



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i Microbiologia

**Caracterización molecular de los genes
*bla*_{AmpC} cromosómicos y adquiridos en
aislados clínicos de *Escherichia coli* en el
área de Barcelona**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat
Autònoma de Barcelona.

Noemí Alonso Louro

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de la Dra. Beatriz Mirelis y la Dra. M.
Alba Rivera en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Barcelona, 2014



Beatriz Mirelis Otero, Profesora Titular Universitaria del Departamento de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y **Alba Rivera Martinez** Doctora en Ciencias Biológicas

CERTIFICAN:

Que la presente tesis titulada “**Caracterización molecular de los genes *bla*_{AmpC} cromosómicos y adquiridos en aislados clínicos de *Escherichia coli* en el área de Barcelona**” que presenta Noemí Alonso Louro para optar al grado académico de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple con los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente

Y para que así conste y para los efectos oportunos firmamos este documento en Barcelona, 29 de Septiembre de 2014

Dra Beatriz Mirelis Otero

Dra Alba Rivera Martinez

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Desde que empecé a escribir esta tesis, ya hace unos cuantos meses, fueron muchas las ocasiones en las que se me pasó por la cabeza cómo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este proyecto se haya llevado a cabo. Ahora que ha llegado el momento, siento que será realmente difícil expresarlo con palabras.

A mis directoras de tesis, la Dra. Beatriz Mirelis y la Dra. Alba Rivera por enseñarme, por apoyarme y por animarme día día a continuar. Por su entusiasmo y por intentar hacer de todo esto una alegría constante.

Al Dr. Pere Coll, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por la confianza que depositó en mí al darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Ferran Navarro, por animarme a realizar este doctorado, por su dedicación y perseverancia.

A la Dra. Elisenda Miró, por compartir sus conocimientos y por guiarme con las técnicas moleculares. Por los buenos momentos en el laboratorio, reuniones y congresos.

A la Dra. Beatriz Guerra, responsable de mi estancia en el Bfr (Federal Institute for Risk Assessment) de Berlín, así como al Dr. Reiner Helmuth, por darme la oportunidad de vivir una nueva experiencia en esa ciudad increíble, por enseñarme y por confiar en mí a la hora de realizar parte de sus proyectos.

A Carolyn Newey, por las correcciones de inglés, por su cercanía y paciencia a la hora de enseñarme a redactar artículos científicos.

A Nùria Prim, por su ayuda desinteresada a la hora de corregir el inglés a última hora y por transmitir su entusiasmo y sus ganas de aprender.

A Gabriel Ortiz y Mercè Gurguí del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; a Vanesa Pascual, Mónica Rodríguez, Esther Calbo y Javier Garau del Hospital Universitario Mútua de Terrasa; a María Simó, Mariona Xercavins, Maria Antonia Morera y Pepa Pérez del CatLab; y a Maria Consol y Elena Espejo del Consorci Sanitari de Terrasa, que han participado en este estudio, tanto en el planteamiento del mismo como en la recogida de casos y datos clínicos.

A todos mis compañeros del laboratorio. A Laura, por su infinita paciencia a la hora de enseñar y de resolver problemas, y por las largas conversaciones de poyata. A Montse y a Paquita, por siempre hacer un hueco para ayudarme a resolver algún problema y por siempre tener palabras de ánimo. A Mar y a Marc, por compartir experiencias de “doctorandos”. A Paula, que a pesar de coincidir poco tiempo, le ha dado tiempo a animarme y ha darme buenos consejos. A las que ya no están, a Rebeca por los momentos compartidos y a Cate, por enseñarme todo lo que podía mientras acababa su tesis. Y, por supuesto no me voy a olvidar de Manel, por las largas horas compartidas dentro y fuera del laboratorio, por ayudarme en todo momento y por llevarme un gran amigo. A todos ellos, mil gracias por vuestra paciencia, por no haber dudado nunca en tenderme una mano y porque de una forma o de otra, todos habéis hecho que esto sea posible.

A Ángela, mi diseñadora particular, por la creación de la portada.

A toda mi familia, especialmente a mis padres, por la plena dedicación, por el cariño y apoyo que siempre me han dado; por animarme a seguir. Si no fuera por ellos, no estaría hoy escribiendo esta tesis. E, como non, a miña avoa, por deixarme se-lo seu rabiño e por facerme sentir sempre tan especial.

A mis niñas, porque a pesar de no ser de sangre, somos más que hermanas. Gracias por estar siempre ahí.

A Guerau, por tu paciencia en esta etapa y por compartir la vida conmigo.

Y a ese largo etcétera de personas, que de una forma más cercana o más lejana, han compartido aunque sea una pequeña parte de este proyecto.

A todos.... graciñas, gracias, gràcies, thanks, danke schön!

ÍNDICE

0. RESUMEN/SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Familia Enterobacteriaceae	9
1.1.1. Escherichia coli	12
1.2. Los antibióticos betalactámicos	15
1.2.1. Contexto histórico.....	15
1.2.2. Mecanismo de acción.....	18
1.2.3. Estructura, clasificación y espectro de actividad.....	20
1.3. Resistencia a los antibióticos.....	24
1.3.1. Resistencia adquirida	24
1.3.2. Elementos genéticos móviles	27
1.3.2.1. Secuencias de inserción y transposones.....	28
1.3.2.2. Integrones y casetes génicos	28
1.3.2.3. Elementos conjugativos integrativos (ICE)	29
1.3.2.4. Plásmidos.....	30
1.3.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos	32
1.3.3.1. Alteración de la permeabilidad celular	32
1.3.3.2. Modificación de la diana	32
1.3.3.3. Bombas de expulsión activa.....	33
1.3.3.4. Producción de enzimas inactivantes	34
1.4. Las betalactamasas	34
1.4.1. Clasificación de las betalactamasas.....	36

1.4.2. Betalactamasas naturales en enterobacterias.....	39
1.4.2.1. Regulación de la expresión de las betalactamasas AmpC.....	42
1.4.2.2. Betalactamasa AmpC de <i>E. coli</i>	44
1.4.3. Betalactamasas adquiridas en enterobacterias	45
1.4.3.1. Betalactamasas AmpC adquiridas	46
1.5. Resistencia a quinolonas.....	50
1.5.1. Mecanismo de acción de las quinolonas	52
1.5.2. Mecanismo de resistencia a las quinolonas	52
1.5.2.1. Resistencia a quinolonas cromosómica	54
1.5.2.2. Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos	55
1.5.2.2.1. Protección de la diana de quinolonas.....	55
1.5.2.2.2. Inactivación enzimática	55
1.5.2.2.3. Bombas de expulsión activa codificadas por plásmidos	55
2. OBJETIVOS.....	57
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1. Características y ámbito de estudio.....	62
3.2. Identificación de los aislados clínicos de <i>E. coli</i>	62
3.3. Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos	63
3.4. Detección fenotípica de las betalactamasas de tipo AmpC	64
3.5. Caracterización de genes de resistencia	65
3.6. Estudio de la expresión del gen <i>ampC</i> de <i>E. coli</i>	70
3.7. Relación epidemiológica de las cepas	75
3.8. Determinación de los grupos filogenéticos	79

3.9. Caracterización de plásmidos.....	84
3.10. Estudio de la relación epidemiológica de los plásmidos	90
4. RESULTADOS.....	93
4.1. Selección y origen de los aislados.....	95
4.2. Estudio de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos	97
4.3. Estudio de la sensibilidad a antibióticos no betalactámicos.....	99
4.4. Caracterización molecular de las betalactamasas AmpCa	100
4.5. Análisis de las regiones reguladoras del gen <i>ampC</i>	101
4.6. Estudio de la expresión del gen <i>ampC</i>	103
4.7. Prevalencia de determinantes de resistencia a quinolonas.....	106
4.8. Relación epidemiológica de las cepas.....	107
4.9. Determinación de grupos filogenéticos.....	107
4.10. Caracterización de plásmidos.....	111
4.10.1. Determinación del grupo de incompatibilidad plasmídico.....	111
4.10.2. Determinación del tamaño de plásmido portador de la AmpCa	111
4.11. Epidemiología de los plásmidos portadores de betalactamasas AmpCa.....	114
5. DISCUSIÓN	117
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	135
7. REFERENCIAS	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pared celular de bacterias gramnegativas.....	10
Figura 2. Relación filogenética de 72 aislados de la colección ECOR.....	14
Figura 3. Diversidad filogenética de <i>E. coli</i>	14
Figura 4. <i>Antibiotic hall of fame</i> del Nobel Museum	16
Figura 5. Estructura de una unidad repetitiva del peptidoglucano de la pared celular con el tetrapéptido	19
Figura 6. Etapas de formación de la pared celular en gramnegativos.....	19
Figura 7. Estructura química de los principales antibióticos betalactámicos.....	21
Figura 8. Mecanismos de adquisición de genes de resistencia a antibióticos	25
Figura 9. Diagrama de un transposón complejo	28
Figura 10. Esquema representativo de los elementos de un integrón	29
Figura 11. Diagrama de un plásmido	31
Figura 12. Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos	33
Figura 13. Mecanismo de acción de las betalactamasas	35
Figura 14. Árbol filogenético que representa las relaciones evolutivas entre algunas PBP y diversas betalactamasas de clase A	35
Figura 15. Regulación de la síntesis, remodelado y reciclaje de la pared celular en relación a la expresión de la betalactamasa AmpC	44
Figura 16. Representación genética del terminador del gen <i>frd</i> y de la región promotora del gen <i>ampC</i>	45
Figura 17. Dendrograma de las betalactamasas AmpC cromosómicas y adquiridas.....	46
Figura 18. Estructura química de quinolonas y fluoroquinolonas.....	51
Figura 19. Mecanismos de resistencia a quinolonas	53
Figura 20. Antibiograma de un aislado de <i>E. coli</i> portador de una betalactamasa inducible DHA-1	66

Figura 21. Árbol dicotómico descrito por Clermont <i>et al</i> para la interpretación de la PCR triple en la determinación de grupos filogenéticos	80
Figura 22. Patrones de bandas obtenidos por la PCR triple de Clermont	81
Figura 23. Patrones de bandas obtenidos por la PCR cuádruple de Clermont	84
Figura 24. Número de aislados que presentaron un fenotipo compatible con la presencia de una betalactamasa AmpC en cada centro	95
Figura 25. Antibiograma de una cepa con una AmpCc y con una AmpCa (CMY-2).....	95
Figura 26. Origen de las muestras en las que se aisló <i>E. coli</i> productora de betalactamasa AmpC	96
Figura 27. Clasificación de los casos según su procedencia	96
Figura 28. Porcentaje de resistencia de las cepas seleccionadas a los diferentes antibióticos	98
Figura 29. Antibiograma de una cepa de <i>E. coli</i> portadora de una betalactamasa de tipo CMY-2 y una BLEE de tipo CTX-M	100
Figura 30. Esquema de la secuencia de la región promotora y atenuadora del gen <i>ampC</i> con las mutaciones relacionadas con la hiperproducción del mismo.....	101
Figura 31. Representación en forma de curvas del incremento de la fluorescencia y con ello de la expresión de los genes <i>gap</i> y <i>ampC</i>	103
Figura 32. Hibridación de un gel S1-PFGE con sonda <i>bla</i> _{CMY-2} y sonda IncI1.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales géneros y especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> de interés en patología humana	12
Tabla 2. Principales antibióticos betalactámicos	23
Tabla 3. Clasificación de las betalactamasas	37
Tabla 4. Patrones de resistencia natural de diferentes especies de Enterobacterias.....	41
Tabla 5. Sustituciones aminoacídicas más frecuentes encontradas en <i>GyrA</i> y <i>ParC</i> de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i>	54
Tabla 6. PCR de betalactamasas de amplio espectro, BLEE y PMQR	68
Tabla 7. PCR de betalactamasas de tipo AmpC	69
Tabla 8. Iniciadores y condiciones utilizadas para la caracterización de betalactamasas de amplio espectro, BLEE, AmpCc, AmpCa y PMQR	70
Tabla 9. Iniciadores y condiciones utilizadas para la determinación de los grupos filogenéticos según Clermont en el año 2000	80
Tabla 10. Iniciadores y condiciones utilizadas para la determinación de los grupos filogenéticos según Doumith <i>et al</i>	82
Tabla 11. Iniciadores y condiciones utilizadas para la determinación de los grupos filogenéticos según Clermont en el año 2013	83
Tabla 12. Iniciadores y condiciones utilizadas para la técnica de PBRT	86
Tabla 13. Iniciadores y condiciones utilizadas en pMLST de IncI1 y RST de IncF.....	92
Tabla 14. Porcentaje de resistencia a antibióticos betalactámicos	97
Tabla 15. Porcentaje de resistencia a antibióticos no betalactámicos	99
Tabla 16. Betalactamasas presentes en aislados de <i>E. coli</i> con una AmpCa	100
Tabla 17. Betalactamasas presentes en aislados de <i>E. coli</i> con una AmpCc	101
Tabla 18. Mutaciones en las cepas hiperproductoras de AmpCc	102
Tabla 19. Resultados del análisis de expresión del gen <i>ampC</i> mediante qRT-PCR.....	104

Tabla 20. Halo de inhibición de 17 aislados con una AmpCa con mayor resistencia a betalactámicos	105
Tabla 21. Determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas en cepas hiperproductoras de AmpCc y con AmpCa	106
Tabla 22. Distribución de las cepas según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2000	107
Tabla 23. Distribución de las cepas con AmpCa y AmpCc según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2000	108
Tabla 24. Distribución de las cepas según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2013	109
Tabla 25. Distribución de las cepas con AmpCa y AmpCc según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2013	109
Tabla 26. Discrepancias entre los diferentes métodos de Clermont	110
Tabla 27. Resultados de PBRT	112
Tabla 28. Caracterización de los plásmidos portadores de betalactamasa AmpCa en <i>E. coli</i> mediante PBRT y S1-PFGE	113
Tabla 29. pMLST de plásmidos IncI1	114
Tabla 30. RST de plásmidos IncF	115

ABREVIATURAS

AMC: amoxicilina-ácido clavulánico

AMK: amikacina

AMP: ampicilina

AmpCa: betalactamasa AmpC adquirida

AmpCc: betalactamasa AmpC cromosómica

BLEE: betalactamasa de espectro extendido

C1G: cefalosporinas de primera generación

C2G: cefalosporinas de segunda generación

C3G: cefalosporinas de tercera generación

C4G: cefalosporinas de cuarta generación

C5G: cefalosporinas de quinta generación

CAZ: ceftazidima

CEF: cefalotina

CIP: ciprofloxacino

COL: colistina

CST: Consorci Sanitari de Terrassa

CTX: cefotaxima

CXM: cefuroxima

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAc: ácido desoxirribonucleico complementario

ECOR: *Escherichia coli* de referencia

FEP: cefepime

FOX: cefoxitina

GEN: gentamicina

GlcNAc: N-acetilglucosamina

HSCiSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

HUMT: Hospital Universitario Mútua de Terrassa

IMI: imipenem

Inc: incompatibilidad

KAN: kanamicina

MLST: *multilocus sequence typing*

MurNAc: ácido N-acetil murámico

NAL: ácido nalidíxico

NIT: nitrofurantoína

PBP: *penicillin binding protein*

PBRT: *PCR-based replicon typing*

PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*

PIP: piperacilina

pMLST: *plasmid multilocus sequence typing*

PMQR: *plasmid mediated quinolone resistance*

PTZ: piperacilina-tazobactam

Qnr: *quinolone resistance*

QRDR: *quinolone resistance determining region*

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

RST: *replicon sequence typing*

S1-PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis* con digestión con la endonucleasa S1

SSS: sulfonamidas

ST: *sequence typing*

STR: estreptomicina

SXT: trimetoprim-sulfametoxazol

TET: tetraciclina

TOB: tobramicina

0. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Escherichia coli presenta un gen *bla*_{AmpC} cromosómico que se expresa de forma constitutiva a bajo nivel debido a la presencia de un promotor débil y un atenuador. En estas condiciones no confiere resistencia a betalactámicos. Sin embargo, *E. coli* puede incrementar la expresión de este gen debido a mutaciones en su región promotora/atenuadora (*AmpCc*) o adquirir genes *bla*_{AmpC} incluyendo CMY, DHA, ACC, FOX, MOX, ACT, MIR, LAT y CFE (*AmpCa*), mecanismos que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y aztreonam.

A diferencia de lo que sucede con las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), la detección fenotípica de betalactamasas AmpC es difícil debido a la escasez de métodos estandarizados.

Los estudios sobre la epidemiología y las características clínicas asociadas con infecciones producidas por *E. coli* productora de AmpC son limitados. Además, en las cepas productoras de AmpC es frecuente la corresponsencia a otras familias de antimicrobianos, lo que convierte el tratamiento de estas infecciones en un reto para el clínico.

Se realizó un estudio multicéntrico con el Consorci Sanitari de Terrassa, el Hospital Universitario Mútua de Terrassa y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, en el que se analizaron los aislados de *E. coli* con patrón fenotípico compatible con la producción de AmpC entre junio de 2010 y noviembre de 2011. El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de aislados productores de AmpC, identificar los genes *bla*_{AmpC} adquiridos, así como las mutaciones involucradas en la hiperproducción del gen *bla*_{AmpC} cromosómico, además de conocer la estructura de la población y sus resistencias asociadas.

De un total de 240 cepas analizadas, el 75% eran portadoras de *AmpCa*, siendo CMY-2 el enzima mayoritario, seguido de DHA-1. El 25% restante resultaron ser hiperproductoras de su *AmpCc*, cuyo principal mecanismo fue la presencia de mutaciones que daban lugar a un promotor alternativo desplazado. Ello provocaba un incremento medio de la expresión del gen *ampC* de 72,5. También se encontraron otros dos patrones de mutaciones que originaban modificaciones en la región espaciadora del

promotor o alteraciones en el atenuador, con incrementos medios de la expresión de 19,9 y 5,8, respectivamente.

El análisis de los grupos filogenéticos permitió conocer la estructura de la población estudiada. Se observó que un 60% de los aislados con AmpCa pertenecían a los grupos filogenéticos B2, D, E o F. Un 82% de los aislados hiperproductores con un promotor desplazado pertenecían a los grupos A, B1 o C. Todos los aislados con la región atenuadora modificada y un 67% de los aislados con la región espaciadora modificada pertenecían a los grupos B2, D, E o F.

De la misma manera que ocurre con las cepas portadoras de BLEE, los plásmidos que vehiculan los genes *bla*_{AmpC} suelen contener otros genes que confieren resistencia a otras familias de antibióticos. El estudio de la sensibilidad mostró tasas de resistencia a ácido nalidíxico, estreptomycin, ciprofloxacino y cotrimoxazol de 79%, 62%, 57,5% y 44%, respectivamente. Se observó que el 30% y 11% de los aislados con AmpCa y AmpCc, respectivamente, eran portadores de determinantes PMQR (*plasmid-mediated quinolone resistance*). Entre los PMQR detectados en aislados con AmpCa el mayoritario fue *qnrB4*, siempre en cepas portadoras de *bla*_{DHA-1}, seguido de *aac(6')-Ib-cr*. En aislados hiperproductores de AmpCc el PMQR mayoritario fue *aac(6')-Ib-cr*.

El continuo aumento de la prevalencia de estas enzimas se debe principalmente a la diseminación de los genes *bla*_{AmpC} por transferencia horizontal. En los plásmidos analizados IncI1 e IncF fueron los replicones mayoritarios asociados a *bla*_{CMY-2} y *bla*_{DHA-1}, respectivamente.

El análisis de la estructura poblacional de los plásmidos mediante pMLST determinó que existía una gran variabilidad genética entre ellos. IncI1/ST12 fue la secuencia tipo mayoritaria. También se encontraron IncI1/ST26, IncI1/ST55, IncI1/ST94 e IncI1/ST134, siendo este último descrito por primera vez en este estudio. De los plásmidos incluidos en el grupo IncF, cada uno correspondía a una secuencia tipo diferente.

SUMMARY

Escherichia coli has a chromosomal *bla*_{AmpC} gene that is expressed constitutively at low level due to the presence of a weak promoter and an attenuator. Under these conditions, this gene does not confer resistance to beta-lactams. However, this chromosomal gene may be overproduced due to mutations in the promoter/attenuator region (cAmpC). Additionally, *E. coli* may also acquire *bla*_{AmpC} genes (aAmpC), namely CMY, DHA, ACC, FOX, MOX, ACT, MIR, LAT and CFE. Both mechanisms (cAmpC and aAmpC) confer resistance to penicillins, cephalosporins, cephamycins and aztreonam. In contrast to the range of phenotypic methods available for extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), no standardized methods are available to detect AmpC beta-lactamases.

There is a paucity of reports on the epidemiology and clinical features associated with infections caused by AmpC-producing *E. coli*. Furthermore, these isolates frequently present co-resistance to other families of antibiotics, converting treatment of these infections into a clinical challenge.

A multicentric study was performed to analyse *E. coli* isolates with a resistance pattern compatible with the production of AmpC. Isolates were obtained from Consorci Sanitari de Terrassa, Hospital Universitario Mútua de Terrassa and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) between June 2010 and November 2011. The aims of this study were: 1) to determine the prevalence of AmpC-producing *E. coli* isolates; 2), to identify acquired *bla*_{AmpC} genes and the mutations involved in the overproduction of the chromosomal *bla*_{AmpC} gene; and 3) to describe the population structure and patterns of resistance.

A total of 240 strains were analysed. Of these, 75% were aAmpC-carriers and the remaining were cAmpC-overproducers. CMY-2 was the predominant enzyme, followed by DHA-1. Most cAmpC-overproducers had mutations that yielded an alternate displaced promoter and caused an increase of *bla*_{AmpC} expression (average increase of expression 72.5). Two other different mutational patterns were found: a modified spacer region in the promoter and a modified attenuator (the average increase of expression was 19.9 and 5.8, respectively).

Analysis of the phylogenetic groups allowed to gain knowledge of the population structure. Of all aAmpC isolates, 60% belonged to the phylogenetic groups B2, D, E and F. Among cAmpC overproducers, 82% of the isolates bearing a displaced promoter belonged to groups A, B1 and C. All the isolates with modified attenuator regions and 67% of the isolates with modified spacer regions belonged to groups B2, D, E and F.

As it happens in ESBL-carrying strains, the plasmids carrying *bla*_{AmpC} genes may also carry other genes, conferring resistance to other families of antibiotics. In the present study, the percentage of resistance to nalidixic acid, streptomycin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole was 79%, 62%, 57.5% and 44%, respectively. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants (PMQR) were detected in 30% of the aAmpC isolates and 11% of the cAmpC isolates. Among aAmpC isolates, the most predominant PMQR was *qnrB4* (always in *bla*_{DHA-1} carriers), followed by *aac(6')-Ib-cr*. Among cAmpC isolates, the predominant PMQR was *aac(6')-Ib-cr*.

The increase in the prevalence of these enzymes is due to the spread of genes through horizontal transfer. The analysis of plasmids showed that IncI1 and IncF were the main replicons involved. IncI1 and IncF were related to *bla*_{CMY-2} and *bla*_{DHA-1}, respectively.

The pMLST analysis of plasmids revealed a large genetic variability. IncI1/ST12 was the predominant sequence type. Other sequence types belonging to the same incompatibility group were IncI1/ST26, IncI1/ST55, IncI1/ST94 and IncI1/ST134, the latter being first described in this study. Regarding IncF, each plasmid corresponded to a different sequence type.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

El origen de la familia *Enterobacteriaceae* data de principios del siglo XIX pero no fue hasta 1937 cuando el término *Enterobacteriaceae* fue propuesto por el microbiólogo Otto Rahn para agrupar a un conjunto de microorganismos bioquímica y morfológicamente similares^{1,2}.

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un conjunto de bacilos gramnegativos, heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patógena, pero incluidos en ella por la semejanza de sus caracteres estructurales y fisiológicos y su homología genética. En la actualidad se han descrito más de 50 géneros cultivables de enterobacterias y centenares de especies, diversos géneros de endosimbiontes o parásitos de insectos y plantas, algunos de los cuales no son cultivables en medios convencionales, y diversos grupos no nominados (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy y www.bacterio.net).

En general, su tamaño oscila entre 2-3 μm por 0,3-0,6 μm , no forman esporas, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Estos organismos crecen bien en medios de cultivo usuales tanto en aerobiosis como anaerobiosis, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa con o sin producción de gas y carecen de citocromoxidasa. Presentan entre un 39 y un 59% de contenido en G+C en su DNA³.

La clasificación de las bacterias, al igual que otros seres vivos, se realiza en base a sus características fenotípicas y genéticas. El grupo natural de los seres vivos es la especie, que se refiere al grupo de seres capaces de reproducirse sexualmente entre sí. Las bacterias carecen de este tipo de reproducción y la clasificación tiene que efectuarse en función a su semejanza genética que se determina mediante técnicas moleculares. Hoy en día, aún se utilizan en los laboratorios de microbiología clínica pruebas metabólicas para la identificación de muchas especies bacterianas, pero también se está introduciendo el análisis de los perfiles proteicos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), ya que es una técnica más específica, sencilla y económica³⁻⁵.

Las enterobacterias tienen la estructura típica de las bacterias gramnegativas. La pared celular se encuentra envolviendo a la membrana interna y está compuesta por una

fina capa de peptidoglucano recubierta por la membrana externa. En ella se encuentran una serie de componentes estructurales (Figura 1):

- Proteínas de membrana y canales proteicos (porinas) que permiten el paso selectivo de sustancias hidrofílicas.
- Lipopolisacáridos (LPS) con tres regiones bien diferenciadas:
 - Lípido A, constituye la endotoxina con actividad patogénica.
 - Núcleo del polisacárido compuesto por polisacáridos especiales.
 - Polisacáridos que confieren a la bacteria propiedades antigénicas (antígeno O).
- Lipoproteínas o proteínas de Braun implicadas en la unión entre la membrana externa y el peptidoglucano.
- Fosfolípidos que confieren rigidez y permeabilidad a la membrana.

El peptidoglucano es un heteropolímero unido covalentemente que se extiende por la parte exterior de la membrana citoplasmática. Sus funciones principales son preservar la integridad celular resistiendo a la presión osmótica interna y mantener la forma de la célula.

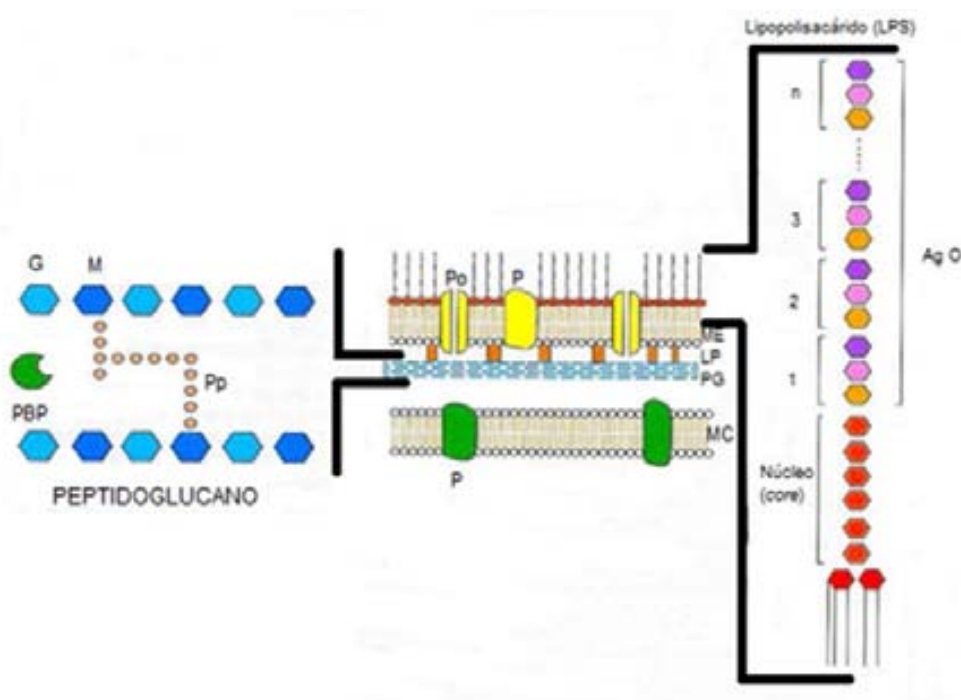


Figura 1. Pared celular de bacterias gramnegativas. Figura adaptada de Microbiología y Parasitología Médicas, Prats.G⁴.

G: *N*-acetilglucosamina; M: ácido *N*-acetilmurámico; Pp: puentes peptídicos; PBP: *penicillin binding-protein*; Po: porinas; P: proteína transmembrana; ME: membrana externa; LP: lipopolisacárido; PG: peptidoglucano; MC: membrana citoplasmática

Las enterobacterias presentan diversas estructuras antigénicas que permiten su clasificación inmunológica. El antígeno O permite definir diversos serogrupos. Las cepas móviles poseen flagelos constituidos por subunidades proteicas altamente antigénicas (antígeno H) que permiten subdividir los serogrupos en diversos serotipos. Algunas especies presentan cápsula polisacárida inmunogénica (antígeno K). Las fimbrias (pili) poseen interés como adhesinas. Los miembros de esta familia poseen un antígeno común situado en la pared (Figura 1).

La mayoría de las especies de la familia *Enterobacteriaceae* ocupan hábitats muy variados en el medio ambiente, las plantas y el tubo digestivo de los animales, otras ocupan hábitats más restringidos y algunas se hallan adaptadas estrictamente al hombre.

Dentro de la familia se encuentran especies patógenas y comensales para las plantas y los animales. Con respecto al hombre, existen especies con capacidad patógena primaria (factores de patogenicidad) pudiendo causar infección en personas previamente sanas sin factores predisponentes, como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Escherichia coli* (variedades patógenas). Las especies comensales que se encuentran estables o transitorias en el tubo digestivo, pueden producir infecciones oportunistas, siempre que existan factores predisponentes locales como la ruptura de las barreras físicas o fisiológicas o generales como la disminución de las defensas globales inespecíficas, principalmente la fagocitosis y de la respuesta inmune del huésped.

Muchas enterobacterias comensales desde su reservorio en el tubo digestivo pueden causar infecciones oportunistas graves (infección urinaria, peritonitis, colecistitis, infección de herida quirúrgica, neumonía, meningitis y sepsis). Los géneros que causan estas infecciones con mayor frecuencia son *Escherichia* y *Klebsiella* seguidas de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y las diferentes especies de los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* (Tabla 1).

Las enterobacterias presentan resistencia natural a la penicilina G, glucopéptidos, macrólidos, ácido fusídico, mupirocina, estreptograminas y linezolid. Son sensibles a la mayoría de los antibióticos betalactámicos de amplio espectro, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, sulfamidas, colistina y cloranfenicol.

Tabla 1. Principales géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* de interés en patología humana.

GÉNERO	ESPECIE	PATOLOGÍA
Patógenos		
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> Serotipos gastroenteríticos: Enteritidis, Typhimurium y otros	Enteritis
	Serotipos septicemiantes: Typhi, Paratyphi A, B, C	Fiebre tifoidea y paratifoidea
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i>	Enteritis
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i>	Peste
	<i>Y. enterocolitica</i>	Enteritis
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Adenitis mesentérica
<i>Klebsiella</i>	<i>K. granulomatis</i>	Granuloma inguinal
	<i>K. rhinoscleromatis</i>	Rinoscleroma
	<i>K. ozenae</i>	Ocena
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Enteritis y procesos extraintestinales
Comensales		Infecciones oportunistas
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i>	
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>	
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>	
<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i>	
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i>	

1.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es la especie más abundante en el tubo digestivo del hombre y los animales de sangre caliente. Un aspecto interesante de *E. coli*, que constituye la especie paradigma de bacteria comensal, es que algunos representantes son capaces de producir enfermedad tanto intestinal (enteritis) como extraintestinal, fundamentalmente infección urinaria, bacteriemia e infección perinatal. Este hecho parece depender de la posesión de determinados factores de virulencia, algunos localizados en elementos genéticos móviles.

Entre los causantes de patología intestinal se han descrito seis categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* adherente difuso (DAEC). Las infecciones del tracto urinario son las infecciones extraintestinales por *E. coli* más comunes y son causadas por *E. coli* uropatógena (UPEC)⁶. A los patotipos de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales se les denominan ExPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*) y se caracterizan por presentar un conjunto de atributos particulares denominados factores de virulencia necesarios para causar infección, como son las adhesinas, cápsulas, quelantes de hierro, hemolisinas, toxinas o sideróforos⁷.

A lo largo de la evolución, *E. coli* ha divergido formando diferentes grupos filogenéticos o filogrupos con características propias cada uno de ellos⁴. Este hecho fue descubierto al analizar 72 aislados de *E. coli* de referencia (ECOR) mediante MLEE (*multi-locus enzyme electrophoresis*) en diversos estudios. En 1987, Selander *et al* analizaron 35 *loci* de cada uno de los aislados de referencia. Los resultados obtenidos definían seis grupos filogenéticos principales A, B1, B2, C, D y E. En un estudio posterior, realizado en 1990, se analizaron 38 *loci* y el resultado fue de cuatro grupos principales A, B1, B2 y D y algunas secuencias no clasificadas que pertenecían al grupo E. El árbol obtenido sugería que el grupo A, el cual incluía a *E. coli* K-12, fue de los primeros en divergir junto con los grupos B1 y B2. El grupo C, el cual se definía en el primer análisis, se consideró como un grupo divergente del grupo B⁸ (Figura 2).

En el año 2008, el grupo de Jauregui describió el grupo filogenético F después de estudiar la diversidad filogenética de 235 aislados de *E. coli* mediante el análisis de 8 porciones génicas por MLST (*multi-locus sequence typing*)⁹. Todos estos estudios permitieron realizar una sólida historia filogenética de *E. coli*, en la cual la primera división separó en una rama del árbol filogenético a las cepas del grupo B2 y F, y otra rama con el resto de los aislados. Tras una segunda división, emergió otra rama con cepas del grupo D, seguida del grupo E. Por último, los grupos A y B1 aparecían como hermanos. Se observó, además, la alta diversidad genética del grupo B2, lo cual se suponía que era debido a su temprana divergencia (Figura 3)^{9,10}. A pesar de que el grupo C no está incluido en esta historia filogenética, diversos estudios sitúan a este grupo próximo al grupo B1¹¹⁻¹³.

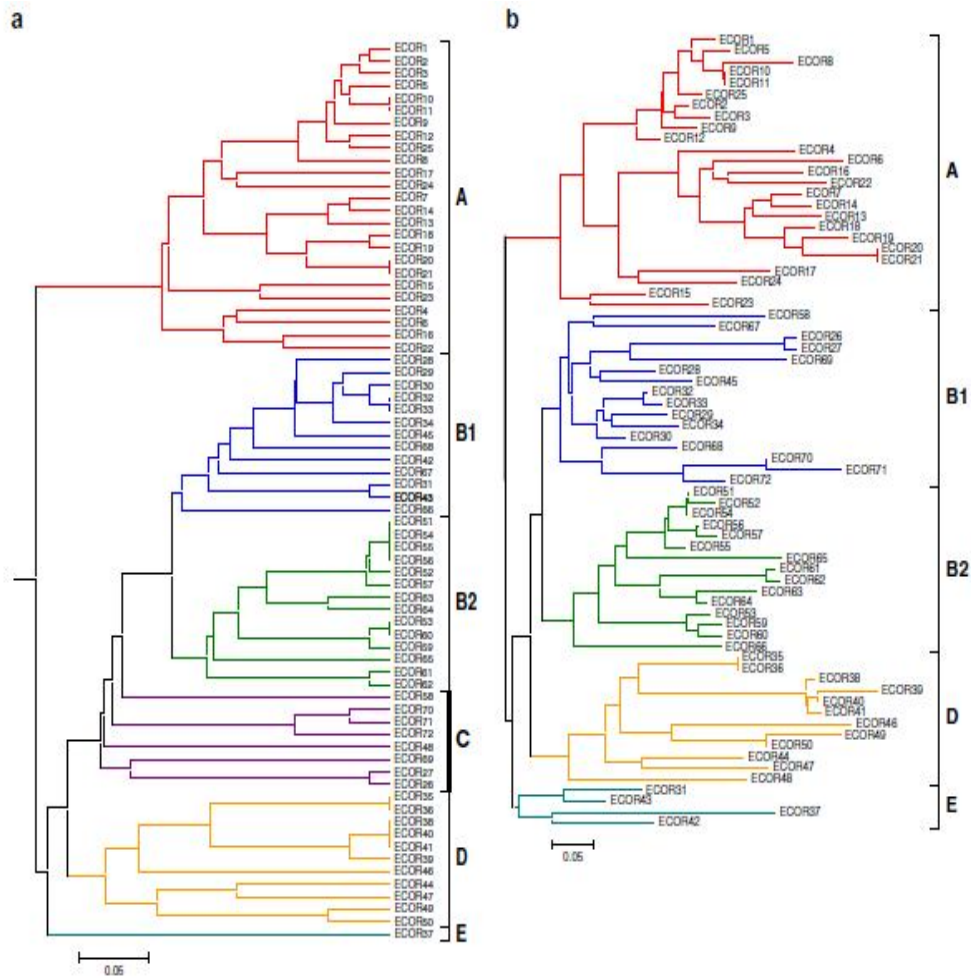


Figura 2. Relación filogenética de 72 aislados de la colección ECOR. A) Filogenia obtenida con el estudio de Selander *et al*¹⁴; B) filogenia obtenida con el estudio de Herzer *et al*¹⁵. Figura extraída de Chaudhuri *et al*⁶.

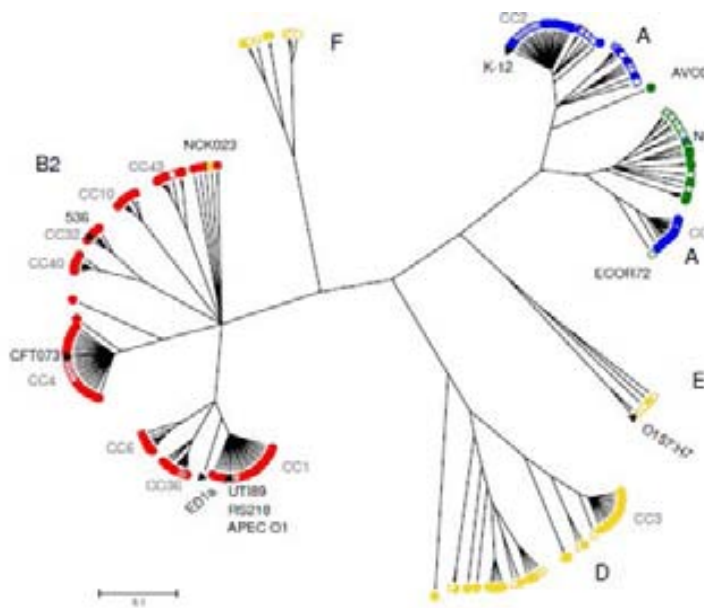


Figura 3. Diversidad filogenética de *E. coli*. Figura extraída de Jauregui *et al*⁶.

Las cepas de *E. coli* causantes de infecciones tanto urinarias como colecistitis, neumonía, meningitis y bacteriemia se han relacionado generalmente con el filogrupo B2 y, en menor medida, con el grupo D. Estas cepas presentan un mayor número de factores de virulencia, por lo que se relaciona a los grupos B2 y D con cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales. En cambio, es relativamente habitual, encontrarlas en el tubo digestivo junto con cepas de los grupos A y B1 sin que produzcan infecciones urinarias o extraintestinales. Este hecho sugiere la existencia de factores predisponentes además de los factores de virulencia. Aunque normalmente la infección está producida por cepas del grupo B2, se calcula que en un 20% de los casos está causada por cepas de otros filogrupos, las cuales podían encontrarse en mayor concentración o poseer algún factor necesario para la infección⁴.

1.2. LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Los antibióticos betalactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Tienen una acción bactericida lenta, presentan escasa toxicidad y un amplio margen terapéutico. El espectro de actividad ha ido aumentando a lo largo de los tiempos por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a bacilos gramnegativos, pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones^{16,17}.

1.2.1. Contexto histórico

El descubrimiento de la penicilina G en 1928 por Alexander Fleming, a partir de una cepa de *Penicillium notatum*, estableció los inicios de la era antibiótica¹⁸.

A pesar de que Fleming demostró la acción bactericida de esta sustancia frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, no fue hasta finales del año 1941 cuando la penicilina G fue usada por primera vez en el ámbito clínico, debido a la dificultad en la extracción de grandes cantidades de esta sustancia. En este proceso fueron partícipes Chain y Florey¹⁹, los cuales recibieron junto a Fleming el premio Nobel de Medicina en 1945 (Figura 4).

