal de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2020;37:716–20.
- Ortega-Paredes D, Barba P, Zurita J. Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiol Infect*. 2016;144:2967–70.
- Bastidas-Caldes C, Guerrero-Freire S, Ortuño-Gutiérrez N, Sunyoto T, Gomes-Dias CA, Ramirez MS, et al. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in humans and backyard animals in Ecuador. *Rev Panam Salud Pública*. 2023;47:1.
- National Healthcare Safety Network. Surveillance Definitions. 2023. https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/17pscnosinfdef_current.pdf

15. Cockerill FR. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9th ed. Wayne: Pa CLSI; 2012.
16. Weinstein MP, editor. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Thirty-first edition. United State of America: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
17. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:119–23.
18. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MMM, et al. Phenotypic and molecular detection of the blaKPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2016;16:737.
19. World Health Organization. The European health report 2021 taking stock of the health-related sustainable development goals in the COVID-19 era with a focus on leaving no one behind. Copenhagen: World Health Organization; 2022.
20. Deglmann RC, Oliveira DD, França PHCD. Perfil fenotípico de resistência à colistina e tigeciclina em um hospital público no Brasil. *Rev Epidemiol E Controle Infecção*. 2019. <https://doi.org/10.1705/v94.13345>.
21. Kaza P, Mahindroo J, Veeraraghavan B, Mavuduru RS, Mohan B, Taneja N. Evaluation of risk factors for colistin resistance among uropathogenic isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study. *J Med Microbiol*. 2019;68:837–47.
22. Giacobbe DR, Del Bono V, Treccarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control study. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:1106.e1–1106.e8.
23. da Silva KE, Baker S, Croda J, Nguyen TNT, Bolnett CJ, Barbosa LS, et al. Risk factors for polymyxin-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in critically ill patients: an epidemiological and clinical study. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55:105882.
24. Rocha VFD, Barbosa MS, Leal HF, Silva GEO, Sales NMM, de Monteiro ASS, et al. Prolonged outbreak of carbapenem and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* at a large tertiary hospital in Brazil. *Front Microbiol*. 2022;13:831770.
25. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E23–30.
26. Haytoğlu Z, Gündeşlioğlu ÖÖ, Yıldızdaş D, Kocabaş E, Alabaz D, Horoz ÖÖ. Carbapenem and colistin resistance in children with enterobacteriaceae infections. *Turk J Pediatr*. 2020;62:778.
27. Büchler AC, Gehringer C, Widmer AF, Egli A, Tschudin-Sutter S. Risk factors for colistin-resistant *Enterobacteriaceae* in a low-endemicity setting for carbapenem resistance—a matched case-control study. *Eurosurveillance*. 2018. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.30.1700777>.
28. Richter SE, Miller L, Uslan DZ, Bell D, Watson K, Humphries R, et al. Risk factors for colistin resistance among gram-negative rods and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e00149–e218.
29. Andersen S, Banks M, Bauer J. Nutrition support and the gastrointestinal microbiota: a systematic review. *J Acad Nutr Diet*. 2020;120:1498–516.
30. Baron SA, Cassir N, Hamel M, Hadjadj L, Saidani N, Dubourg G, et al. Risk factors for acquisition of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* and expansion of a colistin-resistant ST307 epidemic clone in hospitals in Marseille, France 2014 to 2017. *Eurosurveillance*. 2021. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.21.2000022>.
31. Arjun R, Nambi PS, Kumar DS, Madhumitha R, Ramasubramanian V. A study of 24 patients with colistin-resistant gram-negative isolates in a tertiary care hospital in South India. *Indian J Crit Care Med*. 2017;21:317–21.
32. Papadimitriou-Oliveris M, Bartzavali C, Spyropoulou A, Lambropoulou A, Sioulas N, Vamvakopoulou S, et al. Molecular epidemiology and risk factors for colistin- or tigecycline-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in critically ill patients during a 7-year period. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;92:235–40.
33. Chen S, Hu F, Zhang X, Xu X, Liu Y, Zhu D, et al. Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4022–3.
34. Huang P-H, Chen W-Y, Chou S-H, Wang F-D, Lin Y-T, She RC. Risk factors for the development of colistin resistance during colistin treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Microbiol Spectr*. 2022;10:e00381–e422.
35. Herrera Dutan EV, Andrade Campoverde D, Reinoso Rojas YV, Herrera Dutan EV, Andrade Campoverde D, Reinoso Rojas YV. Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella pneumoniae*. *Ecuador Vive Rev Salud*. 2021;4:36–49.
36. Jousset AB, Bonnin RA, Takissian J, Girlich D, Mihaila L, Cabanel N, et al. Concomitant carriage of KPC-producing and non-KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 within a single patient. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75:2087–92.
37. Bakour S, Sahli F, Touati A, Rolain J-M. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect*. 2014;3:34–6.
38. Asencio-Egea MA, Gaitán-Pitera J, Huertas-Vaquero M, Carranza-González R, Román-Ortiz C, Lara-Fuella N. Diseminación interhospitalaria de *Klebsiella pneumoniae* ST512 productora de KPC-3. detección por MALDI-TOF. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021;39:83–6.
39. Di Tella D, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. Molecular epidemiological insights into colistin-resistant and carbapenemase-producing clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Infect Drug Resist*. 2019;12:3783–95.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Colistin resistance screening by 3 µg/ml colistin agar in Carbapenemase-producing *Enterobacterales*

Claudia Soria-Segarra^{1,2,3} | Carmen Soria-Segarra^{1,4} | Michelle Andrade-Soriano¹ |
Tamara Nuñez Quezada^{4,5} | Monica C. Gestal⁶ | Jose Gutierrez-Fernandez^{3,7}

¹Sosecali, Medical Services, Guayaquil, Ecuador

²Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador

³Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada & IBS, Granada, Spain

⁴Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador

⁵Hospital Teodoro Maldonado Carbo, Guayaquil, Ecuador

⁶Department of Microbiology and Immunology, LSU Health Shreveport, Shreveport, Louisiana, USA

⁷Department of Microbiology, Institute for Biosanitary Research-IBS, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Correspondence

Claudia Soria-Segarra, Pedro Moncayo 2929 y Calicuchima, Guayaquil 090308, Ecuador.
Email: claudia.soria.s@gmail.com

Funding information

Sosecali Medical Services. C.Ltda, Grant/Award Number: 001-020; Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Grant/Award Number: SIU#510-298

Abstract

Background: In low- and middle-income countries, the use of colistin in therapeutic regimens is common, to treat infections produced for Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) due to limited access to the recently discovered-approved antibiotics. Furthermore, the technical limitations to perform colistin susceptibility tests make it difficult to assess the suitability of this treatment for each patient, as well as to monitor the rates of resistance. In the present study, we describe the use of agar dilution using a unique colistin concentration of 3 µg/ml to discriminate isolates with colistin resistance in CPE obtained from clinical samples.

Methods: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) colistin broth microdilution method and dilution agar with a colistin concentration of 3 µg/ml were performed in 168 isolates of CPE obtained from clinical samples in Guayaquil, Ecuador. Broth microdilution was considered our gold standard using CLSI breakpoints as reference (≤ 2 µg/ml intermediate and ≥ 4 µg/ml resistant). Categorical agreement was defined as obtaining a reading within the same category with both methodologies.

Results: Isolates obtained from respiratory samples were the most prevalent (26.19%; $n = 44$). *Klebsiella pneumoniae* was the predominant specie (94.04%; $n = 158$). KPC-like carbapenemase was present in all the isolates, and interestingly, colistin resistance was not mediated by MCR-1 production. Categorical agreement between both methods resulted in 97.02%.

Conclusion: We propose the use of dilution agar with a colistin concentration of 3 µg/ml, as a valid method for screening colistin resistance in low- and middle-income countries to monitor resistance and to perform epidemiological studies.

