

traditionally related to IA but they fulfilled the criteria for proven Aspergillosis according to the EORTC/MSG consensus group.⁴ The second patient developed a neurological deficit and it is difficult to determine if the cause was *Aspergillus* or *S. aureus*. However neurological impairment appeared when the bacteraemia had already cleared and the CT scan showed images suggestive of aspergillosis.

Influenza A (H1N1) virus infection may cause various immunological or respiratory tract disorders. Defects in cellular immunity, mucociliary transport as well as leukocyte dysfunction are among the described mechanisms.³ On the other hand, Influenza pneumonia may result in acute respiratory distress syndrome that requires high doses of corticosteroids.⁵ All of these can predispose to pulmonary aspergillosis.

Sporadic cases of invasive aspergillosis complicating influenza A have been reported since the 1990s.⁶ The question is whether infection by the current pandemic A (H1A1) virus is a stronger predisposing factor than infection by other strains. An affirmative answer is plausible based on the increased clinical and pathological morbidity associated with pandemic A (H1A1) virus infection, probably due to a broader range of susceptible respiratory cells.⁷ Invasive pulmonary aspergillosis should be considered as a possible complication in patients presenting with severe influenza A (H1A1) and who have received corticosteroids, even if they do not have classical immunocompromising conditions. Taking this into consideration may be helpful for an early diagnosis and treatment which could be valuable for a favourable outcome.

Bibliografía

1. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 2008;47:1176-84.
2. García-Vidal C, Barba P, Arnan M. Invasive aspergillosis complicating pandemic influenza A (H1N1) infection in severely immunocompromised patients. Clin Infect Dis. 2011;53:e16-9.
3. Lat A, Bhadelia N, Miko B, Furuya EY, Thompson 3rd GR. Invasive aspergillosis after pandemic (H1N1) 2009. Emerg Infect Dis. 2010;16:971-3.
4. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008;46:1813-21.
5. Poulakou G, Souto J, Balcells J. First influenza season after the 2009 pandemic influenza: characteristics of intensive care unit admissions in adults and children in Vall d'Hebron Hospital. Clin Microbiol Infect. 2012;18:374-80.
6. Lewis M, Kallenbach J, Ruff P, Zaltman M, Abramowitz J, Zwi S. Invasive pulmonary aspergillosis complicating influenza A pneumonia in a previously healthy patient. Chest. 1985;87:691-3.
7. Guarner J, Falcón-Escobedo R. Comparison of the pathology caused by H1N1, H5N1, and H3N2 influenza viruses. Arch Med Res. 2009;40:655-61.

Irma Hoyo-Ulloa^{a,*}, Nazaret Cobos-Trigueros^a,
Jordi Puig-de la Bellacasa^b, Jose Antonio Martínez-Martínez^a

^a Department of Infectious Diseases, Hospital Clínic – IDIBAPS, Barcelona, Spain

^b Laboratory of Microbiology, Hospital Clínic – IDIBAPS, Barcelona, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: ihoyo@clinic.ub.es (I. Hoyo-Ulloa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.02.019>

Caracterización de blaOXA-48 detectada en cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* aisladas en el sur de España

Characterization of blaOXA-48 in *Enterobacter cloacae* clinical strains in southern Spain

Sr. Editor,

La oxacilinas OXA-48 es una beta-lactamasa de clase D que fue identificada por primera vez en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en 2004¹, y desde 2008 se han aislado cepas portadoras de esta enzima que han sido responsables de brotes hospitalarios o casos aislados en diversos países mediterráneos. Desde el primer brote detectado en Turquía², se han producido otros aislamientos de cepas OXA-48 en el entorno mediterráneo, como Israel, países del norte de África, España y Francia^{3,4}, demostrando una capacidad de diseminación muy alta y extendiéndose a otros países europeos.

Los brotes suelen ser producidos por *K. pneumoniae*, pero también se han detectado esporádicamente en cepas de *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*.