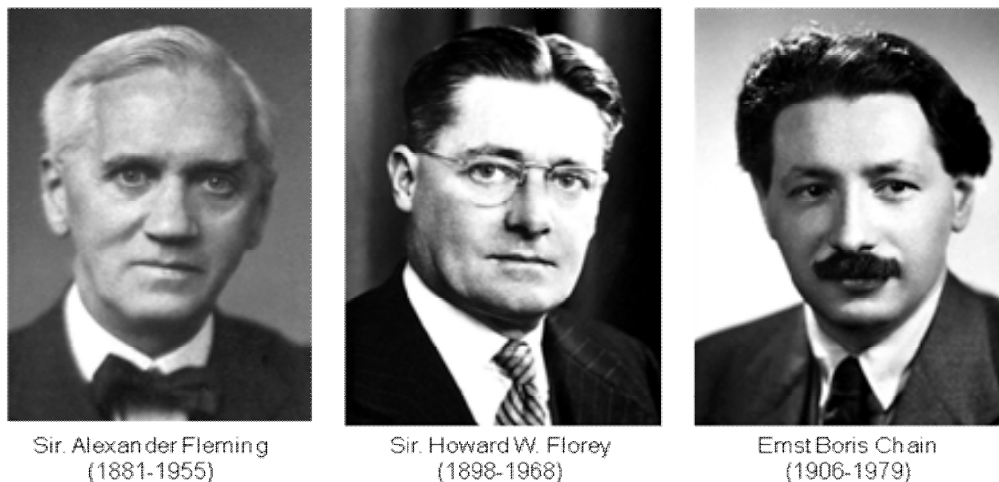


Figura 4. *Antibiotic hall of fame*, Nobel Museum. Figura extraída de Kong KF *et al*²⁰

A pesar que el descubrimiento de la penicilina fue toda una revolución a la hora de hacer frente a enfermedades infecciosas antes intratables, pocos años después empezaron a parecer las primeras resistencias. En 1940, Abraham y Chain detectaron la presencia de una enzima inactivante de la penicilina en una suspensión de *E. coli* (entonces llamada *Bacterium coli*)²¹ y, en 1944, Kirby describió la primera cepa de *S. aureus* resistente a penicilina G, debido a la producción de penicilinasas que la inactivaban²². Aunque inicialmente se trataba de casos puntuales y esporádicos, las tasas de resistencia en *S. aureus* comenzaron a aumentar a los pocos años, llegando a niveles de resistencia del 90-95% en todo el mundo^{23,24}.

Fruto de la aparición de los primeros casos de resistencia, surge la necesidad de buscar nuevas moléculas que fuesen activas frente a las penicilinasas estafilocócicas y con un mayor espectro de actividad, siendo capaces de actuar también frente a bacterias gramnegativas^{16,17,20}.

El trabajo realizado en el *Northen Regional Research Laboratory* (Illinois, EEUU) reveló que cepas en distintas condiciones de crecimiento podían producir diferentes formas de penicilina^{25,26}, lo que facilitaría la síntesis de nuevos compuestos. El núcleo betalactámico, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA, Figura 7) fue la clave en la síntesis y modificación de la penicilina²⁷ y dio paso al desarrollo de diferentes compuestos semisintéticos. Entre ellos, la meticilina, utilizada para uso clínico en los Estados Unidos en la década de 1960, fue la primera penicilina semisintética introducida que resistía la hidrólisis de las penicilinasas estafilocócicas²⁸. Otro grupo de penicilinas semisintéticas

que presentan un espectro ampliado frente a bacterias gramnegativas es el de las aminopenicilinas entre las que se encuentra la ampicilina y la amoxicilina. El desarrollo de derivados carboxi y ureido de la ampicilina condujo a la introducción de agentes con actividad frente a otras enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Entre ellas, se encuentran las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) y las ureidopenicilinas (piperacilina)²⁹.

Aunque la generación de compuestos semisintéticos se encontraba en un gran momento, se seguían explorando los recursos naturales. Abraham y Newton aislaron la cefalosporina C de una cepa de *Cephalosporium acremonium*³⁰. Este compuesto generó una nueva familia de antibióticos betalactámicos, ya que en vez de 6-APA, poseía un núcleo de ácido 7-aminocefalosporínico (7-ACA; Figura 7). Así, usando 7-ACA como precursor, se han sintetizado varias generaciones de cefalosporinas con un potente espectro de actividad.

La primera de utilidad clínica fue la cefalotina que presentaba un espectro de actividad similar a la ampicilina y formaba parte, junto con otras, de la primera generación de cefalosporinas (C1G). A principios de los años 70, aparecen las cefalosporinas de segunda generación (C2G)³¹, que constituyen un grupo heterogéneo con espectro de actividad variable y con mayor estabilidad frente a algunas betalactamasas de gramnegativos. Las cefamicinas, clásicamente incorporadas a las C2G presentan además actividad anaerobicida³². Años más tarde, entre finales de los 70 y principios de los 80, aparecen las cefalosporinas de tercera generación (C3G) con la cefotaxima como primer representante. Fue un notable avance en el campo de la terapia por la amplitud de su espectro, su gran actividad frente a la mayoría de bacilos gramnegativos, por su resistencia a las betalactamasas y sus mejores propiedades farmacocinéticas. Más tarde se incorporan las de cuarta generación (C4G) con cefepime como único representante³¹.

Aztreonam es el representante único de los monobactámicos, betalactámicos monocíclicos activos solo frente a bacterias gramnegativas aerobias y facultativas³³. Los inhibidores de betalactamasas son un grupo de betalactámicos sin actividad antimicrobiana pero que presentan gran afinidad por las betalactamasas a las que inhiben. Ácido clavulánico y tazobactam son los más utilizados³⁴.

Los carbapenémicos, son los betalactámicos con mayor espectro de acción incluyendo estreptococos, estafilococos, enterobacterias, pseudomonas y otros bacilos

gramnegativos aerobios y bacterias anaerobias. Son resistentes a la gran mayoría de betalactamasas³⁵.

Con la aparición de estos últimos compuestos se pensaba que se había conseguido la quimera del antibiótico ideal, dotado de amplísimo espectro de actividad y mejores propiedades farmacocinéticas. Este hecho hizo pensar falsamente que el tratamiento de las principales enfermedades infecciosas bacterianas había quedado resuelto. No obstante, la resistencia a los antimicrobianos comenzó a aparecer al poco tiempo de comercializarse estos compuestos. Hoy en día, el incremento de cepas resistentes y de los problemas clínicos causados por éstas se encuentra en continuo aumento^{16,17,20,24,36}.

En los últimos años se han desarrollado nuevos compuestos, entre los que encontramos las denominadas, por algunos autores, cefalosporinas de quinta generación (C5G) (ceftobiprole y ceftarolina)^{37,38}; y nuevos inhibidores de betalactamasas como el avibactam³⁸.

1.2.2. Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen un efecto autolítico.

La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano, la transpeptidación. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

El peptidoglucano está constituido por cadenas lineales de glucano, el cual está compuesto de unidades alternadas de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Cada unidad de MurNAc presenta unida la cadena lateral de un tetrapéptido constituido por L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y lisina o ácido diaminopimélico (DAP) formando una estructura en forma de malla (Figura 5)³⁹.

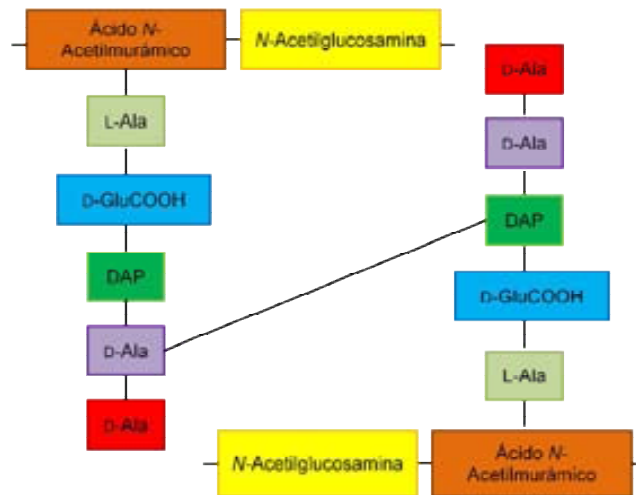


Figura 5. Estructura de una unidad repetitiva del peptidoglucano de la pared celular con el tetrapéptido. Figura adaptada de Kong *et al*²⁰. L-Ala: L-Alanina; D-GluCOOH: Ácido D-glutámico; DAP: Ácido L-diaminopimélico; D-Ala: D-Alanina.

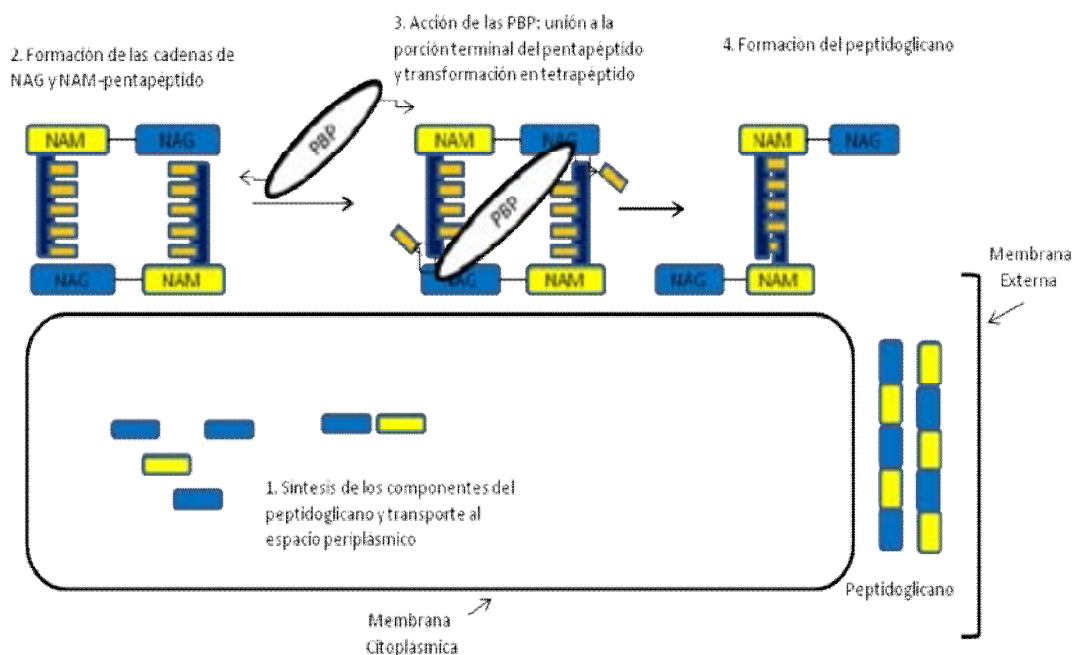


Figura 6. Etapas de formación de la pared celular en gramnegativos. Adaptada de Suárez C. *et al*⁴⁰. NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: N-acetilglucosamina; PBP: *Penicillin Binding Protein*.

La síntesis del peptidoglucano se puede dividir en tres etapas. En la primera y segunda etapa, los precursores del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados en forma de GlcNAc-MurNAC-pentapéptido a través de la membrana citoplasmática al espacio periplásmico (Figura 6). La tercera etapa de la síntesis de la pared bacteriana consiste en el ensamblaje y crecimiento del peptidoglucano. En la última etapa se produce la polimerización de diversas unidades disacáridas mediante una reacción de transglucosidación en la que, mediante transglucosidasas, se une el

GlcNAc-MurNAc-pentapéptido al peptidoglucano ya existente mediante enlaces β (1 \rightarrow 4) formando un polímero que es una cadena lineal del peptidoglucano sin entrecruzar. Este polímero (con el pentapéptido) reacciona, por transpeptidación, con un peptidoglucano aceptor. Esta reacción supone la formación de un enlace peptídico entre el grupo diamino del peptidoglucano aceptor y el grupo carboxil de la D-alanina subterminal del peptidoglucano naciente, liberándose la D-alanina terminal. Para llevar a cabo esta reacción es necesaria la acción de unas enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas. Las D-alanina de los péptidos no implicadas en los entrecruzamientos son eliminadas por enzimas denominadas D-D-carboxipeptidasas.

El anillo betalactámico posee una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) lo que permite su unión covalente a la transpeptidasa. El resultado es el debilitamiento de las uniones del peptidoglucano que torna la bacteria mucho más sensible a la lisis celular. Es por eso que estas enzimas también se llaman PBP (*penicillin binding protein* "proteína de unión a la penicilina"). También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas. Esta inhibición de la síntesis del peptidoglucano provoca, por tanto, una inhibición del crecimiento bacteriano, lo que se denomina efecto bacteriostático del antibiótico.

Los betalactámicos también actúan activando autolisinas endógenas bacterianas. Como consecuencia de la acumulación de precursores del peptidoglucano en el espacio periplásmico, se produce la pérdida de los ácidos lipoteicoicos (potentes inhibidores del sistema autolítico), activando las autolisinas que degradan el peptidoglucano provocando, finalmente, la lisis celular por entrada masiva de agua en la célula.

1.2.3. Estructura, clasificación y espectro de actividad

Los antibióticos betalactámicos reciben este nombre por la presencia de un anillo betalactámico en su estructura que define químicamente a esta familia y les confiere sus propiedades antimicrobianas.

La unión de este anillo a uno secundario origina los diferentes grupos dentro de la familia: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas, que condiciona su espectro de acción y sus propiedades

farmacocinéticas (Figura 7). Unida a cada una de estas estructuras básicas se encuentra una cadena lateral acíclica variable (grupo R). Estas diferentes cadenas laterales influyen en el grado de actividad, espectro y propiedades farmacológicas.

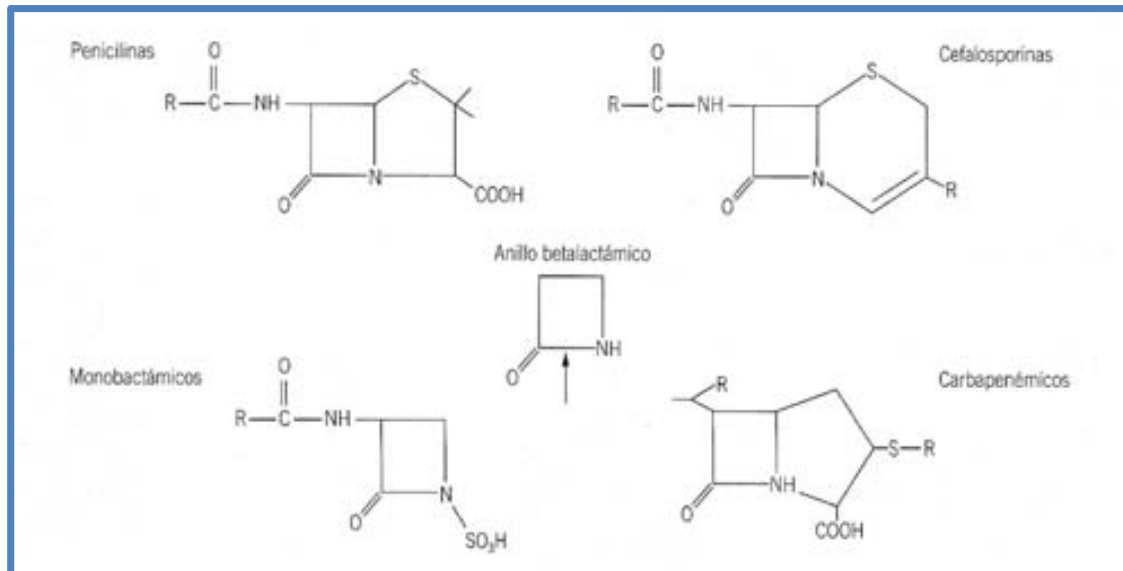


Figura 7. Estructura química de los antibióticos betalactámicos. Figura extraída de Microbiología y Parasitología Médicas, Prats G⁴. En el centro se muestra la estructura del anillo betalactámico común a todos los compuestos de la familia, indicando el lugar en el que actúan las betalactamasas; y el núcleo de cada grupo de betalactámicos: penicilinas (6-aminopenicilánico), cefalosporinas (ácido 7- α -cefalosporánico), monobactámicos (agentes monocíclicos) y carbapenémicos (ácido pirrolínico).

Penicilinas

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico unido a un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico (Figura 7). La sustitución del radical hidroxilo (-OH) del grupo carboxilo del 6-APA por un radical acilo (R) origina los diferentes tipos de penicilinas. Según su estructura química, las penicilinas se pueden clasificar en cinco grandes grupos: penicilinas naturales, aminopenicilinas, ureidopenicilinas, carboxipenicilinas e isoxacililpenicilinas (Tabla 2).

Cefalosporinas

Las cefalosporinas presentan un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazina. Derivan de la cefalosporina C producida por el hongo *Cephalosporium*

acremonium (*Acremonium chrysogenum*). La estructura base es un núcleo cefem, el ácido 7-amino-cefalosporánico (7-ACA), y las modificaciones en las cadenas laterales originan las diferentes cefalosporinas (Figura 7). Se clasifican en generaciones atendiendo al desarrollo histórico y al espectro de actividad (Tabla 2).

Las diferencias en el espectro de actividad y propiedades farmacológicas de los miembros de este grupo resultan de las sustituciones de las cadenas laterales situadas en las posiciones 3 y 7. La adición de un grupo metoxi en la posición 7 del anillo betalactámico da lugar a las cefamicinas.

Monobactámicos

Los monobactámicos son betalactámicos monocíclicos derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA) en el que el nitrógeno amídico se encuentra unido a un radical sulfónico que activa el núcleo (Figura 7). Su principal representante es el aztreonam producido por *Chromobacterium violaceum*. Su espectro de actividad se limita a las bacterias gramnegativas aerobias y facultativas.

Carbapenémicos

Los carbapenémicos presentan una sustitución del átomo de azufre por un átomo de carbono en el anillo tiazolidínico respecto a la estructura original de las penicilinas (Figura 7). El derivado más utilizado y estable es la *N*-formimidodienamicina, también conocido como imipenem. Otros carbapenémicos utilizados hoy en día en la práctica clínica son el meropenem, el ertapenem y el doripenem (Tabla 2). Son la clase de betalactámicos con el mayor espectro de actividad.

Inhibidores de las betalactamasas

Los más utilizados en clínica son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Tabla 2). En el ácido clavulánico, el átomo de azufre se sustituye por uno de oxígeno y en el sulbactam y tazobactam hay una oxidación del azufre en el anillo betalactámico; cada uno presenta un núcleo diferente. Estos compuestos poseen una baja actividad antibiótica, pero presentan muy buena capacidad inhibitoria de las betalactamasas de clase A, variable de las de clase D y son inactivos frente a las betalactamasas de clase C y las metaloenzimas de clase B. Estos inhibidores de las betalactamasas actúan

uniéndose irreversiblemente al grupo hidroxilo de la serina presente en el centro activo de la enzima, produciendo un acilado intermedio muy estable, inhibiendo de esta forma su actividad. Estos compuestos se administran conjuntamente con penicilinas con el fin de prevenir su inactivación por las betalactamasas.

En los últimos años, se han sintetizado nuevos inhibidores de betalactamasas, como el avibactam, pero en este caso no presenta una estructura betalactámica^{38,41}

Tabla 2. Principales antibióticos betalactámicos.

Clase	Grupo	Antibiótico
Penicilinas	Penicilinas naturales	Penicilina G, Penicilina V
	Aminopenicilinas	Ampicilina, Amoxicilina
	Ureidopenicilinas	Azlocilina, Mezlocilina, Piperacilina
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina, Ticarcilina
	Isoxazolilpenicilinas	Oxacilina, Cloxacilina,
Cefalosporinas	Cefalosporinas 1 ^a generación	Cefazolina, Cefalotina, Cefradina, Cefalexina, Cefadroxilo
	Cefalosporinas 2 ^a generación	Cefamandol, Cefuroxima, Cefaclor, Cefonicid
	Cefalosporinas 3 ^a generación	Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefixima, Cefoperazona
	Cefalosporinas 4 ^a generación	Cefepime, Cefpiroma
	Cefalosporinas 5 ^a generación	Ceftobiprole, Ceftarolina
	Cefamicinas	<ul style="list-style-type: none"> • Cefoxitina, Cefmetazol, Cefotetán
Monobactámicos		Aztreonam
Carbapenémicos		Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem
Inhibidores de betalactamasas		Ácido clavulánico, Sulbactam, Tazobactam, Avibactam ^a

^aNuevo inhibidor de betalactamasas no betalactámico.

1.3. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Desde su introducción en la práctica clínica en la década de 1940, el uso de antibióticos ha estado continuamente ligado a la aparición progresiva de microorganismos resistentes^{20,42}. La resistencia a los antibióticos puede ser natural o adquirida.

La resistencia natural o intrínseca es característica de cada especie, género o grupo bacteriano, por lo que se trata de una resistencia predecible (por ejemplo, la resistencia a glucopéptidos en enterobacterias o la resistencia a aminoglucósidos en bacterias anaerobias). Estos mecanismos dependen de funciones codificadas en el cromosoma bacteriano.

La resistencia es adquirida cuando en una especie que es naturalmente sensible a un antibiótico aparecen cepas resistentes a ese mismo antibiótico. La adquisición de resistencia puede originarse en el propio microorganismo mediante mutaciones en genes cromosómicos, o por la adquisición de material genético exógeno en forma de elementos genéticos móviles que son portadores de genes de resistencia.

1.3.1. Resistencia adquirida

La resistencia adquirida se puede originar por mutaciones de los genes bacterianos debido a errores en la replicación del propio microorganismo, o a la adquisición de genes de resistencia. En general, la adquisición de genes de resistencia se produce mediante los procesos de transformación (por incorporación de DNA exógeno), transducción (mediados por bacteriófagos) o conjugación (por plásmidos y transposones conjugativos) (Figura 8)⁴³. El intercambio de material genético por cualquiera de estos mecanismos mencionados se denomina transferencia horizontal, y cuando se transfiriere a sus células hijas se habla de difusión vertical.

La transferencia horizontal de genes entre bacterias contribuye a la variabilidad genética y a la evolución bacteriana, permitiendo adaptarse a las variaciones del medio.

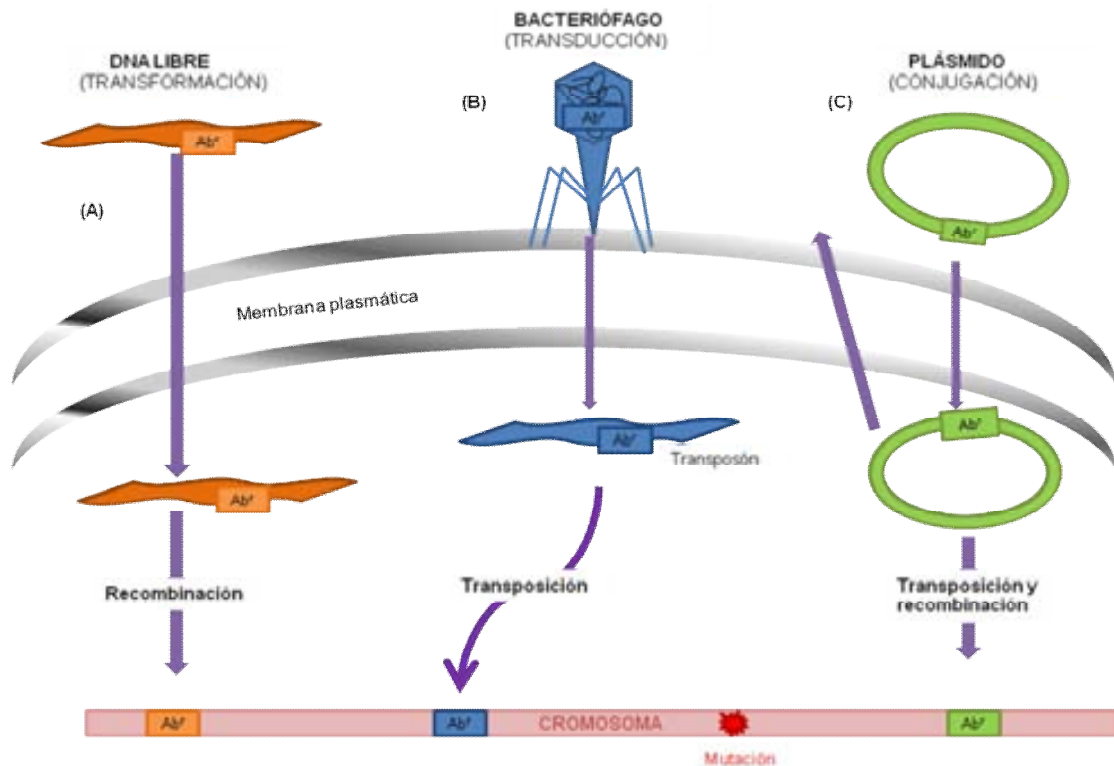


Figura 8. Mecanismos de adquisición de genes resistencia a antibióticos, (A) Transformación por la incorporación de DNA libre; (B) transducción por bacteriófagos; (C) conjugación mediada por plásmidos. Figura adaptada del trabajo de Alekshum *et al*⁴³.

1.3.1.1. Transformación

Fue descubierto por F. Griffith en 1928⁴⁴ y consiste en la captación de DNA libre presente en el ambiente y su posterior integración en el genoma bacteriano (Figura 8A)⁴⁵.

Para que una bacteria sea capaz de captar el DNA foráneo se ha de encontrar en estado de competencia. Esta competencia puede darse de forma natural (competencia fisiológica) en muchos microorganismos como *Streptococcus*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, o inducirse artificialmente en el laboratorio (competencia artificial) por diferentes mecanismos como la electroporación o tratamientos con frío y cloruro cálcico. Estos tratamientos modifican la permeabilidad de la membrana permitiendo la entrada de DNA libre. El proceso de transformación natural es diferente en gramnegativos y grampositivos pero en ambos casos se requiere la presencia de receptores localizados en la superficie celular capaces de reconocer y unirse al DNA de cadena doble libre⁴⁶. Este DNA será internalizado y protegido para evitar su degradación. Una vez en el interior se dirigirá al cromosoma bacteriano o a algún plásmido y se integrará por un proceso de recombinación homóloga.

Si no existe un elevado grado de homología entre el fragmento de DNA a integrar y el cromosoma bacteriano, la recombinación no tendrá lugar y el DNA incorporado será degradado.

1.3.1.2. Transducción

Es el proceso mediante el cual el DNA se transfiere desde una bacteria a otra por medio de un bacteriófago (Figura 8B). Este fenómeno se conoce desde 1951 gracias a los experimentos realizados por Zinder y Lederberg donde observaron que los fagos actuaban como vectores de transferencia de material genético en cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium⁴⁷.

Los fagos que actúan como mediadores de la transducción se denominan fagos defectivos. Se originan cuando el fago infecta a una cepa donadora y fruto de un error en su replicación incorpora DNA bacteriano en su nucleocápside. Esta partícula vírica defectuosa transfiere el material genético a otra bacteria que actúa como receptora. Si hay regiones homólogas, este DNA transductor puede ser incorporado al genoma de la célula receptora. En función de si el fago defectivo incorpora DNA bacteriano de un fragmento cualquiera del genoma o si el DNA bacteriano proviene de una región específica, la transducción se considera generalizada o especializada, respectivamente. La transducción generalizada puede producirse por un gran número de fagos, en cambio, la transducción especializada está limitada a fagos lisogénicos o integrativos.

1.3.1.3. Conjugación

Es el principal mecanismo de diseminación por transferencia horizontal, mediante el cual el intercambio de material genético entre la cepa donadora y la receptora implica necesariamente un contacto físico entre ambas células (Figura 8C). Este fenómeno fue observado por primera vez en 1946 por Lederberg y Tatum, que lo describieron originalmente como una forma arcaica de reproducción sexual entre bacterias⁴⁸.

La conjugación es un proceso que utilizan los plásmidos y los transposones conjugativos para su movilización, con la finalidad de perpetuarse y diseminarse entre la población bacteriana⁴⁹.

El mecanismo conjugativo se basa en la confluencia de dos procesos diferentes, un sistema de transporte de macromoléculas y un sistema de movilización del DNA plasmídico⁵⁰. Los genes encargados de formar la maquinaria de transporte se engloban en la región Mpf (*Mating pair formation*) mientras que la región que codifica los genes implicados en la movilización del DNA se denomina Dtr (*DNA transfer replication*). El sistema Mpf pertenece a la familia de los sistemas de secreción de tipo IV y es el encargado de formar el canal por donde se movilizará el DNA plasmídico hacia la célula receptora.

El contacto entre la cepa donadora y la receptora se consigue por contracción o desacoplamiento del *pilus* sexual. Este contacto, inicialmente inestable, es detectado por unas proteínas sintetizadas en la región *tra* (región de transferencia), que originan cambios que inician la transferencia del DNA plasmídico de una célula a la otra. La proteína TraM, actúa como una proteína señalizadora activando las proteínas TraN y TraG, encargadas de estabilizar y mantener unidas las dos células. La proteína TraM, junto con otras proteínas, produce poros en las paredes del donante como resultado del contacto de los dos citoplasmas. Posteriormente, la relaxasa, que es uno de los principales componentes del relaxoma (complejo formado por DNA y proteínas), reconocerá el *oriT* (origen de transferencia) del plásmido y realizará un corte, de manera que una de las cadenas se romperá, quedando la relaxasa unida covalentemente al extremo 5' de la cadena. Se produce un desenrollamiento de la cadena rota, por acción de las helicasas. A partir del extremo 3' -OH libre se iniciará la replicación por círculo rodante. La relaxasa, unida covalentemente al DNA, se pondrá en contacto con el Mpf por medio de la proteína acopladora (T4CP) que actúa como una bomba, inyectando la relaxasa, unida al DNA de cadena simple hasta la célula receptora. Una vez se haya finalizado la copia de la cadena simple y el traspaso, la relaxasa ligará los dos extremos para circularizar el plásmido⁵¹.

1.3.2. Elementos genéticos móviles

La transferencia horizontal permite el intercambio de genes entre diferentes bacterias. Estos genes se transfieren insertados en elementos genéticos móviles como las secuencias de inserción, transposones, integrones, elementos conjugativos integrativos y plásmidos.

1.3.2.1. Secuencias de inserción y transposones

Las secuencias de inserción (IS) son los elementos genéticos móviles más simples. Se encuentran en cromosomas bacterianos y en plásmidos. Las IS se caracterizan por presentar pequeñas repeticiones terminales invertidas en sus extremos. En su interior se localiza el gen que codifica una enzima denominada transposasa y que es requerida para la movilidad del elemento. Cuando estos elementos contienen genes accesorios que no están involucrados en la translocación del elemento se denominan transposones⁵².

Un transposón simple es más largo que una secuencia de inserción ya que contienen genes accesorios, que normalmente codifican resistencia a algún antibiótico, y la transposasa (*tnpA*)⁵². Un transposón complejo está construido por un par de secuencias de inserción, normalmente inversas, entre las cuales hay una secuencia de DNA cuya expresión puede alterar el fenotipo de la célula (Figura 9).

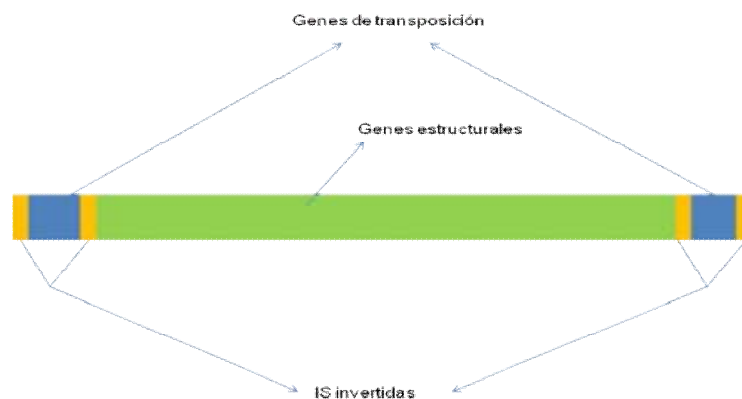


Figura 9. Diagrama de un transposón complejo, formado por un fragmento de DNA que puede codificar resistencia a algún antibiótico, flanqueado de las IS y la transposasa que permiten su translocación.

1.3.2.2. Integrones y casetes génicos

Los integrones bacterianos son sistemas de captura de genes que utilizan un sitio específico de recombinación (Figura 10).

Los integrones constan de un sistema de recombinación especializado que consiste en un gen *intl*, que codifica la enzima de recombinación denominada integrasa, y el sitio de recombinación denominado *attI* donde se pueden incorporar diferentes genes denominados casetes génicos. Estos casetes génicos están formados por un único gen y el sitio de recombinación *attC* que recombinará con *attI* quedando de esta forma incorporado el casete génico al integrón. Los integrones se caracterizan por ser capaces

de captar estos casetes génicos los cuales codifican determinantes de resistencia a antibióticos y con otras funciones (toxinas, lipoproteínas, enzimas modificantes). En los integrones, los casetes génicos son los que constituyen el elemento móvil de la estructura⁴. En el proceso de desplazamiento de un integrón a otro, o de un sitio a otro en el mismo integrón, el casete génico aparece como una pequeña molécula de DNA circular de doble cadena no replicativa, lo que sería un estado intermedio⁵³.

La forma más simple de un integrón presenta una estructura compuesta por dos regiones no variables terminales, denominadas secuencias constantes (CS) y una sección central altamente variable. En el extremo 5' se localiza *intI*, el lugar de inserción del cassette (*attI*), y el promotor (P_{ant}) para la expresión de los genes integrados (Figura 10).

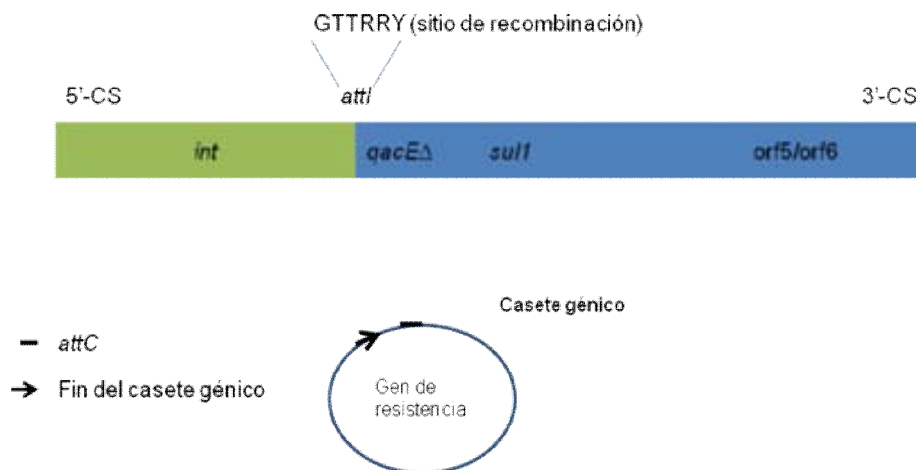


Figura 10. Esquema representativo de los elementos de un integrón. En el extremo 5' se localizan los genes estructurales del integrón (*intI*, *attI* y P_{ant}). En el extremo 3' pueden contener genes de resistencia como el gen *qacEDI* que confiere resistencia a componentes como amonio cuaternario y el gen *sulI* que confiere resistencia a sulfonamidas. Adaptada de Bennet *et al*⁵³.

1.3.2.3. Elementos conjugativos integrativos (ICE)

Los elementos conjugativos integrativos (ICE), también llamados transposones conjugativos, se caracterizan por contener un origen de transferencia y los genes requeridos para formar el aparato de conjugación, presentando así, la capacidad de transponerse de un lugar a otro del genoma bacteriano y autotransferirse de una forma similar a la que veremos en los plásmidos. Estos elementos no presentan un origen de replicación, es decir, no disponen de una replicación autónoma para mantenerse, de forma que su supervivencia y diseminación se deben al hecho de encontrarse integrados en el replicón de un plásmido o cromosoma bacteriano.

Los elementos conjugativos integrativos son un grupo altamente heterogéneo de elementos genéticos con diferentes propiedades y rangos de hospedadores. Es común que estos elementos contengan genes que codifican resistencia a antibióticos. Estos genes se encuentran localizados en regiones variables denominadas puntos calientes o *hotspots*, que son regiones altamente recombinativas que permiten la captura de estos genes adicionales.

Hay también, elementos integrativos que no contienen la región de conjugación pero que pueden mobilizarse mediante ICEs conjugativos co-residentes o mediante plásmidos conjugativos^{52,54,55}.

1.3.2.4. Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos de DNA que contienen su propio origen de replicación (Figura 11). Se han encontrado en casi todos los géneros bacterianos y el más simple de estos elementos contiene un origen de replicación y genes que codifican funciones replicativas⁵⁶. Generalmente, los plásmidos también contienen un origen de transferencia y genes que codifican estructuras que constituyen el aparato de conjugación y que les permiten transferirse a los nuevos hospedadores mediante la conjugación⁵². Estos plásmidos que presentan los genes de conjugación son los llamados plásmidos conjugativos. En cambio, si solamente presentan un origen de transferencia (*oriT*) pero no genes de conjugación se denominan movilizables ya que pueden hacer uso de las funciones de conjugación de los plásmidos conjugativos para transferirse a un nuevo hospedador⁵².

Los plásmidos codifican básicamente tres grupos de genes. El primero incluye los genes implicados en su replicación y en su mantenimiento en la célula hospedadora, estos genes se localizan en una misma región conocida como replicón. Esta región contiene un origen de replicación (*oriV*), los genes *cop/inc* encargados del control del número de copias, y una proteína Rep necesaria para el control de la replicación⁵⁷. El segundo grupo está compuesto por los genes que codifican caracteres fenotípicos como factores de virulencia o enzimas que confieren resistencia a algún antibiótico. El tercer grupo está formado por los genes que codifican las estructuras para realizar la conjugación⁴. Tanto los plásmidos movilizables como los conjugativos presentan la región *mob* que codifica la relaxasa. Esta enzima es la encargada de reconocer el *oriT* en el

proceso de conjugación, la cual hace un corte y se queda unida de forma covalente, transportando el plásmido a la célula hospedadora mediante un sistema de secreción de tipo IV (T4SS)⁵⁸.

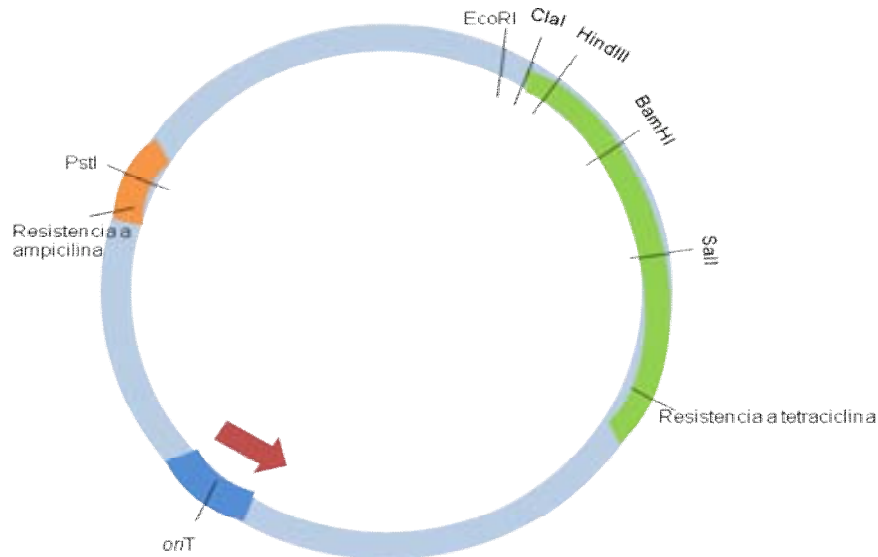


Figura 11. Diagrama de un plásmido con su origen de replicación (*oriT*), genes de resistencia (ampicilina y tetraciclina) y diferentes dianas para enzimas de restricción (PstI, EcoRI, ClaI, HindIII, BamHI, Sall).

Si en un plásmido conjugativo o movilizable hay un gen de resistencia, entonces éste tendrá el potencial para transferirse a nuevos hospedadores. Algunos plásmidos presentan un amplio rango de hospedadores y pueden transferirse entre diferentes especies⁵⁹. Hay también plásmidos que tienen la capacidad de transferirse a un hospedador en particular pero no pueden replicarse en el nuevo hospedador o no se replican bien. En estas circunstancias, el plásmido se podría perder, mientras que si contiene un gen de resistencia en un transposón este elemento genético puede translocarse al cromosoma bacteriano y mantenerse en ausencia del plásmido⁵².