KEYWORDS

broth microdilution, Carbapenemase-producing *Enterobacterales*, colistin dilution agar, colistin resistance, surveillance

1 | INTRODUCTION

Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) are one of our greatest threats worldwide, and the current increasing incidence correlates with a rise in the mortality rate due to the scarce therapeutic options available.^{1,2}

Since the identification of the first carbapenemase KPC-like (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) in 1996 in the United States,³ the outlook has been unfortunate. The rapid spread worldwide correlates with the expansion of predominant clonal complexes and the development of new genetic variants, as well as the appearance of other carbapenemases such as New Delhi metallo-beta lactamase (NDM) or the oxacillinases (OXA), mainly OXA-48.² Altogether, creates an imperative need toward the use of old antibiotics like colistin as well as the development of new antimicrobials.^{4,5}

Even though the recently approved antibiotics such as ceftazidime/avibactam constitute the first line of treatment against CPE, some countries have limited availability. Moreover, combined therapeutic regimens including colistin are broadly used.^{6,7}

The evolving resistance to colistin frightens especially certain regions. After the first description of the plasmid encoded *mcr* (mobile colistin resistance) gene in 2015,⁸ nine variants have been described in humans, environment, and food samples.⁹

Technical difficulties to assess susceptibility to colistin are one of the greatest limitations for diagnostic as well as epidemiological purposes. The size of the colistin molecule does not allow for its use with the classical disc diffusion method nor diffusion by concentration gradient. Moreover, automated methods are not recommended due to the great variability and error when it comes to assess susceptibility of this particular antibiotic.^{10,11} In 2020, the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) approved two methods to perform colistin resistance (CR) surveillance tests, broth disk elution and colistin agar test based in modified agar dilution method, which consist in the use of serial dilutions between 1 and 4 µg/ml, and finally, colistin broth microdilution (BMD), which is still considered the reference method.¹² These methodologies require specific reagents including the agar media containing different colistin concentrations, posing difficulties to implement these tests as routine techniques in every microbiological laboratory. Unlike the CLSI, the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) contemplates the broth microdilution as the only acceptable method for the determination of colistin susceptibility (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf) posing even more hurdles in the detection and diagnostic of this resistance mechanism.

Some of the available commercial methodologies for the detection of CR are chromogenic media such as CHROMagar COL-APSE, or commercial kits such as ComASP colistin, Colistin MAC test, ColiSpot, rapid polymyxin NP test (RPNP), MICRONAUT-MIC Strip, UMIC System and Sensitest™ Colistin, which have proven excellent correlation with the gold standard method.¹³ However, these methodologies are not considered as an alternative in low-income laboratories due to their cost.

Based on the available information, we proposed to evaluate if the agar dilution with a colistin concentration of 3 µg/ml allows to differentiate isolates with colistin resistance in CPE obtained from clinical samples.

2 | METHODS AND MATERIALS

2.1 | Bacterial isolates

One hundred and sixty-eight isolates of *Enterobacterales* with carbapenem resistance were included in this study. These isolates were obtained from clinical samples of secondary and tertiary hospitals units from Guayaquil, Ecuador, during between December 2019 and May 2020. One isolate per patient was utilized, if a patient had more than one, we selected an isolate obtained from a sterile site or the isolate with greater resistance. All the isolates included in the study were *bla*KPC positive and *mcr*-1 gene negative.

The isolates were collected by microbiology laboratories in each hospital and sent to us in Stuart medium for further processing in a reference laboratory. Samples were cultured in agar MacConkey (Becton Dickinson) at 37°C for 16–18h to determine viability as well as purity. Next, they were cultured in CHROMagar SuperCarba (CHROMagar) to confirm the resistance to carbapenems. Bacterial identification was performed using the Vitek 2 Compact System (BioMérieux) and/or conventional biochemical assays. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *K. pneumoniae* BAA ATCC 1705 were used for quality control for bacterial identification tests and chromogenic agar.

Carbapenemase type was molecularly confirmed with a multiplex polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of *bla*KPC, *bla*OXA-48, *bla*VIM, *bla*IMP, and *bla*NDM,¹⁴ and MCR-1 production was detected with a multiplex PCR previously described.¹⁵

2.2 | Antimicrobial colistin susceptibility

2.2.1 | Broth microdilution method

The minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin was determined using broth microdilution, following the recommendations of the CLSI document M07-A8.¹⁶ We used a concentration range between 0.5 and 8 µg/ml Colistin sulfate analytical grade (Sigma-Aldrich. Code C2700000.Batch 3.0) and Mueller Hinton broth with cation adjustment (Thermo Fisher Scientific).

2.2.2 | Agar dilution with colistin 3 µg/ml (CA-3)

The protocol from the CLSI M07-A8 document was followed. A single concentration of 3 µg/ml of colistin sulfate (Sigma-Aldrich. Code C2700000.Batch 3.0) was added to Mueller-Hinton Agar (Becton Dickinson). The agar was prepared and stored at 4°C and it was used

within the next 48 h. The bacterial inoculum was adjusted to 0.5 McFarland Scale using the DensiChek Equipment (BioMérieux Inc). A 1/10 dilution was done and 10 μ l of each bacterial inoculate was cultivated. Ten samples per petri dish were placed and incubation was done for 16–18 h at 35°C. The growth of 1 or more colonies in the agar was considered positive with a MIC > 3 μ g/ml. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* AR Bank #0349 were used for quality control. We also included three clinical isolates of *E. coli* extended spectrum *Beta-lactamase* (ESBL) with *mcr-1* positive (two obtained from urinary samples and one from blood: MICs \geq 8 μ g/ml).

2.3 | Data analysis

The broth microdilution was considered as the reference method. The CLSI breakpoints were used (\leq 2 μ g/ml intermediate and \geq 4 μ g/ml resistant). The categorical agreement (CA) was defined as the percent of the isolates classified within the same susceptibility range by BMD (gold standard) and the method under evaluation. In the case of conflicting results, the results obtained by microdilution were the ones to delineate the category. Very major errors (VME) and major errors (ME) were not identified, because a susceptible category is not defined by CLSI. Minor errors were defined when the BMD identified a resistance isolate and CA-3 shows an intermediate result.

3 | RESULTS

Isolates obtained from respiratory samples were the most prevalent, with 26.19% ($n = 44$) followed by urine and blood samples 23.80% ($n = 40$) and 20.23% ($n = 34$), respectively. The rest of the processed samples were from catheters (8.33%; $n = 14$), surgical wound discharges, (6.54%; $n = 11$), rectal swabs (4.76%; $n = 8$), and others

(7.73%; $n = 13$). Four bacterial isolates were of an unknown origin (2.38%).

K. pneumoniae was the most frequently isolated microorganism, with 94.04% ($n = 158$), followed by *Klebsiella aerogenes* (2.38%, $n = 4$), *Enterobacter cloacae*, and *E. coli*, both isolated in equal percentage (1.79%, $n = 3$).

Fifty-six colistin resistance (33.30%) and 112 (66.66%) colistin intermediate isolates were processed ($n = 168$). Our results demonstrated a categorical agreement of 97.02% ($n = 163$). Five *K. pneumoniae* isolates with MICs 4 μ g/ml provided negative results in CA-3 (mE 2.97%).

MICs distribution of all isolates are detailed in Figure 1, and interpretation results for each microorganism are detailed in Table 1.

In addition, 78.57% ($n = 44$) of the colistin resistant isolates presented confluent growth in agar CA-3. In 12 isolates, the results had to be confirmed due to the insufficient growth (<3 colonies), requiring additional work. Importantly, 100% of these microorganisms that needed to be further evaluated, presented colistin resistance demonstrating the robustness of the method studied.

4 | DISCUSSION

The use of colistin as treatment is highly limited by the rapid increase of CPE being isolated in different countries.⁴ This rapid increase in resistance creates an imperative need to implement susceptibility tests to further evaluate the suitability of this antibiotic; however, these susceptibility tests have rendered many limitations. Because of this, we evaluated the Agar dilution test described in the CLSI using one single colistin concentration (3 μ g/ml).