Comunicamos el aislamiento y la caracterización molecular de dos cepas de *E. cloacae* que se aislaron de 2 pacientes hospitalizados en enero y septiembre del año 2010, respectivamente, en los que se ha identificado OXA-48. El primer caso corresponde a una mujer de 41 años, diagnosticada en diciembre de 2009 de leucemia mieloide aguda en tratamiento quimioterápico en la Unidad de Hematología del hospital. Tras el tratamiento de su proceso basal desarrolla un cuadro de aplasia y fiebre, siendo tratada con vancomicina, meropenem y caspofungina. La cepa de *E. cloacae* (Ecl536) resistente a carbapenem es aislada un mes después de sangre y lavado broncoalveolar y se añade ciprofloxacino al tratamiento. La paciente fallece por fallo renal en febrero de 2010. El segundo caso corresponde a

un hombre de 77 años de edad, hospitalizado el 31 de agosto de 2010 en la Unidad de Neumología (situada en una planta inmediatamente superior a la del caso anterior), por exacerbación de un proceso de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y tratado con ciprofloxacino. El 21 de septiembre se aísla en esputo una cepa de *E. cloacae* (Ecl537) con susceptibilidad intermedia a meropenem y resistente a imipenem y quinolonas, falleciendo de insuficiencia respiratoria al día siguiente.

La identificación y el antibiograma se realizaron mediante métodos comerciales (Wider, Soria Melguizo). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron confirmadas por E-test (Biomerieux). La detección fenotípica de carbapenemasas fue demostrada por el test modificado de Hodge (THM). El análisis molecular de beta-lactamasas plasmídicas fue realizado con Check Carba ESBL (Check-Points). El gen blaOXA-48 fue detectado por PCR⁵ y confirmado por secuenciación. Se realizaron análisis de porinas mediante SDS-PAGE⁶, y la relación clonal fue estudiada por Rep-PCR. Los plásmidos fueron caracterizados por tipificación de los replicones mediante PCR⁷ y fueron extraídos por el método de Kado y Liu⁸. El tamaño aproximado de cada uno de los plásmidos detectados fue calculado usando como referencia diferentes cepas de *E. coli* con un contenido en plásmidos de tamaños conocidos (fig. 1). El entorno genético del gen blaOXA-48 fue determinado por PCR y secuenciación con primers de blaOXA-48 y del transposón Tn1999¹.

Los 2 aislamientos fueron resistentes a todos los beta-lactámicos ensayados: amoxicilina, amoxicilina/clavulánico y cefalosporinas, incluyendo cefotaxima, ceftazidima y cefepima. Además, ambos aislamientos fueron resistentes a cotrimoxazol, tobramicina, gentamicina, amikacina y minociclina, pero susceptibles a colistina y fosfomicina. El primer aislamiento fue susceptible a ácido nalidixico y ciprofloxacino, con CMI de ≤ 16 y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, mientras que el segundo fue resistente a ácido nalidixico

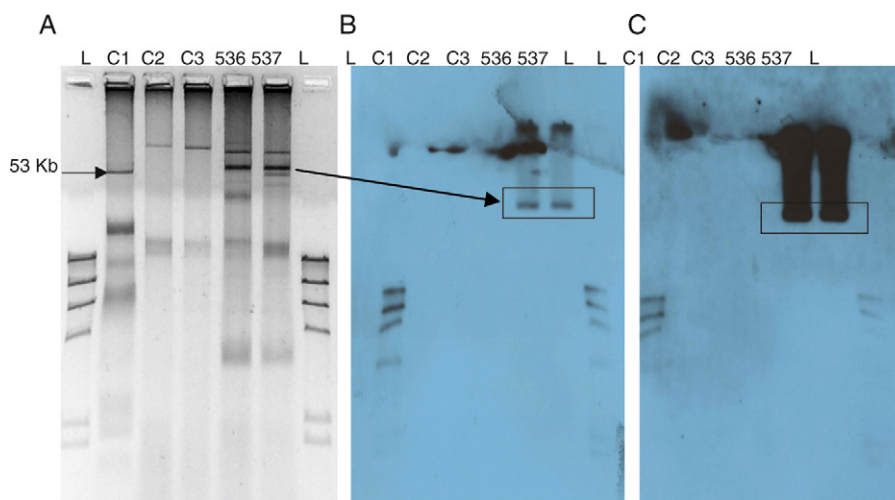


Figura 1. Extracción de plásmidos y resultado de las hibridaciones llevadas a cabo con sondas específicas para los genes de interés. A) Perfil de plásmidos obtenidos de los aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae*. B) Resultado de la hibridación con *repl/M*. C) Resultado de la hibridación con *blaOXA-48*. L: marcador de hibridación, DNA molecular-weight marker II dig labeled 0.12-23.1 Kb (Roche, Mannheim, Alemania); C1: *E. coli* V517; C2: *E. coli* J53 pLac (183 Kb); C3: *E. coli* J53 pR27 (153 Kb).