La gran variabilidad de los plásmidos existentes ha hecho que los intentos por clasificarlos se haya convertido en todo un reto, ya que la capacidad de agruparlos en grupos homogéneos en base a sus relaciones filogenéticas permite analizar su distribución y su relación con las células hospedadoras. En 1971, Hedges y Datta propusieron una clasificación plasmídica basada en la estabilidad de los plásmidos durante la conjugación, fenómeno llamado incompatibilidad plasmídica que se refiere a la incapacidad de ciertos plásmidos de convivir en la misma célula hospedadora. Así, los plásmidos que muestran una incompatibilidad mutua se engloban en un mismo grupo de incompatibilidad (Inc)⁶⁰. Hoy en día se conocen 27 grupos Inc en *Enterobacteriaceae*. En

1988, Couturier *et al* propusieron un esquema de tipaje plasmídico basado en la técnica de *Southern Blot* usando replicones clonados como sondas, pero la baja especificidad de la hibridación junto con la gran diversidad plasmídica producía cruces de hibridaciones entre grupos Inc relacionados. Posteriormente, en 2005, Carattoli describe una técnica basada en la PCR denominada PBRT (*PCR-based replicon typing*), que es la más utilizada hoy en día para la clasificación de plásmidos. Esta técnica permite la detección de la mayoría de las familias plasmídicas aisladas en enterobacterias (HI1, HI2, I1/I γ , X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FII α , K, B/O, F, ColE, R y U)⁶⁰.

En 2009, Garcillán-Barcia *et al* propusieron una nueva clasificación plasmídica basada en la tipificación de la región *mob*, que como se explicó anteriormente, codifica la relaxasa. Según las características genéticas y las propiedades de las relaxasas, se puede realizar una clasificación plasmídica en seis familias (MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P y MOB _{γ}). Esta clasificación engloba una mayor diversidad plasmídica, permitiendo, además de la clasificación de los plásmidos característicos de enterobacterias, la de otras bacterias (como proteobacterias, actinobacterias, cianobacterias, firmicutes....), así como de otros elementos genéticos móviles como los ICE con relaxasas⁵⁸.

1.3.3. Mecanismos de resistencia a los betalactámicos

Los mecanismos implicados en la resistencia a los betalactámicos incluyen la alteración de la permeabilidad, la modificación de la diana, la expresión de bombas de expulsión activa y la producción de betalactamasas (Figura 12).

1.3.3.1. Alteración de la permeabilidad celular

Los canales proteicos o porinas son necesarios para la penetración de los antibióticos betalactámicos a través de la membrana externa. La disminución en el número de porinas o su modificación estructural provoca la disminución en la penetración de los betalactámicos al espacio periplásmico, lugar donde se encuentra presente su diana.

1.3.3.2. Modificación de la diana

Los betalactámicos se tienen que unir a las PBP para ejercer su efecto bactericida. Cambios en las PBP, generalmente mutaciones, recombinaciones o la adquisición de

nuevas PBP, pueden dificultar la unión del betalactámico y por tanto disminuir su actividad. Este mecanismo de resistencia se da principalmente en bacterias grampositivas. También puede producirse en algunos gramnegativos como *Haemophilus influenzae* o neisserias.

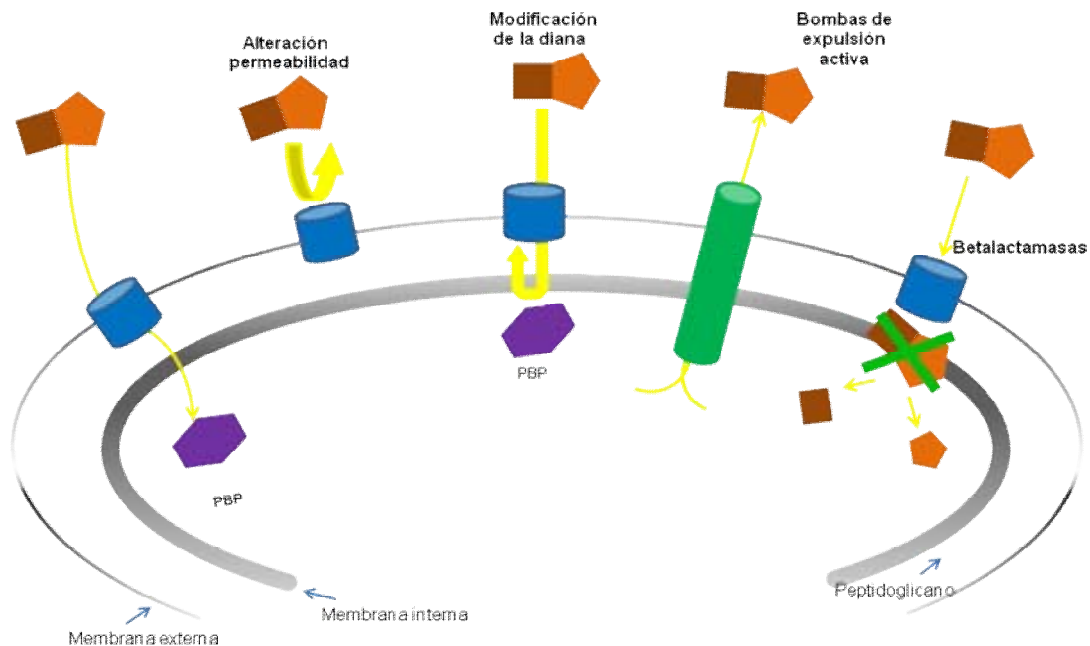


Figura 12. Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos: Alteración de la permeabilidad de la membrana bacteriana, modificación de la diana de los betalactámicos (PBP), expresión de bombas de expulsión activa y producción de enzimas inactivantes (betalactamasas).

1.3.3.3. Bombas de expulsión activa

Los sistemas de expulsión activa son proteínas de transporte encargadas de bombear las sustancias tóxicas hacia el exterior. La activación de estos sistemas implica la eliminación del antibiótico hacia el exterior del microorganismo. En la actualidad se conocen cinco familias de bombas de expulsión activa, que difieren en la manera de obtener la energía para desarrollar su actividad, en su organización estructural y en los sustratos que son capaces de eliminar. Estas cinco familias incluyen la MFS (*major facilitator superfamily*), la ABC (*ATP-binding cassette*), la RDN (*resistance/nodulation/division*), la SMR (*small multidrug resistance*) y la MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*). Estas bombas de expulsión de antibióticos utilizan la

energía de la fuerza motriz protónica para expulsar al antibiótico, excepto las de la familia ABC que utilizan la energía generada por la hidrólisis de ATP⁶¹.

Estas bombas se han encontrado tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. Al igual que las alteraciones de la permeabilidad, las bombas de expulsión activa no suelen causar un alto grado de resistencia por si mismas, aunque pueden actuar de forma sinérgica con otros mecanismos de resistencia.

1.3.3.4. Producción de enzimas inactivantes

El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos, sobre todo en bacterias gramnegativas, es la producción de betalactamasas. Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico dando lugar a un derivado inactivo incapaz de unirse a las PBP. La cantidad y naturaleza de la enzima producida influye en el fenotipo de resistencia observado.

1.4. LAS BETALACTAMASAS

El mecanismo mayoritario de resistencia a los betalactámicos en bacilos gramnegativos es la producción de betalactamasas, enzimas que inactivan a éstos mediante la hidrólisis del anillo betalactámico²¹. Algunas betalactamasas utilizan iones de zinc para romper el anillo betalactámico pero la gran mayoría actúa mediante la acción de la serina. La enzima se une al antibiótico mediante un enlace no covalente reversible; posteriormente, se produce una acilación entre el grupo éster del anillo betalactámico y el grupo hidroxilo libre del residuo de serina del centro activo de la enzima. Finalmente, la hidrólisis del éster libera la enzima activa y el antibiótico inactivado. Este mecanismo tiene lugar en betalactamasas de clase A, C y D que presentan serina en el centro activo; mientras que las enzimas de clase B utilizan iones zinc para actuar sobre el anillo betalactámico (Figura 13)⁶².

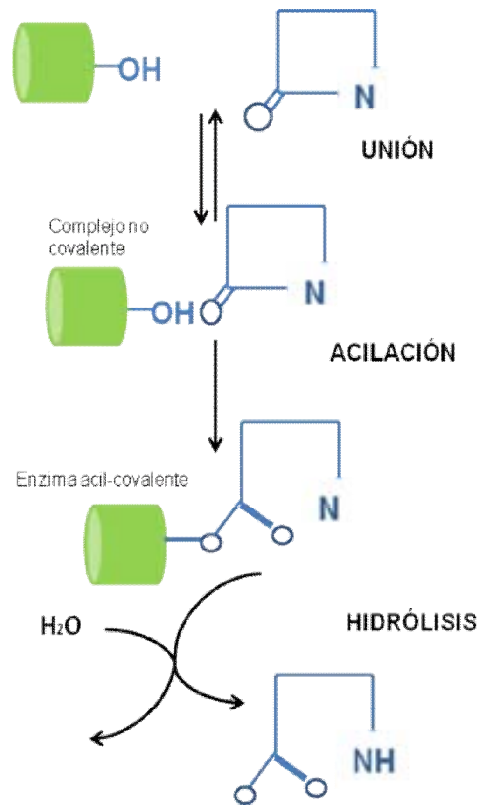


Figura 13. Mecanismo de acción de las betalactamasas. Adaptada de Livermore⁶².

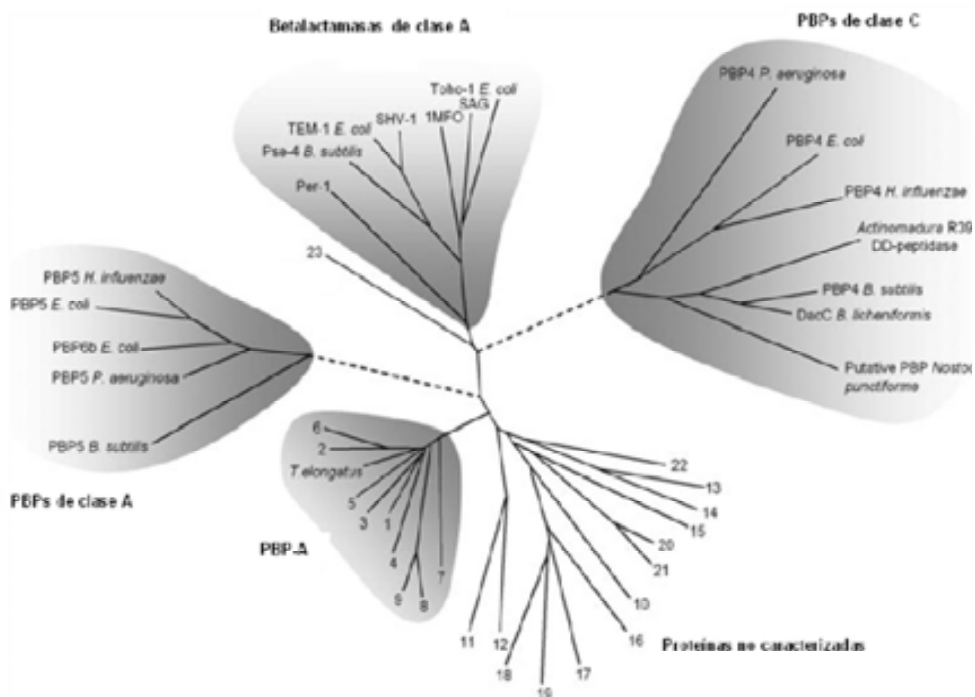


Figura 14. Árbol filogenético que representa las relaciones evolutivas entre algunas PBP y diversas betalactamasas de clase A. Adaptado de Urbach *et al*⁶³.

Basado en el análisis de secuencia, se cree que las betalactamasas y las PBP pueden haber derivado de un ancestro común que evolucionó de forma divergente. Ambas presentan estructuras similares pero las betalactamasas han adquirido un mecanismo catalítico más eficiente en la reacción de deacilación que el que presentan las PBP (Figura 14)^{20,63}.

1.4.1. Clasificación de las betalactamasas

A lo largo de los años se han propuesto diferentes clasificaciones de las betalactamasas, siendo las más utilizadas las siguientes:

- 1) Clasificación de Ambler. Se basa en la secuencia aminoacídica y divide las betalactamasas en cuatro clases (A-D). Las clases A, C y D actúan mediante el mecanismo basado en la serina, mientras que las de la clase B necesitan zinc para su acción.
- 2) Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Se basa en características funcionales que incluyen el perfil de sustrato de hidrólisis y el patrón de inhibición y clasifican las betalactamasas en tres grupos (Tabla 3)⁶⁴.

Ambas clasificaciones están correlacionadas.

- **Grupo 1, cefalosporinas.** Incluye las cefalosporinas que pertenecen a la clase molecular C de codificación cromosómica en enterobacterias y en otros microorganismos. Son más activas frente a cefalosporinas que a benzilpenicilina, no son inhibidas por ácido clavulánico y son activas frente a cefamicinas. En muchos microorganismos, incluyendo *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*, la expresión de AmpC es baja pero inducible en presencia de ciertos antibióticos betalactámicos. En otros, incluyendo *Acinetobacter baumannii* y *E. coli* no es inducible debido a la falta de uno o más componentes del sistema de inducción. También se incluyen en este grupo, las betalactamasas adquiridas CMY, ACT, DHA, FOX y MIR.

Subgrupo 1e. Incluye variantes con mayor actividad contra ceftazidima y otras oximinocefalosporinas como resultado de mutaciones en el gen *ampC*. Se conocen como betalactamasas AmpC de amplio espectro (ESAC) e incluyen GC1 de *E. cloacae*, las plasmídicas CMY-10, CMY-19, CMY-37 y otras.

Tabla 3. Clasificación de las betalactamasas. Tabla extraída de Bush & Jacoby⁶⁴.

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Clase molecular (subclases)	Sustrato(s)	Inhibida por		Característica(s)	Enzima representativa
				CA/TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de benzilpenicilina, hidroliza cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis de CAZ aumentada y a menudo de otros oximino-betalactámicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de benzilpenicilina que de cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, C1G,C2G	Si	No	Similar hidrólisis de benzilpenicilina y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2bc	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	Si	No	Hidrólisis incrementadas de oximinobetalactámicos	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	No	No	Hidrólisis incrementada de oximinobetalactámicos y resistencia a inhibidores	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Si	No	Hidrólisis incrementada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenilina, cefepime	Si	No	Hidrólisis incrementada de carbenicilina y cefepime	RGT-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis incrementada de cloxacilina u oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplio espectro	Variable	No	Hidrólisis incrementada de cloxacilina u oxacilina y oximino-betalactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenémicos	Variable	No	Hidrólisis incrementada de cloxacilina u oxacilina y carbapenémicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de amplio espectro	Si	No	Hidroliza cefalosporinas, inhibida por CA pero no por AZT	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	Hidrólisis incrementada de carbapenémicos, oximino-betalactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1)	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro incluyendo carbapenémicos pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B(B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B(B2)	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis preferencial de carbapenémicos	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconocido					

- **Grupo 2, serina betalactamasas.** Incluye las clases moleculares A y D.

Subgrupo 2a, penicilinasas. Presentan un espectro de actividad hidrolítica relativamente limitado con capacidad para hidrolizar la penicilina G pero no las penicilinas semisintéticas antiestafilocócicas (cloxacilina, dicloxacilina). Son inhibidas por ácido clavulánico. Predominan en bacterias grampositivas y pueden ser de codificación cromosómica (*Bacillus*, *Clostridium butyricum*, *C. clostridioforme*) o plasmídica (*S. aureus*).

Subgrupo 2b. Incluye la mayoría de betalactamasas de amplio espectro capaces de hidrolizar las penicilinas y, si la expresión es elevada, pueden conferir resistencia a cefalosporinas de primera generación. Son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. Incluye las enzimas TEM-1 y TEM-2 y SHV -1, entre otras.

Subgrupo 2be. Comprende las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Presentan un amplio espectro de actividad hidrolítica frente a penicilinas y cefalosporinas, así como aztreonam. Son inhibidas por tazobactam y ácido clavulánico. Incluidas en este grupo están las BLEE SHV, TEM, CTX-M y otras menos comunes como PER, VEB, BEL, BES, SFO y TLA.

Subgrupo 2br. Betalactamasas de amplio espectro que son resistentes a ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. En este grupo se encuentran las IRT (*inhibitor resistant TEM-type*) y algunas SHV como la SHV-10.

Subgrupo 2ber. Incluye enzimas de tipo TEM que combinan un espectro extendido (BLEE) con una relativa resistencia a la inhibición por ácido clavulánico. Se conocen como CMT (*Complex mutant TEM*) y entre ellas se incluye la TEM-50 (CMT-1).

Subgrupo 2c. Incluye las carbenicilinasas CARB o PSE que hidrolizan preferentemente carbenicilina y ticarcilina. Son generalmente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam.

Subgrupo 2ce. Incluye la carbenicilinasa de espectro extendido RTG-4 (CARB-10), que presenta actividad además contra cefepime.

Subgrupo 2d. Incluye las betalactamasas con capacidad para hidrolizar oxacilina. Su perfil de hidrólisis es similar al de las betalactamasas de amplio espectro pero son más resistentes a la acción del ácido clavulánico. Incluye las betalactamasas de la familia OXA.

Subgrupo 2de. Incluye enzimas capaces de hidrolizar oxacilina con un espectro ampliado a oximinobetalactámicos pero no carbapenémicos, adquiriendo el

fenotipo de BLEE. Son enzimas derivadas de OXA-10, y también se incluye OXA-11 y OXA-15.

Subgrupo 2df. Incluye betalactamasas de la familia OXA con actividad frente a carbapenémicos. En este grupo se incluye la OXA-48.

Subgrupo 2e. Presentan actividad frente a cefalosporinas de amplio espectro y son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam. Incluye las cefalosporinasas cromosómicas propias de especies como *P. vulgaris*, *C. koseri* y *C. sedlakii*.

Subgrupo 2f. Son serincarbapenemasas de la clase molecular A. Presentan capacidad de hidrolizar carbapenémicos y son parcialmente inhibidas por ácido clavulánico. Incluye las carbapenemasas SME, IMI, GES, KPC y NMC.

- **Grupo 3, metalobetalactamasas (MBL).** Pertenecen a la clase B de Ambler y necesitan para su acción enzimática cationes divalentes, principalmente zinc. Su perfil de hidrólisis incluye todos los betalactámicos excepto el aztreonam. Son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA o el ácido dipicolínico. Las MBL fueron identificadas originalmente como enzimas cromosómicas en grampositivos y ocasionalmente en bacilos gramnegativos, tales como *Bacteroides fragilis* o *Stenotrophomonas maltophilia*.

Subgrupo 3a. Incluye MBL mediadas por plásmidos, tales como IMP y VIM.

Subgrupo 3b. Contiene un pequeño grupo de MLB que, preferentemente, hidrolizan carbapenémicos frente a penicilinas y cefalosporinas. Incluye las MBL cromosómicas de *Aeromonas* spp.

1.4.2. Betalactamasas naturales en enterobacterias

Todas las enterobacterias de interés clínico, con excepción de *S. enterica* y *P. mirabilis*, presentan una betalactamasa natural y propia de cada especie^{62,65} (Tabla 4):

- **Betalactamasas de clase C.** Son las más abundantes dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y se pueden expresar tanto a nivel constitutivo como inducible.

- **Expresión constitutiva (*E. coli*, *Shigella* spp.).**

La presencia de un promotor débil y un atenuador de la transcripción hace que el gen que codifica la betalactamasa AmpC se exprese a niveles basales muy bajos, siendo estas cepas sensibles a todos los antibióticos betalactámicos, a excepción de los que son resistentes de forma natural. No obstante, mutaciones en la región promotora o en el atenuador⁶⁶, inserciones de elementos móviles que actúan

como promotores fuertes⁶⁷ o mutaciones en su región estructural⁶⁸ pueden causar la hiperproducción de la betalactamasa. En estas circunstancias, el microorganismo expresa niveles elevados de resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas e inhibidores de betalactamasas. Si el grado de hiperproducción es muy elevado pueden verse afectadas también las ureidopenicilinas, las cefalosporinas de tercera generación y los monobactámicos.

- **Expresión inducible (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morgannii*, *Providencia* spp. y *Hafnia alvei*).**

Los microorganismos en los que el gen *ampC* es inducible presentan resistencia natural a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, C1G, inhibidores de betalactamasas y sensibilidad variable a C2G y cefamicinas. *Enterobacter* spp. y *C. freundii* son resistentes a ceftioxitina y presentan sensibilidad disminuida a cefuroxima, mientras que *M. morgannii*, *Providencia* spp. y *Serratia* spp. son resistentes a cefuroxima y moderadamente resistentes a ceftioxitina. Mutaciones en alguno de los genes encargados de la regulación de la expresión de la betalactamasa, mayoritariamente en el gen *ampD* y *ampR*, pueden producir su desrepresión permanente⁶⁹. En este caso, tanto en presencia como en ausencia de inductor los niveles de resistencia son extremadamente elevados, siendo resistentes a C3G y monobactámicos pero manteniéndose sensibles a C4G y carbapenémicos.

- **Betalactamasas de clase A.** Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentan diferentes tipos de betalactamasas de clase A, que pueden agruparse en diferentes subgrupos (clasificación Bush-Jacoby)⁶⁴ en función del patrón de sensibilidad que confieren y la especie donde se encuentran presentes de forma natural. Éstas también pueden expresarse tanto de forma constitutiva como inducible.

- **Expresión constitutiva.**

- Subgrupo 2a (*K. pneumoniae*). Algunas cepas de *K. pneumoniae* expresan betalactamasas cromosómicas de clase A denominadas OKP y LEN^{70,71} con actividad penicilinasas, confiriendo resistencia a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina y ticarcilina de forma natural.
- Subgrupo 2b (*K. pneumoniae*). La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* presentan la betalactamasa cromosómica SHV-1, con un espectro de actividad

similar a las anteriores, excepto cuando se hiperproduce. En este caso puede llegar a conferir resistencia a C1G y afectar de forma moderada a ceftazidima y combinaciones con inhibidores⁷².

- **Subgrupo 2be (*Klebsiella oxytoca*)**. *K. oxytoca* presenta una betalactamasa natural denominada KOXY con un espectro de actividad similar a los anteriores. En caso de hiperproducción, las cepas son altamente resistentes a todas las penicilinas, C2G y aztreonam, y con resistencia moderada o alta a combinaciones con inhibidores y C3G, pero se mantienen sensibles a ceftazidima. Este perfil de sensibilidad, con sinergia entre C3G (excepto ceftazidima) y amoxicilina-ácido clavulánico, puede confundirse fácilmente con el patrón producido por una betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

- **Expresión inducible (*Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter koseri* y *Citrobacter sedlakii*)**.

Son activas frente a penicilinas, C1G y cefuroxima, pero se mantienen sensibles a C3G y C4G, cefamicinas, combinaciones con inhibidores, monobactámicos y carbapenémicos. Su desrepresión implica además resistencia a C3G y sensibilidad disminuida a C4G.

Tabla 4. Patrones de resistencia natural de diferentes especies de enterobacterias. Tabla adaptada de Navarro *et al*⁶⁵.

Especies	AMP	AMC	TIC	C1G	FOX	CXM	GEN	TET	COL	NIT
<i>Klebsiella</i> spp	R		R							
<i>Citrobacter koseri</i>	R		R							
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	R		R							
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R		R	R	r				
<i>Hafnia alvei</i>	R	R		R						
<i>Serratia marcescens</i>	R	R		R	r	R				
<i>Proteus mirabilis</i>								R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R			R		R			R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R		R	r	R			R	R
<i>Providencia</i> spp.	R	R		R	r		R		R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R				

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; TIC: ticarcilina; C1G: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; COL: colistina; NIT: nitrofurantoína; R: resistente; r: halos reducidos o CIM elevadas pero dentro del rango de sensibilidad.

Dentro de las enterobacterias, encontramos especies con más de una betalactamasa cromosómica, como es el caso de *Yersinia enterocolitica*, que produce una cefalosporinasa inducible de clase C y una betalactamasa de clase A. Su fenotipo salvaje incluye resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, combinaciones con inhibidores, cefamicinas, C1G y C2G, siendo sensibles a C3G, C4G y carbapenémicos.

1.4.2.1. Regulación de la expresión de las betalactamasas AmpC

La producción de la betalactamasa cromosómica AmpC en muchos organismos gramnegativos como *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *Y. enterocolitica* y *P. aeruginosa* entre otras, es generalmente baja pero inducible en respuesta a la presencia de antibióticos betalactámicos y otros estímulos, y está estrechamente relacionada con los procesos de síntesis y reciclado de la pared celular⁶⁹. Sin embargo, no todas las especies de bacterias gramnegativas presentan una expresión inducible del gen cromosómico *ampC*, por ejemplo, *E. coli* lo expresa a bajo nivel de forma constitutiva, no inducible⁷³.

El fenómeno de inducción de betalactamasas en gramnegativos ha sido conocido durante muchos años como respuesta de resistencia ante la presencia de antibióticos betalactámicos. Estos antibióticos interactúan (tal y como se ha detallado en el apartado 1.2.2) con las proteínas PBP impidiendo que se lleve a cabo el último paso en la síntesis del peptidoglucano y, por tanto, provocando una alteración del *pool* de muropéptidos en el citoplasma que inhiben al regulador AmpR, lo que resulta en la desrepresión del gen *ampC* que codifica la betalactamasa AmpC.

Aunque la reacción de las PBP se considera el último paso en la síntesis del peptidoglucano, la estructura de la pared celular se rige bajo una constante remodelación⁷⁴. Así, para mantener la integridad de la pared celular existe un balance entre actividades de degradación y de síntesis que deben ser estrictamente controladas para permitir a la célula crecer a la vez que se evita la autólisis celular. La relación entre la inducción de la betalactamasa y el reciclado de la pared celular ha sido descubierta recientemente³⁹.

1.4.2.1.1. Reciclaje de la pared celular y la inducción de betalactamasa

Los productos de la pérdida de componentes de la pared son normalmente capturados y reutilizados por la célula en un proceso denominado reciclaje del peptidoglucano⁷⁵. La principal ruta de reciclaje consiste en la entrada de los fragmentos peptídicos hacia el citoplasma a través de la permeasa transmembrana AmpG. En el citoplasma estos fragmentos peptídicos van a reaccionar con la proteína citosólica AmpD que los va a transformar en tripéptidos que se reutilizarán en la síntesis de nuevo peptidoglucano. Por otro lado, estos fragmentos peptídicos puede que no interactúen con AmpD y se unan a AmpR, activando a este regulador transcripcional que impediría la expresión de la betalactamasa AmpC (Figura 15).

Se ha demostrado que la correlación existente entre AmpG, AmpR y AmpD es imprescindible para la inducción de la betalactamasa AmpC en *C. freundii* y en *E. cloacae*. Mutantes del gen *ampD* presentan una hiperproducción semiconstitutiva de la betalactamasa AmpC, mientras mutantes dobles de los genes *ampG* y *ampD* no son inducibles, por lo que se cree que AmpG debe de ser un transductor de señal o un transportador que permite la entrada de un ligando que activa el regulador AmpR en ausencia de actividad de AmpD. La observación de acumulación del tripéptido anhMurNAc en el citoplasma de mutantes *ampD* permitió concluir que este tripéptido actúa como molécula señal, y AmpD actúa como un regulador negativo de la expresión de la betalactamasa AmpC⁷⁶.

En circunstancias normales, en ausencia de antibióticos betalactámicos, estos anhidro-muropéptidos son hidrolizados por la amidasa AmpD y reciclados mediante una serie de reacciones en precursores para su reincorporación en la pared celular. Cuando el UDP-MurNAc-pentapéptido se une a AmpR, reprime la expresión de AmpC. Así, la regulación de AmpC depende de las concentraciones relativas de fragmentos peptídicos que entran en el citoplasma y de anhidro-muropéptidos. En presencia de antibióticos betalactámicos, los anhidromuropéptidos se acumulan y desplazan al UDP-MurNAc-pentapéptido del regulador AmpR, así la betalactamasa AmpC se expresa y es exportada al periplasma para neutralizar el betalactámico.

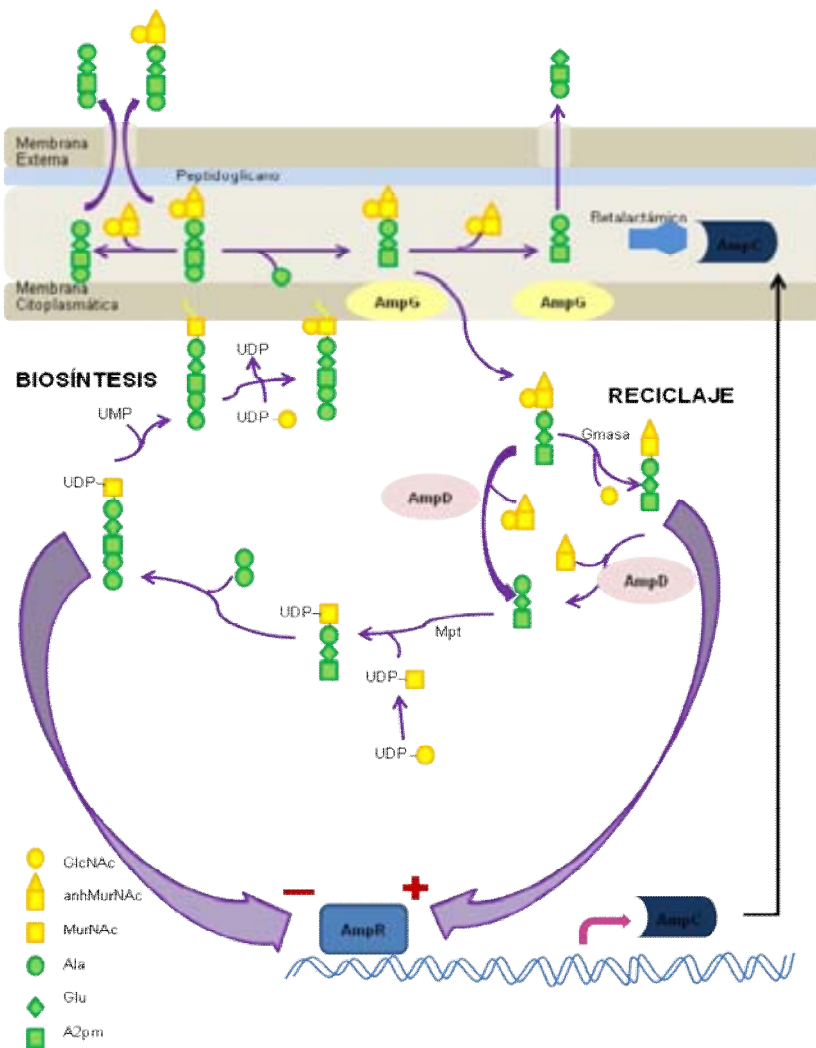


Figura 15. Regulación de la síntesis, remodelado y reciclaje de la pared celular en relación a la expresión de la betalactamasa AmpC.

Figura adaptada de <http://www.sciencemag.org/site/feature/data/pharmacia/1997/jacobs.xhtml>

1.4.2.2. Betalactamasa AmpC en *Escherichia coli*

El gen *ampC* en *E. coli* se localiza *downstream* del operón *frdABCD* que codifica la fumarato reductasa. El gen *ampC* se expresa de forma constitutiva a nivel bajo debido a presentar un promotor débil y a estar sometido a atenuación^{67,77}. El promotor de *ampC* se localiza solapado al gen *frdD* del operón de la fumarato reductasa, donde se localizan las secuencias consenso o cajas del promotor, -35 y -10. *Downstream* se localizan dos secuencias simétricas con capacidad para formar una estructura en forma de horquilla, la

cual presenta doble función: actuar como región atenuadora del gen *ampC* y como región terminadora del gen *frd* (Figura 16)^{78,79}.

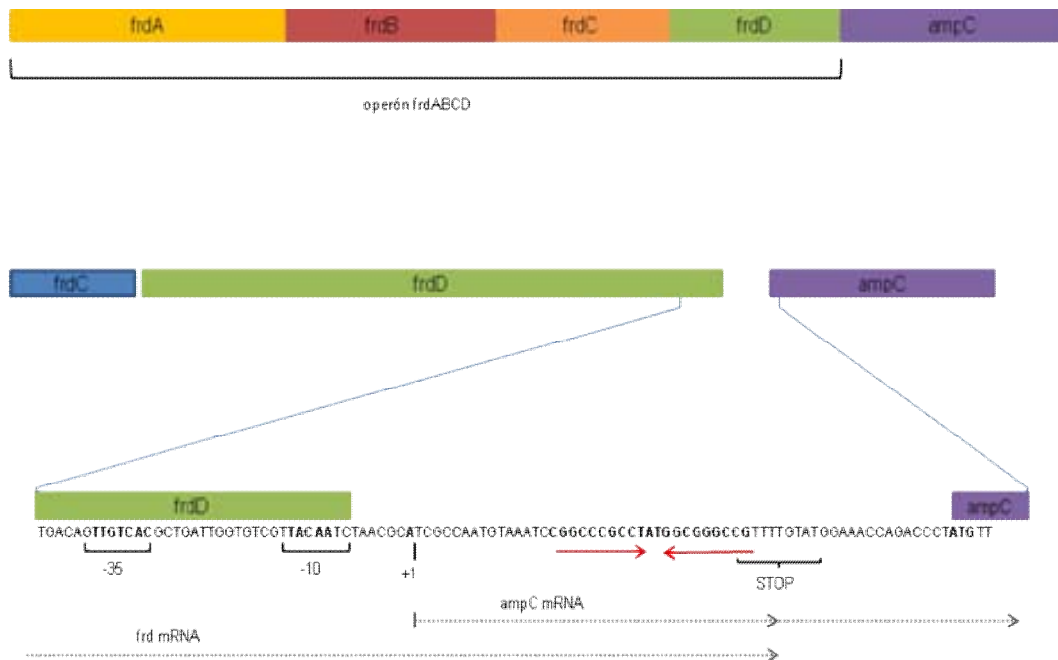


Figura 16. Representación genética del terminador del gen *frd* y de la región promotora del gen *ampC*. Adaptada de Jones HM *et al*⁷⁹.

Debido a esta estructura, y a que *E. coli* tampoco presenta AmpR ni AmpD, el nivel de producción de la betalactamasa AmpC depende principalmente de la fuerza de su promotor, aunque otros factores, tales como la amplificación del gen, la inserción de una IS o diversas mutaciones en la región promotora pueden causar hiperproducción de AmpC y conducir a una resistencia a todos los antibióticos betalactámicos excepto carbapenémicos y C4G⁸⁰.

1.4.3. Betalactamasas adquiridas en enterobacterias

A parte de las betalactamasas naturales presentes en enterobacterias, la adquisición de nuevos genes que confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos es cada vez más frecuente. La primera penicilinasa de naturaleza plasmídica fue descubierta por Novick en 1963 en cepas de *S. aureus*⁸¹. Dos años más tarde, en 1965, Datta y Kontomichalou⁸² descubrieron que la penicilinasa TEM-1 en *Enterobacteriaceae* estaba codificada por genes contenidos en plásmidos. La movilización de estos genes

por elementos móviles vía transferencia horizontal ha permitido su rápida expansión y diseminación por todo el mundo.

El origen de las betalactamasas adquiridas no está totalmente confirmado pero se cree que muchas de ellas derivan de las betalactamasas cromosómicas de algunas especies como es el caso de las betalactamasas AmpC adquiridas, procedentes principalmente de los genes *ampC* cromosómicos de muchas enterobacterias tales como *C. freundii*, *M. morgani*, *H. alvei* o *Enterobacter* spp. entre otras⁸³ (Figura 17); las betalactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M, derivadas del enzima cromosómico de diferentes especies de *Kluyvera*⁸⁴; la betalactamasa adquirida SHV-1, derivada del gen cromosómico de *K. pneumoniae*, entre otras. No obstante, la cepa original de donde podrían haber derivado muchas betalactamasas adquiridas es todavía desconocida.

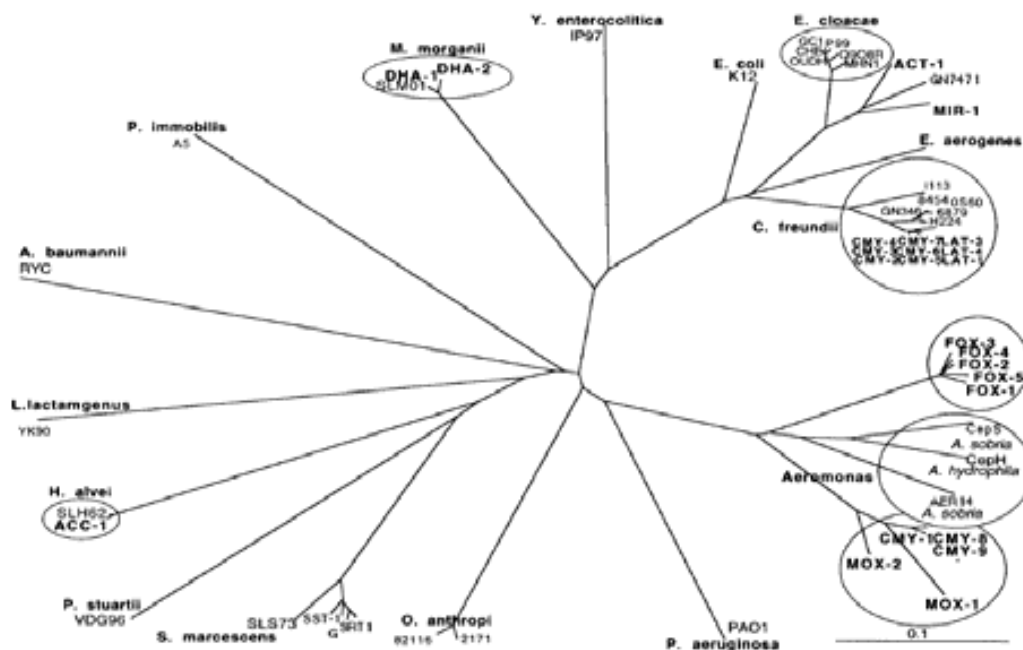


Figura 17. Dendrograma de las betalactamasas AmpC cromosómicas y plasmídicas. Adaptada de Philippon *et al*⁸³.

1.4.3.1. Betalactamasas AmpC adquiridas

La idea de que los genes *ampC* estaban localizados exclusivamente en el cromosoma comenzó a cambiar a mitad de los años 70 cuando Bobrowski *et al*⁸⁵ detectaron la presencia de una betalactamasa indistinguible de la enzima AmpC de *E. coli*, vehiculada por un plásmido, en una cepa de *P. mirabilis*. Desafortunadamente, el

plásmido original se perdió y se llegó a dudar de la veracidad de los experimentos de transferencia. De nuevo, en 1982, Levesque *et al* describieron una cefalosporinasa adquirida en *Achromobacter* spp.⁸⁶, pero del mismo modo que el anterior, la cepa original se perdió y el gen de la betalactamasa no pudo ser secuenciado. No fue hasta finales de la década de los 80, cuando Bauernfeind *et al*⁸⁷ y Papanicolaou *et al*⁸⁸ demostraron con certeza que las betalactamasas de tipo AmpC podían ser transferidas por plásmidos.

Desde la descripción de las primeras betalactamasas AmpC adquiridas, la aparición de nuevas variantes ha estado en un continuo aumento, aunque de una manera mucho más gradual que la observada por las BLEE.

Se han nombrado en función de su preferencia para hidrolizar un sustrato como las cefamicinas (CMY), la ceftioxitina (FOX), el moxalactam (MOX) o el latamoxef (LAT); en función del tipo de betalactamasa, AmpC-tipo (ACC) o clase C de Ambler (ACC); o en función del sitio donde se descubrió, tal como “Miriam Hospital” en Providencia, USA (MIR-1) o Dhahran Hospital en Arabia Saudí (DHA). BIL-1 fue nombrada por el nombre del paciente (Bilal) del cual se obtuvo la muestra original.

Actualmente se han descrito 224 variantes (Julio de 2014) agrupadas en 9 tipos de enzimas diferentes: CMY (121 variantes), ACT (35 variantes), FOX (12 variantes), MOX (9 variantes), DHA (23 variantes), MIR (17 variantes), ACC (6 variantes), CFE (1 variante) y LAT (1 variante) (www.lahey.org/Studies).