Our results demonstrated a robust categorical agreement (97.02%), between the use of CA-3 and broth microdilution, and colistin resistant isolates were clearly separated. Even though there is no susceptibility test that uses agar dilution with a single

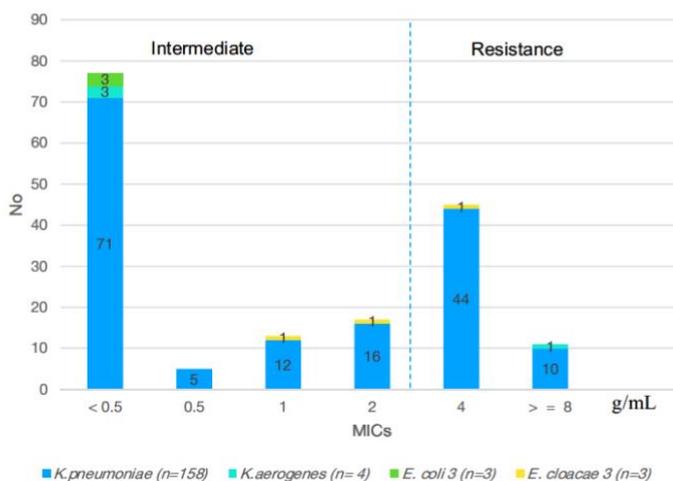


FIGURE 1 Colistin MICs distribution and interpretation according to CLSI breakpoints.

TABLE 1 Comparison of colistin MICs and colistin agar dilution-3 µg/ml results for Carbapenemase-producing *Enterobacterales*

Microorganism	Colistin agar dilution-3 µg/ml Result	MIC distribution ^a (µg/ml)						Interpretation results
		<0.5	0.5	1	2	4	≥8	
<i>Klebsiella aerogenes</i> (n = 4)	Negative	3						CA: 100% mE: 0%
	Positive						1	
<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 3)	Negative			1				CA: 100% mE: 0%
	Positive				1	1		
<i>Escherichia coli</i> (n = 3)	Negative	3						CA: 100% mE: 0%
	Positive							
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 158)	Negative	71	5	12	16	5*		CA: 96.83% mE: 3.16%
	Positive					39	10	
Total		77	5	13	17	45	11	CA: 97.02% (163) mE: 2.97% (5)

Note: Black line represents the CLSI colistin breakpoint. Minor errors are indicated by *.

Abbreviations: CA, categorical agreement; mE, minor error; MIC, minimal inhibitory concentration.

^aResults obtained by broth microdilution method.

concentration, our results are similar to those reported by other authors, in regards to the categorical agreement, that included a MIC between 1 and 4 µg/ml.¹⁷ Moreover, the many limitations encountered to test colistin susceptibility make this method a great option to be broadly used in clinical microbiology laboratories. Providing a great alternative for those places where there is no other option.

In 2021, Pasterán et al. described the technique known as Colistin Agar Spot (CAS), based on agar dilution using a single colistin sulfate concentration (3 µg/ml) but with a simplified inoculation (20-mm drop-spot of a 0.5 McFarland bacterial suspension). They established a CA of 98.5% when compared to broth microdilution for *Enterobacterales*.¹⁸ CAS has been used in the microbiology laboratory system in Argentina since 2018 with excellent results. Giacoboni et al, and Yauri-Condor et al, in Peru, reported similar results with CAS for *Enterobacterales*.^{19,20} The use of this test has been extended to *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* to identify plasmid-mediated resistance to colistin using CAS with EDTA.^{21,22}

Five isolates of *K. pneumoniae* with MIC 4 µg/ml gave negative results in CA-3 (2.97% mE), which could be explained due a large number of isolates with MIC 4 µg/ml (n = 45) was included, and this type of errors are frequently reported to occurred near the breakpoint. Errors in MIC values of 2 µg/ml were not observed, but only 17 isolates were included.²³ Also, the well-known heteroresistance phenomenon, mainly described in *Enterobacter* spp., could be presented in these isolates making it difficult to confront MICs interpretations because it likes to produce different MICs results.^{24,25} This phenomenon has been well described in *Enterobacter* spp.; however, we observed it in *K. pneumoniae*, similar to those described by Földes et al.²⁶ Additionally, the possibility of some technical mistakes associated with pipetting cannot be excluded, due to the fact that our study was performed under a routinary laboratory workflow.

Despite this, mE is below 3%, a value recommended by CLSI for susceptibility tests evaluation.²⁷

The use of a single concentration facilitates sample-processing allowing to save time and resources while gaining in the accuracy of the diagnostic. To our knowledge, using a single concentration breakpoint to determine colistin resistance is not further studied with agar dilution. Pasterán et al. uses a concentration of 2 µg/ml with poor results (CA: 95.9% and ME: 8.3%) for *Enterobacterales*. Breakpoint concentrations to discriminate colistin-resistance isolates have been mainly used in rapid colorimetric tests. Values of 3.7 µg/ml (Rapid Colistin Disk Elution, CA 98.3%, VME 5.4%),²⁸ 3.8 µg/ml (Modified Andrade Screening Antimicrobial Test. ASAT. Sensitivity 90.7%, specificity 100%),²³ and 5 µg/ml (Rapid Polymyxin NP Test. Sensitivity 98.3%, specificity 95.4%) have been described to be used in these techniques with excellent performance. However, its main disadvantage is the requirement of additional reagents and a proper pH adjustment, making them laborious and difficult to implement in the daily routine. Even though we did not test the colistin stability in agar, other authors have reported that it can be used up to a week without affecting the results, being an advantage of our method.¹⁷

Despite the limitations of the study, we believe the use of one single colistin concentration (3 µg/ml) to determine colistin resistance could be a good alternative to implement in the routine workflow of microbiology laboratories with limited resources, to allow not only for a better diagnosis but also to perform epidemiological studies for the surveillance of antibiotic resistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Claudia Soria-Segarra: conception and design of the study, acquisition and analysis and interpretation of data, drafting the article or revising it critically for important intellectual content, final approval of the version. Carmen Soria-Segarra: drafting the article or revising

it critically for important intellectual content, final approval of the version. Andrade Soriano Michelle: acquisition of data and final approval of the version. Nuñez Quezada Tamara: acquisition of data and final approval of the version. Cartelle Gestal Monica: drafting the article or revising it critically for important intellectual content, final approval of the version. Gutierrez-Fernandez José: drafting the article or revising it critically for important intellectual content, final approval of the version.

FUNDING INFORMATION

This work was conducted under the collaborative research project on "Estudio de morbi-mortalidad por Enterobacterias productoras de carbapenemasas resistentes a colistina en Guayaquil, durante los años 2019-2020" by Universidad Católica Santiago de Guayaquil (grant number SIU#510-298) and grant from Sosecali C. LTDA (grant number 001-020).

CONFLICT OF INTEREST

None to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All the data in this study are included in the manuscript.