(CMI > 16 µg/ml) y ciprofloxacino (CMI > 2 µg/ml). Las CMI de imipenem y meropenem fueron de 8 y 16 mg/l, respectivamente, para la primera cepa, y de 2 y 8 mg/l para la segunda. El resultado del THM fue positivo. Ambas cepas tenían betalactamasas SHV-like, CTX-M-grupo 9 y OXA-48, presentaban relación clonal con un perfil de bandas idéntico en Rep-PCR y expresaban proteínas de membrana externa en el rango de tamaño de las porinas (OmpF, OmpC y OmpA). En ambos aislamientos se detectaron plásmidos con replicones de los grupos Y, T, R y P, y además, una de las cepas presentaba también un replicón de tipo HI2. El análisis de hibridación mostraba que el gen que codifica OXA-48 estaba asociado a un plásmido del grupo de incompatibilidad L/M con un tamaño aproximado de 70 Kb (fig. 1) no detectado por el esquema clásico de PBRT, descrito anteriormente por otros autores⁹. El gen *blaOXA-48* estaba flanqueado por 2 copias de IS1999, estando truncada la copia corriente arriba por un IS1R, como caracteriza al transposón Tn1999.2.

La carbapenemasa OXA-48 se está extendiendo muy rápidamente, desde los primeros brotes en Turquía, por el este y el sur del Mediterráneo, introduciéndose en Europa a través de cepas que poseen el transposón Tn1999. Describimos 2 aislamientos de una cepa de *E. cloacae* que portaba Tn1999.2 en pacientes hospitalizados en 2010. Recientemente, en un estudio de control epidemiológico de carbapenemasas en Bélgica¹⁰ se detectaron 19 cepas con OXA-48 en pacientes hospitalizados, sin relación con los países endémicos, lo que sugiere que estas cepas han podido no ser detectadas debido a su perfil de resistencia moderada a los carbapenémicos que las hace difícil de identificar. El aislamiento en Marruecos de cepas ambientales sugiere la posibilidad de transmisión en la comunidad en el área mediterránea¹¹. Tn1999.2-*blaOXA-48* ha sido previamente descrito asociado a un plásmido conjugativo del grupo de incompatibilidad L/M, homólogo a otros de este mismo grupo implicados en la dispersión de beta-lactamasas como CTX-M-3 y NDM-1⁸. La detección en nuestro caso de Tn1999.2-*blaOXA-48* en este mismo tipo de plásmidos indica, en un contexto espaciotemporal, la posible transferencia de este plásmido entre diferentes especies de enterobacterias, lo que refuerza el potencial de diseminación de las cepas productoras de carbapenemasas y la necesidad de la búsqueda sistemática en pacientes hospitalizados.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Luis Martínez Martínez su inestimable ayuda y sus comentarios en la elaboración del manuscrito.

Bibliografía

- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:15-22.
- Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:1369-73.
- Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Western Europe, France. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:2420-3.
- Pitart C, Sole M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4398-401.
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2010;65:490-5.
- Martínez-Martínez L, Conejo MC, Pascual A, Hernández-Alles S, Ballesta S, Ramírez de Arellano-Ramos E, et al. Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2534-6.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005;63:219-28.
- Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981;145:1365-73.
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:559-62.
- Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Baurain C, Gérard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. Int J Antimicrob Agents. 2012;39:168-72.
- Potron A, Poirel L, Bussy F, Nordmann P. Occurrence of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene *blaOXA-48* in the environment in Morocco. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:5413-4.

Fátima Galan-Sánchez^a, Belén Ruiz del Castillo^b,
Pilar Marín-Casanova^a
y Manuel Rodríguez-Iglesias^{a,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: manuel.rodriguezglesias@uca.es
(M. Rodríguez-Iglesias).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.05.002>