1.4.3.1.1. Clases de AmpC adquiridas

Aunque no existe una clasificación formal, la mayoría de las AmpC adquiridas se pueden agrupar en seis clases según sus similitudes nucleotídicas y aminoacídicas con diferentes betalactamasas cromosómicas de clase C^{83,89}.

CIT. Las betalactamasas pertenecientes a esta clase derivan de la AmpC cromosómica de *C. freundii*, con homologías que oscilan entre el 89,2 y el 97,1%⁹⁰. Dentro de este grupo se incluyen las enzimas de la CMY-2 a -7, CMY-12 a -18, CMY-20 a 121, CFE-1 y LAT-1. En algunas revisiones más antiguas, se pueden encontrar variantes como LAT-2 a LAT-4 y BIL-1 dentro de este grupo, aunque estudios más detallados de sus secuencias nucleotídicas mostraron que BIL-1 y LAT-2 eran idénticas a CMY-2, que LAT-3 era idéntica a CMY-6 y que LAT-4 era idéntica a LAT-1.

Los primeros representantes de este grupo fueron aislados principalmente en cepas de *Klebsiella* spp., *E. coli* y *P. mirabilis* a finales de los 80 y a lo largo de la década de los 90⁸³, aunque el descubrimiento de nuevas variantes, principalmente derivadas de CMY-2, sigue estando presente en la actualidad. Todas las enzimas derivadas de este grupo se expresan a nivel constitutivo, a excepción de CMY-13, donde el gen *ampC* con su regulador *ampR* fueron movilizados desde el cromosoma de *C. freundii* a un plásmido de tipo N de una cepa de *E. coli*⁹¹. En la enzima CFE-1 también se observa la presencia del gen regulador *ampR*, aunque en este caso no parece que la betalactamasa sea inducible⁹².

CMY-2 (BIL-1, LAT-2) es el principal representante de este grupo. Fue aislada de una cepa de *K. pneumoniae* procedente de un paciente griego en 1990, siendo publicada su secuencia nucleotídica en 1996⁹³.

Las variantes CMY-33, CMY-37 y CMY-44 se caracterizan por presentar sensibilidad disminuida o resistencia a cefepime, debido a deleciones aminoacídicas en zonas próximas a la región de la hélice H-10^{94,95}. Se ha demostrado que mutaciones en esta zona aumentan el espectro de actividad de las betalactamasas AmpC^{68,96-98}

DHA. Las variantes pertenecientes a este grupo derivan del gen *ampC* cromosómico de *M. morganii*, con una homología que oscila entre el 98,2 y el 100%⁹⁰. El primer representante caracterizado, DHA-1, fue aislado en 1992 de *S. enterica* serovar Enteritidis, procedente de una herida de un paciente hospitalizado en Arabia Saudí⁹⁹. Casi al mismo tiempo se aisló una cepa de *K. pneumoniae* portadora de DHA-2 en un absceso perianal en Francia¹⁰⁰. Años más tarde, se aísla una *K. pneumoniae* portadora de DHA-3 de un absceso hepático en Taiwan¹⁰¹. El resto de variantes no han sido descritas hasta recientemente indicando que estas AmpC adquiridas presentan menor capacidad evolutiva que las variantes de tipo CIT.

A pesar de que la mayoría de las betalactamasas adquiridas se expresan de forma constitutiva, los representantes de esta familia son inducibles.

Verded *et al* demostraron en una cepa de *S. enterica* que tanto el *ampC* como su regulador *ampR* provienen de una región de 2,6 kb del cromosoma de *M. morganii* con una identidad entre el 98-100% y que ambos genes estaban dispuestos en la misma configuración que en el cromosoma¹⁰². La región *ampC-ampR* se encuentra asociada a un integrón complejo de clase 1 asociado a *ISCR1*, siendo la posible causa de la movilización de esta región de *M. morganii* en un plásmido conjugativo.

ACC. Existen seis variantes de este grupo, aunque únicamente dos (ACC-1 y ACC-4) son de localización plasmídica. ACC-2 y ACC-3 son betalactamasas AmpC cromosómicas procedentes de las cepas de *H. alvei* HA-1 (AF180952) y HA-7 (AF180958) respectivamente.

Las ACC son las únicas betalactamasas de tipo AmpC sensibles a cefoxitina, lo que dificulta su detección en el laboratorio¹⁰³. La primera representante plasmídica, ACC-1, se aisló en 1997 en Alemania de una cepa de *K. pneumoniae* causante de neumonía nosocomial¹⁰⁴. Tan solo un año después fue descrita la AmpC cromosómica de *H. alvei* como origen de la AmpC plasmídica ACC-1¹⁰³, con una homología del 99,7%, donde tan solo se observa una sustitución aminoacídica en la secuencia del péptido señal.

Poco después se aísla una cepa de *E. coli* portadora de ACC-4 de una muestra de orina en Atenas¹⁰⁵. Esta nueva variante tiene la particularidad de presentar un mayor espectro de actividad frente a las cefalosporinas de amplio espectro, particularmente ceftazidima y ceftriaxona, respecto a ACC-1.

FOX. Existen 12 variantes de este grupo, de la FOX-1 a la FOX-12, presentando la FOX-5 y la FOX-6 secuencias idénticas. Derivan de la AmpC cromosómica de *Aeromonas caviae* (reidentificada como *A. media*) con la que presentan un grado de homología superior al 96%. La primera representante de este grupo, FOX-1, fue aislada de una cepa de *K. pneumoniae* en Argentina en 1989, aunque su secuencia no se publicó hasta 1994¹⁰⁶.

MOX. Este grupo incluye las variantes MOX-1 a -9, CMY-1, CMY-8 a -11 y CMY-19. A excepción de MOX-3 y MOX-5 a -7, presentes en el cromosoma de *A. caviae*, el resto de variantes son de localización plasmídica. Originalmente se pensaba que este grupo estaba relacionado con la AmpC cromosómica de *P. aeruginosa* con homologías inferiores al 60%^{107,108}. Más tarde, se describió que estas variantes y las betalactamasas AmpC de *Aeromonas sobria*¹⁰⁹ y *Aeromonas hydrophila*¹¹⁰ mostraban una homología de secuencia superior al 78%.

El primer representante de este grupo, CMY-1, se aisló en 1988 en una cepa de *K. pneumoniae* en Corea del Sur. Pocos años más tarde, se aislaron cepas de *K. pneumoniae* productoras de MOX-1 en Japón (1991) y MOX-2 en Grecia (1995), seguidas de aislados de *E. coli* productoras de CMY-8 en Taiwan (1998) y *K. pneumoniae* productoras de CMY-9 en Japón (1995). EN 2003, se describe por primera vez una betalactamasa de localización plasmídica (CMY-10) en *E. aerogenes*, especie productora de una AmpC cromosómica propia. Finalmente, aparece una cepa de *E. coli* portadora de

CMY-11 en Corea del Sur y cuatro *K. pneumoniae* portadoras de la variante CMY-19 en Japón, recogidas durante el período 1995-1997. En 2007, se describe una nueva variante MOX-4 en una cepa de *A. caviae* aislada de un paciente con neumonía en China.

Presentan un patrón fenotípico de resistencia característico de una betalactamasa AmpC, con la particularidad de que MOX-1, CMY-8 y CMY-9 son inhibidas por ácido clavulánico y que CMY-19 es más activa frente a cefalosporinas de amplio espectro, incluyendo cefepime. El grado de homología entre las diferentes variantes de este grupo es muy elevado, entre el 98 y el 99%.

EBC. Incluye las variantes ACT-1 a -9 y MIR-1 a -5. Aunque la mayoría son de localización plasmídica, algunas de sus representantes se han encontrado únicamente en el cromosoma como ACT-2 y ACT-4, aisladas de cepas de *Enterobacter asburiae*, y MIR-2 y MIR-3, presentes en el cromosoma de *E. cloacae*.

La primera representante de este grupo, MIR-1, se describió en 1990 en cepas de *K. pneumoniae* en Estados Unidos⁸⁸. En 1994 se aísla ACT-1, la segunda representante de este grupo, en cepas de *K. pneumoniae* y de *E. coli* en Estados Unidos¹¹¹. El gen que codifica esta enzima se localizó tanto en el cromosoma como en plásmidos de algunas cepas estudiadas y presenta la particularidad de ser inducible en presencia de antibióticos betalactámicos, debido a la co-transferencia del gen *bla*_{ACT-1} y su regulador *ampR* desde el cromosoma de *E. asburiae* a un plásmido¹¹².

En años posteriores se describen otras variantes de este grupo en cepas de *K. pneumoniae* (ACT-3, ACT-6, ACT-7 y MIR-5) y *E. coli* (ACT-5 y MIR-4). Inicialmente, tanto ACT-1 como MIR-1 se relacionaron con el *ampC* cromosómico de *E. cloacae*, con homologías que oscilaban entre el 85 y el 91,1%, aunque estudios posteriores señalan a *E. asburiae* como el verdadero origen, con una homología del 97,6% para ACT-1 y del 92,9% para MIR-1^{90,112}.

1.5. RESISTENCIA A QUINOLONAS

Las quinolonas son quimioterápicos que presentan una estructura formada por dos anillos. El tipo de sustituyentes en distintas posiciones de su estructura determinan su actividad, espectro y propiedades farmacocinéticas que permiten su clasificación en generaciones.

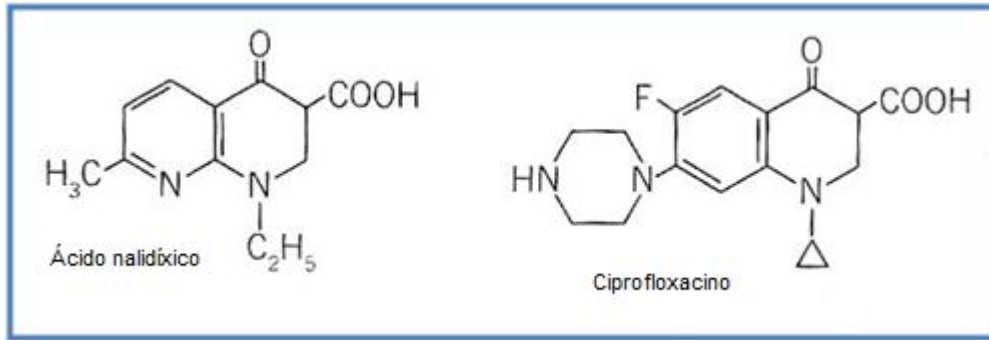


Figura 18. Estructura química de quinolonas (ácido nalidíxico) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina).
Figura extraída de Microbiología y Parasitología Médicas, Prats G⁴.

Las moléculas que presentan sustituciones de tipo piperacina en posición 7 son, en general, más activas frente a gramnegativos, mientras que las que presentan un sustituyente de tipo pirrolidina aumentan su actividad sobre grampositivos¹¹³.

El ácido nalidíxico es el representante de la primera generación y presenta corto espectro de acción ya que solo es activo frente a gramnegativos. La segunda generación se caracteriza por la adición de un átomo de flúor en posición 6 (de ahí el nombre de fluoroquinolonas). Además de presentar un amplio espectro de actividad frente a gramnegativos tienen una serie de propiedades farmacocinéticas que las hacen útiles para el tratamiento de infecciones sistémicas. Ciprofloxacino y levofloxacino son los compuestos más utilizados de esta generación. Moxifloxacino es un representante de la tercera generación que incrementa su espectro a cocos grampositivos y bacterias anaerobias. Entre las generaciones más recientes se encuentran moléculas como garenoxifloxacino que no presenta flúor en posición 6 formando la subclase de las desfluoroquinolonas.

A pesar del gran número de moléculas producidas, muchas de ellas han sido retiradas del mercado debido a su elevada toxicidad y solo un número reducido han permanecido con utilidad clínica. En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos de esta clase, como nemonoxacino y delafloxacino, que se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos (Figura 18)^{38,41}.

1.5.1. Mecanismo de acción de las quinolonas

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV, que son topoisomerasas de tipo II relacionadas con procesos de replicación y segregación del cromosoma bacteriano. Ambas son enzimas tetraméricas constituidas por dos subunidades, GyrA y GyrB en la DNA girasa, y ParC y ParE en la topoisomerasa IV. La DNA girasa es la responsable de introducir superenrollamientos negativos en el DNA y de disminuir el estrés topológico surgido de la translocación de los complejos de transcripción y elongación a lo largo de la cadena de DNA. La topoisomerasa IV está involucrada principalmente en la decatenación, la desunión del cromosoma hijo replicado. Las quinolonas actúan uniéndose al complejo DNA-girasa/topoisomerasa IV e inhibiendo la replicación del DNA^{114,115}.

1.5.2. Mecanismos de resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas se produce principalmente por la alteración de las dianas y por la disminución de la acumulación intracelular del antibiótico debido a la impermeabilidad de la membrana o a la expulsión activa del antibiótico. A diferencia de estos mecanismos que se producen por mutaciones en genes cromosómicos, existen otros mecanismos transmisibles que incluyen la protección de las dianas mediada por las proteínas Qnr, la inactivación enzimática y la expulsión activa, cuyos determinantes genéticos se encuentran localizados en plásmidos (Figura 19). Las alteraciones producidas por cada uno de estos mecanismos pueden acumularse dando lugar a bacterias con alto nivel de resistencia a quinolonas¹¹⁵.

1.5.2.1. Resistencia a quinolonas cromosómica

La alteración de las dianas es el mecanismo de resistencia a quinolonas con más importancia clínica y se produce como consecuencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Figura 19.1). Estas mutaciones se localizan en regiones concretas de las subunidades conocidas como QRDR (*quinolone resistance determining region*). La especificidad de las diferentes quinolonas para cada una de las dianas es variable y depende del microorganismo y de la quinolona específica. En general, en bacterias gramnegativas la diana primaria es GyrA, mientras que en

grampositivas es ParC, aunque algunas quinolonas como clinafloxacino y garenoxacino presentan afinidad similar por ambas enzimas y son referidas como quinolonas duales.

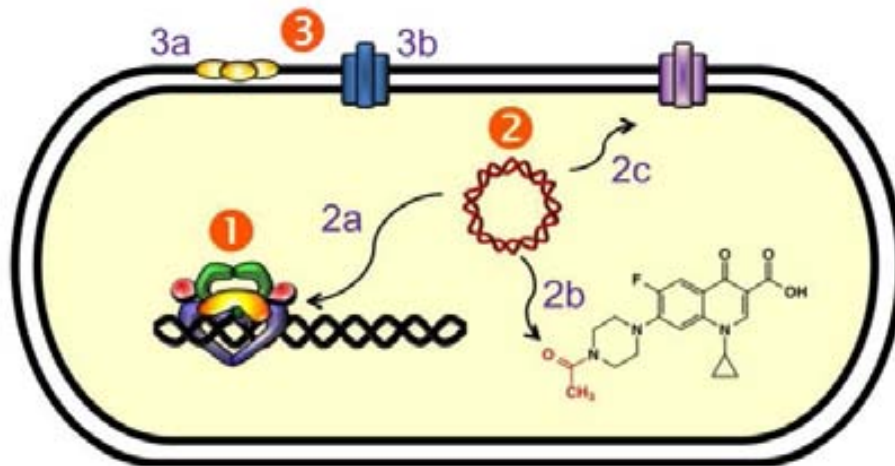


Figura 19. Mecanismos de resistencia a quinolonas. (1) Resistencia por mutaciones en la girasa o en la topoisomerasa IV debilitan la interacción enzima-quinolona. (2) Resistencia plasmídica. (2a) Proteínas Qnr disminuyen la unión DNA-topoisomerasa y protegen al complejo DNA-enzima de las quinolonas. (2b) AAC(6)-Ib-cr acetila el nitrógeno libre de ciprofloxacino y norfloxacino, disminuyendo su efectividad. (2c) Bombas de expulsión de codificación plasmídica disminuyen la concentración de quinolonas en la célula. (3) Resistencia cromosómica. (3a) Alteración de porinas disminuye la penetración del antibiótico. (3b) Hiperexpresión de bombas de expulsión de codificación cromosómica disminuye la concentración del antibiótico en el interior de la célula. Figura extraída de Aldred K. *et al*¹¹⁵.

La resistencia a quinolonas se produce de manera escalonada como consecuencia de la acumulación de mutaciones sucesivas, de manera que el nivel de resistencia conferido por una primera mutación en la diana primaria se incrementa con mutaciones adicionales en la misma diana o en la diana secundaria. Así en *E. coli*, una primera mutación en *gyrA* normalmente confiere resistencia de alto nivel a ácido nalidíxico pero para evidenciar resistencia a fluoroquinolonas se requieren mutaciones adicionales en *gyrA* y/o *parC* (Tabla 5)^{113,116}.

Tabla 5. Sustituciones aminoacídicas más frecuentes encontradas en GyrA y ParC de *E. coli* y *Salmonella*¹¹³.

Microorganismo	Cambio aminoacídico				CMI CIP (mg/l)
	GyrA		ParC		
<i>Escherichia coli</i> wt	Ser-83	Asp-87	Ser-80	Glu-84	
	Leu				0,25-4
	Leu		Arg		1-4
	Leu				4
	Leu	Asn/Tyr		Lys	8-128
	Leu	Asn	Arg/Ile		4-128
	Leu	Asn/Tyr	Ile	Val/Lys	64-128
<i>Salmonella</i> spp. wt	Ser-83	Asp-87	Ser-80		
	Phe				0,2-2
		Gly/Tyr			0,12-0,25
	Phe		Ile		4

CMI: concentración mínima inhibitoria; CIP: ciprofloxacino.

Las quinolonas penetran al interior de la célula por un sistema de difusión pasiva, principalmente atravesando la membrana y a través de porinas. La disminución intracelular del antibiótico puede ser debida a una reducción de la permeabilidad relacionada con una disminución de la expresión de porinas como OmpF y OmpC¹¹⁷ (Figura 19.3a). Se trata de un mecanismo de resistencia múltiple que afecta a otros antibióticos no emparentados como tetraciclinas, cloranfenicol y betalactámicos.

Adicionalmente, el incremento en la expresión de sistemas de expulsión por inducción, mutaciones en los promotores o alteraciones en sistemas reguladores puede originar resistencia a quinolonas y a otros antibióticos no relacionados estructuralmente. Así por ejemplo, la sobreexpresión de AcrAB/ToIC juega un papel importante en la expulsión de las quinolonas¹¹³.

1.5.2.2. Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

En 1998, se describió el primer mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos en *K. pneumoniae*¹¹⁸. Se trataba del gen *qnrA*, el cual codifica una proteína pentapeptídica. Actualmente, los mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR, *plasmid mediated-quinolone resistance*) descritos incluyen los determinantes Qnr de clase A, S, B, C y D (siendo los de tipo A, B y S los predominantes

en enterobacterias), la enzima AAC(6')-Ib-cr (variante de AAC(6')-Ib) y las bombas de expulsión activa (OqxAB y QepA)¹¹⁹.

1.5.2.2.1. Protección de la diana de quinolonas

Los determinantes Qnr no producen un cambio en la acumulación intracelular de quinolonas ni tampoco causan una inactivación del antimicrobiano. El efecto de los Qnr ha sido estudiado mediante ensayos de DNA superenrollado. Al menos *in vitro*, los Qnr protegen la DNA girasa de su inhibición por ciprofloxacino. Esta protección es dependiente de la concentración de Qnr e inversamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino. Además, la topoisomerasa IV, también parece estar protegida de las quinolonas por los Qnr. La expresión de estos determinantes solamente produce un bajo nivel de resistencia a quinolonas¹¹³. A pesar de esto, la presencia conjunta de dos o más de estos mecanismos en el mismo microorganismo presenta un efecto aditivo, con un incremento de la concentración mínima inhibitoria¹²⁰.

Los determinantes *qnr* se definen como alelos codificantes de una proteína formada por pentapéptidos en tándem (Figura 19.2a). Ésta confiere sensibilidad reducida a ácido nalidíxico y a fluoroquinolonas¹²⁰. Se han establecido al menos cinco familias que agrupan a unas 100 variantes de proteínas Qnr¹¹⁵.

1.5.2.2.2. Inactivación enzimática

La inactivación enzimática de quinolonas fue observada en hongos hace varios años; en cambio, no se estableció como un fenómeno en bacterias hasta que en 2006 se describió una variante de la enzima modificadora de aminoglucósidos AAC(6')-Ib con dos mutaciones puntuales, denominada AAC(6')-Ib-cr (Figura 19.2b). Esta enzima acetila el nitrógeno en posición C7 del anillo piperacínico que se encuentra en norfloxacino y ciprofloxacino, lo que hace disminuir la actividad del antibiótico¹¹⁵. Esta enzima confiere bajo nivel de resistencia a algunas quinolonas como ciprofloxacino y norfloxacino, conservando su capacidad para inactivar aminoglucósidos.

1.5.2.2.3. Bombas de expulsión activa codificadas por plásmidos

Las bombas de expulsión activa pueden estar codificadas tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos (Figura 19.2c). En bacterias gramnegativas las que confieren resistencia a quinolonas pertenecen principalmente a la familia RND

(*resistance-nodulation-cell division*) y están codificadas por genes cromosómicos endógenos. Se han descrito dos bombas transportadoras de quinolonas de codificación plasmídica denominadas OqxAB y QepA¹¹⁹.

La bomba de expulsión activa OqxAB confiere resistencia a quinolonas y otros agentes como el cloranfenicol¹¹⁹. Ha sido detectada tanto en microorganismos comensales como patógenos humanos¹²¹

La bomba de expulsión activa QepA1 ha sido la descrita más recientemente¹²². El gen *qepA1* codifica una bomba de expulsión transmembrana protón-dependiente. También se ha descrito el gen *qepA2* cuyo producto difiere en dos de los 511 aminoácidos con respecto a QepA1, aunque su espectro es similar. Las diferencias principales entre ambos genes radican en su entorno genético.

QepA1 y QepA2 probablemente favorecen el desarrollo de resistencia a ciprofloxacino o norfloxacino, incrementando la frecuencia de selección de mutantes resistentes¹²⁰.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral fueron:

1. Determinar la prevalencia de aislados de *E. coli* productores de una betalactamasa de tipo AmpC, bien por adquisición (AmpCa) o por hiperproducción de su betalactamasa cromosómica (AmpCc).
2. Conocer los enzimas AmpCa más prevalentes en la población.
3. Determinar los mecanismos implicados en la hiperexpresión del gen *ampC* cromosómico, así como su correlación con el incremento de su expresión.
4. Determinar el grupo filogenético al que pertenecen cada uno de los aislados de *E. coli* productores de AmpC.
5. Conocer la prevalencia de PMQR en aislados de *E. coli* productores de AmpC.
6. Caracterizar los plásmidos implicados en la diseminación de los genes *ampC* adquiridos en *E. coli* y conocer su epidemiología.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CARACTERÍSTICAS Y ÁMBITO DEL ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico prospectivo en el cual participaron el Consorci Sanitari de Terrassa (CST), el Hospital Universitario Mútua de Terrassa (HUMT) y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (HSCiSP), así como sus centros primarios, entre los cuales abarcan un área de influencia de más de 1.300.000 habitantes. En estos centros se procedió a la recogida de cepas de *E. coli* productoras de AmpC entre junio de 2010 y noviembre de 2011. Se incluyó una cepa con significación clínica por paciente.

Se consideraron como infecciones nosocomiales las que se producían después de 48h del ingreso y no estaban presentes en el período de incubación en el momento del ingreso del paciente¹²³. Como infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria, aquellas adquiridas por pacientes no ingresados que presentaban tratamientos endovenosos en su domicilio, cuidados especializados de heridas, hemodiálisis ambulatoria, hospitalización de dos o más días en los 90 días previos y residencia en un centro geriátrico o de larga estancia¹²⁴. Limitando las infecciones comunitarias a aquellas que se producían en pacientes que, estrictamente, no tenían ningún contacto con la asistencia sanitaria.

Se seleccionaron todos los aislados de *E. coli* según los siguientes criterios:

- Resistencia o sensibilidad disminuida según los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a la asociación amoxicilina-ácido clavulánico (<14 mm; > 8/4 mg/l) y cefotaxima (<23 mm; > 8 mg/l) o ceftazidima (<18 mm; > 4 mg/l) o aztreonam (<21 mm; > 4 mg/l)¹²⁵.
- Las cepas con BLEE se descartaron a excepción de aquellas que eran resistentes a cefoxitina (<15 mm;>8mg/l) o a la combinación amoxicilina-ácido clavulánico.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS DE *E. coli*

La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas metabólicas manuales o automatizadas.

Las pruebas manuales incluyeron los siguientes caracteres: fermentación de la glucosa y producción de gas, fermentación de la lactosa, producción de SH₂, prueba de Voges-Proskauer, crecimiento en citrato de Simmons, producción de ureasa, DNAsa, decarboxilasas (lisina y ornitina), indol a partir del triptófano y fenilalanina deaminasa.

Los sistemas comerciales consisten en galerías multipuebas, es decir, celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan de forma automatizada y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. La lectura se efectúa también de forma automatizada, ya que el *software* incluye una extensa base de datos.

Los paneles comerciales utilizados fueron el Vitek 2 (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Montana, EEUU) y el Microscan (Dade Behring MicroScan, West Sacramento, CA, EEUU).

3.3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

El estudio de sensibilidad se realizó mediante los sistemas automatizados Vitek 2 (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Montana, EEUU) o Microscan (Dade Behring MicroScan, West Sacramento, CA, EEUU) y mediante la técnica de disco difusión.

3.3.1. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos mediante métodos automatizados

Los sistemas automatizados como el Vitek y el Microscan, además de contener los sustratos de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana, presentan diversos antimicrobianos a diferentes concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y el antibiograma del microorganismo sujeto de estudio.

3.3.2. Estudio de sensibilidad a agentes antimicrobianos mediante la técnica de disco difusión

La técnica de disco difusión se llevó a cabo en agar Mueller-Hinton (bioMérieux, Hazelwood, Montana, EEUU) con tabletas de antimicrobianos Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica S/A, Taastrup, Denmark), siguiendo la normativa del CLSI¹²⁵. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), piperacilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), cefoxitina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20+10 µg), piperacilina-tazobactam (100+10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), sulfonamidas (240 µg), trimetoprim (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25+23,75 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), tobramicina (10 µg), amikacina (30 µg) y estreptomina (10 µg). Tras 18-24 horas de incubación a 37°C se leyeron e interpretaron los halos de inhibición según los criterios establecidos por el CLSI¹²⁵.

Se compararon los resultados obtenidos entre diferentes aislados y con estudios previos mediante análisis estadístico. Se utilizó el test *chi* cuadrado para comparar variables categóricas y el test *t* de Student o de Mann-Whitney para comparar variables continuas. Todos los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. El *software* IBM-SPSS (V21) se utilizó para el análisis.

3.4. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LAS BETALACTAMASAS DE TIPO AmpC

Para la detección fenotípica de betalactamasas de tipo AmpC en *E. coli* se utilizaron pruebas basadas en la técnica de disco difusión que incluyen la técnica de aproximación de discos para detectar el carácter inducible de la betalactamasa y la observación de colonias dentro de los halos de inhibición^{126,127}.

3.4.1. Técnica de aproximación de discos

Consiste en situar un disco con un betalactámico inductor débil (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam) cercano a otro con un betalactámico inductor fuerte (imipenem, cefoxitina). El achatamiento del halo del betalactámico inductor débil en la zona adyacente al del inductor fuerte demuestra la expresión inducible de la betalactamasa (Figura 22).

3.4.2. Presencia de colonias en los halos de inhibición

La presencia de colonias dispersas en el borde de los halos de inhibición de cefotaxima, ceftazidima y aztreonam se ha descrito como característica altamente sugestiva de la presencia de betalactamasas AmpCa¹²⁶ (Figura 20).

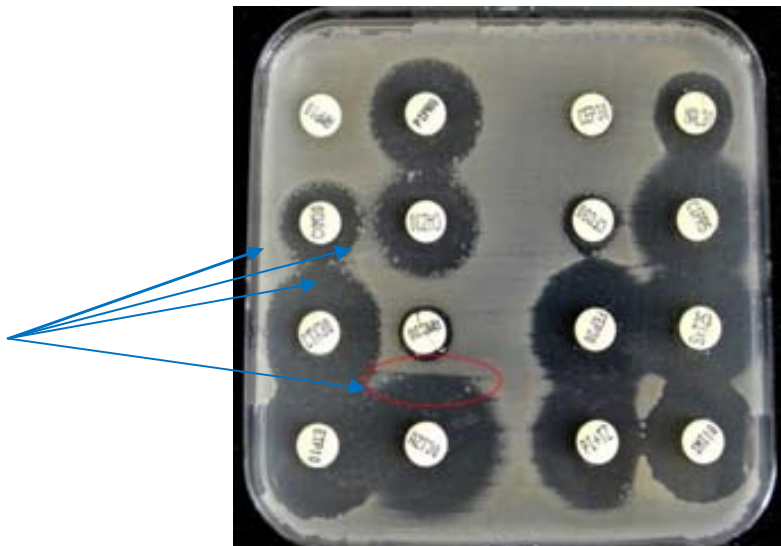


Figura 20. Antibiograma de un aislado de *E. coli* portador de una betalactamasa inducible DHA-1, en el cual se puede observar un halo de inhibición cortante en el aztreonam (señalado con un círculo rojo) y colonias dispersas en el borde de los halos de inhibición de ceftazidima, cefotaxima y aztreonam (señalados en azul).

3.5. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE GENES DE RESISTENCIA

Se llevó a cabo la detección de los genes de resistencia que codifican las betalactamasas de amplio espectro y de espectro ampliado *bla*_{TEMt}, *bla*_{SHVt}, *bla*_{CTX-M-9t} y *bla*_{CTX-Mt}, las betalactamasas de tipo AmpC *bla*_{ACCt}, *bla*_{FOXt}, *bla*_{DHA}, *bla*_{MOXt}, *bla*_{CITt}, *bla*_{CMY-2t}

y bla_{DHA-1t} , el gen *ampC* de *E. coli* y los determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas (PMQR) *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac-6'-Ib-cr* y *qepA*.

El procedimiento a seguir para la caracterización genotípica de los genes de resistencia se divide en diferentes fases:

- Extracción del DNA bacteriano
- Reacción de amplificación (PCR)
- Separación de los fragmentos de DNA amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa
- Purificación del DNA amplificado y secuenciación
- Análisis de los resultados

3.5.1. Extracción del DNA

La extracción del DNA se puede realizar por métodos convencionales como la ebullición o mediante kits comerciales. En este caso, se utilizó la extracción por ebullición.

Procedimiento

1. Resuspender una porción de una o dos colonias crecidas en una placa de agar sangre en 100 μ l de agua bidestilada estéril.
2. Utilizar el siguiente programa de ebullición:

Ebullición		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	20'
1	4	∞

3.5.2. Reacción de amplificación (PCR)

La PCR permite la amplificación *in vitro* de grandes cantidades de un fragmento de DNA y se divide en tres etapas que se repiten un número x de veces. La primera etapa o iniciación comprende una desnaturalización térmica del DNA bicatenario para obtener cadenas monocatenarias, las cuales puedan emparejarse con los iniciadores (cadenas sintéticas de DNA, complementarias a los extremos 5' o 3' de cada cadena monocatenaria del fragmento a amplificar). La segunda etapa consiste en la hibridación

entre los iniciadores y el DNA monocatenario diana. Esta hibridación es necesaria ya que la polimerasa requiere una región de DNA de doble cadena para la iniciación de la síntesis de la cadena complementaria a partir de una única cadena. La tercera y última etapa o extensión consiste en la síntesis de las dos cadenas monocatenarias por parte de la Taq polimerasa.

Procedimiento

1. Descongelar el tampón de reacción y la solución de $MgCl_2$ (incluidos en el kit *ExpandTM High Fidelity PCR system*, Roche).
2. Se preparan los dNTPs mezclando 20 μ l de la solución madre de cada oligonucleótido (ATP, CTP, GTP y TTP) a 100 mM en 920 μ l de agua bidestilada estéril, quedando una concentración final de 2 mM.
3. Se preparan los iniciadores (Tabla 6) a una concentración de 10 mM a partir de una solución madre de 100 mM.
4. Preparar la *master mix* siguiendo las proporciones indicadas en las tablas 6 y 7 y alicuotar la cantidad correspondiente de DNA hasta el volumen final de la reacción de PCR, que será de 50 μ l.
5. Colocar los tubos en el termociclador, con el programa de amplificación correspondiente (en la tabla 8 de iniciadores se exponen las condiciones).

Tabla 6. PCR de betalactamasas de amplio espectro, BLEE y PMQR.

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	30,5 μ l
Tampón (10X)	5 μ l
dNTP (2 mM)	5 μ l
Iniciador 1 (10 μ M)	2 μ l
Iniciador 2 (10 μ M)	2 μ l
Taq pol (5 U/ μ l)	0,5 μ l

Tabla 7. PCR de betalactamasas de tipo AmpC.

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	30,5 μ l
Tampón (10X)	5 μ l
dNTP (2mM)	5 μ l
Iniciadores A	3 μ l
Iniciadores B	2,5 μ l
Iniciadores C	2 μ l
Taq pol (5U/ μ l)	0,5 μ l

Iniciadores A consta de los iniciadores: MOXMR, MOXMF, CITMR, CITMF, DHAMR, DHAMF.

Iniciadores B consta de los iniciadores: ACCMR, ACCMF, EBCMR, EBCMF.

Iniciadores C consta de los iniciadores: FOXMR, FOXMF.

La solución madre es de 100 μ M. Por tanto, para la PCR hay que hacer una dilución 1/10. Es decir, para cada mezcla de iniciadores se ponen 10 μ l de cada iniciador y se completa hasta 100 μ l con agua destilada estéril.

3.5.3. Visualización de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa

La separación de los amplificados obtenidos por PCR se realizó mediante electroforesis de corriente continua o convencional con geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Esta técnica se basa en la migración del DNA cargado negativamente hacia un polo positivo dentro de un campo eléctrico uniforme y constante. Permite separar fragmentos de DNA con una medida de entre 10 pb y 50 kb, que migran en el gel en función de su peso molecular. El bromuro de etidio se intercala entre los fragmentos de DNA permitiendo la visualización de los mismos cuando se irradia con una fuente de luz ultravioleta.

Procedimiento

1. Preparar la solución de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X (50mM Tris, 50 mM ácido borónico y 0,2 mM EDTA). Disolver en el microondas y una vez que se ha atemperado, se añade el bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se vierte la mezcla en un molde con los peines.
2. Se retiran los peines y las cintas con las que se ha sellado el molde, y se coloca el gel con el molde en la cubeta de electroforesis.
3. Mezclar 10 μ l de amplificado con 2 μ l de tampón de carga.
4. Se cargan las muestras y el marcador de peso molecular.
5. Correr el gel en tampón TBE 0,5X a 90V (30mA aprox) hasta que las bandas del peso molecular queden bien separadas.
6. Visualizar el gel situándolo en el transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla 8: Iniciadores utilizados para la caracterización de betalactamasas de amplio espectro, BLEE, AmpCa y PMQR, con su temperatura de hibridación.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	T ^a (°C)	Tamaño (pb)	Ref.
<i>bla</i> _{TEMt}	P4	AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG	55	874	128
	P3	AGTGTCGACTTACCAATGCTTAATCAGT			
<i>bla</i> _{SHVt}	SHVA	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	55	1016	129
	SHVB	TCTTCCGATGCCGCCGCGTCA			
<i>bla</i> _{CTX-M-9t}	IATG	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	55	359	130
	ISTOP	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
<i>bla</i> _{CTX-M-AB}	CTX-A	CTTTACCCAGCGTCAGA	55	857	131
	CTX-B	GCGATGTGCAGTACCAAGTAA			
<i>bla</i> _{ACCt}	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	60	346	89
	ACCMR	TTCGCCGAATCATCCCTAGC			
<i>bla</i> _{FOXt}	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	60	190	89
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			
<i>bla</i> _{DHAt}	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	60	405	89
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC			
<i>bla</i> _{MOXt}	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	60	520	89
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGGTGC			
<i>bla</i> _{CITt}	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	60	462	89
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
<i>bla</i> _{CMY-2t}	CMY-2 ATG	ATGATGAAAAAATCGTTATGC	55	1143	132
	CMY-2 STOP	TTGCACTTTTCAAGAATGCGC			
<i>bla</i> _{DHA-1t}	DHA-1A	CTGATGAAAAAATCGTTATC	55	1141	133
	DHA-1B	ATCCAGTGCCTCCAAAATA			
<i>bla</i> _{ampC}	AMPC-F	GATCGTTCTGCCGCTGTG	55	271	134
	AMPC-R	GGGAGCAAATGTGGAGCAA			
<i>qnrA</i>	QnrA Up	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	53	516	135
	QnrA Dn	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
<i>qnrB</i>	QnrB Up	GATCGTAAAAGCCAGAAAGG	53	469	135
	QnrB Dn	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
<i>qnrS</i>	QnrS Up	ACGACATTCGTCAACTGCAA	53	417	135
	QnrS Dn	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
<i>aac-6'-Ib-cr</i>	AAC-6'-Ib-FW	CGCGCGGATCCAAAGTTAGGCATCACA	55	540	135
	AAC-6'-Ib-RV	ACCTGTACAGGATGGAC			
<i>qepA</i>	QepA-F	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	58	596	136
	QepA-R	GTCTACGCCATGGACCTCAC			

3.5.4. Purificación del DNA amplificado y secuenciación

La purificación de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR se realizó mediante el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR clean-up System* (Promega). Este sistema se basa en la habilidad del DNA de unirse a membranas de sílice en presencia de altas concentraciones de sales, permitiendo la eliminación de restos de iniciadores y nucleótidos presentes en el amplificado de DNA. Los purificados fueron secuenciados por la empresa MacroGen Europe (Amsterdam, Holanda).

3.5.5. Análisis de los resultados

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas mediante el software *Vector NTI Advance* (versión 9.0) de Invitrogen y posteriormente, comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ampC* DE *E. coli*

El estudio de la expresión del gen *ampC* se realiza para conocer si éste se encuentra hipereexpresado en una cepa concreta de *E. coli*.

La cuantificación relativa de la expresión de un gen es el método más ampliamente usado. Se basa en la comparación de la expresión del gen *ampC* de la cepa problema con el de una cepa control y con un gen de referencia que en nuestro caso fue el gen *gap* (que codifica la enzima gliceraldehído-3-fosfato). Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922.

3.6.1. Ambiente libre de ribonucleasas

Se debe tener un especial cuidado para evitar la introducción de RNAsas en la preparación de RNA, tanto durante como después de su extracción por lo que se tendrán en cuenta las siguientes precauciones:

- Descontaminar toda la zona de trabajo, así como gradillas, pipetas, centrífuga y agitador con *RNaseZap RNase Decontamination Solution* (Applied Biosystems).
- Utilizar siempre guantes, los cuales se rociarán con la solución anterior y se cambiarán a menudo.
- Utilizar material desechable *RNase-free* (tubos y puntas de pipetas).
- Si se requiere material de cristal se debe mantener a 200°C *overnight* y para material de plástico se debe limpiar primero con 0,1 N NaOH que contenga 1 mM de EDTA y después con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).
- Como el método de autoclavar no es suficiente para inactivar las RNAsas, todas las soluciones deben ser tratadas con 0,1% de DEPC. Añadir 0,1 ml de DEPC a 100 ml de la solución a tratar, agitar vigorosamente e incubarla durante 12 horas a 37°C. A continuación se debe autoclavar o hervir a 100°C durante 15' para eliminar cualquier traza de DEPC.
- Se debe trabajar siempre en hielo para evitar la degradación del RNA.

3.6.2. Extracción del RNAm total bacteriano

La extracción de RNA mensajero bacteriano se lleva a cabo con el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). El procedimiento es el siguiente, utilizando tres réplicas por muestra.

Procedimiento

Pasos previos a la extracción:

- Cultivar una colonia de la cepa de estudio en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) *overnight* a 37°C con agitación suave.
 - Añadir 50 µl de dicho cultivo a 5 ml de medio LB nuevo e incubar durante 2 o 3 horas a 37°C con agitación suave hasta obtener una O.D_{600nm} (densidad óptica a λ=600 nm) de aproximadamente 0,5 (ajustar 1 ml con LB).
 - Tampón TE (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8) conteniendo 1 mg/ml de lisozima.
 - Tampón de lisis (RLT) + β-mercaptoetanol: Añadir 10 µl de β-mercaptoetanol por 1 ml de tampón RLT (esta solución es estable durante 1 mes).
1. Añadir 500 µl de cultivo a un tubo con 1 ml de *RNAprotect Bacteria Reagent*. Agitar 5" e incubar 5' a temperatura ambiente.
 2. Centrifugar durante 10' a 5.000 g.
 3. Decantar el sobrenadante y eliminar el sobrenadante residual dejando el tubo invertido sobre papel (no eliminar con pipeta).