ORCID

Claudia Soria-Segarra  <https://orcid.org/0000-0003-0896-6291>

Jose Gutierrez-Fernandez  <https://orcid.org/0000-0001-6146-9740>

REFERENCES

- Fraenkel-Wandel Y, Raveh-Brawer D, Wiener-Well Y, Yinnon AM, Assous MV. Mortality due to blaKPC *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):1083-1087.
- Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S521-S528.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-1161.
- Peyclit L, Baron SA, Rolain JM. Drug repurposing to fight colistin and carbapenem-resistant bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:1-11.
- Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S565-S575.
- Mo Y, Lorenzo M, Farhaly S, Kaur K, Housman ST. What's new in the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(2):171-181.
- Lim LM, Pharm D, Ly N, et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy.* 2010;30(12):1279-1291.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-168.
- Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3087-3095.
- Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(8):865-870.
- Borrego-Jiménez J, Soria-Segarra C, Moldovan TD, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Use of walkaway microscan system colistin well when determining the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* recent clinical isolates. *Rev Esp Quimioter.* 2020;33(1):83-84.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th informational supplement. CLSI document M100-S30. 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute – NCCLS; 2020.
- Satlina MJ. The search for a practical method for colistin susceptibility testing: have we found it by going back to the future? *J Clin Microbiol.* 2019;57(2):18-21.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119-123.
- Rebello AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance.* 2018;23(6):1-11.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 31th informational supplement. CLSI document M100-S31. Clinical and Laboratory Standards Institute – NCCLS; 2021.
- Turlej-rogacka A, Xavier BB, Janssens L, et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:345-353.
- Pasteran F, Danze D, Alejandra M, et al. Simple phenotypic tests to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2021;59(1):e01701-e01720.
- Yauri-Condor K, Apestegui MZ, Sevilla-Andrade CR, et al. Enterobacteriales productores de Betalactamasas de espectro extendido portadores del gen mcr-1 en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2020;37(4):711-715.
- Giacoboni G, Nievas F, Moredo F, Plata L, Aires B. Experience with spot agar as a screening method for the detection of colistin-resistant *E. coli*. *Rev Med Vet.* 2020;101(3):14-17.
- Lima CA, Vera-leiva A, Bello-toledo H, et al. Carbapenemasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales de Chile. *Rev Chil Infectol.* 2021;38(1):2-9.
- Yauri K, Gonzales E, Di J, Gutkind G. Detection of plasmid-mediated colistin resistance by colistin pre-diffusion and inhibition with EDTA test (CPD-E) in Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2019;167:105759.
- Rodríguez CH, Maza J, Tamarin S, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. In-house rapid colorimetric method for detection of colistin resistance in *Enterobacteriales*: a significant impact on resistance rates. *J Chemother.* 2019;31(7-8):432-435.
- Kang KN, Klein DR, Kazi MI, et al. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy-l-arabinose addition to lipid A. *Mol Microbiol.* 2019;111(6):1604-1616.
- Mashaly GES, Mashaly MES. Colistin-heteroresistance in carbapenemase-producing *Enterobacter* species causing hospital-acquired infections among Egyptian patients. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;24:108-113.
- Sz E, Toader S, Dobreanu M. Comparison of six phenotypic assays with reference methods for assessing colistin resistance in clinical

- isolates of Carbapenemase-producing *Enterobacterales*: challenges and opportunities. *Antibiotics*. 2022;11:377.
27. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, et al. CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4):1-10.
 28. Ngudsuntia A, Lunha K, Lulitanond A, et al. Colistin susceptibility testing by rapid colistin disk elution test among enterobacteriaceae in low-resource setting. *Microb Drug Resist*. 2021;27(12):1685-1691.

How to cite this article: Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Andrade-Soriano M, Quezada TN, Gestal MC, Gutierrez-Fernandez J. Colistin resistance screening by 3 µg/ml colistin agar in Carbapenemase-producing *Enterobacterales*. *J Clin Lab Anal*. 2022;36:e24639. doi: [10.1002/jcla.24639](https://doi.org/10.1002/jcla.24639)

9. DISCUSIÓN

9.1. Prevalencia, características microbiológicas, moleculares y factores de riesgo asociados a Enterobacteriales productores de carbapenemasas resistentes a colistina.

La emergencia de microorganismos MDRs, como los Enterobacteriales productores de carbapenemasas, constituyen un reto para la Salud Pública mundial, debido a las pocas opciones terapéuticas disponibles y a las altas tasas de mortalidad asociadas. En este contexto, viejos antibióticos como colistina resultan todavía útiles, sobre todo en regiones con recursos económicos limitados donde el acceso a los nuevos antibióticos es escaso.

La última comunicación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) del año 2021 informó que la tasa de resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* era del 20%, y de *E. coli* del 10%. Sin embargo, estos datos no se enfocan exclusivamente en los EPC, por lo tanto, los resultados de esta tesis permiten extraer datos relevantes acerca de esta problemática en Ecuador, enfocándose principalmente en el estudio de la resistencia a colistina en EPC.

Los resultados de esta tesis muestran una prevalencia de 23,33% de resistencia a colistina en EPC durante el 2022, en las tres ciudades principales del país. La prevalencia global de 361 aislados de EPC obtenidos en diferentes ciudades de Ecuador y durante los tres períodos de tiempo, muestra una prevalencia de resistencia a colistina alta (20,77%), la cual fue incrementándose a través del tiempo. La prevalencia de EPC-RC en el 2016 fue de 3,73% mientras que en el 2022 alcanzó valores de 23,73%. Este incremento a través del tiempo ha sido descrito a nivel mundial, en el cual datos del 2013 reflejan una prevalencia del 3,6%, mientras que en el 2019, se observaron valores de un 3,6%, siendo Latinoamérica, la región con las mayores tasas de resistencia (68).

Actualmente, prevalencias altas de EPC-RC se han encontrado en otros países como Grecia (20,4%), España (31%) e Italia (43%), principalmente en aislados KPC, estas altas incidencias han sido asociadas principalmente a brotes (102). A pesar de las escasas publicaciones acerca de EPC-RC en América del sur, Brasil informó prevalencias de EPC-RC de un 35,5%, principalmente asociadas a brotes por KPC-2 (95,103).

Las altas tasas de EPC-RC evidenciadas, sugieren una falta de adherencia al plan nacional para combatir la resistencia antimicrobiana implementado en el 2019, el cual está alineado con

el Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los Antimicrobianos de la OMS, con una perspectiva de Una Salud, el cual involucra no solo a unidades hospitalarias, sino a diversos aspectos como el consumo de antibióticos o la restricción del uso veterinario de los antimicrobianos (104,105). El control del uso de antibióticos en la industria agropecuaria constituye un componente crítico para la OMS en la lucha contra la resistencia antimicrobiana. El uso de la colistina en animales fue prohibido en Ecuador en el 2019, sin embargo existe poca información sobre la adherencia a esta regulación (106). Adicionalmente, se sabe que el uso de antimicrobianos intrahospitalariamente y en la comunidad determina la resistencia antibiótica. En Ecuador, así como en otros países de América Latina, el consumo de antibióticos sin prescripción médica es una realidad, lo cual contribuye a su excesivo consumo y a la resistencia antimicrobiana, lo cual demuestra la falta de adherencia a las regulaciones existentes (107).

La resistencia a la colistina en este estudio se observó en las muestras clínicas de origen respiratorio (27,40 % n=57/208) y en las bacteriemias (25,48% n=53/208) y exclusivamente en aislados de *K. pneumoniae* durante los años 2016 y 2020, pero en el 2022, se presentó también en *E. cloacae* y *K. aerógenes*. De manera global, el microorganismo con la mayor resistencia a colistina fue *K. aerógenes* 52,94% (n=9) seguido por *K. pneumoniae* 20,19% (n=65) y *E. cloacae* 9,09% (n=1). Estas observaciones, son similares a lo descrito por otros autores, que mencionan a *K. aerógenes* como la Enterobacteria con las mayores tasas de resistencia a colistina (108). El gen *bla_{KPC}* fue el único involucrado en los aislados EPC-RC y no se detectaron en los aislados EPC-RC las otras carbapenemasas detectadas en el país como NDM y OXA-48.

Los resultados de esta tesis mostraron que los aislados EPC-RC presentaban altos niveles de co-resistencia a aminoglucósidos, particularmente gentamicina y ciprofloxacino. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en Brasil, en el cual la co-resistencia a ciprofloxacino se presentó en un 16% y a gentamicina en un 20% de los aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes, el cual constituye un fenotipo muy frecuente en este país (109). Este fenotipo de resistencia también ha sido descrito en Tucumán, Argentina, en donde la co-resistencia a ciprofloxacino alcanza valores de 100% y un 22% a gentamicina (110). El fenotipo de resistencia encontrado en los aislados EPC-CR correspondería a aislados extremadamente resistentes (XDR, por sus siglas en inglés), de acuerdo con la clasificación de Magiorakos y cols.(111), lo cual es una situación alarmante para Ecuador. Sin embargo, según los resultados de esta tesis, tigeciclina y ceftazidima-avibactam podrían ser consideradas como una posible opción terapéutica por sus altas tasas de sensibilidad.

Esta tesis también comprendió la identificación del principal mecanismo de resistencia a colistina con importancia epidemiológica, el gen *mcr-1* de origen plasmídico, el cual no fue identificado en ninguno de los aislados estudiados, lo cual podría sugerir que el mecanismo de resistencia involucrado podría ser la presencia de otras variantes del gen *mcr* no estudiadas o mutaciones puntuales. Brasil e Italia, han reportado resultados similares a los encontrados en este estudio (118–121). En América del Sur solo se han descrito las variantes *mcr-1*, *mcr-3* y *mcr-5*, las dos últimas exclusivamente en Brasil y Colombia respectivamente (75,95), lo cual podría sugerir que la causa de la resistencia podría ser atribuida a mutaciones puntuales.

Publicaciones de Ecuador, Argentina, Brasil y Colombia, muestran un incremento en la frecuencia de resistencia a colistina de origen plasmídico, especialmente relacionadas al gen *mcr-1*. En Ecuador, la presencia del gen *mcr-1* ha sido descrito en casos aislados de muestras clínicas, pero fundamentalmente se han reportado en aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de animales (122,123).

Fortalezas del estudio de Epidemiología molecular de bacilos gram-negativos resistentes a carbapenémicos en Ecuador

Este estudio permitió obtener datos actualizados de la resistencia a colistina en EPC y compararlos con otros bacilos gram-negativos de importancia epidemiológica, en las tres ciudades más importantes del país.

Limitaciones del estudio

Los datos obtenidos no pueden ser generalizados a otras ciudades no incluidas en el estudio, ni tampoco hospitales con niveles primarios de atención.

Fortalezas del estudio de vigilancia epidemiológica de *mcr-1* en aislados EPC-RC durante tres períodos de tiempo

La principal fortaleza de este estudio es que recoge resultados de un gran número de aislados de EPC obtenidos en diferentes períodos de tiempo, lo cual permite comprender de mejor manera esta problemática a nivel nacional, además que es el primer estudio en el país que aporta con esos datos.

Limitaciones del estudio

Una de las principales limitaciones, es que las unidades hospitalarias incluidas en el estudio no son iguales en los tres períodos de tiempo analizados, por lo tanto no permite hacer

una comparación en cada unidad a lo largo del tiempo. Otra limitación, es que no se pudo profundizar en los otros mecanismos de resistencia que podrían estar involucrados.

Debido a las pocas opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones por EPC-RC, esta tesis probó la sinergia “*in vitro*” con colistina y fosfomicina (col/fos) en aislados KPC, la cual no pudo ser demostrada en los ensayos realizados, a pesar de que varios autores han descrito efectos sinérgicos en esta combinación realizando ensayos de farmacocinética/farmacodinamia y curva de muerte en cepas de *K. pneumoniae* KPC-2 (112,113), incluso la sinergia positiva ha sido demostrada en cepas de *K. pneumoniae* con carbapenemasas tipo NDM, *Acinetobacter baumannii* XDR y *P. aeruginosa*, en los cuales se demostró con esta combinación una mejor respuesta microbiológica y menor mortalidad (114–117). Las diferencias encontradas con los estudios anteriormente mencionados pueden ser atribuidas a que no se probaron concentraciones altas de colistina (> 4 mg /L) y fosfomicina (512 mg/L) ya que superan los niveles séricos, y que se incluyeron aislados con resistencia a los dos antimicrobianos. Los resultados obtenidos con este estudio sugieren que esta combinación no podría ser considerada para el tratamiento de pacientes con infecciones por KPC.

Fortalezas del estudio de sinergia entre colistina y fosfomicina en aislados clínicos de *K. pneumoniae* productora de KPC

Existen pocos estudios sobre combinaciones sinérgicas entre colistina y fosfomicina para cepas KPC, por lo tanto este estudio aporta con datos acerca de esta temática q

Limitaciones del estudio

Los datos no pueden ser extrapolados a otras EPC que no sean exclusivamente *K. pneumoniae* productora de KPC u otro mecanismo de resistencia a colistina.

El estudio de los factores de riesgo asociados a las infecciones por EPC-RC, permitió establecer que la prevalencia de infecciones por EPC-RC es de 28,07%, además de las variables relacionadas con las infecciones por este MDR. Los resultados demostraron que aun cuando las tasas de mortalidad son consideradas altas en pacientes con infecciones por EPC no se encontró ninguna diferencia entre los pacientes infectados por EPC-colistina sensible y EPC-CR. Estos mismos hallazgos concuerdan con datos descritos en estudios similares realizados en pacientes pediátricos y adultos (120, 124–127). Adicionalmente, las diferentes combinaciones antimicrobianas ensayadas para el tratamiento de las infecciones por EPC-RC en este estudio tampoco mostraron ningún impacto en las tasas de mortalidad.

Las infecciones del tracto urinario fueron las infecciones por EPC-RC más frecuentemente encontradas, sin embargo, las más altas tasas de mortalidad se encontraron en las bacteriemias, donde colistina, junto a otros fármacos constituye la terapia principal (124).

El conocimiento de los factores de riesgo asociados a infecciones por EPC-RC, permitiría a los clínicos iniciar terapias antimicrobianas empíricas más adecuadas, por lo cual es importante analizar los factores involucrados localmente, ya que la mayoría de los estudios se ejecutan en países desarrollados, los cuales tienen una situación clínica diferente (128).

El análisis multivariado demostró que el fallo renal, la hemodiálisis en los 3 meses previos a la hospitalización, la presencia de catéteres para hemodiálisis y el uso de inhibidores de β -lactamasas están asociados con EPC-CR. Otros investigadores han demostrado asociación entre EPC-CR y enfermedad neurológica (129), insuficiencia renal crónica (120,130), otras comorbilidades (120), uso previo de carbapenémicos (89,99). Adicionalmente, la literatura muestra una asociación entre EPC-CR y uso de inhibidores de β -lactamasas (130), terapia antimicrobiana múltiple, larga estancia hospitalaria (120,130,132) y dispositivos invasores (120,130). Las diferencias encontradas entre estos autores y este estudio ,podría radicar en las diferentes poblaciones incluidas en cada estudio, los niveles de complejidad de las instituciones de salud, tamaño muestra y metodologías utilizadas.

Portar otros microorganismos MDRs podría ser un factor de riesgo para adquirir EPC-CR, pero en este estudio no se pudo probar esa hipótesis, así como el contacto previo con otro paciente portador de EPC-CR, el cual ha sido considerado como una variable independiente asociada a la adquisición de EPC-RC (133). Tampoco se identificó asociación entre el uso previo de colistina. Sin embargo, los hallazgos con respecto a este tópico son controversiales (130,134). Incluso hay un estudio que ha encontrado un efecto protector en el uso de la combinación tigeciclina-colistina en terapia combinada (135) y otro que muestra un efecto protector en el uso de aminoglucósidos para adquirir cepas resistentes a la colistina (120).

La epidemiología molecular de los aislados EPC-RC analizada en es estudio es muy similar a lo descrito por otros países ya que los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la presencia de brotes en las unidades hospitalarias estudiadas, lo cual se evidencia en el estudio realizado con los aislados del 2020 en la ciudad de Guayaquil, donde el análisis de clonalidad demostró que el 34,47% de los aislados tenían 100% de similitud y se evidenció la presencia predominante

(95,23%) de *K. pneumoniae* *bla*_{KPC-3} ST 512 resistente a colistina. Este hallazgo concuerda con lo descrito en otros estudios que sugieren la diseminación clonal de KPC en Ecuador (36), además que , este estudio permitió evidenciar la presencia predominante en los aislados EPC-RC de la combinación KPC-3 ST 512, descrita por primera vez en Ecuador .

Fortalezas del estudio factores de riesgo asociados a las infecciones por EPC-RC

Entre las fortalezas de este estudio se puede mencionar el análisis molecular de los aislados de EPC-RC, comprendiendo la dinámica de las cepas involucradas, describiendo por primera vez la presencia de *K. pneumoniae* ST512-KPC-3 además de demostrar la diseminación clonal de los aislados en la ciudad de Guayaquil, adicionalmente se puede mencionar que provee valiosa información asociada a EPC-CR en países de bajos recursos económicos, advirtiendo del riesgo de transmisión entre países cercanos en Sudamérica.

Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones de este estudio es el tamaño muestral utilizado , por lo que no se pueden inferir los hallazgos a toda la población ecuatoriana, además que tampoco se pueden extrapolar a cepas de EPC-CR portadoras del gen *mcr-1*.

9.2. Evaluación de un método de laboratorio útil para su identificación.

Las escasas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las infecciones por EPC y la poca accesibilidad a los nuevos antimicrobianos disponibles como ceftazidima-avibactam, obliga a mantener el uso de viejos antimicrobianos como la colistina, a pesar del incremento en sus tasas de resistencia, por lo cual es necesario un método de laboratorio que permita determinar la susceptibilidad a este antimicrobiano de una manera confiable.

Los resultados del estudio con el agar colistina-3 µg/ml (97,02%), mostraron que este método de laboratorio tiene una excelente concordancia categórica con el método de referencia para poder separar claramente los aislados de EPC resistentes a la colistina. La concordancia categórica encontrada en este estudio es muy similar a la obtenida por otros investigadores que testaron metodologías similares en países como Argentina y Perú (86, 136). Una ventaja del método probado en este estudio con un método similar descrito en el 2021 por Pasterán y cols., (86) es que puede utilizar la metodología recomendada por el CLSI para la inoculación bacteriana en el agar.

En este estudio se incluyeron aislados con MIC de 4 mg/L, lo que generó un 2,97% de resultados falsos negativos, sin embargo este tipo de errores son frecuentemente descritos cuando las MICS se encuentran muy cerca de los puntos de corte (137), pero son menores al 3% recomendado por el CLSI para este tipo de métodos (138).

La alta concordancia categórica, los escasos errores menores observados, además de su fácil implementación en la rutina del laboratorio, sugieren que este método podría ser considerado como una excelente opción para ser utilizada en laboratorios de microbiología con recursos limitados.

Fortalezas del estudio Cribado de resistencia a colistina con el agar Colistina 3 mg/L en Enterobacterales productores de carbapenemasas

Este estudio constituye el único en el país que utiliza aislados clínicos locales para probar una metodología de laboratorio.

Limitaciones del estudio Cribado de resistencia a colistina con el agar Colistina 3 mg/L en Enterobacterales productores de carbapenemasas

Los resultados no pueden ser extrapolados a otros microorganismos no testados en el estudio, ni tampoco a otros mecanismos de resistencia a la colistina no probados.

10. CONCLUSIONES

1. Existe una alta prevalencia de resistencia a colistina en Enterobacterales productores de carbapenemasas en las principales ciudades de Ecuador, la cual ha aumentado significativamente en el transcurso de los años.
2. La resistencia en Enterobacterales productores de carbapenemasas no está mediada por el gen *mcr-1* de origen plasmídico, lo cual sugiere la presencia de otros mecanismos involucrados que requieren una investigación más profunda.
3. Los aislados Enterobacterales productores de carbapenemasas resistentes a colistina se clasifican como extremadamente resistentes, ya que presentaron una elevada co-resistencia a otros antimicrobianos, por lo cual se requiere que los nuevos antimicrobianos, como ceftazidima-avibactam o meropenem-vaborbactam, sean accesibles para su uso.
4. No se recomienda la utilización de la combinación de colistina-fosfomicina debido a la falta de sinergia.
5. Las infecciones por EPC-RC alcanzan un 28,07% y se produjeron predominantemente en infecciones del tracto urinario, con una tasa de mortalidad del 42,2%. La nutrición parenteral, hemodiálisis reciente, el uso de inhibidores de β -lactamasas y el fallo renal se pueden considerar como factores de riesgo independientes asociados a la portación de EPC-RC.
6. *K. pneumoniae* ST 512-KPC-3 es la responsable de la diseminación clonal de la resistencia a colistina en Enterobacterales en las unidades hospitalarias de la ciudad de Guayaquil, Ecuador, evidenciando la necesidad de fortalecer el Plan Nacional de Resistencia Antimicrobiana en el país.
7. El Agar Colistina 3 $\mu\text{g/ml}$ puede ser considerado como una buena alternativa para implementar en los laboratorios de microbiología clínica con recursos limitados para la detección de EPC-RC, además de que podría ser utilizado en estudios epidemiológicos de vigilancia de resistencia antimicrobiana.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order : Syndromes. Clin Microbiol Rev. 2021;28(February):1-45.
2. Rozik NN, Asaad JN, Mansour SH, Gomaa E. Effect of aluminum and aluminum/nickel hybrid fillers on the properties of epoxy composites. Vol. 230, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications. 2016. 550-557 p.
3. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5575-99.
4. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(5):1-28.
5. Armstrong T, Fenn SJ, Hardie KR. JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. J Med Microbiol. 2021;70:1462.
6. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. Clin Infect Dis. 2019;69(Suppl 7):S521-8.
7. Moreno-Monge KM. Terapéutica Médica Carbapenémicos : Tipos Y Mecanismos De Resistencia. Rev Médica Costa Rica y Centroamérica LXX. 2013;608(608):599-605.
8. Knols BG, Smallegange RC, Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics. Lancet Infect Dis. 2009;9(9):535-6.
9. Lee YL, Chen HM, Hii IM, Hsueh PR. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. Int J Antimicrob Agents. 2022;59(2):106528.
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440-58.
11. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969-76.
12. García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al.

Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19(2):197-213.

13. Hansen GT. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther.* 2021;10(1):75-92.

14. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in bla KPC gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 2011;55(11):5370-3.

15. Liu H, Lin H, Sun Z, Zhu X, Zhang X, Li Q, et al. Distribution of β -lactamase genes and genetic context of bla_{kpc-2} in clinical carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae isolates. *Infect Drug Resist.* 2021;14:237-47.

16. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 1 de abril de 2019;32(2).

17. Boyd SE, Holmes A, Peck R, Livermore DM, Hope W. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(8).

18. Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. *Microorganisms.* 2023;11(6):1491.

19. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.

20. Isler B, Özer B, Çınar G, Aslan AT, Vatansever C, Falconer C, et al. Characteristics and outcomes of carbapenemase harbouring carbapenem-resistant Klebsiella spp. bloodstream infections: a multicentre prospective cohort study in an OXA-48 endemic setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2022;41(5):841-7.

21. World Health Organization. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed [Internet]. [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

22. Aguilar GR, Swetschinski LR, Weaver ND, Ikuta KS, Mestrovic T, Gray AP, et al. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Reg Heal - Am.* 2023;25:1-16.

23. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2016;3099(16):1-11.
24. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance*. 2019;24(9):1-8.
25. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151-61.
26. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):818-20.
27. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017;8(4):460-9.
28. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):101.
29. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2880-2.
30. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(3):277-97.
31. Cejas D, Elena A, Guevara Nuñez D, Sevilla Platero P, De Paulis A, Magariños F, et al. Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;18:238-42.
32. Zurita J, Alcocer I, Ortega-paredes D, Barba P, Yauri F, Mora M. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. 2013;1:229-30.
33. Prado-Vivar MB, Ortiz L, Reyes J, Villacis E, Fornasini M, Baldeon ME, et al. Molecular typing of a large nosocomial outbreak of KPC-producing bacteria in the biggest tertiary-care hospital of

Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:328-32.

34. Gomez SA, Rapoport M, Piergrossi N, Faccone D, Pasteran F, De Belder D, et al. Performance of a PCR assay for the rapid identification of the *Klebsiella pneumoniae* ST258 epidemic clone in Latin American clinical isolates. *Infect Genet Evol*. 2016;44:145-6.

35. Zurita J, Alcocer I, Ortega-Paredes D, Barba P, Yauri F, Iniguez D, et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(4):229-30.

36. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-gonzález A. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units. *J Infect Public Health*. 2019;1-9.