4. Añadir 100 µl de tampón TE.
5. Agitar 10" e incubar a temperatura ambiente 5' (incubar con agitación o agitar 10" al menos cada 2').
6. Añadir 350 µl de tampón de lisis RLT + β-mercaptoetanol (1/100) y agitar vigorosamente. Si existe material particulado visible, centrifugar y utilizar el sobrenadante.
7. Añadir 250 µl de etanol (96-100%) y mezclar con pipeta.
8. Transferir 700 µl del lisado (sin incluir el precipitado que se pueda haber formado) a una columna de RNeasy Mini con su tubo colector de 2 ml. Cerrar la tapa y centrifugar 15" al menos a 8.000 g (10.000 rpm). Desechar el líquido y reutilizar el tubo para el siguiente paso.
9. Añadir 350 µl del tampón de lavado RW1 a la columna y centrifugar 15" a ≥ 8.000 g. Descartar el líquido.
10. Añadir 10 µl de DNAsa a 70 µl de tampón RDD. Mezclar invirtiendo el tubo (no agitador) y hacer un pulso de centrifuga para bajar el líquido residual de las paredes del tubo.
11. Añadir la mix de DNAsa I (80 µl) directamente en la membrana de la columna e incubar a temperatura ambiente 15'.
12. Añadir 350 µl del tampón de lavado RW1 a la columna, esperar 5' y, centrifugar 15" a ≥ 8.000 g. Descartar el líquido y el tubo colector.
13. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml. Añadir 500 µl de tampón de lavado RPE y centrifugar 15" a ≥ 8.000 g. Descartar el líquido.
14. Añadir 500 µl de tampón de lavado RPE y centrifugar 2' a ≥ 8.000 g. Desechar el líquido y el tubo.
15. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml. Añadir 30-50 µl de agua RNase-free y centrifugar 1' a ≥ 8.000 g.
16. Ajustar la concentración de RNA a 50 ng/µl y almacenar a -80°C.

3.6.3. Síntesis de DNAc y qRT-PCR

La PCR en tiempo real es un método basado en la detección de fluorescencia de los amplicones de DNA obtenidos en cada ciclo durante la PCR. Se usa el termociclador Rotor-Gene 3000 (*Corbett Research*) y los kits *High-capacity cDNA Reverse Transcription kit* (*Applied Biosystems*) para la síntesis de DNAc y *qPCR Mastermix Plus* (*Eurogentec*) para la PCR en tiempo real.

A través de esta técnica, se puede determinar la expresión de un gen en diferentes cepas, comparando los resultados obtenidos con uno basal. En resumen, en el total de RNA obtenido (después de haberlo ajustado a 50 ng/µl), habrá una cantidad de RNAm del gen dado que será el responsable de su expresión. Por medio de la reacción de la reverso-transcripción, este RNAm da lugar a DNAc, que será el molde para la reacción de

la PCR en tiempo real. Cuanto más expresado esté el gen, la señal de fluorescencia de la amplificación por PCR pasará antes el umbral (*threshold*) y será detectado por el aparato. El valor del CT (*cycle threshold*) obtenido por el Rotor-Gene será proporcional a la cantidad de RNAm del gen.

Una vez el RNA purificado y ajustado a 50 ng/μl, se realiza la reacción de síntesis de DNAc.

Procedimiento

1. Preparar la mezcla para un volumen final de 20μl.

Reactivo	Volumen por muestra
Agua libre de nucleasas	4,2 μl
Tampón RT (10X)	2 μl
25X dNTP Mix	0,8 μl
10X Random primers	2 μl
Transcriptasa reversa	1 μl
RNA	10 μl

2. Con el siguiente programa de termociclador:

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	25	10
1	37	120
1	85	5
1	4	∞

Ajustar la concentración que se obtiene de DNAc a 200 ng/μl.

qRT-PCR

Procedimiento

1. Preparar una mezcla de los reactivos para cada gen a analizar .

Reactivo	Volumen por muestra
Agua libre de nucleasas	5 μl
Tampón (2X)	25 μl
Sondas	5 μl
Iniciadores (2X)	5 μl
cDNA	5 μl

2. Utilizar el siguiente programa de termociclador:

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	50	2
1	95	10
40	95	5
	60	1
1	50	∞

3.6.4. Cálculo e interpretación de resultados

Los resultados se calcularon mediante el método Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)¹³⁷. Se trata de un método simple basado en la comparación directa de los valores de Ct del gen problema (*ampC*) y del gen de referencia (*gap*). En primer lugar se calcula la variación de Ct (ΔCt) del gen problema y del gen de referencia entre la cepa control (*E. coli* ATCC 25922) y la cepa problema. Después, se calcula el valor de la diferencia entre las variaciones de Ct ($\Delta\Delta Ct$):

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{ampC} - Ct_{gap})_{ATCC} - (Ct_{ampC} - Ct_{gap})_{PROBLEMA}]$$

La expresión relativa normalizada de la muestra es igual a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y este valor puede ser usado para comparar los niveles de expresión de las muestras. Al analizar cada muestra por triplicado, se calculó la media aritmética de los tres valores. Agrupadas las muestras en función a su perfil de mutaciones se calculó la mediana de los valores de cada muestra como el incremento representativo de cada grupo.

El test estadístico de Mann-Whitney y su extensión, el test de Kruskal-Wallis, se utilizaron para comparar los resultados obtenidos mediante el *software* IBM-SPSS (V21). Todos los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3.7. RELACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LAS CEPAS

La técnica utilizada para estudiar la relación epidemiológica entre las cepas fue la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Esta técnica permite establecer la relación epidemiológica entre aislados y, por tanto, determinar si son derivados recientes de un ancestro común. Permite, así mismo, diferenciar aislados no relacionados dentro de una misma especie o taxón.

3.7.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La técnica de PFGE está basada en la digestión del DNA cromosómico en fragmentos de gran tamaño con enzimas de restricción y la separación mediante una técnica especial de electroforesis en la que se aplican campos eléctricos que regularmente cambian de dirección. Esta alternancia de campos eléctricos provoca que las moléculas de DNA cambien de conformación y se orienten en función del campo eléctrico, permitiendo de esta manera su migración en una trayectoria de zig-zag a lo largo del gel. Estos fragmentos no pueden ser separados mediante electroforesis convencional, la cual presenta un campo eléctrico uniforme y constante y con un límite de resolución máxima de 50 Kb.

El procedimiento utilizado viene definido por la metodología para el sistema de PFGE CHEF-DRII (o DRIII) de BioRad.

Para este tipo de análisis electroforético se necesita obtener el DNA lo más intacto posible, evitando al máximo las rupturas mecánicas. Por eso, se han desarrollado métodos de extracción de DNA en los cuales el proceso de lisis celular se realiza en bloques de agarosa (insertos). La matriz de estos bloques protege las moléculas de alto peso molecular y al mismo tiempo permite la difusión de detergente y proteasas. El DNA se digiere con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte que dan lugar a un número relativamente pequeño de fragmentos de restricción de alto peso molecular (no inferior a 10).

Mediante este procedimiento se consigue dividir el cromosoma bacteriano en patrones sencillos (de 10 a 20 bandas), lo cual facilita la comparación de unos aislados con otros, permitiendo establecer grados de similitud genética entre las bacterias estudiadas.

El procedimiento consta de las siguientes fases: 1) preparación de los insertos y lisis celular, 2) lavado de los insertos, 3) digestión enzimática del DNA cromosómico, 4) electroforesis de los fragmentos de restricción y 5) tinción y visualización del DNA.

Procedimiento

1. Preparación de los insertos y lisis celular

1. Sembrar las cepas en placas de agar sangre, incubar a 37°C 24 horas.
2. Preparar agarosa al 1% en TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8). Emplear 100 µl por inserto (hacer entre 3 y 5 insertos por cepa). Disolver la agarosa en TE. Una vez disuelta, mantener la agarosa en el *heatblocker* a unos 52-55°C para evitar que se solidifique.
3. Resuspender diversas colonias de la cepa en 1 ml de tampón CSB (Tris 100 mM-EDTA 100 mM; pH 7,5).
4. Dispensar 250 µl de la suspensión bacteriana en un eppendorf de 1,5 ml, añadir 1,5 µl de proteinasa K (50 mg/ml).
5. Mezclar suavemente 250 µl de la suspensión bacteriana con 250 µl de agarosa.
6. Limpiar los moldes para la formación de los insertos con agua destilada y etanol al 96%. Dejar secar y sellar la parte inferior con cinta adhesiva transparente.
7. Dispensar 100 µl en cada bloque del molde, con cuidado de no hacer burbujas.
8. Dejar solidificar los insertos en la nevera como mínimo 15'.
9. Dispensar para cada muestra 2 ml de solución de lisis Clysris B (Tris 50 mM, EDTA 50 mM y Sarkosyl 1%; pH 7,5) en un tubo de vidrio estéril de 5 ml o similar. Añadir 12 µl de proteinasa K (50 mg/ml). Poner los insertos solidificados en la solución de lisis e incubar en un baño a 55°C con agitación durante dos horas.

2. Lavado de los insertos

1. Atemperar a 37°C una botella de agua destilada estéril y una con tampón TE.
2. Para cada cepa estudiada preparar un tubo de vidrio con 2 ml de agua destilada estéril temperada, añadir un inserto y ponerlo al baño a 55°C en agitación durante unos 10'. Cambiar el agua destilada estéril y repetir el lavado.
3. Cambiar el agua destilada estéril por 2 ml de TE y dejarlo en el baño en agitación a 55°C unos 10'. Repetir el lavado dos veces más cambiando el TE.
4. Conservar los insertos en un eppendorf con 1ml de TE en la nevera, si no se va a seguir con la digestión a continuación.

3. Digestión enzimática del DNA cromosómico

La digestión enzimática del DNA, igual que la lisis celular, tiene lugar en el mismo inserto gracias a la difusión de la enzima a través de la matriz de agarosa. Las enzimas que se utilizan para el análisis de restricción del DNA cromosómico en PFGE son endonucleasas de baja frecuencia de corte, obteniendo de esta forma un número limitado de fragmentos de alto peso molecular. La elección de la enzima dependerá del contenido en G+C del genoma de la especie

bacteriana a estudiar, de la secuencia diana de restricción, y de la medida y número de fragmentos obtenidos.

Para la digestión de un fragmento del inserto de aproximadamente 1mm de grosor, se utilizan 30 unidades de enzima en un volumen total de 200 μ l, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

1. Preparar la siguiente mezcla de lisis:
 - 144 μ l de agua destilada estéril
 - 20 μ l de tampón de restricción 10X
 - 2 μ l de albúmina sérica bovina
 - 1/3 parte del inserto (cortado de forma longitudinal)
 - 30 U de la enzima de restricción, en el caso de *E. coli* se utilizará *Xba*I
2. Incubar en un baño a 37°C sin agitación unas 18 horas.
3. Guardar en la nevera 30' antes de proceder con la electroforesis.

4. Electroforesis de los fragmentos de restricción

1. Preparar un gel de agarosa (Seakem[®] - Inderlab) al 1% en 200 ml de TBE 0,5X.
2. Montar la base para hacer el gel, colocar el peine y añadir la agarosa especial reservando un poco para poder sellar después los pocillos.
3. Dejar enfriar el gel unos 30' hasta que se solidifique bien.
4. Colocar en cada pocillo cada uno de los insertos dejando un pocillo en cada extremo del gel para colocar los marcadores de peso molecular (*Lambda ladder PFGE marker-Roche*).
5. Sellar los pocillos con la agarosa sobrante usada para hacer el gel.
6. Añadir a la cubeta de electroforesis del CHEF, entre 2,3 y 2,5 litros de TBE 0,5X, y encender la bomba del CHEF, dejándolo en posición 80-90.
7. Encender la unidad de refrigeración del CHEF (*cooling module*), pulsar SET y programar la temperatura a 14°C.
8. Desmontar la base y dejar el gel solamente con la base negra, y con un papel limpiar esta base por debajo para eliminar la agarosa que haya quedado.
9. Cuando la temperatura de la cubeta llegue a 14°C colocar el gel.
10. Programar las condiciones de electroforesis y parámetros del *CHEF DRIII Power Module*. El ángulo de electroforesis será de 120° y el voltaje de 6 vols/cm.

Las condiciones de electroforesis varían según la especie a estudiar y la enzima utilizada. Para *E. coli*, las condiciones fueron las siguientes:

Bloque 1: 5-25" (6 horas) Bloque 2: 30-45" (18 horas)

Modificación de la electroforesis: Si se sospecha que se puede lisar el DNA bacteriano añadiremos tiourea 75 μ M al tampón TBE 0,5X en el punto 6.

5. Tinción y visualización del DNA

Una vez finalizada la electroforesis:

1. Colocar el gel en una cubeta de plástico con unos 500 ml del tampón que hemos quitado del CHEF.

2. Agitar suavemente y añadir 40 µl bromuro de etidio (0,4 µg/ml), repartir homogéneamente.
3. Revelar el gel y fotografiar.

3.7.2. Cálculo e interpretación de los resultados

La lectura e interpretación de los resultados se hace sobre la foto del gel. En general, para establecer la relación genética de un grupo de aislados en los que se ha establecido una posible vinculación epidemiológica se siguen los criterios definidos por Tenover *et al.* en 1995¹³⁸:

- si las cepas tienen patrones idénticos pertenecen al brote
- si las diferencias son de hasta tres bandas los aislados forman probablemente parte de un brote
- si hay entre cuatro y seis bandas de diferencia posiblemente forman parte del brote
- a partir de siete bandas de diferencia se consideran aislados diferentes.

Cuando se trata de un número elevado de cepas, la comparación de los patrones se realiza mediante el software de análisis de imágenes *Bioinformatics* (BioRad). En este caso, los geles se normalizan con el marcador de peso molecular antes mencionado. Los niveles de homología entre los patrones se calculan mediante el coeficiente de similitud Dice (S_D) y el análisis de homología de las matrices se calcula utilizando el método UPGMA.

3.8. DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS

3.8.1. Determinación de grupos filogenéticos mediante el método Clermont

En el año 2000, Clermont *et al*¹³⁹ describieron un método rápido y sencillo para determinar los grupos filogenéticos en *E. coli*. Esta técnica se basa en una PCR triple en la cual se amplifican los genes *chuA*, (requerido para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7), *yjaA* (identificado en *E. coli* K-12) y el fragmento de DNA TSPE4.C2. La determinación del grupo filogenético se realiza siguiendo un árbol dicotómico en función de los fragmentos amplificados (Figura 21).

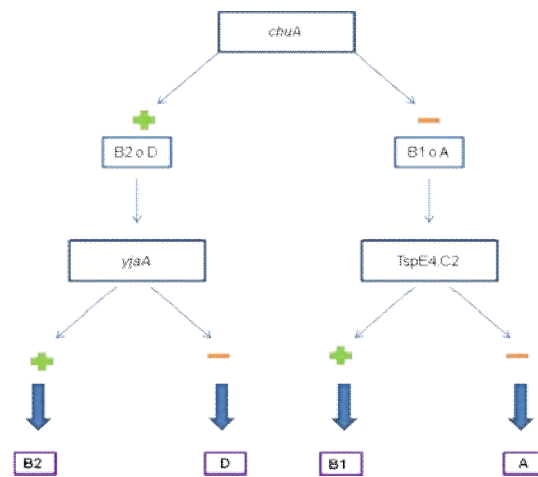


Figura 21. Árbol dicotómico descrito por Clermont *et al* para la interpretación de la PCR triple.

Procedimiento.

1. Realizar una mezcla de los iniciadores (Tabla 9) para la amplificación de los tres genes marcadores.

Tabla 9. Iniciadores utilizados para la determinación de los grupos filogenéticos según Clermont *et al*¹³⁹ y su temperatura de hibridación para la PCR.

Gen	Secuencia iniciador (5' - 3')	Tamaño amplificado (pb)	T _m (°C)
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	55
	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTGACGGAGACGCTG	211	55
	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TSPE4.C2	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	55
	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

- Preparar la mezcla de amplificación para un volumen de 50 μ l.

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	32 μ l
Tampón (10X)	5 μ l
dNTP (2 mM)	5 μ l
Mezcla de iniciadores (10 μ M)	2,5 μ l
Taq pol (5 U/ μ l)	0,5 μ l
DNA	5 μ l

- El programa de PCR se realiza en base a las condiciones descritas en la tabla 9.
- Cargar los amplificados en un gel de electroforesis al 2%.
- Interpretar los resultados según el patrón de bandas obtenido para cada muestra (Figura 22).

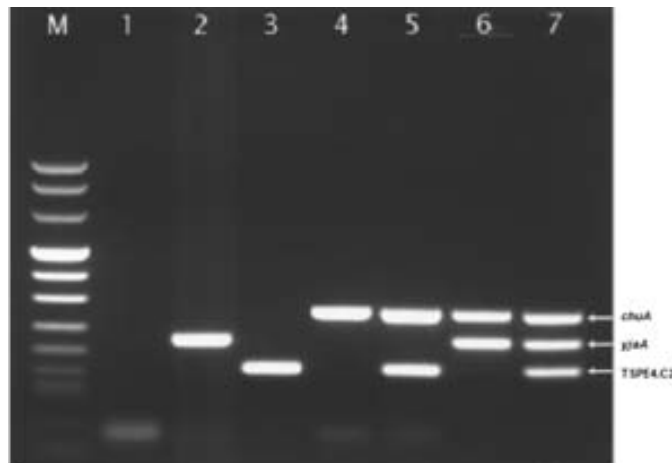


Figura 22. Patrones de bandas obtenidos por la PCR triple de Clermont *et al*¹³⁹. Líneas 1 y 2, grupo A; línea 3, grupo B1; líneas 4 y 5, grupo D; líneas 6 y 7, grupo B2; línea M, marcador de peso molecular. Figura extraída de Clermont *et al*¹³⁹.

3.8.2. Modificación de la técnica de Clermont

En el año 2012, Doumith *et al*¹⁴⁰ encontraron incongruencias en los resultados al utilizar el método de Clermont al compararlos con resultados obtenidos por MLST (*multilocus sequence typing*). Observaron una baja eficiencia de amplificación que provocaba asignar aislados en filogrupos anómalos. Tras analizar un número de secuencias de cada uno de los tres marcadores asignados, observaron la existencia de polimorfismos en las regiones amplificadas.

Diseñaron nuevos iniciadores para amplificar regiones conservadas de los tres marcadores, además de añadir un cuarto par de iniciadores específicos para el gen

glutamato decarboxilasa-alfa (*gadA*) de *E. coli*, como control interno de amplificación. En la técnica original no se incluía un control interno, pero decidieron incluirlo para permitir una mayor confianza al asignar aislados al filogrupo A basado en la ausencia de los tres marcadores.

Al igual que con la técnica de Clermont, el procedimiento se basa en la realización de una PCR utilizando los iniciadores mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Iniciadores utilizados para la determinación de los grupos filogenéticos según Doumith *et al*¹⁴⁰ y temperaturas de hibridación para la PCR.

Gen	Secuencia iniciador (5' - 3')	Tamaño amplificado (pb)	T _m (°C)
<i>gadA</i>	FW: GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373	65
	RV: GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC		
<i>chuA</i>	FW: ATGATCATCGCGCGTGCTG	281	65
	RV: AAACGCGCTCGCGCCTAAT		
<i>yjaA</i>	FW: TGTTTCGCGATCTTCAAAGCAAACGT	216	65
	RV: ACCTGTGACAAACCGCCCTCA		
TSPE4.C2	FW: GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152	65
	RV: TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG		

Procedimiento

1. Preparar una mezcla de amplificación para un volumen de 22,5 µl.

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	12 µl
Tampón (10X)	2,5 µl
dNTP (200 µM)	2,5 µl
Mezcla de iniciadores (10 pmol)	2,5 µl
Taq pol (5U/µl)	0,5 µl
DNA	2,5 µl

2. El programa de PCR se realiza en base a las condiciones descritas en la tabla 10.
3. Cargar en un gel de electroforesis al 2%.
4. Interpretar los resultados de la misma forma que describieron Clermont *et al*¹³⁹.

3.8.3. Técnica de Clermont actualizada

En 2013, Clermont *et al* introdujeron modificaciones en su método del año 2000 que mejoraban la especificidad y permitían la detección de nuevos filogrupos¹³. Gordon *et*

al realizó una comparación de los resultados obtenidos con la técnica de Clermont del año 2000 y con MLST¹⁴¹. Se observó que entre un 80 y un 85% de los filogrupos asignados eran correctos y que una fracción significativa de cepas asignadas a los filogrupos A y D eran incorrectamente asignados.

Además, fueron descubiertos nuevos filogrupos: el filogrupo E, que está formado por un pequeño grupo de cepas entre las cuales se encuentra *E. coli* enterohemorrágico O157:H7; el grupo filogenético F, que consiste en un grupo hermano al grupo B2; y el grupo C, propuesto como un grupo relacionado pero diferente del grupo B1¹³.

Con estos factores presentes, desarrollaron el nuevo método Clermont que mantenía los mismos genes diana (*chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2) y fragmentos de tamaño similar pero evitando los posibles polimorfismos. Además, fue añadido *arpA* como nuevo gen diana, convirtiendo el nuevo método en una PCR cuádruple. La adición de *arpA* se realizó con el fin de actuar como un control interno y para incluir dentro del grupo F a cepas erróneamente categorizadas dentro del grupo D, ya que *arpA* está presente en todos los *E. coli* excepto en las cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos B2 y F. Para identificar cepas pertenecientes a los grupos filogenéticos C y E se utilizan dos pares de iniciadores adicionales específicos para estos alelos como PCR simple además de amplificar como control interno el gen *trpA*.

Del mismo modo que en los dos casos anteriores, se realiza una PCR cuádruple con los iniciadores mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Iniciadores utilizados para la determinación de los grupos filogenéticos según Clermont *et al*¹³ y temperaturas de hibridación para la PCR.

Reacción de PCR	Iniciador	Diana	Secuencia iniciador (5' - 3')	Tamaño (pb)	T _m (°C)
Cuádruple	chuA. 1b	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	59
	chuA.2		TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	yjaA. 1b	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	59
	yja.2b		AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
	TspE4C2. 1b	TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	59
	TspE4C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
	Acek.f	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	59
	ArpA1.r		TCTCCCCATACCGTACGCTA		
Grupo E	ArpAgpE.f	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	57
	ArpAgpE.r		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG		
Grupo C	trpAgpC. 1	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219	59
	trpAgpC.2		TCTGCGCCGGTCACGCC		
Control interno	trpBA.f	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	57/59
	trpBA.r		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

Procedimiento

1. Preparar la mezcla de amplificación para un volumen 20 μ l.

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	11,9 μ l
Tampón (10X)	2 μ l
dNTP (200 μ M)	2 μ l
Mezcla de iniciadores (10 pmol)	2 μ l
Taq pol (5 U/ μ l)	0,1 μ l
DNA	2 μ l

2. Cargar los amplificados en un gel de agarosa al 2%.
3. Interpretar los resultados en función de su perfil de bandas (Figura 25). En el caso de los perfiles coincidentes para A y C, y D y E; se debe realizar una segunda PCR específica para grupos E y C (si existe un amplificado positivo corresponderá a los grupos E o C, y si es negativo a los grupos D o A)

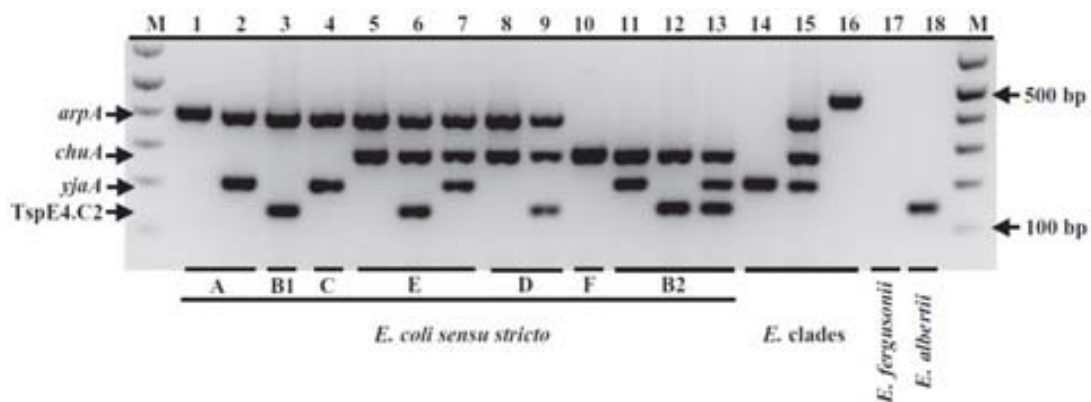


Figura 23. Patrones de bandas obtenidos por la PCR cuádruple de Clermont en 2013 que diferencia los grupos filogenéticos de *E. coli*. Figura extraída de Clermont *et al*¹³.

3.9. CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS

Para la caracterización plasmídica se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Caracterización de los grupos Inc
2. Análisis del DNA plasmídico
3. *Southern Blot*
4. Hibridación del DNA plasmídico con sondas específicas de los genes *bla* y de los grupos Inc correspondientes.

3.9.1. Caracterización de los grupos Inc

Los grupos Inc de los plásmidos portadores de los genes *bla* se determinaron mediante la técnica de PCR descrita por Carattoli *et al* denominada PBRT (*Plasmid-based Replicon Typing*)⁶⁰. Esta técnica ofrece la posibilidad de identificar de forma específica los 18 replicones más frecuentes en enterobacterias descritos previamente por Couturier *et al* en 1988¹⁴².

Se basa en la realización de cinco PCR múltiples que amplifican 3 replicones cada una y tres PCR simples (Tabla 12). La técnica de Carattoli no incluía los replicones IncColE, IncU ni IncR, pero tiempo después García-Fernández *et al* determinaron su identificación también usando PBRT¹⁴³.

Para llevar a cabo esta técnica se sigue el procedimiento descrito anteriormente para la extracción de DNA y de PCR. Los iniciadores y las condiciones de la PCR se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Iniciadores y condiciones utilizadas para la técnica de PBRT.

PCR	Grupo Inc	Iniciador	Secuencia (5'-3')	T ^a (°C)	Tamaño (pb)
Múltiple 1	HI1	HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	60	471
		HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
	HI2	HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC		644
		HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
	I1	I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA		139
		I1 RV	TCGTGTTCCGCCAAGTTCGT		
Múltiple 2	X	X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	60	376
		X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
	L/M	L/M FW	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG		785
		L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
	N	N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG		559
		N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
Múltiple 3	FIA	FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	60	462
		FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
	FIB	FIB FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG		702
		FIA RV	CTCCCGTCGCTTACGGGCATT		
	W	W FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG		242
		W RV	GGTGCGCGCATAGAACCGT		
Múltiple 4	Y	Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	60	765
		Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
	P	P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA		534
		P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
	FIC	FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG		262
		FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT		
Múltiple 5	A/C	A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	60	465
		A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
	T	T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT		750
		T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
	FII _s	FII _s FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC		270
		FII _s RV	CTCTGCCACAACTTCAGC		
Simple	F	F _{repB} FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	52	270
Simple		F _{repB} RV	GAAGATCAGTCACACCATCC		
Simple	K	K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	60	160
Simple		K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
Simple	B/O	B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	60	159
Simple	ColE	oricoIE FW ^a	GTTCGGCATAACAGTCCA	55	187
		oricoIE RV	GGCGAAACCCGACAGGAC		
Simple	U	IncU FW	TCACGACACAAGCGCAAGGG	55	843
		IncU RV	TCATGGTACATCTGGGCGC		
Simple	R	IncR FW	TCGCTTATTCTGCTTCAGC	55	251
		IncR RV	GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA		

3.9.2. Análisis del DNA plasmídico

Para el análisis del DNA plasmídico se utiliza la técnica descrita por Barton *et al*, la cual consiste en la migración del DNA plasmídico mediante PFGE tras digestión con la endonucleasa S1¹⁴⁴. Esta enzima transforma el DNA plasmídico superenrollado en DNA lineal, permitiendo así su migración en el gel en función de su peso molecular.

La técnica es similar a la descrita para el estudio de la epidemiología en el Apartado 3.7, pero con algunas variaciones. La preparación de los insertos y su lavado se realiza del mismo modo, excepto por la cantidad de masa bacteriana utilizada, en este caso es muy superior.

Una vez lavados los insertos, se procede a la digestión con la endonucleasa S1

Procedimiento

1. Cortar 1/3 del inserto y depositar en un tubo con 1 ml de Tris-HCl 10mM durante 10'. Repetir este paso.
2. Digerir el inserto con la enzima S1. Realizar una mezcla de 200 µl de tampón S1 (acetato de sodio 30 mM, NaCl 50 mM y sulfato de zinc 5 mM) con 0,28 µl de una dilución 1/100 de enzima S1. Incubar la digestión en un baño a 37°C durante 45'.
3. Eliminar la solución y añadir 100 µl de tampón ES (EDTA 0,5 mM, SLS 1%; pH 9,5) y colocar el tubo en hielo durante un mínimo de 15'.
4. La separación y visualización de los plásmidos mediante PFGE se realiza del mismo modo que se ha explicado anteriormente con las condiciones de un bloque de 5-25" durante 6 horas, seguido de un segundo bloque de 30-45" durante 18 horas.

3.9.3. Southern Blot

Consiste en la transferencia de los fragmentos de DNA, separados electroforéticamente, a una membrana de nylon donde quedarán accesibles a la sonda marcada en el proceso de hibridación. La transferencia se facilita tratando el gel con ácido clorhídrico, fragmentando el DNA en porciones pequeñas. Con el tratamiento ácido se produce la despurinización parcial en determinados puntos que se romperán posteriormente con el tratamiento alcalino dando lugar a fragmentos más pequeños (~1kb) que se transferirán con mucha más eficacia.

Procedimiento

1. Preparación del gel

1. Bañar el gel durante 5 minutos en agua bidestilada en agitación para eliminar los restos de bromuro de etidio.
2. Eliminar el agua y colocar el gel con 500 ml de solución de desnaturalización (HCl 0,25 M) durante 25' en agitación.
3. Lavar el gel en agua bidestilada durante 5' en agitación.
4. Eliminar el agua y cubrir el gel con la solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5M) durante 30' en agitación.
5. Lavar el gel con agua destilada 5' en agitación.
6. Eliminar el agua y cubrir el gel con la solución de neutralización (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M; pH 7,5) durante 30' en agitación.

2. Preparación de la membrana

1. Cortar la membrana Hybond N+ y el papel Whatmann 3 mm a la medida del gel, dejando 1 cm por cada lado.
2. Humedecer el papel Whatmann en una cubeta con SSC 2X [dilución 1/10 de la solución SSC 20X (citrato trisódico 0,3 M, NaCl 3 M; pH 7)] y colocar sobre el soporte poroso de la unidad de transferencia (BioRad).
3. Colocar la membrana Hybond N+ humedecida con SSC 2X sobre el papel Whatmann.
4. Colocar la ventana de plástico sobre la membrana haciendo coincidir el hueco donde se depositará el gel, marcando los extremos de la ventana.

3. Transferencia

1. Una vez transcurridos 30' de neutralización, lavar el gel con agua destilada durante 5' y transferir al aparato de transferencia, centrándolo sobre la ventana y evitando la formación de burbujas.
2. Sellar los laterales con agarosa y colocar el *sealing frame* para cerrar el aparato.
3. Conectar la bomba de vacío y ajustar la presión a 3-4 inc. Hg.
4. Verter el tampón de transferencia (SSC 10X) sobre la parte superior del gel (no sumergir). Repetir este paso cada media hora.
5. Transferir durante 3 horas aproximadamente.
6. Retirar el gel y pasarlo a la cubeta con bromuro de etidio para comprobar posteriormente si se ha transferido el DNA correctamente.

4. Post-transferencia

1. Lavar la membrana durante 2' con SSC 2X.
2. Colocar la membrana sobre un papel de filtro y mantener en un horno a 80°C durante 30'.

3.9.4. Hibridación del DNA plasmídico con sondas específicas de los genes *bla* y de los grupos Inc correspondientes.

Para la hibridación y detección se utiliza el kit comercial *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche). El principio fundamental del sistema DIG no radiactivo consiste en el uso de digoxigenina, un hapteno esteroideo, que se une a dUTP, UTP o ddUTP para marcar el DNA, RNA u oligonucleótidos, para la hibridación y subsecuente detección luminiscente.

Las sondas hibridadas son inmunodetectadas con antidigoxigenina (fragmentos Fab conjugados con fosfatasa alcalina) y visualizadas con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Disodium 3-(4-metoxi-spiro{1,2-diox-etano-3,2-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)fenilfosfato). La defosforilación enzimática de CSPD por la fosfatasa alcalina produce una emisión de luz a una longitud de onda de 477 nm. La señal de quimioluminiscencia del CSPD persiste durante días en las membranas de nylon. Así, exposiciones de pocos minutos son suficientes para detectar la señal y permiten conseguir múltiples imágenes.

Procedimiento

1. Calcular la temperatura de hibridación

$$T_m = 49,82 + [0,4 \times (\%G+C)] - (600/\text{longitud de onda})$$

$$T_{\text{óptima}} = T_m \text{ (de 20 a 25°C)}$$

2. Precalentar 20 ml del tampón de hibridación a la temperatura de hibridación calculada (normalmente ajustar a 42°C).
3. Colocar la membrana en un tubo de hibridación y añadir 20 ml de tampón de hibridación previamente atemperados. Incubar en el horno a 42°C con rotación fuerte durante 30'.
4. Calcular el volumen de sonda a desnaturalizar (entre 5 y 25 ng de sonda por ml de tampón de hibridación).
4. Hervir durante 5' (mezclar con agua hasta un volumen final de 50 µl para evitar que se evapore).
5. Colocar en hielo durante 5'. Hacer un pulso con la centrífuga.
6. Añadir la sonda al tampón de hibridación.
7. Incubar *overnight* si se estudia una única diana, si son múltiples, la incubación se puede reducir a 6 horas.
8. Recuperar el tampón de hibridación con la sonda y guardar a -20°C. Para reutilizarlo, desnaturalizar la sonda a 65°C durante 30' (no hervir).
9. Añadir 100 ml de *Low Stringency Buffer* (SSC 2X, 0,1% SDS) en una bandeja y colocar la membrana. Agitar a temperatura ambiente durante 5'. Repetir una segunda vez.

10. Pasar la membrana al tubo de hibridación previamente lavado y añadir 100 ml de *High Stringency Buffer* [para sondas de baja contenido en G+C (SSC 0,5X, 0,1% SDS) o de alto contenido en G+C (SSC 0,1X, 0,1% SDS)] (previamente atemperado a 65°C). Ponerlo en el horno de hibridación con rotación fuerte a 65°C durante 15'. Repetir una segunda vez.
11. Quitar el buffer, añadir 100 ml de *Washing Buffer* 1X [0,1M ácido maleico, 0,15 M NaCl; pH 7,5 (20°C); 0,3% (v/v) Tween 20] y colocar la membrana. Incubar durante 5' en agitación fuerte a temperatura ambiente.
12. Eliminar la solución y añadir 100 ml de *Blocking Solution* 1X durante 10' en agitación suave a temperatura ambiente.
13. Eliminar la solución, pasar la membrana a una bandeja pequeña y añadir 20 ml de *Antibody solution* (2 µl de Anti-digoxigenina-AP + 20 ml de *blocking solution* del paso anterior) e incubar durante 30' en agitación suave a temperatura ambiente.
14. Eliminar la solución y añadir 100 ml de *Washing Buffer* 1X. Incubar 15' en agitación fuerte a temperatura ambiente. Repetir una segunda vez.
15. Eliminar la solución y añadir 25 ml de *Detection Buffer* (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5). Incubar 5' en agitación.
16. Colocar la membrana en una bolsa de hibridación, añadir 2 ml de CSPD y expandirlo evitando formar burbujas.
17. Incubar 5' a temperatura ambiente.
18. Incubar la membrana en la bolsa de hibridación 15 minutos a 37°C para que tenga lugar la reacción de fluorescencia.
19. Colocar la membrana con la bolsa en el GBOX para capturar la imagen.
20. Lavar con SSC 2X.

Deshibridación:

1. Lavar la membrana con agua bidestilada.
2. Lavar la membrana con 100 ml de solución de deshibridación (0,2 M NaOH, 0,1% SDS) durante 15' a 37°C. Repetir una segunda vez.
3. Lavar la membrana con SSC 2X.

3.10. ESTUDIO DE LA RELACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE PLÁSMIDOS

Para analizar la relación epidemiológica de los plásmidos de las familias IncI1 e IncF se utilizaron las técnicas pMLST (*plasmid multilocus sequence typing*)¹⁴⁵ y RST (*replicon sequence typing*)¹⁴⁶, respectivamente.

Ambas técnicas se basan en la amplificación mediante PCR de diferentes genes o regiones diana. La extracción genómica se realiza mediante el kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma).

Procedimiento

1. Resuspender 3 o 4 colonias en 0,5 ml de agua estéril.
2. Centrifugar la suspensión a 16.000 g durante 2'.
3. Resuspender el pellet en 180 µl de solución de lisis T (incluida en el kit) y añadir 20 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml.
4. Homogeneizar con un agitador o pipeta y situarlo en el baño a 55°C durante 30'.
5. Añadir 200 µl de solución de lisis C (incluida en el kit), homogeneizar y situarla en el baño durante 10'.
6. Añadir 500 µl de la solución de preparación (*Column Preparation solution*) a cada una de las columnas de extracción y centrifugar a 12.000 x g durante 1'.
7. Sacar el tubo del baño y añadirle 200 µl de etanol frío para precipitar el DNA. Homogeneizar por inversión.
8. Transferir la solución con el DNA precipitado a la columna y centrifugar a 6.500 g durante 1'.
9. Transferir la columna a un nuevo tubo y añadirle 500 µl de la solución de lavado concentrada (*Wash solution 1*). Centrifugar a 6.500 x g durante 1'.
10. Diluir al 1/10 el DNA obtenido con agua destilada. La dilución puede utilizarse al momento o conservarse en el congelador hasta su uso.

3.10.1. Estudio de plásmidos de la familia IncI1

Para conocer el *sequence type* de los plásmidos de la familia IncI1, se analizan 5 genes diana (*repI1*, *ardA*, *trbA*, *sogS*, *pilC*) utilizando los iniciadores y las condiciones de PCR descritos por García-Fernández *et al* (Tabla 13)¹⁴⁵.

3.10.2. Estudio de plásmidos de la familia IncF

Para conocer el *replicon sequence typing* de los plásmidos de la familia IncF, se analizan las secuencias de FII, FIA, FIB y FIC con los iniciadores y las condiciones de PCR descritos por Villa *et al* (Tabla 13)¹⁴⁶.

Tabla 13. Iniciadores utilizados en pMLST de IncI1 y RST de IncF con sus condiciones

Técnica	Locus	Iniciadores	Secuencias (5'-3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
pMLST IncI1	<i>repl</i>	repl1 Fw	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	142	60
		repl1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
	<i>ardA</i>	ardA FW	ATGTCTGTTGTTGCACCTGC	501	
		ardA RV	TCACCGACGGAACACATGACC		
	<i>trbA</i>	trbA FW	CGACAAATGCTTCCGGGGT	507	
		trb RV	TCTTACAATCGACAGCCTGT		
	<i>sogS</i>	sogS FW	TTCCGGGGCGTAGACAATACT	291	
		sogS RV	AACAGTGATATGCCGTCGC		
<i>piL</i>	piL FW	CCATATGACCATCCAGTGCG	316		
	piL RV	AACCACTATCTCGCCAGCAG			
RST IncF	FII	FII FW	CTGATCGTTTAAGGAATTTT	258-260	54
		FII RV	CACACCATCCTGCACTTA		
	FIA	FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	60
		FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
	FIB	FIB FW	TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC	683	
		FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
	FIC	FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	
		FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		

4. RESULTADOS

4.1. SELECCIÓN Y ORIGEN DE LOS AISLADOS

Entre junio de 2010 y noviembre de 2011, se aislaron un total de 21.563 cepas de *E. coli* en los tres hospitales participantes y sus centros primarios. De éstas, se seleccionaron 240 (1,1%) que presentaban un fenotipo compatible con la presencia de una betalactamasa AmpC. Veinte cepas (8,3%) procedían del Consorci Sanitari de Terrassa, 100 (41,7%) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y 120 (50%) del Hospital Universitario Mútua de Terrassa (Figura 24). Este fenotipo se describe como resistente a penicilinas, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas y sensibilidad disminuida o resistencia a cefalosporinas de tercera generación y aztreonam (Figura 25).

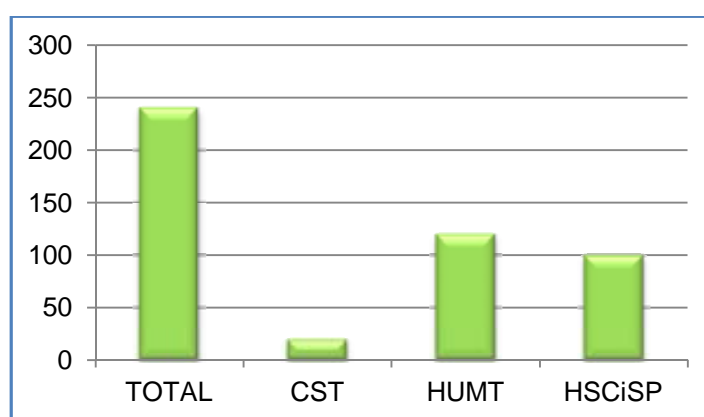


Figura 24. Número de aislados que presentaron un fenotipo compatible con la presencia de una betalactamasa AmpC en cada centro.

CST: Consorci Sanitari de Terrassa; HUMT: Hospital Universitario Mútua de Terrassa; HSCiSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.



Figura 25. Antibiograma compatible con una betalactamasa AmpC hiperproducida (izq) y con una betalactamasa AmpCa CMY2 (dcha).

AMP10: ampicilina; PIPRA: piperacilina; CEP30: cefalotina; NAL20: ácido nalidíxico; CXM30: cefuroxima; CAZ30: ceftazidima; CF030: ceftoxitina; CIPR5: ciprofloxacino; CTX30: cefotaxima; AMC30: amoxicilina-ácido clavulánico; FEP30: cefepime; SxT25: cotrimoxazol; ETP10: ertapenem; AZT30: aztreonam; PI+TZ: piperacilina-tazobactam; IMI10: imipenem.

Las muestras seleccionadas procedían de pacientes con edad media de 71 años y en un 65,1% se trataba de mujeres. El 82,8% de las muestras eran orina y el 7,3% sangre. El 9,9% restante agrupó muestras de diversas procedencias (exudado de herida quirúrgica, abscesos, muestras cutáneas, bilis y muestras respiratorias) (Figura 26).

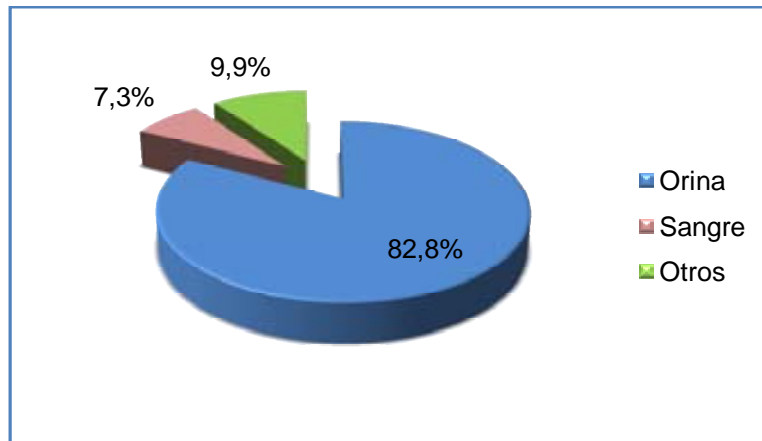


Figura 26. Origen de las muestras en las que se aisló *E. coli* productora de betalactamasas AmpC.

El 42,7% de los casos eran comunitarios, el 40,5% relacionados con la atención sanitaria y el resto nosocomiales (Figura 27).

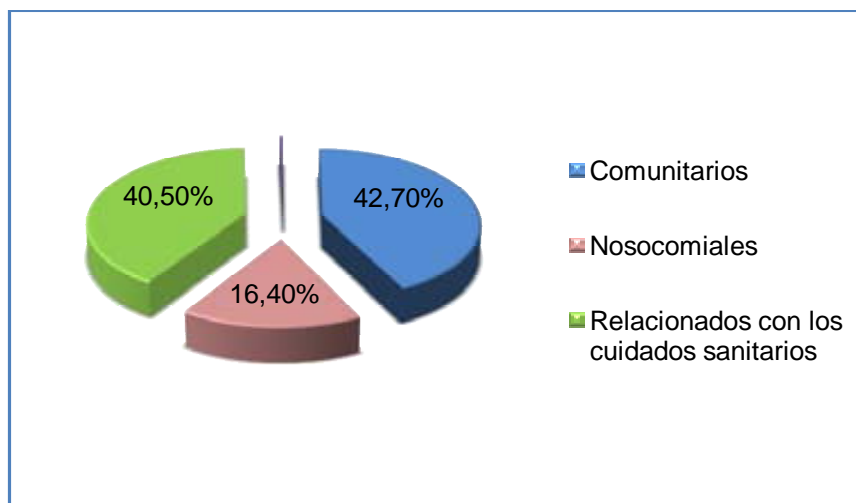


Figura 27. Clasificación de los casos según su procedencia.

4.2. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Los resultados de los estudios de sensibilidad a antibióticos betalactámicos se muestran en la tabla 14 y en la figura 30. La tasa de resistencia a cefotaxima fue del 79,2% y la de ceftazidima del 88,3%. Un total de 18 cepas (7,5%) fueron no sensibles a cefepime, de las cuales 11 presentaban una BLEE. Al ser ésta una característica de ESAC, en los siete aislados resistentes a cefepime no portadores de BLEE se analizaron posibles mutaciones en el gen *ampC*, no encontrándose en ninguno de ellos.

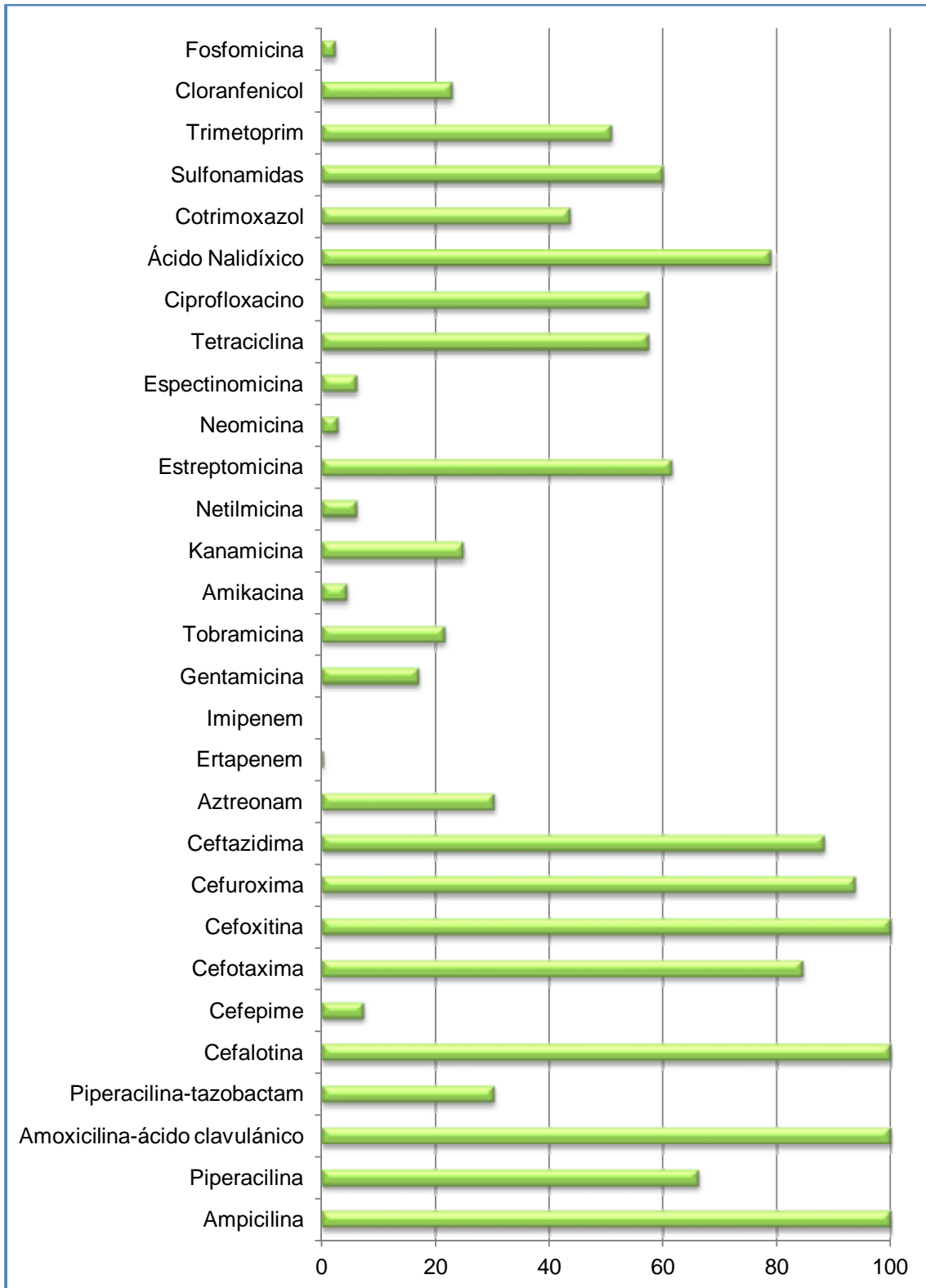
Con respecto a los carbapenémicos, solo se encontró una cepa no sensible a ertapenem.

En la tabla 14 se muestran los porcentajes de resistencia a betalactámicos de las cepas hiperproductoras y las cepas con una AmpCa. Se observaron diferencias significativas en la frecuencia de resistencia a cefotaxima y ceftazidima, presentando porcentajes de resistencia más elevados los aislados productores de betalactamasas AmpCa.

Tabla 14. Porcentajes de resistencia a antibióticos betalactámicos.

Antibiótico	Total Nº aislados (%)	AmpCc Nº aislados (%)	AmpCa Nº aislados (%)	<i>p</i> *
Cefoxitina	240(100)	60(100)	180(100)	-
Ceftazidima	212(88,3)	44(73,3)	168(93,3)	<i>p</i> <0,001
Cefotaxima	190(79,2)	23(38,3)	167(92,7)	<i>p</i> <0,001
Amoxicilina/ácido clavulánico	240(100)	60(100)	180(100)	-
Cefepime	18(7,5)	6(10)	12(6,7)	NS
Aztreonam	73(30,4)	13(21,7)	60(33,3)	NS
Imipenem	0	0	0	-
Ertapenem	1(0,4)	0	1(0,6)	NS

* Estadísticamente significativo (*p*<0,05)

Figura 28. Porcentajes de resistencia de las cepas seleccionadas a los diferentes antibióticos.

4.3. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS NO BETALACTÁMICOS

Se observó un alto porcentaje de cepas resistentes a ácido nalidíxico (79,2%), estreptomycin (61,7%), sulfonamidas (60%), tetraciclinas (58,3%) y ciprofloxacino (57,5%) (Figura 28, Tabla 15). El 50,8% de las cepas fueron resistentes a trimetoprim y el 44% a cotrimoxazol. La resistencia a gentamicina, tobramicina y/o cloranfenicol se situó entre el 17 y el 25%. Las tasas más bajas de resistencia correspondieron a amikacina (4,6%) y fosfomicina (2,1%).

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de resistencia entre cepas hiperproductoras y portadoras de una AmpCa (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentajes de resistencia a antibióticos no betalactámicos en cepas con AmpCc y cepas con AmpCa.

Antibiótico	Total Nº aislados (%)	AmpCc Nº aislados(%)	AmpCa Nº aislados (%)	<i>p</i> *
Ácido nalidíxico	190(79,2)	44(73,3)	146(81,1)	NS
Ciprofloxacino	138(57,5)	35(58,3)	103(57,2)	NS
Cotrimoxazol	105(43,8)	28(46,7)	77(42,8)	NS
Sulfonamidas	144(60)	38(63,3)	106(58,9)	NS
Trimetoprim	122(50,8)	34(56,7)	88(48,9)	NS
Tetraciclina	140(58,3)	34(56,7)	106(58,9)	NS
Cloranfenicol	56(23,3)	18(30)	38(20,6)	NS
Estreptomycin	148(61,7)	39(65)	109(60,6)	NS
Kanamycin	60(25)	23(38,3)	37(20,6)	NS
Tobramycin	52(21,7)	19(31,7)	33(18,3)	NS
Amikacina	11(4,6)	4(6,7)	7(3,9)	NS
Gentamicina	40(16,7)	11(18,3)	29(16,1)	NS
Netilmicin	15(6,3)	5(8,3)	10(5,6)	NS
Neomicin	7(2,9)	0(0)	7 (3,9)	NS
Espectinomycin	15(6,3)	3(5)	12(6,7)	NS
Fosfomicin	5(2,1)	1(0,4)	4(2,1)	NS

* Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

4.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BETALACTAMASAS AmpCa

De los 240 aislados analizados mediante la PCR múltiple, se detectó la presencia de betalactamasas AmpCa en 180 (75%), siendo 132 (73,3%) de tipo CMY y 48 (26,7%) de tipo DHA. Mediante el análisis de las secuencias las betalactamasas fueron caracterizadas como 129 CMY-2, 48 DHA-1, una CMY-4, una CMY-7 y una CMY-42.

Algunos de los aislados portadores de una AmpCa (11,7%) presentaron también otras betalactamasas de amplio espectro o de espectro extendido (Figura 29) de los tipos CTX-M, CTX-M-9, SHV y TEM. Estas betalactamasas se encontraron en cepas portadoras de CMY-2 y DHA-1 (Tabla 16).

Tabla 16. Betalactamasas presentes en aislados de *E. coli* con una AmpCa.

		Betalactamasas Nº de aislados					
		CTX-Mt	CTX-Mt + TEMt	CTX-M-9t	CTX-M-9t + TEMt	SHVt	TEMt
AmpCa	CMY-2	4	-	3	-	3	3
	DHA-1	-	1	3	1	2	1



Figura 29. Antibiograma de una cepa de *E. coli* portadora de una betalactamasa de tipo CMY-2 y una BLEE de tipo CTX-M.

AMP10: ampicilina; PIPRA: piperacilina; CEP30: cefalotina; NAL20: ácido nalidixico; CXM30: cefuroxima; CAZ30: ceftazidima; CF030: ceftoxitina; CIPR5: ciprofloxacino; CTX30: cefotaxima; AMC30: amoxicilina-ácido clavulánico; FEP30: cefepime; SxT25: cotrimoxazol; ETP10: ertapenem; AZT30: aztreonam; PI+TZ: piperacilina-tazobactam; IMI10: imipenem.

4.5. ANÁLISIS DE LAS REGIONES REGULADORAS DEL GEN

ampC

En los 60 aislados que no eran portadores de una betalactamasa AmpCa, se amplificó y secuenció la región promotora y atenuadora del gen *ampC* (Figura 30). En todos los aislados analizados se observaron mutaciones en dichas regiones que pueden explicar la hiperproducción de la betalactamasa AmpCc. Se observaron tres patrones de mutaciones (Tabla 12 y 13):

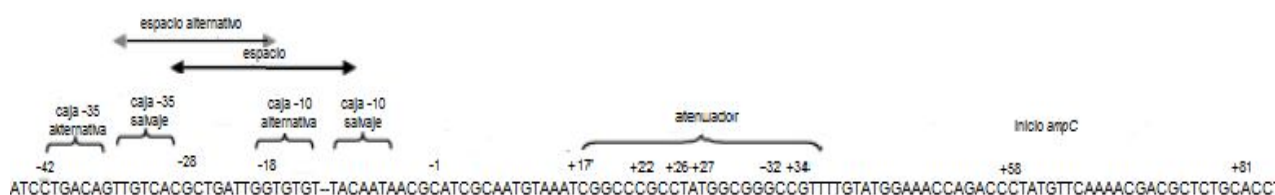


Figura 30. Esquema de la secuencia de la región promotora y atenuadora del gen *ampC* con las mutaciones relacionadas con la hiperproducción del mismo.

- Treinta y ocho aislados (63,3%) presentaban un perfil idéntico con mutaciones en las posiciones -88, -82, -42, -18, -1, +58, +81 que dan lugar a un desplazamiento del promotor, dando lugar a un promotor alternativo desplazado.
- Diecinueve aislados (31,7%) presentaban perfiles similares, con la región espaciadora modificada, inserciones y/o transiciones nucleotídicas en los que las mutaciones -73 y -28 se encontraban siempre presentes.
- Tres aislados (5%) presentaban diferentes mutaciones en la región atenuadora.

En 18 (30%) aislados hiperproductores de su AmpCc se detectó la presencia de otra betalactamasa de los tipos CTX-M, CTX-M-9, SHV y TEM. Estas betalactamasas se encontraron en siete cepas del primer grupo según el perfil de mutaciones, diez del segundo y una del tercero (Tabla 17).

Tabla 17. Betalactamasas presentes en aislados de *E. coli* con una AmpCc.

		Betalactamasas Nº de aislados					
		CTX-Mt	CTX-Mt + TEMt	CTX-Mt + SHVt	CTX-Mt + CTX-M-9t	CTX-M-9t	CTX-M-9t + TEMt
AmpCc	Promotor desplazado	4	-	1	1	1	-
	Región espaciadora modificada	8	1	-	-	-	1
	Región atenuadora modificada	-	-	-	-	1	-

Tabla 18. Mutaciones en las cepas hiperproductoras de AmpCc.

	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+17	+22	+23	+26	+27	+32	+34	+58	+81
<i>E. coli</i> K-12	T	C	A	G	C	C	G	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-11	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-12	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-17	T	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	T	A		
HP-CAS-19	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	T	C		
HP-CAS-21	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-25	T	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	A	T	A		
HP-CAS-26	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-27	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-31	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	A		
HP-CAS-34	A	T	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-37	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-38	T	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	G	T	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-48	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-53	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-55	T	C	A	A	C	C	G	-	G	G	-	-	G	C	C	T	G	G	A	A	G	C	A		
HP-CAS-58	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-59	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	G	T	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-60	T	C	A	A	C	C	G	-	G	G	-	-	G	C	C	T	G	G	T	A	G	C	A		
HP-CAS-67	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	A		
HP-CAS-68	A	T	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
HP-CAS-73	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-89	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-90	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-99	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-101	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HP-CAS-105	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
HT-CAS-18	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
MT-CAS-10	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
MT-CAS-11	A	C	A	A	T	C	A	-	G	G	-	T	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
MT-CAS-14	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	A		
MT-CAS-15	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
MT-CAS-16	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	A		
MT-CAS-19	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
MT-CAS-20	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
MT-CAS-21	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
MT-CAS-23	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
MT-CAS-28	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	T	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
MT-CAS-32	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	G	T	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
VC-CAS-02	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-06	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-09	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-10	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-19	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-20	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-24	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-37	A	C	A	G	T	C	A	T	A	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
VC-CAS-38	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
VC-CAS-39	A	C	A	G	T	C	A	T	A	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
VC-CAS-44	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-45	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-47	A	C	A	G	T	C	A	-	G	G	-	-	G	C	C	C	G	T	A	G	G	C	A		
VC-CAS-50	T	C	A	A	C	C	G	-	G	G	-	-	G	C	C	T	G	G	A	A	G	C	A		
VC-CAS-51	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-56	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-58	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-59	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-61	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-71	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-78	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		
VC-CAS-82	T	T	G	G	C	T	G	-	G	A	-	-	G	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G		

Cepas con mutaciones que dan lugar un promotor desplazado (amarillo), cepas con mutaciones que modifican la región espaciadora (fucsia), y cepas con mutaciones que modifican la región atenuadora (verde)

4.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ampC*

La expresión del gen *ampC* fue analizada en las 60 cepas que no portaban una betalactamasa AmpCa mediante qRT-PCR (Figura 31).

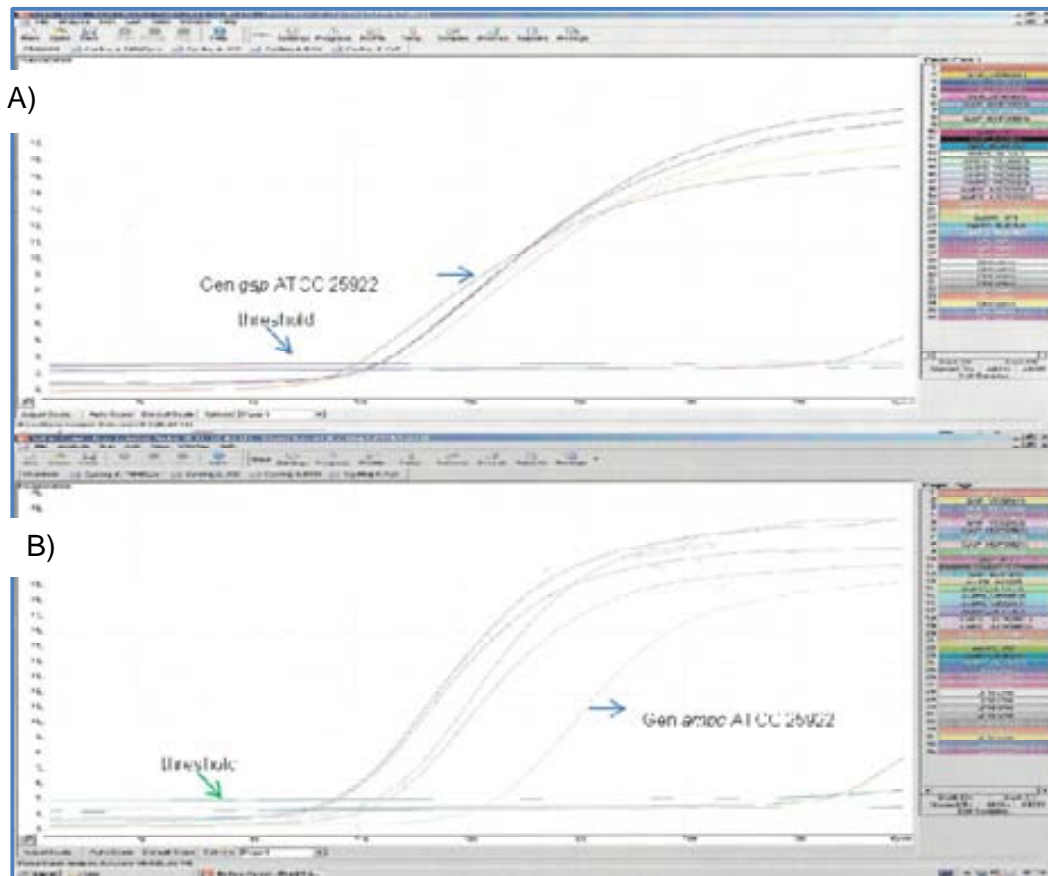


Figura 31. Representación en forma de curvas del incremento de la fluorescencia y con ello de la expresión de los genes A) *gap* y B) *ampC* conforme avanzan los ciclos de la PCR. Se muestran las curvas de amplificación de cinco cepas en las que se constata un CT para el gen *ampC* varios ciclos inferior al de la cepa control ATCC.

Todas las cepas analizadas mostraron un incremento en la expresión del gen *ampC* con un rango de 2 a 442 veces. Se observó una gran variabilidad de resultados (Tabla 19). Para el grupo mayoritario formado por cepas con un promotor alternativo desplazado, el rango fue de 5,1 a 338,2 siendo la mediana de los datos de 72,5. Para el grupo de cepas con una región espaciadora del promotor modificada, el rango se movía entre 2,3 y 442,5,

siendo la mediana de los datos de 19,9. Para las cepas con una región atenuadora modificada, el rango fue de 2,03 a 42,4, siendo la mediana de 5,8.

Tabla 19. Resultados del análisis de expresión del gen *ampC* mediante qRT-PCR.

Grupo	Nº de cepas	Perfil de mutaciones (n) ^a	Rango <i>ampC</i> Δ	Incremento de la expresión (<i>ampC</i> Δ) ^b
Promotor desplazado	38	-88, -82, -42, -18, -1, +58, +81 (38)	[5,11-338,23]	72,5
Región espaciadora modificada	19	-117,-73,-28 (7)		
		-117,-73,-28,-15* (5)		
		-117, -73, -28, -22*, -20, -15* (2)		
		-73,-28,+58 (1)	[2,26-442,54]	19,9
		-73,-28,+34 (1)		
		-117,-73,-32,-28 (1)		
		-117,-73,-28, -22* (1)		
		-117,-73,-28,-16*, -15* (1)		
Región atenuadora modificada	3	-76; +23; +27; +33; +81 (2)	[2,03-42,39]	5,8
		-76; +22; +26; +27; +32 (1)		

^a Mutaciones localizadas en las regiones reguladoras del gen *ampC* debidas a sustituciones o a inserciones(*) nucleotídicas.

^b Incremento de la expresión calculado a partir de la mediana de los resultados obtenidos de todos los aislados.

Se analizaron estos datos de forma estadística mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta prueba analiza si los datos provienen de una misma población, asumiendo que no existe normalidad en los mismos. Según esta prueba, las diferencias en la expresión entre los tres grupos fueron estadísticamente significativas ($p=0,028$).

Se estudió la expresión del gen *ampC* de 17 cepas portadoras de una AmpCa que no iba acompañada de ninguna otra betalactamasa y que presentaban un mayor grado de resistencia a betalactámicos (Tabla 20). Este análisis se realizó en base a la hipótesis de que se tratasen también de cepas hiperproductoras de su AmpCc.

De las 17 cepas, seis presentaron un incremento de expresión del gen *ampC* (2,1; 2,3; 3,4; 8,7; 9,04 y 149,5; respectivamente) y el perfil mayoritario de mutaciones observado fue el que implicaba la creación de un promotor alternativo desplazado.

Tabla 20. Halo de inhibición de 17 aislados con una AmpCa con mayor grado de resistencia a los betalactámicos.

	Halo de inhibición (mm)	No sensible según CLSI ¹²⁵
Ceftazidima	≤12	≤20
Cefoxitina	9	≤17
Cefotaxima	≤14	≤25
Amoxicilina-ácido clavulánico	≤13	≤17
Aztreonam	≤20	≤20

4.7. PREVALENCIA DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

Se estudió la presencia de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas (PMQR – *plasmid mediated quinolone resistance*) en todos los aislados. Se detectaron 61 PMQR, 55 (30%) en cepas portadoras de una AmpCa y seis (10%) en cepas hiperproductoras de AmpCc. De los 55 PMQR detectados en cepas portadoras de AmpCa, 38 eran *qnrB4*, ocho *aac(6')-Ib-cr*, seis *qnrS1* y tres *qnrB19*. Todas las cepas con *qnrB4* eran portadoras a su vez de *bla_{DHA-1}*. De los seis PMQR detectados en cepas hiperproductoras, cinco fueron *aac(6')-Ib-cr* y uno *qnrS1*. Todos estos aislados hiperproductores presentaban una región espaciadora modificada. No se encontró ninguna cepa portadora de *qnrA* ni *qepA* (Tabla 21).

Tabla 21. Determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas en cepas hiperproductoras de AmpCc y con AmpCa.

		<i>qnrA</i>	<i>qnrB4</i>	<i>qnrB19</i>	<i>qnrS1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qep A</i>	n(%)
AmpCa (180)	129 CMY-2	-	-	3	3	4	-	55 (30)
	48 DHA-1	-	38	-	3	3	-	
	1 CMY-4	-	-	-	-	-	-	
	1 CMY-7	-	-	-	-	-	-	
	1 CMY-42	-	-	-	-	1	-	
AmpCc (60)	38 Promotor desplazado (<i>ampCΔ72,5</i>)	-	-	-	-	-	-	6 (10)
	19 Región espaciadora modificada (<i>ampCΔ19,9</i>)	-	-	-	1	5	-	
	3 Región atenuadora modificada (<i>ampCΔ5,8</i>)	-	-	-	-	-	-	

4.8. RELACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LAS CEPAS

Las 240 cepas incluidas en el estudio fueron analizadas mediante PFGE para establecer la posible relación clonal entre ellas. Se observó una amplia variabilidad con la presencia de 193 patrones diferentes. Se obtuvieron dos *clusters* de dos cepas con una homología del 100% (uno compuesto por dos cepas portadoras de *bla_{CMY-2}* procedentes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y otro compuesto por dos cepas hiperproductoras del Hospital Universitario de Terrasa), y diez *clusters* con una homología superior al 90% pero sin relación epidemiológica entre las cepas que los componen (un *cluster* de tres cepas y nueve de dos cepas).

4.9. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS

Tal y como se especifica en el apartado de Material y Métodos, los grupos filogenéticos fueron determinados según tres métodos basados en la técnica de PCR.

1. Método de Clermont 2000

Este método se basa en una PCR triple y permite diferenciar los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D en *E. coli*¹³⁹.

Según este método, más de un 60% de las cepas portadoras de una betalactamasa AmpCa pertenecen a los considerados grupos filogenéticos virulentos B2 y D (Tablas 22 y 23). En la cepas hiperproductoras, las que presentan el promotor desplazado pertenecen en su mayoría a los grupos filogenéticos menos virulentos (A y B1), mientras que las que presentan su región espaciadora modificada pertenecen a los grupos B2 y D.

Tabla 22. Distribución de las cepas según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2000.

Grupo filogenético	Nº de aislados (%)
A	53 (22,1)
B1	47 (19,6)
B2	85 (35,4)
D	55 (22,9)

Tabla 23. Distribución de las cepas con AmpCa y AmpCc según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2000.

Betalactamasa (Nº de aislados)	Grupo filogenético Nº de aislados (%)			
	A	B1	B2	D
DHA _t (48)	11	7	16	14
CMY _t (132)	24	25	53	30
Total AmpCa (180)	67 (37,2)		113 (62,8)	
Promotor desplazado (38)	17	15	0	6
Región espaciadora modificada (19)	0	0	16	3
Región atenuadora modificada (3)	1	0	0	2
Total AmpCc (60)	33 (55)		27 (45)	

2. Método Doumith 2012

Este método se basa en la amplificación de un cuarto gen con respecto a la técnica de Clermont *et al* del año 2000. Se trata del gen *gadA* que se utiliza como control interno de la PCR y da una mayor fiabilidad en los resultados del grupo filogenético A¹⁴⁰.

De las 53 cepas asignadas al grupo filogenético A según el método anterior, 12 no amplificaron ninguna banda. Se realizó una revisión de estas cepas mediante el método descrito por Doumith y los resultados obtenidos corroboraron una correcta asignación al grupo A de estas cepas.

3. Método revisado de Clermont 2013

Clermont *et al* modifican su método anterior para obtener una mayor especificidad y permitir la detección de nuevos grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F)¹³. Se analizó nuevamente el grupo filogenético de todas las cepas de la colección utilizando el método revisado por Clermont (Tablas 24 y 25).

El 62% de las cepas portadoras de AmpCa pertenecían a los grupos filogenéticos B2, D, E y F. Entre las cepas hiperproductoras con un promotor desplazado se encontró que el 87% pertenecía a los grupos filogenéticos menos virulentos A, B1 o C. El 100% de las cepas con la región espaciadora de su promotor modificada pertenecían a los grupos B2, D o F. Una cepa portadora de CMY-2 perteneciente al grupo B1 por el método antiguo presentó un perfil no descrito mediante este método.

Tabla 24. Distribución de las cepas según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2013.

Grupo filogenético	Nº de aislados (%)
A	20 (8,4)
B1	49 ^a (20,4)
B2	87(36,3)
C	32 (13,3)
D	18 (7,5)
E	2 (0,8)
F	32 (13,3)

^aUna cepa asignada a B1 por el método Clermont 2000.

Tabla 25. Distribución de las cepas con AmpCa y AmpCc según el grupo filogenético obtenido por el método de Clermont del año 2013.

Betalactamasa (Nº de aislados)	Grupo filogenético Nº de aislados (%)						
	A	B1	C	B2	D	E	F
DHAt (48)	6	6	5	18	4	1	8
CMYt (132)	12	27 ^a	11	52	10	0	20
Total AmpCa (180)	67(37,2%)			113(62,8%)			
Promotor desplazado (38)	2	16	15	1	2	1	1
Región espaciadora modificada (19)	0	0	0	16	1	0	2
Región atenuadora modificada (3)	0	0	1	0	1	0	1
Total AmpCc (60)	34(56,7%)			26(43,3%)			

^aUna cepa asignada a B1 por el método Clermont 2000.

Al comparar ambos métodos de Clermont, se observaron algunas discrepancias (Tabla 26). De las 53 cepas asignadas anteriormente al grupo A, 32 pasan a ser del grupo C y una al grupo B1. De las 85 cepas asignadas al grupo B2, una pasa a ser del grupo D; y de las 55 cepas del grupo D, una cepa pasa a ser del grupo B1, tres del grupo B2, dos del grupo E y 32 pasan al grupo F. Las 41 cepas B1 siguen manteniendo dicho grupo.

Tabla 26. Discrepancias entre los diferentes métodos de Clermont.

Clermont 2000 Grupo filogenético (N° de aislados)	Clermont 2013 Grupo filogenético (N° de aislados)
A (53)	A (20)
	B1 (1)
	C (32)
B1 (47)	B1 (46)
	ND (1)
B2 (85)	B2 (84)
	D (1)
D (55)	B1 (1)
	B2 (3)
	D (17)
	E (2)
	F (32)

ND: no determinado por el método actualizado de Clermont, necesario análisis con MLST. Se resaltan en gris las mayores discrepancias entre ambos métodos, la mayor parte de las cepas asignadas al grupo A y D pasan a asignarse a los grupos descritos como minoritarios, C y F.

4.10. CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS

4.10.1. Determinación del grupo de incompatibilidad plasmídico

Se analizó el grupo de incompatibilidad de los plásmidos presentes en 90 aislados portadores de una betalactamasa AmpCa: 56 CMY-2, 31 DHA-1, una CMY-4, una CMY-7 y una CMY-42.

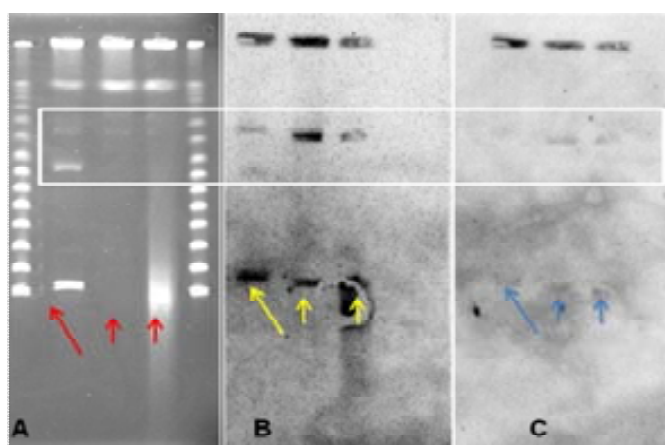
Como el análisis se realizó sobre el DNA plasmídico total, se obtuvo más de un grupo de incompatibilidad para muchos de los aislados (Tabla 27). En el caso de cuatro aislados no se pudo determinar el grupo de incompatibilidad.

4.10.2. Determinación del tamaño del plásmido portador de AmpCa

Tras la digestión de los insertos, con la endonucleasa S1 y su posterior transferencia a una membrana de nylon; ésta se hibridó con sondas específicas de las betalactamasas y de los grupos de incompatibilidad (Figura 32).

El grupo de incompatibilidad IncI1 fue el replicón encontrado con mayor frecuencia en los plásmidos portadores de *bla*_{CMYt} (44%), seguido de IncK (33%). En los plásmidos portadores de *bla*_{DHA_t}, los replicones más habituales fueron los variantes de la familia de IncF (65%). El tamaño de los plásmidos en el caso de los portadores de *bla*_{CMYt} era entre 40 y 185 kb; y el de los portadores de *bla*_{DHA_t} de entre 70 y 185 aproximadamente (Tabla 28). El tamaño del plásmido portador de *bla*_{CMY-7} no pudo ser determinado debido a que tanto la sonda específica de IncY y de la betalactamasa, hibridaban en el inserto.

Figura 32. Hibridación de un gel S1-PFGE (A) con sonda *bla*_{CMY-2} (B) y sonda IncI1 (C).



Se observan bandas hibridadas en la zona superior debidas a una digestión parcial de la enzima S1, asumiendo como tamaño correcto el que se indica con flechas.

Tabla 27. Resultados de PBRT.

Cepa	pAmpC	PBRT	Cepa	pAmpC	PBRT
HSP002	CMY-2	K , F, ColE	HSP081	CMY-2	K , B/O, F
HSP003	CMY-2	F, ColE	HSP082	DHA-1	ColE
HSP004	CMY-2	I1/I , F, ColE	HSP083	CMY-2	I1 , F, ColE
HSP005	DHA-1	F	HSP084	CMY-2	I1 , F
HSP006	DHA-1	N/D	HSP085	CMY-2	I1 , F
HSP007	CMY-2	I1/I , F	HSP086	CMY-2	N/D
HSP008	CMY-2	FIA, K , B/O, F	HSP087	DHA-1	I1 , K , ColE
HSP009	CMY-2	FIA, K , B/O, F	HSP088	CMY-2	I1 , F
HSP010	CMY-2	I1/I , F	HSP091	CMY-2	I1 , F
HSP013	DHA-1	F, ColE	HSP092	DHA-1	I1 , F
HSP018	CMY-2	K , B/O, F	HSP094	DHA-1	F, ColE
HSP020	CMY-2	FIA, F	HSP097	CMY-2	K
HSP022	CMY-2	FIA, K , B/O, F	HSP098	CMY-2	FIA , K
HSP023	DHA-1	FIA , F	HSP100	DHA-1	I1 , F, ColE
HSP024	CMY-2	K , B/O, F	HSP103	CMY-2	I1
HSP028	DHA-1	F	HSP104	CMY-2	FIA, K
HSP029	DHA-1	I1	HSP106	CMY-2	K , F
HSP030	DHA-1	F	HT001	DHA-1	I1 , FIB , F
HSP032	CMY-2	K , F, ColE	HT004	CMY-2	I1 , F
HSP035	CMY-2	FIA, K , B/O, F	HT007	DHA-1	FIB , F
HSP036	CMY-2	I1 , F, ColE	HT008	DHA-1	FIA , F
HSP039	CMY-2	K , B/O, ColE	HT009	DHA-1	FIA , F
HSP042	CMY-2	K , B/O, ColE	HT012	DHA-1	F
HSP043	CMY-2	I1 , F	HT019	DHA-1	FIA
HSP044	CMY-2	K , B/O, ColE,	HT020	CMY-2	K , FIA, F
HSP045	DHA-1	N/D	MT005	CMY-4	I1 , FIB , F
HSP046	CMY-2	I1 , FIA , F	MT007	CMY-42	I1 , F
HSP047	DHA-1	I1 , F, ColE	MT008	CMY-2	FIB , F
HSP049	CMY-2	P, K , B/O, F, ColE	MT012	DHA-1	FIA , F
HSP051	CMY-2	K , F, ColE	MT017	DHA-1	FIA
HSP052	CMY-2	I1 , F	MT025	DHA-1	FIB , F
HSP054	CMY-2	I1 , F, ColE	MT031	DHA-1	FIA , F
HSP056	CMY-2	I1 , Y, F, ColE	VC001	CMY-2	K , F
HSP057	CMY-2	I1 , F, ColE	VC003	DHA-1	I1 , F
HSP061	CMY-2	N/D	VC004	CMY-2	K , F
HSP063	CMY-2	K , B/O, F	VC005	CMY-2	I1 , F, ColE
HSP064	CMY-2	I1 , F	VC007	DHA-1	K , F
HSP065	CMY-2	FIA , F, ColE	VC008	CMY-2	I1 , K , F, ColE
HSP066	DHA-1	F, ColE	VC011	CMY-2	I1 , Y, F, ColE
HSP069	DHA-1	F	VC012	CMY-2	I1 , F
HSP071	CMY-2	I1 , F	VC013	DHA-1	FIB , F
HSP074	DHA-1	FIA, F , ColE	VC018	CMY-7	Y, F
HSP076	DHA-1	I1 , F, ColE	VC030	CMY-2	I1 , F
HSP078	CMY-2	I1 , F	VC062	CMY-2	I1 , FIB , F
HSP080	CMY-2	I1 , ColE	VC077	CMY-2	I1 , FIB , F

N/D= grupo de incompatibilidad no determinado. En negrita se resalta el grupo de incompatibilidad del plásmido portador de la betalactamasa

Tabla 28. Caracterización de los plásmidos portadores de betalactamasas AmpCa en *E. coli* mediante PBRT y S1-PFGE.