37. Satán C, Satyanarayana S, Shringarpure K, Mendoza-Ticona A, Palanivel C, Jaramillo K, et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in bacteria isolated from inpatient and outpatient samples, Ecuador, 2018. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2023;47:1-10.

38. Acosta-España JD, Satán Salazar C, Suaste K, Luna C, Rodríguez-Morales AJ. Unmasking carbapenemases molecular patterns in Ecuador: An analysis of Gram-negative bacteria, 2014–2022. *New Microbes New Infect*. 2024;56(December 2023):2023-5.

39. Segarra CS, Vera GL, Jara MB, Mendez MA, Cujilema P, Lino MS. Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *New Microbes New Infect*. 2018;26:42-8.

40. Claudia SS, Carmen SS, Andrés D, Marcela MA, Kerly CA, Bryan BM, et al. Risk factors associated with colistin resistance in carbapenemase-producing Enterobacteriales: a multicenter study from a low-income country. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2023;22(1):1-9.

41. Zurita J, Parra H, Gestal MC, McDermott J, Barba P. First case of NDM-1-producing *Providencia rettgeri* in Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015;3(4):302-3.

42. Villacís JE, Reyes JA, Castelán-Sánchez HG, Dávila-Ramos S, Lazo MA, Wali A, et al. OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 307 in Ecuador. *Microorganisms*. 2020;8(3).

43. Villacís JE, Castelán-Sánchez HG, Rojas-Vargas J, Rodríguez-Cruz UE, Albán V, Reyes JA, et al. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* in human infections from different hospitals in Ecuador with OXA-48-producing resistance. *Front Microbiol*. 2023;14(August):1-13.

44. Reyes JA, Villavicencio F, Villacís JE, Pavón E, Campoverde N, Espinel M, et al. First report of a clinical isolate of blaOXA-48- carbapenemase producing *Raoultella ornithinolytica* in South

America. *Rev Argent Microbiol.* 2020;52(1):82-3.

45. Romero Thomas G, Corso A, Pasterán F, Shal J, Sosa A, Pillonetto M, et al. Increased Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(11):E1-8.

46. Gómez BJP, Pazmiño JPR, Quinde GSG, Viejó JFG, Amaguaña MJM, Neira ÉIR, et al. Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Patient with SARS-Cov-2 Pneumonia in an Intensive Care Unit in Guayaquil, Ecuador: A Case Report. *Am J Case Rep.* 2022;23:1-7.

47. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 1 de enero de 2012;18(1):18-29.

48. Rhouma M, Madec J-Y, Laxminarayan R. Colistin: from the shadows to a One Health approach for addressing antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2023;61(2).

49. Peyclit L, Baron SA, Rolain JM. Drug repurposing to fight colistin and carbapenem-resistant bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:1-11.

50. 2021 AWaRe classification [Internet]. [citado 6 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/2021-aware-classification>

51. Polymyxin-containing medicines - referral | European Medicines Agency [Internet]. [citado 6 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/polymyxin-containing-medicines>

52. Mondal AH, Khare K, Saxena P, Debnath P, Mukhopadhyay K, Yadav D. A Review on Colistin Resistance: An Antibiotic of Last Resort. *Microorganisms.* 2024;12(4):772.

53. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(5):526-35.

54. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms.* 2020;8(11):1-12.

55. Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides.* 2003;24(11):1681-91.

56. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int.* 2015;2015.

57. Yu Z, Zhu Y, Fu J, Qiu J, Yin J. Enhanced NADH metabolism involves colistin-induced killing of *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa*. *Molecules.* 2019;24(3).

58. Baeuerlein A, Ackermann S, Parlesak A. Transepithelial activation of human leukocytes by probiotics and commensal bacteria: Role of Enterobacteriaceae-type endotoxin. *Microbiol Immunol.* 2009;53(4):241-50.
59. Olaitan AO lumuyiw., Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, et al. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *J Antimicrob Chemother.* 1 de diciembre de 2015;70(12):3402-4.
60. Dotto G, Giacomelli M, Grilli G, Ferrazzi V, Carattoli A, Fortini D, et al. High prevalence of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from domestic and wild lagomorphs in Italy. *Microb Drug Resist.* 1 de abril de 2014;20(2):118-23.
61. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents.* noviembre de 2013;42(5):379-83.
62. Bressan CR, Kunz A, Schmidell W, Soares HM. Toxicity of the colistin sulfate antibiotic used in animal farming to mixed cultures of nitrifying organisms. *Water Air Soil Pollut.* 1 de marzo de 2013;224(3).
63. Guo R, Ding X, Zhong X, Gao S, Sun Y. Molecular and ultrastructural insights into the earthworm *Eisenia fetida* of the assessment of ecotoxicity during colistin exposure. *Environ Sci Pollut Res Int.* 15 de noviembre de 2014;21(23):13405-11.
64. El-Gawad El-Sayed, Ahmed MA, Zhong L-L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G-B. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect.* 2020;9:7-9.
65. Kato A, Chen HD, Latifi T, Groisman EA. Reciprocal Control between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of Its Lipopolysaccharide. *Mol Cell.* 2012;47(6):897-908.
66. Hjort K, Nicoloff H, Andersson DI. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2016;102(2):274-89.
67. Janssen AB, Doorduyn DJ, Mills G, Rogers MRC, Bonten MJM, Rooijackers SHM, et al. Erratum: Evolution of colistin resistance in the *klebsiella pneumoniae* complex follows multiple evolutionary trajectories with variable effects on fitness and virulence characteristics (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2021) 65:1 (e01958-20) DOI: 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(7).

68. Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: A review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. Vol. 46, FEMS Microbiology Reviews. 2022. 1-37 p.
69. Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, Crivaro V, Cuccurullo S, Imperi F, et al. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency «Ospedale dei Colli,» Naples, Italy. *Front Microbiol.* 2018;9(JUL):1-11.
70. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.
71. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):2017.
72. Zurfluha K, Tasaraa T, Poirel L, Patriceb N, Stephana R. Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* S51, a Chicken Isolate Harboring a Chromosomally Encoded *mcr-1* Gene. *Prokaryotes.* 2016;51.
73. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Malhotra-Kumar S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistinresistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, june 2016. *Eurosurveillance.* 2016;21(27):6-11.
74. Partridge SR, Pilato V Di, Doi Y, Feldgarden M, Haft DH, Klimke W, et al. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (*mcr*) genes. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(10):2625-30.
75. Bastidas-Caldes C, de Waard JH, Salgado MS, Villacís MJ, Coral-Almeida M, Yamamoto Y, et al. Worldwide Prevalence of *mcr*-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens.* 2022;11(6).
76. Nang SC, Li J, Velkov T. The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol.* 4 de marzo de 2019;45(2):131-61.
77. Volland H, Dortet L, Bernabeu S, Boutal H, Haenni M, Madec JY, et al. Development and Multicentric Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of MCR-1-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 1 de mayo de 2019;57(5).
78. Bradford PA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Wise MG, Hackel M, Sahm DF. Correlation

of β -lactamase production and colistin resistance among Enterobacteriaceae isolates from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1385-92.

79. Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan H, Li X, Xie S, et al. Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria : Mobilized Colistin Resistance Genes Study. 2019;1-18.

80. Satlina MJ. The search for a practical method for colistin susceptibility testing: Have we found it by going back to the future? *J Clin Microbiol*. 2019;57(2):18-21.

81. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 31th informational supplement. CLSI document M100-S31. Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS. Wayne, PA; 2021.

82. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, valid from 2023-06-29 [Internet]. [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

83. Bardet L, Rolain JM. Development of new tools to detect colistin-resistance among enterobacteriaceae strains. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018;2018(Mic).

84. Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L, et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: The MALDix test. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(12):3359-67.

85. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(6):1038-43.

86. Pasteran F, Danze D, Alejandra M, Carla C, Ignacio C, Ezequiel A, et al. Simple Phenotypic Tests To Improve Accuracy in Screening Chromosomal and Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol*. 2021;59(1):e01701-20.

87. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018;23(6):1-11.