Betalactamasa (Nº de aislados)	Replicón	Tamaño (kb)	Nº aislados (%)
CMY-2 (54)	I1	~40-170	24(44)
	K	~60-130	35(19)
	F	~65-185	5(9)
	ColE	~90-112	2(4)
	FIA	~90	2(4)
	FIB	~120	1(2)
	K+FIA	~72	1(2)
DHA-1(29)	F	~80-185	9(31)
	FIA	~70-125	7(24)
	FIB	~100-125	4(14)
	I1	~100-115	4(14)
	ColE	~100	3(10)
	K	~100-130	2(7)
CMY-4 (1)	I1	~85	1(100)
CMY-7 (1)	Y	ND	1(100)
CMY-42 (1)	I1	~116	1(100)

4.11. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS PLÁSMIDOS PORTADORES DE BETALACTAMASAS AMPCa

Se analizó la epidemiología de 10 plásmidos IncI1 y 10 plásmidos IncF mediante la técnica pMLST (plasmid *multilocus sequence typing*) o RST (*replicon sequence typing*) (Tablas 29 y 30).

1. pMLST de plásmidos IncI1

Se analizaron las secuencias de los diferentes locus amplificados y se asignó la numeración de los alelos y las secuencias tipo utilizando *Plasmid MLST Database* (Tabla 29).

Entre los 10 replicones IncI1, cinco fueron IncI1/ST12, dos IncI1/ST134 (descritos por primera vez en este estudio), uno IncI1/ST26, uno IncI1/ST55, y uno IncI1/ST94 (Tabla 29).

Tabla 29. pMLST de plásmidos IncI1.

Cepa	Enzima	<i>repl</i>	<i>ardA</i>	<i>trbA</i>	<i>sogS</i>	<i>pilL</i>	ST
HSP004	CMY-2	1	4	3	4	1	12
HSP043	CMY-2	1	4	13	2	1	26
HSP064	CMY-2	4	5	15	11	3	55
HSP103	CMY-2	1	4	3	4	1	12
HT004	CMY-2	1	2	8	6	10	134
MT005	CMY-4	1	4	3	4	1	12
VC012	CMY-2	1	4	3	4	1	12
VC030	CMY-2	1	14	15	11	2	94
VC062	CMY-2	1	2	8	6	10	134
VC077	CMY-2	1	4	3	4	1	12

2. RST de plásmidos F

Al igual que los plásmidos IncI1, las secuencias obtenidas de los plásmidos IncF se introdujeron en la base de datos nombrada anteriormente. Se observó una gran variabilidad de estos plásmidos al resultar cada uno de ellos una variante diferente (F:-A-:B10; F1:A1:B-; F2:A-:B1; F2:A1:B1; F2:A6:B1; F18:A3:B37; F24:A-B1; F24:A-:B37; F24:A1:B-; F29:A-:B10) (Tabla 30).

Tabla 30. RST de plásmidos IncF.

Cepa	Enzima	FII	FIA	FIB	FIC	ST
HSP020	CMY-2	24	-	1	-	F24:A:B1
HSP046	CMY-2	1	1	-	-	F1:A1:B-
HSP074	DHA-1	29	-	10	-	F29:A:B10
HSP084	CMY-2	2	6	1	-	F2:A6:B1
HSP088	CMY-2	2	1	1	-	F2:A1:B1
HT007	DHA-1	-	-	10	-	F:A:B10
MT008	CMY-2	2	-	1	-	F2:A:B1
MT017	DHA-1	18	3	37	-	F18:A3:B37
MT025	DHA-1	24	-	37	-	F24:A:B37
VC030	CMY-2	24	1	-	-	F24:A1:B-

5. DISCUSIÓN

La aparición de bacterias multirresistentes tanto a nivel hospitalario como comunitario se ha convertido en un problema a nivel mundial^{16,17,147}. La resistencia adquirida es una de las causas más frecuentes de multirresistencia. La multirresistencia no solo limita las opciones terapéuticas sino que también facilita la selección y persistencia de estas bacterias^{36,148}. Al ser, en muchos casos, la resistencia transferible, esta persistencia favorece la posibilidad de dispersión tanto de las bacterias como de los genes responsables de la resistencia^{149,150}.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son comensales del tracto intestinal e importantes agentes causales de infecciones oportunistas. Estas bacterias adquieren con facilidad diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos por mutaciones en su genoma (resistencia cromosómica) o por transferencia horizontal (adquirida), entre las que hay que destacar la producción de betalactamasas¹⁵¹.

La dramática escalada de la resistencia a betalactámicos entre las enterobacterias a nivel mundial refleja la emergencia y la amplia diseminación de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), además de las betalactamasas de tipo AmpC y las carbapenemasas. Las betalactamasas AmpC son menos prevalentes que las BLEE, pero en los últimos años están adquiriendo relevancia^{147,152}.

Desde la primera descripción de una betalactamasa AmpC adquirida, a finales de los años 80⁸⁷, se han descrito numerosos ejemplos de AmpCa, principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*¹⁵³⁻¹⁵⁷. Su distribución es universal, encontrándose tanto en muestras clínicas, como en animales (domésticos y salvajes)¹⁵⁸⁻¹⁶², alimentos^{163,164} y agua^{165,166}, pudiendo actuar estos últimos como reservorios ambientales de estas enzimas¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia de *E. coli* productora de AmpC tanto en aislados clínicos como en aislados de carne para consumo. Börjesson *et al* describieron una alta prevalencia del plásmido IncK portador de *bla*_{CMY-2} en pollos en Suecia y una minoría en aislados clínicos humanos; siendo, comúnmente, la prevalencia de betalactamasas AmpC muy baja en Suecia¹⁷⁰. En Holanda se describe mediante MLST un *cluster* que contiene un aislado clínico humano y tres aislados de carne de aves de corral¹⁷¹. En Japón, describen la presencia de *E. coli* productora de *bla*_{CMY-2} en aislados bovinos de la industria láctea¹⁷². En ese mismo año, se publica una revisión de seguridad alimentaria sobre los riesgos para la salud si no se controlan estas posibles transmisiones de alimentos a humanos. Así mismo, se recomienda la restricción del uso de antimicrobianos, principalmente las cefalosporinas, en animales que se utilizan para

consumo humano¹⁷³. Recientemente, Huijbers *et al* describen un aumento de la prevalencia de betalactamasas AmpC debido a un incremento de la transmisión entre pollos y humanos que trabajan o viven en granjas¹⁷⁴.

Debido al frecuente uso de cefalosporinas en el tratamiento de infecciones de *E. coli*, es importante conocer la prevalencia de los patrones de AmpC y los mecanismos responsables (AmpCc o AmpCa). Hoy en día, en España se disponen de datos limitados u obsoletos en relación a la hiperproducción de AmpC en *E. coli*¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

En este estudio se han caracterizado las betalactamasas de tipo AmpC producidas por *E. coli* aislados de muestras clínicas procedentes de tres hospitales del área de Barcelona. *E. coli* presenta una betalactamasa AmpC de codificación cromosómica que se expresa a bajo nivel debido a la presencia de un promotor débil y a un atenuador transcripcional^{67,77,178}. Mutaciones en la región promotora y/o atenuadora conducen a la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y aztreonam^{66,179-181}. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* también puede ser debida a betalactamasas AmpCa (CMY, DHA, ACC, FOX, MOX, ACT, MIR, LAT y CFE)¹⁵⁴. Por tanto, la resistencia en *E. coli* productora de AmpC puede resultar de una hiperexpresión de su AmpCc, por una AmpCa o por la combinación de ambas^{154,178,182}.

5.1. Características y prevalencia de los aislados de *E. coli* productores de una betalactamasa de tipo AmpC

La falta de métodos fenotípicos estandarizados para la detección de cepas productoras de AmpCa, unido al hecho de que estas betalactamasas presentan un patrón fenotípico indistinguible al de la hiperproducción de una AmpCc dificulta en gran medida su detección. En los últimos años, se han realizado de forma periódica controles de calidad en los hospitales españoles que ponen de manifiesto la poca eficiencia que presentan en la detección de betalactamasas AmpC; haciendo que estos estudios tengan una gran importancia en la actualización de este campo¹⁸³.

Solamente EUCAST aporta algunas recomendaciones usando como criterios de cribado la resistencia a cefoxitina, cefotaxima y/o ceftazidima, seguido de un test de sinergia con cloxacilina^{184,185}. Existen otros métodos de detección de betalactamasas

AmpC como el basado en el uso de ácido borónico¹⁸⁶ o los métodos basados en el estudio de la actividad enzimática de las betalactamasas como son el test tridimensional¹⁵³ y el *AmpC disk test*¹⁸⁷. Estos tests de detección de AmpC en *E. coli* no pueden discriminar entre una AmpCa y una hiperproducción de su AmpCc. Aún así, la presencia de halos de inhibición cortantes indican la producción de betalactamasas inducibles o el salto de colonias dentro de los halos de inhibición de cefalosporinas de tercera generación nos permiten intuir que se trata de una betalactamasa adquirida. Los métodos basados en PCR o *microarrays* de DNA proporcionan un resultado confirmatorio. Hoy en día, la técnica más usada, y utilizada en este estudio, para confirmar la presencia de una AmpCa es la PCR diseñada por Pérez-Pérez⁸⁹.

La prevalencia de las betalactamasas AmpC depende en gran medida del área geográfica, de las especies, y del período de estudio, así como del criterio de selección utilizado. Es por este motivo que la comparación de los datos de prevalencia entre estudios es complicada. Aunque la prevalencia de estas enzimas es relativamente baja alrededor del mundo, en muchos estudios se observa un incremento continuo año tras año de aislados portadores de AmpCa. Este incremento es especialmente importante en el continente asiático, debido principalmente al aumento en esta zona de *K. pneumoniae* productora de DHA-1^{188,189}. Otros estudios recientes realizados en otros países, siguen constatando este aumento. En Canadá, la prevalencia se incrementó de 0,7% en 2007 al 2,9% detectado en 2011¹⁹⁰ y en aislados de terneros en Holanda, el porcentaje se dobló (6,1-12,6%) entre 1997 y 2010¹⁵⁹. En los últimos años también se ha observado un incremento constante en nuestro centro, en un estudio realizado entre 1999 y 2007, el porcentaje de *E. coli* portadora de AmpCa pasó de 0,04% a 1,12%¹⁵⁵.

De los resultados de este trabajo se desprende que la prevalencia de betalactamasas AmpC en *E. coli* es del 1,1%, superior a la descrita en un trabajo similar en Noruega donde fue del 0,4% pero inferior a la detectada en Bélgica del 1,4% o a la recientemente descrita en Irán del 3,3%¹⁹¹⁻¹⁹³. Estos datos de prevalencia incluyen tanto a aislados hiperproductores de AmpCc como a aislados portadores de una AmpCa. Si desglosamos nuestros resultados, se obtiene que el 0,83% de los aislados de *E. coli* eran portadores de una AmpCa, un valor superior al obtenido en un estudio multicéntrico realizado en España en 2009, en el cual se obtuvo un porcentaje de AmpCa en *E. coli* del 0,67%¹⁵⁶. Otros estudios más recientes realizados en España muestran una prevalencia de AmpCa del 0,5% en La Rioja y Zaragoza y del 1% en Cádiz^{194,195}. En el año 2013, se publicaron estudios en diferentes países donde se observó una prevalencia superior, en

Japón se detectó un 1,7%, en Paquistán un 2,5%, en Canadá un 2,9% y en Holanda un 5,2% de *E. coli* con AmpCa^{171,190,196,197}. El porcentaje obtenido de aislados hiperproductores en este estudio fue del 0,28%, ligeramente superior al obtenido en otro estudio multicéntrico realizado en España en 2010 que fue del 0,23%, si bien en este estudio se analizaron los mecanismos de resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico en *E. coli* y los criterios de inclusión fueron diferentes¹⁷⁷. En 2002, Sabaté *et al* realizaron un estudio en nuestro centro en el cual se detectó que un 0,7% de los aislados de *E. coli* eran hiperproductores de su AmpCc, y no se detectaron AmpCa¹⁹⁸. A diferencia de los resultados obtenidos en esta tesis, en el estudio realizado en Bélgica por Bogaerts *et al* en 2010, la prevalencia de los aislados portadores de AmpCa fue del 0,16%, dato muy inferior al de los aislados hiperproductores de su AmpCc que representaron un 1,05% de los aislados de *E. coli* analizados¹⁹².

En el presente estudio, las características clínicas coinciden con estudios realizados anteriormente por Sidjabat *et al.* en Estados Unidos en 2009 u otros más recientes realizados en España por Rodríguez-Baño *et al.* y por Gude *et al.*, en los cuales la mayoría de las muestras procedían de pacientes de sexo femenino con una edad superior a los 65 años y principalmente se trataban de muestras de origen urinario^{194,199,200}. Otro estudio reciente realizado en Nepal mostraba un porcentaje superior de aislados procedentes de pacientes de sexo femenino con una edad media de 49 años²⁰¹, esta diferencia puede ser debida a la esperanza de vida que existe en este país, siendo inferior a los 70 años y superior a los 80 en España y Estados Unidos (www.who.int).

En nuestra serie, los casos de infección por *E. coli* productor de AmpC fueron principalmente de origen comunitario o relacionadas con la asistencia sanitaria y, en menor medida (16,4%) de origen nosocomial. En estudios anteriores, se había visto reflejado un aumento de infecciones nosocomiales o relacionadas con los cuidados sanitarios producidas por *E. coli* productora de AmpC^{155,202,203}. En estudios más recientes como de Gude *et al* en Zaragoza o el de Pitout *et al* en Estados Unidos^{194,204} se describe un aumento de estas infecciones de origen comunitario, como ocurre en este estudio, convirtiéndose en un serio riesgo de transmisión desde la comunidad al hospital.

5.2. Distribución de enzimas AmpCa

En *E. coli* la primera betalactamasa AmpCa descubierta fue BIL-1, posteriormente denominada CMY-2 tras una revisión de su secuencia⁸³. Esta betalactamasa es la más prevalente y ampliamente distribuida en todo el mundo^{154-156, 162, 176, 179, 181,190,205}. Estudios publicados en los últimos años, revelan que la prevalencia de la betalactamasa CMY-2 en *E. coli* se encuentra entre un 55 y un 95% de todas las AmpCa detectadas, siendo el valor más bajo el detectado en Canadá (55,7%) y el más elevado en Japón (95%), situándose en Europa alrededor del 80%^{156,171,190,193-196,206,207}. En consonancia con estos datos, la clase de enzima más prevalente en este estudio fue CMY, representando un 73,3% de las AmpCa. CMY-2 fue la betalactamasa mayoritaria con un 71,6%, siendo este porcentaje inferior al encontrado en el estudio multicéntrico realizado por Miró *et al*¹⁵⁶, en el cual se observó que un 87,1% de los aislados de *E. coli* presentaban CMY-2. También se observaron tres variantes de CMY-2; la CMY-4, que fue descrita por primera vez en un aislado clínico de *P. mirabilis* en Túnez y difiere de CMY-2 en una sustitución aminoacídica en la posición 221²⁰⁸; la CMY-7, descrita en 2002 en un aislado de *S. enterica* serovar Typhimurium²⁰⁹; y la CMY-42, descrita en un aislado de *E. coli* en 2011 y que difiere en una sustitución aminoacídica en posición 231 de la CMY-2²¹⁰. Las dos primeras han sido también descritas en *E. coli*, como por ejemplo en un aislado clínico en Francia que presentaba la betalactamasa CMY-4 y una pérdida de porinas provocando una resistencia a carbapenémicos o la CMY-7 en un aislado clínico en Noruega y en otro perteneciente al estudio multicéntrico español realizado por Miró *et al*^{156,181,211}.

La otra betalactamasa AmpCa encontrada en este estudio fue DHA-1. La primera betalactamasa DHA-1 descrita fue aislada en 1992 en *S. enterica* serovar Enteritidis y aunque se ha encontrado en una gran variedad de enterobacterias, esta AmpCa se encuentra íntimamente ligada a aislados de *Klebsiella* spp., especialmente *K. pneumoniae*. El aumento de cepas productoras de DHA-1 se ha visto especialmente reflejado en el continente asiático, principalmente por la emergencia de cepas de *K. pneumoniae* portadoras de DHA-1, convirtiéndose en la AmpCa más prevalente y de mayor importancia clínica en esta zona^{189,212,213}. En un estudio reciente realizado en Egipto, se observó una prevalencia del 10% de *E. coli* portadores de DHA-1²¹⁴, pero en muchos otros estudios realizados en diferentes países la prevalencia es igual o inferior al 5%^{193,215-217} o no se detecta ningún caso^{157,171,181,191,192,218}. En España, hay estudios recientes como el Oteo *et al* en el que describen una prevalencia del 4,3%, el de Gude *et al* que observaron un 5% o el de Miró *et al* en el cual un 8,1% de aislados de *E. coli* son

portadores de DHA-1^{156,177,194}. En este estudio, la betalactamasa DHA-1 se encontró en el 26,7% de los aislados portadores de AmpCa, lo que refleja un incremento de la presencia de esta betalactamasa en *E. coli* con respecto a estudios previos.

En estudios anteriores realizados en nuestro país, se detectaron aislados de *E. coli* portadores de betalactamasas de tipo ACC o FOX, aunque en una proporción muy baja. Mata *et al* describen dos aislados de *E. coli* portadores de ACC-1 en un estudio realizado entre 1999 y 2007; Miró *et al* en 2009 describen cuatro aislados portadores de ACC-1, uno de los cuales también era portador de FOX, y describen, además, un aislado portador de FOX-3 y dos de FOX-8^{155,156,219}. Con respecto a la betalactamasa de tipo MOX, solamente se ha descrito en *E. coli* en países como India y Turquía^{157,220}. En este trabajo no se detectó ninguna de estas tres betalactamasas.

La coexistencia en un mismo aislado de BLEE y AmpCa está dejando de ser un hallazgo excepcional en el laboratorio clínico, lo que probablemente se relaciona con una creciente incidencia de ambos tipos de betalactamasas. En 2008, Li *et al* realizaron un estudio en un hospital chino en el cual describieron una coexistencia muy alta de BLEE y AmpCa, un 100% de los aislados de *E. coli* productor de AmpCa eran también portadores de una betalactamasa de tipo TEM, un 68,5% de una de tipo SHV y un 53,7% de una de tipo CTX-M²²¹. En 2012, Shahied *et al* describieron que un 100% de los aislados portadores de CIT en la India eran coproductores de las betalactamasas de tipo SHV y CTX-M²²². En otro estudio reciente realizado también en la India, el 89% de los aislados eran coproductores de ambas betalactamasas²²³. En un estudio reciente realizado en Irán, un 39,3% de los aislados presentaban simultáneamente AmpCa y BLEE, de las cuales un 13,3% eran de tipo CTX-M²²⁴. En estudios realizados en regiones geográficas más cercanas como el realizado por Jörgensen *et al* en 2010 en Dinamarca, se observó que todos los aislados de *E. coli* productores de CMY-2 presentaban además una betalactamasa TEM-1, pero no se encontraron betalactamasas de tipo CTX-M o SHV¹⁹¹. Por el contrario, en el estudio reciente de Freitas *et al* realizado en Portugal, no encontraron ningún aislado productor de CMY-2 que coprodujese una BLEE; en cambio, los dos únicos casos de *E. coli* productora de DHA-1 iban acompañados de CTX-M-32 y SHV-12, respectivamente²²⁵. En España, el estudio de Galán-Sánchez realizado en Cádiz demostró que un 8,9% de los aislados presentaban ambos tipos de betalactamasas¹⁹⁵. En el presente estudio se observó un resultado ligeramente superior al descrito por Galán-Sánchez, siendo un 11,7% de los aislados productores de AmpCa y BLEE. Esta última situación se convierte en más compleja y problemática, ya que tal y como se ha

descrito previamente, ambas betalactamasas podrían estar codificadas en un mismo plásmido²²⁶.

5.3. Mecanismos implicados en la hiperproducción del gen *ampC* cromosómico y su correlación con el incremento de su expresión.

Desde que a principios de la década de los 80 Jaurin *et al* describieron los elementos genéticos que intervenían en la regulación del gen *ampC* de *E. coli*^{77,78,78}, se han publicado diferentes mecanismos implicados en la hiperexpresión de este gen. Se han descrito como mecanismos más frecuentes, sustituciones nucleotídicas en las regiones -35 y -10, inserción de un nucleótido entre ambas regiones, inserción de la ISEc10 y delección de 30 nucleótidos en la región atenuadora^{227,228,181}. Para detectar la presencia de estos mecanismos, se amplifica mediante PCR la región promotora/atenuadora del gen *ampC*, se han descrito diferentes iniciadores para dicha amplificación^{179,229,230}, pero en este estudio se utilizaron los descritos por Haldorsen *et al*¹⁷. El análisis del incremento de expresión del gen se lleva a cabo mediante la detección de la expresión de RNAm con una PCR a tiempo real¹⁸¹ y el cálculo de la expresión mediante el modelo matemático descrito por Pfaffl *et al*¹³⁷.

En los aislados hiperproductores analizados en este estudio, se detectaron tres patrones diferentes de mutaciones, siendo uno de ellos mayoritario (65%) con mutaciones en las posiciones: -88, -82, -42, -18, -1, +58 y +81. Las mutaciones que presenta este perfil han sido descritas en numerosas ocasiones^{179-181,228,229,231}, siendo la transición de C→T en la posición -42 la más común. Esta mutación crea un hexámero con perfecta homología a la secuencia consenso -35 (TTGACA) reconocida por la RNA polimerasa de *E. coli*. El cambio G→A en la posición -18 genera un hexámero consenso (TATCGT) que está separado por 17 pares de bases del hexámero -35, creando un promotor fuerte en la región reguladora de *ampC*²³². Se considera que la distancia de 17 pares de bases también tiene un papel importante en la fuerza del promotor, ya que constituye la distancia óptima para la transcripción del gen^{231,233}. Ya en 1999, Nelson *et al* especulaban sobre la influencia de las mutaciones en posiciones -1 y +58 en la pausa de la RNA polimerasa, que junto a la fuerte unión del ribosoma, previene la formación de la horquilla y por tanto, facilitan la transcripción²³². En el estudio realizado por Bogaerts *et al* en 2010, todos los aislados hiperproductores presentaban este perfil de mutaciones, y

algunos de ellos también incluían mutaciones en el atenuador¹⁹². En los estudios previos de Mulvey *et al* y Haldorsen *et al*, este perfil de mutaciones también se encontró como el mayoritario^{179,181}. Por el contrario, Jorgensen *et al* observaron solamente un 33% de los aislados con este perfil de mutaciones, encontrando entre los aislados hiperproductores una mayor diversidad de patrones de mutaciones; estos aislados presentaban una disminución moderada de sensibilidad a cefalosporinas¹⁹¹. El rango de incremento de expresión del gen con este perfil de mutaciones fue muy amplio en el trabajo realizado por Haldorsen *et al* [27,2-380,2]¹⁸¹, lo mismo que nos encontramos en este estudio [5,11-338,23] con un incremento medio de 72,5.

El segundo perfil de mutaciones presentó en común una mutación en la posición -28 y una inserción entre las posiciones -15 y -14, que creaba un nuevo promotor; o, entre -20 y -19, que incrementa a 17 pb la distancia de la región espaciadora. La mutación en la posición -28 parece contribuir de forma insignificante a la hiperexpresión del gen¹⁸⁰. Mutaciones entre las posiciones -10 y -35 fueron descritas por Siu *et al* en 2003 por provocar el fallo terapéutico en dos pacientes en Taiwan, a los cuales se les estaba tratando con oximinocefalosporinas²³¹. En cambio, Jorgensen *et al* describieron en cinco aislados que la inserción entre las posiciones -21 y -13 provocaba una disminución moderada de la sensibilidad a las cefalosporinas¹⁹¹. Los aislados de este grupo presentaron un incremento medio de expresión de 19,9.

Por último, nos encontramos con un tercer perfil que incluyen mutaciones en la región atenuadora. Estas mutaciones parecen estar implicadas en la desestabilización de la estructura en forma de horquilla que permite el incremento de los niveles de transcripción¹⁷⁹. Aún así, se ha visto que estas mutaciones por sí mismas, provocan un aumento insignificante de la expresión de *ampC*¹⁸⁰, tal y como podemos observar en nuestras cepas, cuyo incremento medio de la expresión es de 5,8. En cambio, se han descrito cambios significativos en la expresión y aumento de resistencia a cefalosporinas cuando estas mutaciones en la región atenuadora van acompañadas de otras mutaciones. Caroff *et al* en 1999 describieron que la mutación en posición +24 de la región atenuadora, cuando va acompañada de una mutación en posición -32 de la región promotora, incrementaba la resistencia a cefoxitina y a ceftazidima; en cambio, cuando la mutación en posición +24 se encontraba sola se incrementaba la resistencia a cefoxitina pero no a ceftazidima²²⁹. La delección del atenuador acompañada de mutaciones en las posiciones -32 y -11 y de la inserción entre -20 y -21 provocaba un incremento de la expresión de 140 en el aislado de *E. coli* N99-001 descrito por Tracz *et al*⁶⁶.

Las mutaciones en las posiciones -32 y -11, citadas anteriormente, se localizan en el promotor salvaje, la primera es una sustitución T→A y la segunda C→T¹⁸⁰. Éstas han sido descritas en diferentes estudios como mutaciones bastante prevalentes y que provocan un incremento significativo de la expresión del gen *ampC* así como una elevada resistencia a las cefalosporinas^{66,134,179,180,191,229}. En nuestro estudio no se encontró ningún aislado que presentase estas mutaciones.

En 2005, Mulvey *et al* estudiaron el patrón de mutaciones en el promotor del gen *ampC* de aislados portadores de CMY-2. De los 25 aislados con CMY-2, solamente siete presentaban el tipo de promotor salvaje. Todos los aislados con AmpCa e hiperproductores presentaban el perfil de mutaciones que incluye la mutación -42¹⁷⁹. Por el contrario, Jorgensen *et al* no detectaron mutaciones implicadas en la hiperproducción del gen en los aislados portadores de AmpCa¹⁹¹. En nuestro estudio, el análisis génico y de expresión del gen *ampC* en 17 aislados portadores de una AmpCa, indicó una hiperproducción de su gen cromosómico en un 23,5% de estos aislados. Este resultado es superior al descrito en el trabajo de Oteo *et al*, en el cual un 6,6% de los aislados portadores de CMY-2 hiperproducían su AmpCc¹⁷⁶. No obstante, sería necesario analizar todos los aislados con AmpCa para poder realizar una comparación correcta. Todos estos aislados compartían el mismo perfil de mutaciones del primer grupo de aislados hiperproductores, confirmando la conservación de estas mutaciones en aislados hiperproductores.

Al igual que ocurre con los aislados de *E. coli* productores de AmpCa, los hiperproductores de su AmpCc también pueden coproducir una BLEE. Jorgensen *et al* describen en 2010 que tres aislados con mutación en la posición -28 también presentan una betalactamasa de tipo CTX-M¹⁹¹. En el estudio recientemente publicado de Hansen *et al*, se describe que un 32,3% de los productores de BLEE también presentaban mutaciones en el promotor del gen *ampC*, principalmente formando un promotor alternativo desplazado²¹⁸. En nuestro estudio se obtuvo que un 30% de los aislados hiperproductores de su AmpCc presentaban una BLEE, siendo un resultado similar al obtenido por Hansen *et al*, encontrando estas betalactamasas en aislados con cualquiera de los tres perfiles de mutaciones descritos anteriormente.

5.4. Resistencia antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos reveló diferencias significativas en los porcentajes de resistencia a cefotaxima y a ceftazidima entre aislados portadores de AmpCa y aislados con hiperproducción de AmpCc. Este hecho se ha observado en un estudio previo pero no fue considerado relevante²³⁴. Además, el análisis estadístico indicó una tendencia de la población de cepas portadoras de una AmpCa a ser menos sensibles a cefotaxima y/o ceftazidima que las cepas hiperproductoras ($p < 0,001$). Aún así, no se puede considerar un criterio de detección, ya que probablemente habría que analizarlo en un mayor número de aislados, con diferentes AmpCa y en diferentes especies que presenten una AmpCc.

Los aislados productores de betalactamasas AmpC son también con frecuencia resistentes a otros antimicrobianos como cotrimoxazol, quinolonas y aminoglucósidos. A menudo estas corresponsibilidades son debidas a una asociación en el mismo plásmido de los diferentes determinantes de resistencia, lo que complica el tratamiento de la infección²³⁵. Así, por ejemplo, Bartolaia *et al* describieron recientemente plásmidos IncA/C portadores de *bla*_{CMY-2} que cotransfieren resistencia a tetraciclinas y algunos IncI1 a cotrimoxazol¹⁶².

Al comparar los porcentajes de resistencia observados de todos los aislados de *E. coli* no seleccionados en el HSCiSP durante el mismo período²³⁶, se observaron incrementos significativos en varios antimicrobianos. Las diferencias más remarcables fueron para el cotrimoxazol (44% en este estudio vs 35,7% en aislados no seleccionados; $p = 0,001$), ácido nalidíxico (79% vs 52,6%; $p < 0,001$) y ciprofloxacino (57,5% vs 39,3%). El porcentaje de aislados no sensibles a cotrimoxazol en *E. coli* productor de AmpC es muy variable alrededor del mundo; en Paquistán es del 18%¹⁹⁷, en Canadá se incrementa hasta el 34%¹⁹⁰, y en el estudio multicéntrico español realizado por Miró *et al* del 62,7%¹⁵⁶. En estudios de Nepal y Portugal se describen valores de aproximadamente un 80%, pero hay que tener en cuenta que estos datos incluyen aislados de otras enterobacterias^{201,225}. Con respecto a ciprofloxacino, los valores se sitúan, entre un 65 y un 80% en diferentes países^{156,194,201,225}; en cambio, en Canadá se describe un 38,3% y en Paquistán un 18,8%^{190,197}.

En relación a los aminoglucósidos, la tasa más elevada de resistencia correspondió a estreptomina (62%), seguida de kanamicina (25%), tobramicina (22%), gentamicina (17%), netilmicina (6,2%) y amikacina (4,5%). Estas tasas fueron similares a

las observadas en HSCiSP en aislados de *E. coli* en 2006²³⁷. La mayor discrepancia correspondió a estreptomycinina, con 90,2% de resistencia en el total del *E. coli* del estudio anterior²³⁷ y un 62% en este trabajo ($p < 0,001$). Si bien la resistencia a amikacina es baja en ambos estudios, se observó un incremento significativo de la resistencia en el presente estudio (4,5% vs 0,7%) ($p < 0,001$). Cabe destacar valores de resistencia superiores al 80% a estreptomycinina, tobramicina y gentamicina reflejados en el estudio de Freitas *et al* en Portugal²²⁵, así como el 18,8% a amikacina en un estudio de Nepal o el 33,3% de Paquistán de los aislados de *E. coli* productores de AmpC^{197,201}. No se encontraron diferencias significativas entre los aislados portadores de AmpCa y los hiperproductores de AmpCc.

5.5. Relación de grupos filogenéticos en los aislados de *E. coli* productores de AmpC.

E. coli ha divergido formando diferentes grupos filogenéticos, siendo el grupo B2 y en minoría el grupo D, los que abarcan generalmente a los aislados patógenos extraintestinales de *E. coli* (ExPEC). La virulencia de estos aislados de *E. coli* se debe a que presentan un mayor número de factores de virulencia, los cuales pueden ir asociados a determinantes de resistencia en un mismo plásmido, como es el caso del clon epidémico de *E. coli* ST131²³⁸. En este trabajo se analizaron los grupos filogenéticos para conocer la filogenia de los aislados y si se cumple lo descrito anteriormente en relación a la virulencia de *E. coli* productora de AmpC. Clermont *et al* en el año 2000, describieron un método rápido y sencillo basado en una PCR múltiple para detectar los principales grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D)¹³⁹, pero la detección de incongruencias en los resultados y la falta de especificidad hicieron que otros grupos desarrollaran PCRs alternativas^{140,141}. En el año 2013, Clermont *et al* modificaron su técnica anterior para mejorar la especificidad y detectar otros grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F)¹³; por lo que ésta fue la técnica con la cual se obtuvieron los resultados finales de este estudio.

En estudios previos, los grupos filogenéticos considerados virulentos (B2 y D), se han relacionado con *E. coli* portadora de una AmpCa. En Estados Unidos y en Noruega se describió que más de un 90% de los aislados de *E. coli* productores de CMY-2 pertenecían a los grupos filogenéticos B2 y D^{199,217}. Oteo *et al* observó una fuerte

asociación entre la betalactamasa CMY-2 y el grupo filogenético D¹⁷⁶, al igual que se describe en un estudio reciente realizado por Sidjabat *et al*²³⁹. Hansen *et al* describieron recientemente que la mayoría de los aislados estudiados pertenecían al grupo B2²¹⁸. A pesar de que la mayoría de los estudios relacionan las AmpCa con los grupos filogenéticos más virulentos, existen estudios que obtienen resultados diferentes, siendo el grupo filogenético B1 el mayoritario, seguido del grupo D en estudios realizados en Francia y en España^{195,240}. En un estudio reciente en el sur de la India, el 65% de los aislados con una AmpCa pertenecían a los grupos filogenéticos A o B1²²³, lo mismo que ocurría en el estudio de Corvec *et al* en 2010 cuyos aislados portadores de CMY-2 pertenecían al grupo A²⁰³.

En nuestro estudio, se analizaron los grupos filogenéticos según el método de Clermont del año 2000¹³⁹. Posteriormente, se actualizaron los resultados obtenidos con una versión revisada de dicho método, el cual incluye nuevos grupos filogenéticos (C, E y F)¹³. Así, hemos detectado que un 63% de los aislados portadores de una AmpCa pertenecían a los grupos más virulentos (B2, D, E o F), corroborando lo descrito anteriormente en los estudios citados, lo que podría hacer sospechar que los factores de virulencia que presentan se encuentren en el mismo plásmido que la betalactamasa.

En el caso de los aislados hiperproductores, en estudios previos se asociaron a los grupos filogenéticos menos virulentos (A y B1)^{192,218,240,241}. En 2007, Corvec *et al* describieron una fuerte asociación entre AmpCc y el grupo A²⁴¹; en 2010, Bogaerts *et al* observaron que el 92% de los aislados con AmpCc pertenecían al grupo A, seguido del B1¹⁹². En cambio, en un estudio posterior de Corvec *et al* diferenciaban las AmpCc según su perfil de mutaciones en el promotor y su grupo filogenético²⁰³. Al igual que en este último estudio de Corvec *et al*, en nuestro estudio se encontró que existían diferencias según el perfil de mutaciones que presentaban. Un 82% de los aislados hiperproductores que compartían la mutación -42 pertenecían a los filogrupos menos virulentos (A, B1 o C). Todos los aislados hiperproductores con la región espaciadora modificada y un 67% de aquellos con la región atenuadora modificada, pertenecían a los filogrupos más virulentos (B2, D o F). Así, al contrario de lo que se describía en los primeros estudios, los aislados hiperproductores con la mutación -42 se pueden asociar a filogrupos menos virulentos, mientras que los hiperproductores con otras mutaciones se relacionan principalmente con los grupos virulentos.

5.6. Prevalencia de los determinantes PMQR en aislados de *E. coli* productores de AmpC

El principal mecanismo de resistencia a quinolonas involucra la acumulación de mutaciones en los genes que codifican las enzimas DNA girasa y DNA topoisomerasa IV. El descubrimiento del determinante *qnr* en 1998, y la consecuente aparición de otros determinantes PMQR (*aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *OqxAB*) también han contribuido a la emergencia de la resistencia a quinolonas. Estos genes presentan una amplia distribución geográfica aunque no se conoce su prevalencia real debido a las dificultades de su detección fenotípica. La importancia de estos mecanismos es que aunque causan resistencia de bajo nivel, contribuyen a la selección de otros mecanismos de resistencia²⁴².

En este estudio se detectaron mediante PCR determinantes PMQR en el 30% de los aislados con AmpCa, de los cuales un 69% eran portadores del gen *qnrB4* y, a su vez, presentaban el gen *bla_{DHA-1}*. La asociación entre estos dos genes se ha descrito principalmente en *K. pneumoniae*²⁴³⁻²⁴⁹. En 2011 Mata *et al.* detallaron la organización genética del plásmido L/M portador de *bla_{DHA-1}* y *qnrB4* en aislados clínicos de *E. coli*^{59,247}. Los estudios en los que se detectan aislados de *E. coli* portadores de ambos genes son escasos. En un estudio realizado en China en 2010, cuyo objetivo era analizar la prevalencia de los determinantes PMQR en aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEE o AmpC, solamente se detectaron dos aislados que presentaban conjuntamente DHA-1 y *qnrB4*²⁵⁰. Con el mismo objetivo que este último estudio, se realizó otro en Corea en el que solamente se detectó un aislado de *E. coli* que compartía ambos genes²⁴⁸.

El 11% de aislados eran portadores de la acetiltransferasa *aac(6')-Ib-cr*; este resultado difiere de lo descrito en trabajos anteriores, en los cuales este determinante era más prevalente. En 2006, Park *et al* analizaron la presencia de PMQR en aislados clínicos de enterobacterias con sensibilidad reducida a ceftazidima y observaron que, el 24% de los aislados de *E. coli* presentaban *aac(6')-Ib-cr*²⁵¹. En otro estudio realizado en Holanda donde analizaban la presencia de PMQR en aislados con sensibilidad reducida a C2G, C3G y ciprofloxacino, *aac(6')-Ib-cr* fue el determinante de resistencia a quinolonas más prevalente en *E. coli*, la mayoría de estos aislados eran portadores de CTX-M-15²⁵². En otro estudio realizado en España donde se analizaron enterobacterias portadoras de BLEE, el 24,8% de los aislados de *E. coli* presentaban dicho determinante²⁵³.

El porcentaje restante se dividía entre *qnrS1* y *qnrB19*, el primero se encontró en la misma proporción en aislados portadores de *bla*_{CMY-2} y *bla*_{DHA-1}, y el segundo solamente en los que portaban *bla*_{CMY-2}. En muchos estudios *qnrS1* se detecta en aislados de *E. coli* portadores de BLEE^{250,253,254}; en cambio, se ha descrito una alta asociación entre *qnrS1* y *bla*_{CMY-2} en un estudio realizado en Estados Unidos en aislados de animales de compañía¹³⁶. Estudios realizados en diferentes países han descrito la presencia de *qnrB19* en *E. coli*, aunque no se han encontrado datos de asociación entre *qnrB19* y AmpCa²⁵⁵⁻²⁵⁷.

No se detectó ningún aislado portador del gen *qepA*, hecho que coincide con lo descrito en la literatura y con la práctica ausencia de este determinante. Se han encontrado casos aislados portadores del gen *qepA* en Francia, Canadá y Argentina²⁵⁸⁻²⁶⁰. El número de aislados portadores de *qepA* es mayor en estudios realizados en Asia, aunque la prevalencia no llega al 1%^{261,262}. En todos estos estudios *qepA* se encontró en *E. coli* portador de BLEE.

En el caso de los aislados hiperproductores, al contrario de lo que ocurría con los portadores de AmpCa, no se detectó ningún gen *qnrB*. Se detectaron cinco aislados portadores de *aac(6')-Ib-cr* y uno de *qnrS1*. Todos ellos pertenecían al segundo grupo de aislados hiperproductores con una región espaciadora modificada.

5.7. Plásmidos implicados en la diseminación de las betalactamasas de tipo AmpC

Como los plásmidos son el principal vehículo para la difusión de una gran variedad de genes de resistencia, su estudio es crítico para comprender el incremento de la resistencia antimicrobiana a nivel mundial. La técnica usada comúnmente para la caracterización de plásmidos es la PCR basada en el tipaje del replicón (*PBRT-plasmid based replicon typing*) descrita por Carattoli *et al* en 2005⁶⁰.

En estudios realizados en años anteriores, tanto en nuestro centro como en otros, el gen *bla*_{CMY-2} fue descrito de forma mayoritaria en plásmidos IncA/C^{165,226,263}. En un estudio reciente realizado con aislados de alimentos en China se describe una alta asociación entre los plásmidos IncA/C y este gen²⁶⁴. No obstante, los estudios publicados

recientemente indican un cambio de tendencia ya que la asociación entre el gen bla_{CMY-2} y los plásmidos IncI1 se está convirtiendo en mayoritaria, con prevalencias superiores al 50% y, en ciertos casos, cercanas al 100%^{161,162,217,239,265}. En el trabajo de Bartolaia *et al* describen que un 13% de los genes bla_{CMY-2} detectados se encuentran en plásmidos IncA/C, siendo el segundo tipo prevalente tras los IncI1¹⁶². En este estudio se observó que en los plásmidos portadores del gen $bla_{CMY-tipo}$, IncI1 fue el replicón más prevalente (44%), seguido de IncK (33,9%), siendo estos resultados concordantes con lo descrito previamente, en los cuales bla_{CMY-2} también se encuentra principalmente en plásmidos IncI1. Otros estudios como el de Borjesson *et al* describen los genes bla_{CMY-2} en plásmidos IncK¹⁷⁰, mientras que Voets *et al* en su estudio realizado en Holanda observa que un 47% son plásmidos IncI1 y un 42% IncK¹⁷¹.

Con respecto al gen bla_{DHA-1} , se asocia principalmente a plásmidos Inc L/M^{161,165,226,263}. En este estudio, los plásmidos portadores del gen bla_{DHA-1} correspondían a variantes de la familia de IncF (65%).

Estos resultados nos sugieren un cambio de tendencia en los plásmidos que contribuyen a la difusión de las betalactamasas AmpCa. Tanto los plásmidos de la familia IncI1 como los de la familia IncF codifican factores de virulencia por lo que la asociación de éstos con determinantes de resistencia podría facilitar su difusión^{145,146,238}.

El tamaño de los plásmidos se determinó mediante PFGE-S1, mostrando un tamaño entre 95 y 140 pares de bases, valores similares a los descritos por Mata *et al*²²⁶. El tamaño del plásmido IncY portador del gen bla_{CMY-7} no pudo ser determinado por S1-PFGE, pudiendo encontrarse este gen localizado en nuestro aislado en un plásmido muy grande o en el cromosoma. Contrario a esto, en la bibliografía se describe el plásmido portador de este gen con un tamaño de aproximadamente 93kb, pero no se especifica el replicón del mismo¹⁹⁹.

Otra técnica utilizada en los últimos años para la tipificación de plásmidos es la basada en la caracterización de la región MOB que codifica la relaxasa de estos elementos. En el estudio previo de Mata *et al*, la comparación de ambas técnicas indicó una alta correlación entre PBRT y la tipificación de la relaxasa, aunque esta última no permitió tipificar varios plásmidos debido a la ausencia de relaxasa o a que hay pocos plásmidos descritos con más de una relaxasa²²⁶.

La epidemiología molecular de los plásmidos portadores de los genes *bla*_{AmpCa} permite entender el éxito de la diseminación de estos elementos móviles, ya que ésta es proporcional al aumento de la prevalencia de clones bacterianos con genes de resistencia²⁶⁶. Se ha desarrollado la técnica de *plasmid multilocus sequence typing* (pMLST) para plásmidos de los grupos IncI1, IncHI2, IncF e IncN^{145,146,267,268}; en este estudio se analizan solamente los de grupo IncI1 e IncF ante la ausencia de los otros dos grupos. Para el análisis de las secuencias obtenidas mediante pMLST se desarrollaron dos herramientas informáticas; se tratan de dos bases de datos (PlasmidFinder y pMLST Web) que permiten la rápida identificación de los plásmidos en enterobacterias²⁶⁶.

Dentro de los plásmidos IncI1, el que nos encontramos en mayor número fue el IncI1/ST12. Este plásmido ha sido relacionado con plásmidos portadores de *bla*_{CMY-2} en aislados clínicos de *S. enterica* y *E. coli*^{162,164,265}.

En este estudio se describen por primera vez dos cepas portadoras de un plásmido IncI1/ST134; y también se observa uno IncI1/ST26, uno IncI1/ST55 y uno IncI1/ST94. Se ha descrito IncI1/ST26 asociado a *bla*_{CMY-2} en Inglaterra y Estados Unidos, tanto en *Salmonella* spp. como en *E. coli*²⁶⁹ y en Taiwán IncI1/ST55 e IncI1/ST94 en *Salmonella* y en *E. coli*, respectivamente (<http://pubmlst.org/plasmid/>). Con respecto a los replicones IncF, cada uno correspondía a una variante diferente (F-:A-:B10; F1:A1:B-; F2:A-:B1; F2:A1:B1; F2:A6:B1; F18:A3:B37; F24:A-B1; F24:A-:B37; F24:A1:B-; F29:A-:B10). Estos resultados parecen indicar una gran diversidad genética entre los plásmidos portadores de *bla*_{AmpCa}. Bartolaia *et al* describieron 12 STs diferentes en 31 plásmidos portadores de *bla*_{CMY-2} en *E. coli*, lo que parece implicar también un alta diversidad de estos plásmidos. Estos autores describieron este hecho como una posible ventaja adaptativa de los microorganismos para difundir fácilmente estos determinantes de resistencia, como consecuencia de un uso abusivo de antibióticos betalactámicos¹⁶².

6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. La prevalencia global de *E. coli* productor de AmpC durante el período de Junio de 2010 a Noviembre de 2011 en el área estudiada de la provincia de Barcelona fue del 1,1%.
2. Se observó una gran diversidad clonal entre las cepas de *E. coli* productoras de AmpC, exceptuando pequeños *clusters*.
3. La producción de AmpC adquiridas fue el mecanismo más prevalente (75%).
4. La enzima AmpC adquirida detectada con mayor frecuencia fue CMY-2, seguida de DHA-1. Las otras enzimas encontradas fueron CMY-4, CMY-7 y CMY-42.
5. El mecanismo principal de hiperproducción de AmpC cromosómica fue un promotor alternativo desplazado producido por un perfil de mutaciones altamente conservado. La inserción de un nucleótido creando una región espaciadora modificada fue el segundo mecanismo de hiperproducción. El mecanismo minoritario correspondió a mutaciones en la región atenuadora.
6. Los aislados con un promotor alternativo desplazado presentaron el mayor incremento medio de expresión del gen *ampC*, 72,5 veces con respecto al nivel basal. Los aislados con un promotor con la región espaciadora o atenuadora modificada presentaron un incremento medio de 19,9 y 5,8, respectivamente.
7. Se observaron elevados porcentajes de resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacino, cotrimoxazol y estreptomicina de 79%, 57,5%, 44% y 62%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre aislados productores de AmpC adquiridas e hiperproductores de AmpC cromosómica.
8. Un 60% de los aislados con AmpC adquiridas pertenecían a los grupos filogenéticos B2, D, E o F.
9. Se encontró variabilidad en los grupos filogenéticos a los que pertenecían los aislados hiperproductores de su AmpC cromosómica. Un 82% de estos aislados con un promotor alternativo desplazado pertenecían a los grupos A, B1 o C. Todos los

aislados con la región atenuadora modificada y un 67% de los aislados con la región espaciadora modificada pertenecían a los grupos B2, D, E o F.

10. Se detectaron determinantes PMQR en el 30% de los aislados con AmpC adquiridas y en el 11% de los hiperproductores de AmpC cromosómica. El PMQR mayoritario en AmpC adquiridas fue *qnrB4* (69%), siempre asociado a DHA-1, también se detectaron los determinantes *qnrS1* y *qnrB19*. Entre los aislados hiperproductores se detectaron los determinantes *aac(6')-Ib-cr* y *qnrS1*.
11. Los plásmidos portadores de *bla*_{CMY-2} más prevalentes pertenecían al grupo Inc11/Iy, seguido del grupo IncK. Los plásmidos portadores de *bla*_{DHA-1} correspondían principalmente (65%) a variantes de la familia IncF.
12. Se encontró gran variabilidad plasmídica. El plásmido Inc11 se observó de forma mayoritaria asociado a la secuencia tipo Inc11/ST12. También se encontraron Inc11/ST26, Inc11-ST55, Inc11/ST94 e Inc11/ST134, siendo este último descrito por primera vez en este estudio. De los plásmidos pertenecientes a variantes de la familia IncF, cada uno correspondía a una secuencia tipo diferente.

CONCLUSIONS

1. The overall prevalence of AmpC-producing *E.coli* was 1.1% in the area under study from June 2010 to November 2011.
2. Except for small clusters, there was large clonal diversity among the AmpC-producing *E. coli* isolates.
3. The production of acquired AmpC enzymes was the most prevalent mechanism (present in 75% of isolates).
4. CMY-2 was the most predominant acquired AmpC enzyme, followed by DHA-1. Other AmpC enzymes detected were CMY-4, CMY-7 and CMY-42.
5. The main mechanism of chromosomal AmpC overproduction was an alternate displaced promoter caused by a highly preserved mutational pattern. The second mechanism of overproduction was a modified spacer region created by the insertion of a single nucleotide. Mutations in the attenuator region were the less predominant mechanism.
6. The isolates with an alternate displaced promoter had the largest average increment in the *ampC* gene expression (72.5 fold). The isolates with a modified spacer region in the promoter or a modified attenuator had an average increase in expression of 19.9 and 5.8, respectively.
7. The percentage of resistance to nalidixic acid, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and streptomycin was 79%, 57.5%, 44% y 62%, respectively. No significant differences were detected between acquired AmpC isolates and chromosomal AmpC overproducers.
8. Of all acquired AmpC isolates, 60% belonged to the phylogenetic groups B2, D, E and F.
9. Analysis of the phylogenetic groups showed variability within chromosomal AmpC overproducers. Among them, 82% of the isolates bearing a displaced promoter belonged to groups A, B1 and C. All the isolates with modified attenuator regions and 67% of the isolates with modified spacer regions belonged to groups B2, D, E and F.
10. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants (PMQR) were detected in 30% of acquired AmpC isolates and 11% of chromosomal AmpC overproducers. Among acquired AmpC isolates, the most predominant PMQR was *qnrB4* (69%), which was always present in *bla*_{DHA-1} carriers; other determinants detected were *qnrS1* and

qnrB19. Among chromosomal AmpC overproducers, the predominant PMQR was *aac(6')-Ib-cr*.

11. IncI1/Iy was the most prevalent plasmid carrying *bla_{CMY-2}*, followed by IncK. IncF plasmid variants were the predominant plasmids carrying *bla_{DHA-1}* (65%).
12. There was a large genetic variability in plasmids. IncI1 was mainly associated with the sequence type IncI1/ST12. Other sequence types belonging to the same incompatibility group were IncI1/ST26, IncI1/ST55, IncI1/ST94 and IncI1/ST134, the latter being first described in this study. Regarding IncF, each plasmid corresponded to a different sequence type.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brenner DJ, Enterobacteriaceae. En: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1st edition. Williams and Wilkins Co, Baltimore. 1984; 408-516.
2. Janda J, Abbot S. *The enterobacteria*. 2nd edition. ASM Press, Washington DC. USA. 2006.
3. Murray P, Baron E, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology ASM Press, Washington DC. USA. 2011.
4. Prats G. *Microbiología y Parasitología médicas*. Editorial Médica Panamericana, Madrid. 2013.
5. Janda J. Taxonomic update on enteric- and aquatic- associated Gram-negative bacteria: proposed new species and classification changes. *Clin Microbiol Newsletter* 2014; 36:1-5.
6. Kaper JB, Nataro JP, Mobley T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev* 2004; 2:123-40.
7. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. *J Infect Dis* 2000; 181:1753-4.
8. Chaudhuri R, Henderson I. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol* 2012; 12:214-26.
9. Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 2008; 9:1-14.
10. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:207-17.
11. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouquéne C, Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 2004; 21:1085-94.
12. Moissenet D, Salauze B, Clermont O, Bingen E, Arlet G, Denamur E, Mérens A, Mitanchez D, Vu-Thien H. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2459-63.
13. Clermont O, Christenson J, Denamur E, Gordon D. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5:58-65.
14. Selander RK, Caugant D, Whittam TS. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cell Mol Biol* 1987; 2:1625-48.
15. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1990; 172:6175-81.

16. Bush K. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistance *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13:558–64.
17. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27:128–42.
18. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ* 2001;79:780-90.
19. Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA. Further observations on penicillin. 1941. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 42:3-9.
20. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 2010; 118:1–36.
21. Abraham E, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 1988; 10:677-8.
22. Kirby WM. Properties of a penicillin inactivator extracted from penicillin-resistant *Staphylococci*. *J Clin Invest* 1945; 24:170–4.
23. Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2003; 21:42–55.
24. Livermore D. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:283–97.
25. Chain E. The early years of the penicillin discovery. *Trends Pharm Science J* 1979; 1:6–11.
26. Rammelkamp CH, Keefer CS. Its antibacterial effect in whole blood and serum for the hemolytic *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 1943; 22:649–57.
27. Sheehan JC, Henery-Logan KR. A general synthesis of the penicillins. *J Am Chem Soc* 1959; 81:5838–9.
28. Fairbrother RW, Taylor G. Sodium methicillin in routine therapy. *Lancet* 1961; 1:473–6.
29. Acred P, Brown DM, Knudsen ET, Rolinson GN, Sutherland R. New semi-synthetic penicillin against *Pseudomonas pyocyanea*. *Nature* 1967; 215:25–30.
30. Abraham E, Newton GF. The structure of cephalosporin C. *Biochem J* 1961; 79:377–93.
31. Price K, McGregor D. Basic design of beta-lactam antibiotics-cephalosporins. *Scand J Infect Dis* 1984; 42:50–63.
32. Stapley E, Jackson M, Hernandez S, Zimmerman SB, Currie SA, Mochales S, Mata JM, Woodruff HB, Hendlin D. Cephamycins, a new family of beta-lactam antibiotics

- I. Production by Actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp.n. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 2:122–31.
33. Sykes R, Bonner D. Discovery and development of the monobactams. *Rev Infect Dis* 1985; 7(Suppl 4):579–93.
 34. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 11:852–7.
 35. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Miller AK, Hendlin D, Mochales S, Hernandez S, Woodruff HB, Birnbaum J. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1979; 32:1–12.
 36. Martínez-Martínez L, Calvo J. El problema creciente de la resistencia a antibióticos en bacilos gramnegativos. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2010; 28(Supl 2):25–31.
 37. Kollef MH. New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Resusc* 2009; 11:282–6.
 38. Bush K. Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12:527–34.
 39. van Heijenoort J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75:636–63.
 40. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2009; 27:116–29.
 41. García-Sánchez J, García-Merino E, Martín-del-Rey A. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? *Rev Esp Quimioter* 2012; 25:100–21.
 42. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003; 36(Suppl 1):S11–23.
 43. Alekshum MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007; 128:1037–50.
 44. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg (London)* 1966; 64:129–143.
 45. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:711–21.
 46. Averhoff B, Friedrich A. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch Microbiol* 2003; 180:385–93.
 47. Zinder N, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* 1952; 64: 679–99.
 48. Lederberg J, Tatum E. Sex in bacteria; genetics studies, 1945-1952. *Science* 1953; 118:169–75.

49. Bergstrom C, Lipsitch M, Levin BR. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics* 2000; 155:1505–19.
50. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, de la Cruz Fd F. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* 2002; 45:1–8.
51. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz, F. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74:434–52.
52. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts Ap, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Fron in Microbiol* 2011; 2:203.
53. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153(Suppl 1):S347–57.
54. Frost LS, Koraimann G. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol* 2010; 5:1057–71.
55. Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:552–63.
56. Chambers SP, Prior SE, Barstow DA, Minton NP. The pMTL nic- cloning vectors I. Improved pUC polylinker regions to facilitate that use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene* 1988; 68:139–49.
57. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:722–32.
58. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz, F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:657–87.
59. Mata C, Garcillán-Barcia M, de la Cruz F, Coll P, Navarro F. In vivo transmission of a plasmid coharbouring *bla_{DHA-1}* and *qnrB* genes between *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 308:24–8.
60. 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.
61. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; available on-line. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090.
62. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557–84.
63. Urbach C, Fastrez J, Soumillon P. A new family of cyanobacterial Penicillin-binding proteins. A missing link in the evolution of class A beta-lactamases. *J Biol Chem* 2008; 283:32516–26.
64. Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969-79.

65. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2010; 28:638–45.
66. Tracz DM, Boyd DA, Bryden L, Hizon R, Giercke S, Van Caesele P, Mulvey MR. Increase in *ampC* promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. *J Antimicrobial Chemother* 2005; 55:768–72.
67. Jaurin B, Grundström T, Normark S. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO J* 1982; 1:875–81.
68. Mammeri H, Poirel L, Nordmann P. Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC betalactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:490-4.
69. Bennett P, Chopra I. Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:153–8.
70. Tarnberg M, Nilsson LE, Monstein HJ. Molecular identification of *bla_{SHV}*, *bla_{LEN}* and *bla_{OKP}* beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* by bi-directional sequencing of universal SP6- and T7-sequence-tagged *bla_{SHV}*-PCR amplicons. *Mol Cell Probes* 2009; 23:195–200.
71. Haeggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2400–8.
72. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(Suppl 1):87–102.
73. Normark S, Grundström T, Bergström S. Susceptibility to penicillins and cephalosporins in beta-lactamase producing strains of *E. coli* and relative amount of beta-lactamase produced by these strains. *Scand J Infect Dis Suppl* 1980; suppl 25:23–9.
74. dePedro MA, Quintela JC, Hölte JV, Schwarz H. Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997; 179:2823–34.
75. Park JT, Uehara T. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72:211–27.
76. Johnson J, Fisher J, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1277:54–75.
77. Jaurin B, Grundström T, Edlund T, Normark S. The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate dependent regulation. *Nature* 1981; 290:221–5.
78. Grundström T, Jaurin B. Overlap between *ampC* and *frd* operons on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1982; 79: 1111–5.
79. Jones H, Gunsalus R. Transcription of the *Escherichia coli* fumarate reductase genes (*frdABCD*) and their coordinate regulation by oxygen, nitrate, and fumarate. *J Bacteriol* 1985; 164:1100–9.

80. Yu W, Bing L, Zhenhua L. AmpC promoter and attenuator mutations affect function of three *Escherichia coli* strains. *Curr Microbiol* 2009; 59:244–7.
81. Novick RP. Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 1963; 33:121–36.
82. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 1968; 208:239–41.
83. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1–11.
84. Poirel L, Kampf P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:4038–40.
85. Bobrowski MM, Matthew M, Barth PT, Datta N, Grinter NJ, Jacob AE, Kontomichalou P, Dale JW, Smith JT. Plasmid-determined beta-lactamase indistinguishable from the chromosomal beta-lactamase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1976; 125:149–57.
86. Levesque R, Roy PH, Letarte R, Pechère JC. A plasmid-mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. *J Infect Dis* 1982; 145:753–61.
87. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17:316–21.
88. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2200–9.
89. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Antimicrob Chemother* 2002; 40:2153–62.
90. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Can J Microbiol* 2002; 48:479–93.
91. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Villa L, Lebessi E, Vatopoulos AC, Carattoli A, Tzelepi E. CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3172–4.
92. Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, Inoue M. CFE-1, a novel plasmid encoded AmpC beta-lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1151–8.
93. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:221–4.

94. Ahmed AM, Shimamoto T. Emergence of a cefepime- and ceftazidime-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate harbouring a novel chromosomally encoded AmpC beta-lactamase, CMY-37. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:256–61.
95. Doi Y, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, O'Keefe A, Endimiani A, Bonomo RA. Reduced susceptibility to cefepime among *Escherichia coli* clinical isolates producing novel variants of CMY-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3159–61.
96. Barnaud G, Labia R, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Philippon A, Arlet G. Extension of resistance to cefepime and ceftazidime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 195:185–90.
97. Mammeri H, Poirel L, Bemer P, Drugeon H, Nordmann P. Resistance to cefepime and ceftazidime due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC beta-lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:716–20.
98. Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Horizontal transfer of *bla*_{CMY} bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:534–41.
99. Gaillot O, Clément C, Simonet M, Philippon A. Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:85–7.
100. Fortineau N, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:207-10.
101. Wu LT, Hung SW, Chuang YC, Chen HE, Jones RN, Yu WL. Identification of a novel cephalosporinase (DHA-3) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:893–7.
102. Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange P, Philippon A. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar enteritidis, carrying the *bla*_{DHA-1} gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:222–5.
103. Girlich D, Naas T, Bellais S, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1470–8.
104. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC betalactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1924–31.
105. Pagaiianitsis C, Tzouvelekis L, Tzelepi E, Miriagou V. Plasmid-encoded ACC-4, an extended-spectrum cephalosporinase variant from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3763–7.

106. González Leiza M, Pérez-Díaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martínez-Beltrán J, Bush K, Baquero F. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2150–7.
107. Bauernfein A, Stemplinger I, Jungwirth R, Chong Y. Comparative characterization of the cephamycinase *bla*_{CMY-1} gene and its relationship with other betalactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1926–30.
108. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N. Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum betalactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:984–90.
109. Walsh TR, Hall L, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible beta-lactamases from *Aeromonas sobria*, strain 163a, one a class D penicillinase, the other an AmpC cephalosporinase. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:41–52.
110. Avison MB, Niumsup P, Walsh T, Bennett P. *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH beta-lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking *creB*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:695–02.
111. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 44:563–9.
112. Rottman M, Benzerara Y, Hanau-Berçot B, Bizet C, Philippon A, Arlet G. Chromosomal *ampC* genes in *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae*, and ancestral association of the ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 210: 87–92.
113. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2009; 2:40–61.
114. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:463–9.
115. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014; 53:1565–74.
116. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jiménez de Anta M. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:491–3.
117. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Suppl 2):S120–6.
118. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351:797–9.
119. Strahilevitz J, Jacoby G, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664–89.

120. Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40:196–203.
121. Kim HB, Wanq M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3582-4.
122. Yamame K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3354–60.
123. CDC/NHSN Surveillance definition of Healthcare-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting 2014; http://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/17pscnosindef_current.pdf
124. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarguhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. Health care associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002; 137:791–7.
125. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20. 2010. Wayne, PA, USA: CLSI.
126. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:370–2.
127. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29:524–34.
128. Sabaté M, Vergés C, Miró E, Mirelis B, Navarro F, del Río E, Prats G. Incidence of extended spectrum beta-lactamase in *Escherichia coli* in a university hospital from 1994-1996. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17:401–4.
129. Nüesch-Inderbilen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:398–402.
130. Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, Miró E, Verges C, Barbé J, Prats G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1970–3.
131. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:509–13.
132. Navarro F, Pérez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. CMY-2 producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus*

- mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:383–9.
133. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3121–6.
 134. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Marraillac J, Reynaud A. -11 Mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to beta-lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3262–7.
 135. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12:83–8.
 136. Shaheen BW, Nayak R, Foley SL, Boothe DM. Chromosomal and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance mechanisms among broad-spectrum-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1019–24.
 137. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:2002–7.
 138. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233–9.
 139. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4555–8.
 140. Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3108–10.
 141. Gordon D, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 2008; 10:2484–96.
 142. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 1988; 52:375–95.
 143. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:274–81.
 144. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995; 226:235–40.
 145. García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, Carattoli A. Multilocus sequence typing of IncI plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:1229–33.

146. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2518–29.
147. Pitout JD. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect* 2008; 6:657–69.
148. Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. Multiresistant gram-negative infections: a global perspective. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23:546–53.
149. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35:736–55.
150. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; 303:298–04.
151. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2008; 85:11–9.
152. Seral C, Gude M, Castillo F. Emergencia de beta-lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter* 2012; 25:89–99.
153. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1791–6.
154. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161–82.
155. Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:472–6.
156. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, González-López JJ, Lara N, Martínez-Martínez L, Oliver A, Aracil B, Oteo J, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Zamorano L, Navarro F. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:253–9.
157. Yilmaz N, Agus N, Bozcal E, Oner O, Uzel A. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J Microbiol* 2013; 31:53–9.
158. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* 2010; 145:273–8.
159. Hordijk J, Wagenaar JA, van de Giessen A, Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, Mevius D. Increasing prevalence and diversity of ESBL/AmpC-type beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from veal claves from 1997 to 2010. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1970–3.

160. Schwaiger K, Bauer J, Hölzel CS. Selection and persistence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* including extended-spectrum beta-lactamase producers in different poultry flocks on one chicken farm. *Microb Drug Resist* 2013; 19:498–506.
161. Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A, Lorenzetti S, Lorenzetti R, Battisti A, Franco A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. *PLoS One* 2014; 9(3):e90564.
162. Bartolaia V, Hansen KH, Nielsen CA, Fritsche TR, Guardabassi L. High diversity of plasmids harbouring *bla*_{CMY-2} among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwest USA. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1492–6.
163. Rodríguez I, Barownick W, Helmuth R, Mendoza MC, Rodicio MR, Schroeter A, Guerra B. Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:301–9.
164. Doublet B, Praud K, Nguyen-Ho-Bao T, Argudín MA, Bertrand S, Butaye P, Cloeckaert A. Extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B from broilers and human patients in Belgium, 2008–10. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1257–64.
165. Mataseje LF, Neumann N, Crago B, Baudry P, Zhanel GG, Louie M, Mulvey MR, ARO Water Study Group. Characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3126–30.
166. Su HC, Ying GG, He LY, Liu YS, Zhang RQ, Tao R. Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and *ampC* gene in two typical municipal wastewater treatment plants. *Environ Sci Process Impacts* 2014; 16:324–32.
167. Radhouani H, Silva N, Poeta P, Torres C, Correia S, Igrejas G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Front Microbiol* 2014; 5:23.
168. Starlander G, Yin H, Edquist P, Melhus A. Survival in the environment is a possible key factor for the expansion of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *APMIS* 2014; 122:59–67.
169. Alves MS, Pereira A, Araújo SM, Castro BB, Correia AC, Henriques I. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Front Microbiol* 2014; 5:426.
170. Börjesson S, Jernberg C, Brolund A, Edquist P, Finn M, Landén A, Olsson-Liljequist B, Teqmark Wisell K, Benqtsson B, Englund S. Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:E309–11.
171. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Schapendonk C, van den Munckhof T, Leverstein-van Hall MA, Stuart JC. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes

- and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 2013; 167:359–62.
172. Ohnishi M, Okatani AT, Esaki H, Harada K, Sawada T, Murakami M, Marumo K, Kato Y, Sato R, Shimura K, Hatanaka N, Takahashi T. Herd prevalence of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M-type and CMY-2 beta-lactamases among Japanese dairy farms. *J Appl Microbiol* 2013; 115:282–9.
 173. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, Torren-Edo J, Torres C, Threlfall J. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors and control options. *Clin Infect Dis* 2013; 56:1030–7.
 174. Huijbers PM, Graat EA, Haenen AP, van Santen MG, van Essen-Zandbergen, Mevius DJ, van Duijkeren E, van Hoek AH. Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:2669–75.
 175. Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, Prats G. Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:989–97.
 176. Oteo J, Cercenado E, Cuevas O, Bautista V, Delgado-Iribarren A, Orden B, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Campos J. AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2 producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393 and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67:270–6.
 177. Ortega A, Oteo J, Aranzamendi-Zaldumbide M, Bartolomé RM, Bou G, Cercenado E, Conejo MC, González-López JJ, Marín M, Martínez-Martínez L, Merino M, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Rivera A, Rodríguez-Baño J, Weber I, Aracil B, Campos J. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:3576–81.
 178. Jaurin B, Normark S. In vivo regulation of chromosomal beta-lactamase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1979; 138:896–902.
 179. Mulvey MR, Bryce E, Boyd DA, Ofner-Agostini M, Land AM, Simor AE, Paton S. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:358–65.
 180. Tracz DM, Boyd DA, Hizon R, Bryce E, McGeer A, Ofner-Agostini M, Simor AE, Paton S, Mulvey MR. Canadian nosocomial infection surveillance program *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 270:265–71.
 181. Haldorsen B, Aasnaes B, Dahl KH, Hanssen AM, Simonsen GS, Walsh TR, Sundsfjord A, Lundblad EW. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like *ampC* element or

- hyperproduction of the endogenous AmpC. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:694–702.
182. Olsson O, Bergström S, Normark S. Identification of a novel *ampC* beta-lactamase promoter in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *EMBO J* 1982; 1:1411–6.
 183. Rivera A, Larrosa N, Mirelis B, Navarro F. Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos beta-lactámicos en enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:30–36.
 184. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 1.0 (2013-12-11), http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/.
 185. Maraskolhe DL, Deotale VS, Mendiratta DK, Naranq P. Comparison of three laboratory tests for detection of AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* species and *E. coli*. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:DC05–8.
 186. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Klebsiella* spp. *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4163–7.
 187. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3110–3.
 188. Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeonq SH, Park MJ, Lee KM. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal *ampC* gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55:219–24.
 189. Park MJ, Kim TK, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee J. An increase in the clinical isolation of acquired AmpC beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Korea from 2007 to 2010. *Ann Lab Med* 2013; 33:353–5.
 190. Denisuk AJ, Lagacé-Wiens PR, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Taylor F, Karlowky JA, Hoban DJ, Adam HJ, Zhanel GG; Canadian Antimicrobial resistance Alliance. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-, AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(Suppl 1):i57–i65.
 191. Jorgensen RL, Nielsen JB, Friis-Moller A, Fjedsoe-Nielsen H, Schonning K. Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* expressing an AmpC phenotype. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:460–4.
 192. Bogaerts P, Rodríguez-Villalobos H, Bauraing C, Deplano A, Laurent C, Berhin C, Struelens MJ, Glupczynski Y. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered at two Belgian hospitals. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58:78–83.
 193. Shayan S, Bokaeian M, Shahraki S. Prevalence and molecular characterization of AmpC-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from Southeastern Iran. *Microb Drug Resist* 2014; 20:104-7.

194. Gude M, Seral C, Sáenz Y, Cebollada R, González-Domínguez M, Torres C, Castillo FJ. Molecular epidemiology, resistance profiles and clinical features in clinical plasmid-mediated AmpC-producing *Enterobacteriaceae*. *Int J Medical Microbiol* 2013; 303:553–7.
195. Galán-Sánchez F, Aznar-Marín P, Marín-Casanova P, Rodríguez-Iglesias M. Diversity of *bla* genes and low incidence of CTX-M in plasmid-mediated AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates. *APMIS* 2014; 122:796–9.
196. Matsumura Y, Yamamoto M, Matsushima A, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Cefotaxime for the detection of extended-spectrum beta-lactamase or plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and clinical characteristics of cefotaxime-non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:1931–9.
197. Shafiq M, Rahman H, Qasim M, Ayub N, Hussain S, Khan J, Naeem M. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at tertiary care hospital of Islamabad, Pakistan. *Eur J Microbiol Immunol* 2013; 3:267–71.
198. Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, Prats G. Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:989–97.
199. Sidjabat HE, Paterson DL, Qureshi ZA, Adams-Haduch JM, O'Keefe A, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Doi Y. Clinical features and molecular epidemiology of CMY-Type beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2009; 48:739–44.
200. Rodríguez-Baño J, Miró E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, Bou G, Conejo MC, Pomar V, Aracil B, Larrosa N, Agüero J, Oliver A, Fernández A, Oteo J, Pascual A, Navarro F. Colonisation and infection due to *Enterobacteriaceae* producing plasmid-mediated AmpC β -lactamases. *J Infect* 2012; 64:176–83.
201. Baral P, Neupane S, Shrestha B, Ghimire KR, Marasini BP, Lekhak B. Clinical and microbiological observational study on AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a hospital of Nepal. *Braz J Infect Dis* 2013; 17:256–9.
202. Baudry PJ, Mataseje L, Zhanel GG, Hoban DJ, Mulvey MR. Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC beta-lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65:379–83.
203. Corvec S, Crémet L, Leprince C, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Caroff N. Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic beta-lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67:277–81.
204. Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:443–8.
205. Baudry PJ, Nichol K, DeCorby M, Mataseje L, Mulvey MR, Hoban DJ, Zhanel GG. Comparison of antimicrobial resistance profiles among extended-spectrum-beta-lactamase-producing and acquired AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia*

- coli* isolates from Canadian intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1846–9.
206. Kiiru J, Kariuki S, Goddeeris BM, Butaye P. Analysis of beta-lactamase phenotypes and carriage of selected beta-lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *BMC Microbiology* 2012; 12:155.
 207. Cejas D, Fernández Canigia L, Quinteros M, Giovanakis M, Vay C, Lascialandare S, Mutti D, Pagniez G, Almuzara M, Gutkind G, Radice M. Plasmid-encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Rev. Argent Microbiol* 2012; 44:182–8.
 208. Verdet C, Arlet G, Redjeb S, Ben Hassen A, Lagrange PH, Philippon A. Characterization of CMY-4, an AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase in a Tunisian clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169:235–40.
 209. Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:1011–4.
 210. Hentschke M, Kotsakis SD, Wolters M, Heisig P, Miragou V, Aepfelbacher M. CMY-42, a novel plasmid-mediated CMY-2 variant AmpC beta-lactamase. *Microb Drug Resist* 2011; 17:165–9.
 211. Stapleton P, Shannon KP, French GL. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1206–10.
 212. Koh TH, Sng L, Wang G, Hsu LY, Lin RT, Tee NW. Emerging problems with plasmid-mediated DHA and CMY AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Singapore. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:278–80.
 213. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Wang A, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:915–21.
 214. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. *Biomed Res Int* 2014; 17:1548.
 215. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-Lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:533–7.
 216. Alder H, Fenner L, Walter P, Hohler D, Schultheiss E, Oezcan S, Frei R. Plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2007; 61:457–8.

217. Naseer U, Haldorsen B, Simonsen G, Sundsfjord A. Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:171–8.
218. Hansen F, Olsen S, Heltberg O, Justesen US, Fuglsang-Damgaard D, Knudsen JD, Hammerum AM. Characterization of third-generation cephalosporins resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *Microb Drug Resist* 2014; 20:316–24.
219. Pérez-Llarena FJ, Kerff F, Zamorano L, Fernández MC, Nuñez ML, Miró E, Oliver A, Navarro F, Bou G. Characterization of new AmpC betalactamase FOX-8 reveals a single mutation, Phe313Leu, located in the R2 loop that affects ceftazidime hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5158–61.
220. Coskun S, Altanlar N. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in clinical isolates of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:375–85.
221. Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, Li G, Jiang Y. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC beta-lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1317–21.
222. Shahid M, Sobia F, Singh A, Khan HM. Concurrent occurrence of *bla*_{ampC} families and *bla*_{CTX-M} genogroups and association with mobile genetic elements ISEcp1, IS26, ISCR1, and sul1-type class 1 integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates originating from India. *J Clin Microbiol* 2012; 50:1779–82.
223. Chakraborty A, Adhikari P, Shenoy S, Saralaya V. Characterization of plasmid mediated AmpC producing *Escherichia coli* clinical isolates from a tertiary care hospital in South India. *Indian J Pathol Microbiol* 2014; 57:255–8.
224. Mansouri S, Neyestanaki D, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended spectrum beta-lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(2)e8756.
225. Freitas F, Machado E, Ribeiro T, Novais A, Peixe L. Long-term dissemination of acquired AmpC beta-lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 551–8.
226. Mata C, Miró E, Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, Toleman M, Walsh TR, de la Cruz F, Navarro F. Plasmid typing and genetic context of AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes: findings from a Spanish hospital 1999-2007. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:115–22.
227. Jaurin B, Grundström T, Normark S. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO* 1982; 1:875–81.
228. Fernández-Cuenca F, Pascual A, Martínez-Martínez L. Hyperproduction of AmpC beta-lactamase in a clinical isolate of *Escherichia coli* associated with a 30 bp deletion in the attenuator region of *ampC*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:251–2.

229. Caroff N, Espaze E, Bérard I, Richet H, Reynaud A. Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 173:459–65.
230. Mammeri H, Poirel L, Fortineau N, Nordmann P. Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2573–6.
231. Siu LK, Lu PL, Lin FM, Chang SC. High-level expression of AmpC beta-lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2138–44.
232. Nelson EC, Elisha BG. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:957–9.
233. Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:783–8.
234. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Böttger EC, Zbinden R, Bloemberg GV. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J Clin Microbiol* 2011; 49:2924–32.
235. Pallett A, Hand K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(Suppl 3):iii25–33.
236. *Resumen de sensibilidad de las bacterias a diferentes antimicrobianos, HSCiSP. 2011*; <http://www.santpau.es/santpau/activitats/inicioMicrobiologia.htm>.
237. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in *Enterobacteriaceae* clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist* 2013; 19:94–9.
238. Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 2012; 3:18–28.
239. Sidjabat H, Seah K, Coleman L, Sartor A, Derrington P, Heney C, Faoagali J, Nimmo GR, Paterson DL. Expansive spread of Inc11 plasmids carrying *bla*_{CMY-2} amongst *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44:203–8.
240. Mammeri H, Eb F, Berkani A, Nordmann P. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:498–03.
241. Corvec S, Prodhomme A, Giraudeau C, Dauvergne S, Reynaud A, Caroff N. Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC beta-lactamase belong to phylogenetic group A. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:872–6.

242. Rodríguez-Martínez JM, Cano M, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 2011; 17:149–82.
243. Verdet C, Benzerara Y, Gautier V, Adam O, Ould-Hocine Z, Arlet G. Emergence of DHA-1 producing *Klebsiella* spp in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:607–17.
244. Hu FP, Xu XG, Zhu DM, Wang MG. Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29:320–4.
245. Corvec S, Crémet L, Caroff N, Dauvergne S, Le Flosch R, Reynaud A, Lepelletier D, Bémer P. *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate coproducing SHV-2a, DHA-1, QnrB4, and AAC(6′)-Ib-cr determinants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64:462–3.
246. Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:3967-9.
247. Mata C, Miró E, Toleman M, Rivera MA, Walsh TR, Navarro F. Association of *bla*_{DHA-1} and *qnrB* genes carried by broad-host-range plasmids among isolates of *Enterobacteriaceae* at a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1514–7.
248. Jeong HS, Bae IK, Shin JH, Jung HJ, Kim SH, Lee JY, Oh SH, Kim HR, Chang CL, Kho WG, Lee JN. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. *Korean J Lab Med* 2011; 31:257–64.
249. Pérez-Moreno MO, Estepa V, Sáenz Y, Cortell-Ortolá M, Fort-Gallifa I, Ruiz J, Torres C. Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{DHA-1} and *qnrB4* genes within a novel complex class 1 integron. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:210–1.
250. Han C, Yang Y, Wang M, Wang A, Lu Q, Xu X, Wang C, Liu L, Deng Q, Shen X. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among clinical isolates of ESBL or AmpC-producing *Escherichia coli* from Chinese pediatric patients. *Microbiol Immunol* 2010; 54:123–8.
251. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac*(6′)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3953–5.
252. Paltansing S, Kraakman M, Ras J, Wessels E, Bernards AT. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an *Escherichia coli* ST131 clone with a specific mutation in *parE*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:40–5.
253. Briales A, Rodríguez-Martínez J, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac*(6′)-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:431–4.

254. Kanamori H, Navarro R, Yano H, Sombrero LT, Capeding MR, Lupisan SP, Olveda RM, Arai K, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Philippines. *Acta Trop* 2011; 120:140–5.
255. Richter S, Frasson I, Bergo C, Manganelli R, Cavallaro A, Palù G. Characterization of *qnr* plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae* from Italy: association of the *qnrB19* allele with the integron element ISCR1 in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:578–83.
256. Ríos E, Rodríguez-Avial I, Rodríguez-Avial C, Hernández E, Picazo JJ. High percentage of resistance to ciprofloxacin and *qnrB19* gene identified in urinary isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Madrid, Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67:380–3.
257. Paiva MC, Nascimento AM, Camargo IL, Lima-Bittencourt CI, Nardi RM. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:687–9.
258. Baudry PJ, Nichol K, DeCorby M, Lagacé-Wiens P, Oliver E, Bod D, Mulvey MR, Hoban DJ, Zhanel GG. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63:319–26.
259. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3801–4.
260. Rincón G, Radice M, Giovanakis M, Di Conza JA, Gutkind G. First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79:70–2.
261. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1564–6.
262. Kim E, Jeonq J, Choi S. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65:335–8.
263. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2227–38.
264. Guo YF, Zhang W, Ren SQ, Yang L, Lü DH, Zeng ZL, Liu YH, Jiang HX. Inc A/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PLoS One* 2014; 9:e96738.
265. Ben Sallem R, Ben Slama K, Rojo-Bezares B, Porres-Osante N, Jouini A, Klibi N, Boudabous A, Sáenz Y. Inc11 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} or *bla*_{CMY-2} genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2014; 20:495-500.
266. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using

- PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:3895-03.
267. García-Fernández A, Carattoli A. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1155–61.
268. García-Fernández A, Villa L, Moodley A. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1987–91.
269. Folster J, Pecic G, McCullough A, Rickert R, Whichard JM. Characterization of *bla*_{CMY}-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathog Dis* 2007; 8:1289–94.