88. Fan Z, Feng Y, Xu W, Feng J, Yan C, Fu T, et al. Rapid Detection of Multi-Resistance Strains Carrying *mcr-1* Gene Using Recombinase-Aided Amplification Directly on Clinical Samples. *Front Microbiol*. 2022;13(March):1-9.

89. Zou D, Huang S, Lei H, Yang Z, Su Y, He X, et al. Sensitive and rapid detection of the plasmid-encoded colistin-resistance Gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae isolates by loop-mediated isothermal amplification. *Front Microbiol*. 2017;8(NOV):1-7.

90. Zhong L, Zhou Q, Ahmed S, Chen G, Dai M, Yang F, et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (multi-LAMP) assay for rapid detection of mcr-1 to mcr-5 in colistin-resistant bacteria. 2019;1877-87.
91. Powell EA, Haslam D, Mortensen JE. Performance of the check-points check-MDR CT103XL assay utilizing the CDC/FDA antimicrobial resistance isolate bank. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;88(3):219-21.
92. World Health Organization. WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics [Internet]. [citado 20 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
93. Borer A, Odes LS, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, et al. Attributable Mortality Rate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(10):972-6.
94. Cosgrove SE. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Supplement_2):S82-9.
95. Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. *Travel Med Infect Dis.* 2019;31(July):101459.
96. Zhang S, Mi P, Wang J, Li P, Luo K, Liu S, et al. The optimized carbapenem inactivation method for objective and accurate detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2023;14(July):1-13.
97. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119-23.
98. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(4):351-3.
99. Janeiro D, Felipe C, Araujo M De, Silva M, Carneiro T, Ribeiro S, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio. 2016;60(7):4380-3.
100. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Ninth Edition. 2012. 18 p.

101. Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJ de, Lupski JR. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 1994;5:25-40.
102. Otter JA, Doumith M, Davies F, Mookerjee S, Dyakova E, Gilchrist M, et al. Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-8.
103. Seco BMS, Mello JL, Santa S, De C, Paulo S, Santos CC Dos, et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(10):1849-51.
104. World Health Organization. Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. 2016.
105. Ministerio de Salud Pública. Plan Nacional para la Prevención y Control de la Resistencia Antimicrobiana 2019-2023 [Internet]. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2019 [citado 20 de marzo de 2024]. p. 1-38. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-Nacional-para-la-prevención-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana_2019_compressed.pdf
106. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. AGROCALIDAD PROHÍBE EL USO DEL ANTIBIÓTICO COLISTINA EN ANIMALES [Internet]. [citado 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-en-animales/>
107. Ortiz-Prado E, Galarza C, León FC, Ponce J. Acceso a medicamentos y situación del mercado farmacéutico en Ecuador. 2014;36(1):57-62.
108. Mashaly GES, Mashaly MES. Colistin-heteroresistance in carbapenemase-producing *Enterobacter* species causing hospital-acquired infections among Egyptian patients. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;24:108-13.
109. Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF da, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;21:255-61.
110. Vargas JM, Moreno Mochi MP, Nuñez JM, Cáceres M, Mochi S, del Campo Moreno R, et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon.* 2019;5(6):23-8.

111. 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;18(3):268-81.
112. Wang J, He JT, Bai Y, Wang R, Cai Y. Synergistic activity of colistin/fosfomycin combination against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
113. Zhao M, Bulman ZP, Lenhard JR, Satlin MJ, Kreiswirth BN, Walsh TJ, et al. Pharmacodynamics of colistin and fosfomycin: A «treasure trove» combination combats KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(7):1985-90.
114. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1757-62.
115. Saelim W, Changpradub D, Thunyaharn S, Juntanawiwat P, Nulsopapon P, Santimaleeworagun W. Colistin plus sulbactam or fosfomycin against carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii*: Improved efficacy or decreased risk of nephrotoxicity? *Infect Chemother.* 2021;53(1):128-40.
116. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2395-7.
117. Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. Prevalence of in vitro synergistic antibiotic interaction between fosfomycin and nonsusceptible antimicrobials in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2019;68(6):893-7.
118. Rocha VFD, Barbosa MS, Leal HF, Silva GEO, Sales NMMD, Monteiro A de SS, et al. Prolonged Outbreak of Carbapenem and Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* at a Large Tertiary Hospital in Brazil. *Front Microbiol.* 2022;13(March):1-12.
119. Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 1 de enero de 2019;51(1):93-100.
120. da Silva KE, Baker S, Croda J, Nguyen TNT, Boinett CJ, Barbosa LS, et al. Risk factors for polymyxin-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in critically ill patients: An epidemiological and clinical study. *Int J Antimicrob Agents.* 1 de marzo de 2020;55(3).

121. Di Tella D, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. Molecular Epidemiological Insights into Colistin-Resistant and Carbapenemases-Producing Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3783.
122. Ortega-Paredes D, de Janon S, Villavicencio F, Ruales KJ, De La Torre K, Villacís JE, et al. Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Front Vet Sci.* 2020;7(November):1-8.
123. Barba P. SHORT REPORT Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. 2016;(March):1-4.
124. Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(12):1106.e1-1106.e8.
125. Haytoğlu Z, Gündeşlioğlu ÖÖ, Yıldızdaş D, Kocabaş E, Alabaz D, Horoz ÖÖ. Carbapenem and colistin resistance in children with Enterobacteriaceae infections. *Turk J Pediatr.* 1 de septiembre de 2020;62(5):778-86.
126. Büchler AC, Gehringer C, Widmer AF, Egli A, Tschudin-Sutter S. Risk factors for colistin-resistant Enterobacteriaceae in a low-endemicity setting for carbapenem resistance - a matched case-control study. *Euro Surveill.* 26 de julio de 2018;23(30).
127. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Spyropoulou A, Lambropoulou A, Sioulas N, Vamvakopoulou S, et al. Molecular epidemiology and risk factors for colistin- or tigecycline-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in critically ill patients during a 7-year period. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 de noviembre de 2018;92(3):235-40.
128. Richter SE, Miller L, Uslan DZ, Bell D, Watson K, Humphries R, et al. Risk Factors for Colistin Resistance among Gram-Negative Rods and *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol.* 1 de septiembre de 2018;56(9).
129. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? *Virulence.* 2017;8(4):417-26.
130. Arjun R, Gopalakrishnan R, Senthur Nambi P, Suresh Kumar D, Madhumitha R, Ramasubramanian V. A Study of 24 Patients with Colistin-Resistant Gram-negative Isolates in a Tertiary Care Hospital in South India. *Indian J Crit Care Med.* 1 de mayo de 2017;21(5):317-21.
131. Gallagher JC, Satlin MJ, Elabor A, Saraiya N, McCreary EK, Molnar E, et al. Ceftolozane-

Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections : A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis.* :1-5.

132. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(1).

133. Baron SA, Cassir N, Hamel M, Hadjadj L, Saidani N, Dubourg G, et al. Risk factors for acquisition of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* and expansion of a colistin-resistant ST307 epidemic clone in hospitals in Marseille, France, 2014 to 2017. *Euro Surveill.* 27 de mayo de 2021;26(21).

134. Chen S, Hu F, Zhang X, Xu X, Liu Y, Zhu D, et al. Independent Emergence of Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Clinical Isolates without Colistin Treatment. *J Clin Microbiol.* noviembre de 2011;49(11):4022.

135. Huang P-H, Chen W-Y, Chou S-H, Wang F-D, Lin Y-T. Risk Factors for the Development of Colistin Resistance during Colistin Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Microbiol Spectr.* 29 de junio de 2022;10(3).

136. Yauri K, Gonzales E, Di J, Gutkind G. Detection of plasmid-mediated colistin resistance by colistin pre-diffusion and inhibition with EDTA test (CPD-E) in Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2019;167:105759.

137. Rodriguez CH, Maza J, Tamarin S, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. In-house rapid colorimetric method for detection of colistin resistance in Enterobacterales: A significant impact on resistance rates. *J Chemother.* 2019;31(7-8):432-5.

138. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, Castanheira M, Dingle T, Hindler JA, et al. CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4):1-10.